**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

PRISCILLA APARECIDA TARTARI PEREIRA

**EFEITOS ANTAGÔNICOS DA PROSTAGLANDINA D₂
E PROSTAGLANDINA E₂ NA RESPOSTA IMUNE
DURANTE INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Histoplasma capsulatum***

Ribeirão Preto – SP

2013

PRISCILLA APARECIDA TARTARI PEREIRA

**EFEITOS ANTAGÔNICOS DA PROSTAGLANDINA D₂
E PROSTAGLANDINA E₂ NA RESPOSTA IMUNE
DURANTE INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Histoplasma capsulatum***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor em Ciências, pelo curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – Área de concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Faccioli

Ribeirão Preto – SP

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa desde que citada à fonte.

Catálogo de Publicação

Preparada pela Biblioteca do serviço de Biblioteca
e Documentação da Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo

Pereira, Priscilla Aparecida Tártari

Efeitos antagônicos da prostaglandina D₂ e prostaglandina E₂ na resposta imune durante infecção experimental por *Histoplasma capsulatum*. Priscilla Aparecida Tártari Pereira; orientadora Lúcia Helena Faccioli. Ribeirão Preto, 2013.

245p. : Il.

Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Departamento de Bioquímica e Imunologia. Área de
concentração: Imunologia Básica e Aplicada

1. Prostaglandina D₂. 2. Prostaglandina E₂. 3. *Histoplasma capsulatum*.
4. Macrófago alveolar. 5. Polímero PLGA

Pereira, PAT. **Efeitos antagônicos da prostaglandina D₂ e prostaglandina E₂ na resposta imune durante infecção experimental por *Histoplasma capsulatum*.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP), do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP) e no Laboratório de Vacinas Genéticas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, onde se encontra a Cabine de Segurança Biológica de Nível 3. Essa tese recebeu o apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2009/05106-6;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP – USP (FAEPA);
- Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP;
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

***Esta tese é dedicada ao divino Criador pela sua ajuda, direção e provisão.
Assim diz a Palavra de Deus: “... porque sem mim nada podereis fazer” (João 15:5).***

“Nunca se cansam de inspirar e socorrer. Jamais abandonam os seus pupilos ou desistem da ação de beneficência ao lado deles.

Sempre se utilizam das menores ensanchas para incutir as idéias felizes e o bem operante.

Vigilantes, são o apoio no desfalecimento, a coragem no receio e a força no momento do desânimo.

Não estimula insensatez, nem emulam à vaidade ou ao orgulho venenoso. Discretos, passam às vezes, despercebidos, porém, estão sempre presentes.

Generosos, não descuram a disciplina ou a energia. Gentis, invectivam contra o erro, administrando com carinho, todavia, com decisão. Caridosos, perseveram até a exaustão que não atingem, porque se renovam no amor de Deus, que nunca lhes falta.”

*Joanna de Angelis
(Momento de Coragem – Divaldo Franco)*

Amada mãe, obrigada por tudo!

Já te agradei pelo dom da vida, já te escrevi outras cartas de amor... Porém, acredito que este registro amoroso aqui, neste momento de realização acadêmica, expõe o que me ensinou: “Querer é poder”. Compartilhei contigo todos os meus sonhos e acredito que os frutos que vingaram – e que ainda estão por vir – serão nutridos pelo teu amor!

Querida Vó, bondosa, ingênua e amável, obrigada por toda oração nos momentos difíceis da minha caminhada e pelos agradecimentos nas conquistas! Sua frase: - A Priscillinha estuda desde os três aninhos, ainda não tá cansada minha filha?

Agradeço a professora Dra Lúcia Helena Faccioli pela orientação conferida ao longo do trabalho, da oportunidade do convívio, da aprendizagem, por acreditar em meu potencial e me dar a chance de desenvolver este projeto. Serei eternamente grata. Muito Obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, FMRP-USP, pela disponibilização da sala de biossegurança nível 3 e de seu laboratório para a produção das micropartículas. E todos os membros de seu laboratório, Ana Paula, Izaíra, Rodrigo, Rogério, Wendy pela disposição e colaboração.

À Profa. Dra. Cláudia Maffei, pela cepa de Histoplasma capsulatum cedida para a execução deste trabalho.

Dra. Simone Gusmão Ramos, pela colaboração no projeto, disponibilidade em compartilhar sua experiência em patologia, recepção amável em seu laboratório e exemplo de profissionalismo.

À técnica Elaine Medeiros Floriano, pela inclusão dos órgãos e confecção das lâminas de histologia e também por sempre me receberem prontamente com carinho e atenção. Também a Cristianetefé da Silva por sua ajuda nas análises histológicas.

Ao Dr Carlos Artério Sorgi, que sempre esteve disponível para discussão de alguns resultados.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, José Orestes Del Ciampo e Henrique Diniz, pela disponibilização do laboratório para

liofilização e análise de alguns parâmetros envolvidos na caracterização das micropartículas, e pela disposição técnica.

Ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes e sua aluna Tania Petta, pelas análises de Espectrometria de Massas.

Às técnicas do laboratório Alyne Fávero Galvão e Caroline Fontanari, por estarem sempre disponíveis para me ajudar. Agradeço demais à vocês.

Fabiana Rosseto de Moraes, sempre muito atenciosa me ajudou com as análises dos resultados de citometria de fluxo.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela manutenção dos animais e auxílio técnico.

Aos amigos do Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses (LIIP) e do Laboratório de Imunologia e Epigenética (LIME), pela agradável convivência, amizade e pelo auxílio, direta ou indiretamente, nos experimentos e na vida: Adriana, Aline, Ana Carolina, Bruno, Cláudia, Camila, Cecília, Conny, Denise, Elyara, Fabiana, Francisco, Gabriel Pietro, Gabriel, Gisele, Guilherme, Márcio, Maira, Milena, Morgana, Karina, Leonardo, Leticia, Luana, Patrícia, Rafael, Rodrigo, Thais e Prof Dra Fabiani Frantz.

Em especial, agradeço à Cláudia e Daiane, pelas sugestões, discussões e colaboração nos experimentos executados neste trabalho, e além disso, pela amizade e carinho. Eternamente...

A todos os meus colegas da Pós-graduação, pela amizade e agradável convivência. Pelos momentos no curso do “João”, nas festas, no Journal Club, nos Churras, nas SBIs, no Marcão, na Quinta das meninas, enfim, em todos os momentos que podemos passar minutinhos todos juntos. Obrigada!!!

À Ana Cristine, secretária do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pela paciência, atenção e por toda ajuda prestada. Bem como, ao Coordenador, Prof. Dr. João Santana da Silva, e aos demais professores do Programa pela dedicação e incentivo aos pós-graduandos ao longo destes anos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da obtenção de microesferas pelos métodos de simples ou dupla emulsão seguida pela evaporação/extração do solvente.....	40
Figura 2. Célula de difusão vertical (célula de Franz) adaptada para os ensaios de liberação <i>in vitro</i>	41
Figura 3. Multiplicidade de infecção.....	54
Figura 4. A opsonização de leveduras com IgG potencializa sua fagocitose por macrófagos alveolares	54
Figura 5. Produção das prostaglandinas por macrófagos alveolares de rato.....	55
Figura 6. Inibição das prostaglandinas endógenas aumenta a fagocitose de leveduras de <i>H.capsulatum</i> opsonizadas com IgG	56
Figura 7. Efeito da PGE ₂ , PGD ₂ e 15dPGJ ₂ exógenas sobre a fagocitose de leveduras de <i>H. capsulatum</i> opsonizadas com IgG	58
Figura 8. O aumento da fagocitose induzida por PGD ₂ é mediada pelo receptor DP2.....	59
Figura 9. A PGE ₂ sinaliza via receptor EP2 e EP4 inibindo a fagocitose de leveduras por macrófagos	60
Figura 10. A 15dPGJ ₂ aumenta a fagocitose por mecanismo dependente dos receptores DP1 e DP2	61
Figura 11. Participação de PPAR-γ na fagocitose de <i>H.capsulatum</i> opsonizado (IgG) por macrófagos alveolares	62
Figura 12. Efeito da PGE ₂ , PGD ₂ e 15dPGJ ₂ exógenas sobre a atividade fungicida dos macrófagos incubados com <i>H. capsulatum</i>	64
Figura 13. Produção de óxido nítrico, H ₂ O ₂ , IL-10 e TNF-α por macrófagos alveolares após pré-tratamento com prostanóides	66
Figura 14. Produção de LTB ₄ por macrófagos alveolares de rato pré-tratados com PGD ₂	67
Figura 15. Expressão da molécula BLT1 na membrana de macrófagos alveolares de rato pré-tratados com prostaglandinas	68
Figura 16. Concentração resposta do efeito do antagonista de BLT1 na fagocitose.....	69

Figura 17. Papel dos receptores BLT1 e DP2 na fagocitose de <i>H.capsulatum</i> opsonizado (IgG)	70
Figura 18. Distribuição de tamanho da MS-controle	72
Figura 19. Distribuição de tamanho da MS-PGD ₂	72
Figura 20. Distribuição de potencial zeta de MS-controle	73
Figura 21. Distribuição de potencial zeta da MS-PGD ₂	73
Figura 22. Foto da Microscopia eletrônica de varredura	74
Figura 23. Concentração de PGD ₂ liberada <i>in vitro</i> das MS de PLGA 50:50 após diferentes períodos de incubação	75
Figura 24. Viabilidade dos macrófagos alveolares incubados com MS.....	76
Figura 25. Porcentagem de fagocitose dos macrófagos alveolares incubados com as diferentes micropartículas	78
Figura 26. O índice fagocítico dos macrófagos alveolares incubados com as diferentes micropartículas	79
Figura 27. Nitrito (NO ²⁻) no sobrenadante da cultura de macrófagos alveolares estimulados com MS	81
Figura 28. Imagens confocais de macrófagos alveolares incubados com somente meio, MS-PGD ₂ ou PGD ₂ solúvel	83
Figura 29. Ativação de NFκB/ atividade SEAP.....	84
Figura 30. Produção do TNF-α, IL-1β e TGF-β por macrófagos alveolares após incubação com MS-controle, MS-PGD ₂ ou PGD ₂ solúvel	86
Figura 31. Produção de NO, TNF-α, IL-1β e IL-6 por macrófagos alveolares pré-estimulados com LPS e posteriormente tratados com MS-PGD ₂ ou PGD ₂ solúvel.....	88
Figura 32. Inibição de PGD ₂ diminui sobrevivência de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>H. capsulatum</i>	90
Figura 33. Efeito da inibição da PGD ₂ na produção de quimiocina e citocinas no parênquima pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>H. capsulatum</i>	92
Figura 34. Produção de NO ₂ ⁻ nos pulmões de animais infectados aumentou com o tratamento com HQL-79	94
Figura 35. Produção de PGD ₂ e PGE ₂ nos pulmões de animais infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com HQL-79	96

Figura 36. Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados e tratados ou não com HQL-79	98
Figura 37. Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados e tratados ou não com HQL-79 corados com GMS	99
Figura 38. Carga fúngica dos pulmões e baço de camundongos infectados tratados ou não com prostaglandinas encapsuladas ou solúveis	101
Figura 39. Número de células inflamatórias no espaço broncoalveolar de camundongos infectados e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD ₂ , MS-PGE ₂ , PGD ₂ ou PGE ₂ solúveis	103
Figura 40. Concentração de NO ₂ ⁻ nos pulmões de camundongos infectados e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD ₂ , MS-PGE ₂ , PGD ₂ ou PGE ₂ solúveis.....	104
Figura 41. Marcação de imuno-histoquímica para a enzima iNOs nos pulmões de animais infectados com <i>H.capsulatum</i> e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD ₂ , MS-PGE ₂ , PGD ₂ ou PGE ₂ solúveis	106
Figura 42. Tratamento com MS influencia na produção de quimiocina e citocinas no parênquima pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de <i>H. capsulatum</i>	108
Figura 43. Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com <i>H.capsulatum</i> e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD ₂ , MS-PGE ₂ , PGD ₂ ou PGE ₂ solúveis	111
Figura 44. Fotomicrografia de cortes do pulmão de camundongos infectados com <i>H.capsulatum</i> e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD ₂ , MS-PGE ₂ , PGD ₂ ou PGE ₂ solúveis corados com GMS	112
Figura 45. Concentração dos mediadores lipídicos nos pulmões de animais infectados e tratados com celecoxibe, MS-PGD ₂ ou MS-PGE ₂	114
Figura 46. Carga fúngica nos pulmões de animais infectados e tratados ou não com MS	116
Figura 47. A reposição da PGD ₂ aumenta a sobrevivência de camundongos infectados com inóculo letal de <i>H. capsulatum</i> e tratados com o composto HQL-79.....	118

Figura 48. A reposição da PGE₂ aumenta a mortalidade de camundongos infectados com inóculo letal de *H.capsulatum* e tratados com inibidor da sintase de PGE₂..... 120

Lista de Abreviaturas

5-LO: enzima 5 lipoxigenase

5-HETE: 5-hidroperoxieicosatetraenóico

15dPGJ₂: 15-Deoxy-delta12,14-Prostaglandina J₂

AA: ácido araquidônico

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

BLT1: receptor de leucotrieno B₄ 1

COX-1: cicloxigenase 1

COX-2: cicloxigenase 2

CRTH2: chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 lymphocytes

DP1: receptor de prostanóide D1

DP2: receptor de prostanóide D2

ELISA: ensaio imunoenzimático

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GMS: prata de Grocott

HE: Hematoxilina-eosina

HIV: Human immunodeficiency vírus

H-PGDs:

IgG: Imunoglobulina G

iNOS:

i.p.: intraperitoneal

i.n.: intranasal

i.t.: intratraqueal

IFN- γ : interferon gamma

IL: interleucinas

LBA: lavado broncoalveolar

LPS: lipopolissacarídeos

LTB₄: leucotrieno B₄

LTC₄: leucotrieno C₄

LTD₄: leucotrieno D₄

LT: leucotrieno

MIF: média de intensidade de fluorescência

MS: micropartículas

MS-PGD₂: micropartículas contendo PGD₂

MS-PGE₂: micropartículas contendo PGE₂

NK: “natural killer”

NO: óxido nítrico

NO⁻²: nitrito

o: via oral

PBS: salina tamponada com fosfato

PGE₂: prostaglandina E₂

PGD₂: prostaglandina D₂

PGI₂: prostaglandina I₂ ou prostaciclina

PGF_{2α}: prostaglandina F₂ alfa

PLGA: “poly-lactic-co-glycolic acid”

PPAR-γ: peroxisome proliferator-activated receptor γ

PPAR-α: peroxisome proliferator-activated receptor α

PG: prostaglandina

PGDs: prostaglandina D sintase

PGEs: prostaglandina E sintase

ROI: reativos intermediários de oxigênio

SEAP: fosfatase alcalina secretada

SMF: Sistema Mononuclear Fagocítico

SBF: soro bovino fetal

Th1: padrão T “helper” 1

Th2: padrão T “helper” 2

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

TGF-β1: fator de crescimento tumoral β1

UFC: Unidades formadoras de colônia

ÍNDICE

Resumo	20
Abstract.....	22
 1. INTRODUÇÃO.....	 24
1.1 Histoplasmose	24
1.2 Mediadores proteicos e lipídicos nas infecções fúngicas	25
1.3 Atividades biológicas da PGE ₂ e PGD ₂	27
1.4 Características gerais dos macrófagos pulmonares	30
1.5 Mecanismos moleculares envolvidos na fagocitose e atividade microbicida.....	31
1.6 Micropartículas Biodegradáveis.....	32
 2. JUSTIFICATIVA.....	 34
 3. OBJETIVOS	 35
 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 36
4.1 Preparo das soluções das prostaglandinas para as micropartículas	36
4.2 Animais	36
4.3 Obtenção do soro imune anti <i>H.capsulatum</i> (SI)	36
4.4 Obtenção de macrófagos alveolares de ratos	36
4.5 Opsonização e marcação de leveduras de <i>H.capsulatum</i> com FITC	37
4.6 Ensaio de Fagocitose do <i>H.capsulatum</i>	37
4.7 Avaliação da atividade fungicida.....	38
4.8 Micropartículas Biodegradáveis (MS)	39
4.9 Caracterização das micropartículas biodegradáveis	40
4.9.1 Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia.....	40
4.9.2 Eficiência de encapsulação	41
4.9.3 Estudos de liberação in vitro	41
4.10 Ensaio de citotoxicidade in vitro pela redução do brometo de tiazolil – (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio – Sal de tetrazólio MTT)	42
4.11 Ensaio de Fagocitose das MS	43
4.12 Ativação do NF-κB	43
4.13 Detecção de prostaglandinas, leucotrieno B ₄ por ELISA	43
4.14 Obtenção e cultivo de leveduras do <i>H.capsulatum</i> em meio sólido	44

4.15 Infecção pulmonar com <i>H. capsulatum</i> através da inoculação intratraqueal por procedimento cirúrgico e tratamento com celecoxibe.....	44
4.16 Grupos Experimentais	45
4.17 Administração intranasal das micropartículas em camundongos infectados com <i>H. capsulatum</i>	49
4.18 Determinação da carga fúngica em pulmões e baços após infecção com <i>H. capsulatum</i>	49
4.19 Obtenção, contagem total e diferencial das células do lavado bronco-alveolar (LBA).	49
4.20 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	50
4.21 Histopatologia do pulmão de animais infectados ou não, tratados com MS contendo PGD ₂ ou PGE ₂	50
4.22 Análise da Expressão de BLT1.....	51
4.23 Detecção de nitrito (NO ₂ ⁻).....	51
4.24 Avaliação da ativação de fator de transcrição NF-kB em macrófagos alveolares estimulados com as MS.....	51
4.25 Técnica de imuno-histoquímica para iNOS.....	52
4.26 Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Efeito das PGD ₂ , PGE ₂ e 15dPGJ ₂ nos mecanismos efetores de macrófagos alveolares.....	53
5.1.1 Ensaio de Fagocitose para escolha da melhor proporção entre o número de leveduras e de macrófagos.....	53
5.1.2 Macrófagos alveolares são produtores de prostanoides.....	55
5.1.3 Curva concentração resposta do efeito dos inibidores das ciclooxygenases no ensaio de fagocitose	56
5.1.4 Curva concentração resposta do efeito da PGD ₂ , PGE ₂ e 15dPGJ ₂ no ensaio de fagocitose	57
5.1.5 PGD ₂ aumenta a fagocitose via receptor DP2, mas inibe via receptor DP1.....	59
5.1.6 PGE ₂ aparentemente inibe a fagocitose de leveduras opsonizadas tanto via receptor EP2 como EP4.....	60
5.1.7 A 15dPGJ ₂ induz aumento da fagocitose por mecanismo mediado pelos receptores DP1 e DP2.	61
5.1.8 PPAR-γ pode influenciar a fagocitose de IgG-opsonizado- <i>H.capsulatum</i>	62
5.1.9 Avaliação da atividade Fungicida de macrófagos alveolares incubados com diferentes prostanoides.....	63
5.1.10 Prostaglandinas podem influenciar no “killing” de <i>H.capsulatum</i> através da produção de nitrito, H ₂ O ₂ , IL-10 e TNF-α por macrófagos alveolares.	65

5.1.11 Produção de LTB ₄ por macrófagos alveolares após incubação com <i>H. capsulatum</i> e pré-tratamento ou não com PGD ₂ .	67
5.1.12 O tratamento com PGD ₂ aumenta a expressão do receptor BLT1 em macrófagos alveolares.	68
5.1.13 PGD ₂ aumenta a fagocitose via BLT1 e DP2, e LTB ₄ aumenta a fagocitose também via DP2 e BLT1.	69
5.2 Caracterização das micropartículas biodegradáveis.	71
5.2.1 Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia.	71
5.2.2 Eficiência de encapsulação e estudo de liberação in vitro.	75
5.2.3 Atividades biológicas das micropartículas, in vitro.	76
5.2.3.1 Viabilidade dos macrófagos incubados com as MS de PLGA.	76
5.2.3.2 Fagocitose das MS-PGD ₂ ou MS-PGE ₂ por macrófagos alveolares.	77
5.2.3.3 MS induzem discreta, mas significativa produção de nitrito por macrófagos alveolares em cultura.	80
5.2.3.4 MS ativam o fator de transcrição NF-κB em macrófagos alveolares.	82
5.2.3.5 Ativação de NFκB em células Raw blue TM incubadas com MS.	84
5.2.3.6 Concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares incubados com as MS.	85
5.2.3.7 Tratamento com MS-PGD ₂ modifica a liberação de nitrito, IL-1β e IL-6 por macrófagos alveolares pré-incubados com LPS.	87
5.3 Avaliação do papel da PGD ₂ in vivo em comparação com PGE ₂ durante a resposta imune celular na infecção por <i>H. capsulatum</i> em camundongos.	89
5.3.1 Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 infectados com inóculo subletal <i>H. capsulatum</i> , tratados ou não com inibidor da PGD sintase, composto HQL-79.	89
5.3.2 Efeito da inibição da síntese de PGD ₂ na produção de quimiocina e citocinas por células do pulmão durante a infecção por <i>H. capsulatum</i> .	91
5.3.3 Concentração de nitrito (NO ₂ ⁻) no sobrenadante de homogeneizado de pulmão de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com HQL-79.	94
5.3.4 Concentração das prostaglandinas no homogeneizado dos pulmões de camundongos infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados com o composto HQL-79.	95
5.3.5 Histopatologia do parênquima pulmonar dos animais infectados e tratados ou não com HQL-79.	97
5.3.6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas dos pulmões e baços de animais infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados com a administração intranasal de MS contendo PGD ₂ ou PGE ₂ .	100
5.3.7 Efeito da PGD ₂ e PGE ₂ encapsuladas ou não no recrutamento de células inflamatórias para os pulmões de animais infectados.	102

5.3.8 Concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de homogeneizado de pulmão de camundongos infectados e tratados com a administração intranasal de MS contendo PGD_2 ou PGE_2	104
5.3.9 Marcação da enzima iNOS nos pulmões de camundongos infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados com diferentes MS	105
5.3.10 Efeito do tratamento com MS contendo prostaglandinas na produção de citocinas e quimiocina por células do pulmão de animais infectados com inóculo subletal de <i>H. capsulatum</i>	107
5.3.11 Histopatologia do parênquima pulmonar dos animais infectados e tratados com MS.....	109
5.3.12 Concentração de PGD_2 , PGE_2 e LTB_4 em homogeneizado de pulmões de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com celecoxibe, MS- PGD_2 ou MS- PGE_2	113
5.3.13 Os efeitos benéficos do tratamento com MS- PGD_2 se mantem após o término do tratamento.....	115
5.3.14 Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 infectados com inóculo letal de <i>H. capsulatum</i> , tratados ou não com inibidor da PGD sintase, HQL-79, e submetidos à reposição da PGD_2 em MS	117
5.3.15 Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 infectados com inóculo letal <i>H. capsulatum</i> , tratados ou não com inibidor da PGE sintase, o composto CAY 10526, e submetidos à reposição da PGE_2 em MS.	119
6. DISCUSSÃO.....	122
7. CONCLUSÃO.....	140
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
8. ANEXOS.....	166

RESUMO

Pereira, P.A.T. **Efeitos antagônicos da prostaglandina D₂ e prostaglandina E₂ na resposta imune durante infecção experimental por *Histoplasma capsulatum*.** 2013. 245f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico, patogênico e responsável por graves lesões pulmonares. A infecção é adquirida pela inalação de conídios e posterior conversão para leveduras nos alvéolos e bronquíolos, onde são fagocitadas por macrófagos alveolares residentes e leucócitos que migram para o local da infecção. Recentemente, demonstramos que animais infectados com *H. capsulatum* e tratados com inibidor da síntese de prostaglandinas apresentaram diminuição de carga fúngica nos pulmões e baço, aumento da produção de nitrito e da fagocitose de leveduras por macrófagos alveolares, e maior sobrevivência, quando comparados com os animais somente infectados. Porém, neste estudo não foram determinados quais subtipos de prostaglandinas participam na patogênese da histoplasmose. Vários grupos de pesquisa têm demonstrado que PGD₂ e PGE₂ podem ter ações biológicas distintas quanto à remoção de microrganismos no hospedeiro. Desta maneira, é fundamental o entendimento do papel da PGD₂ e da PGE₂ nos mecanismos efetores dos macrófagos na defesa do hospedeiro, especialmente na histoplasmose. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a participação da PGD₂ e PGE₂ na infecção experimental por *H. capsulatum*. Assim, demonstramos que a PGD₂ aumentou a fagocitose e mecanismos microbicidas de macrófagos alveolares infectados *in vitro* com *H. capsulatum*. Observamos ainda que a 15dPGJ₂, metabólito da PGD₂, aumentou somente a fagocitose, e PGE₂ inibiu os mecanismos efetores do macrófago. Mostramos ainda o aumento de BLT1 em macrófagos alveolares após adição de PGD₂, e a possível ligação desta ao BLT1, e de LTB₄ em DP2. Além disso, caracterizamos micropartículas de PLGA contendo PGD₂ (MS-PGD₂), e investigamos seus efeitos. O tamanho, carga elétrica e morfologia das micropartículas foram adequados para um tratamento intranasal e para fagocitose por macrófagos alveolares. As MS-PGD₂ foram fagocitadas e capazes de ativar NF-κB, e consequentemente, influenciar na produção de nitrito, IL-1β, TNF-α, IL-6 e TGF-β. Com base nestes dados, avaliamos os efeitos do

tratamento da MS-PGD₂ ou da MS-PGE₂ em animais infectados com *H. capsulatum*. Estas foram administradas via intranasal em animais infectados e tratados ou não com celecoxibe. Verificamos a diminuição da carga fúngica nos pulmões e baço, diminuição do infiltrador celular no espaço broncoalveolar e de citocinas inflamatórias no pulmão após tratamento com MS-PGD₂. Contrariamente, após tratamento da MS-PGE₂ observamos maior carga fúngica nos pulmões e baço, e aumento da inflamação no tecido e maior produção de IL-10. Além disso, demonstramos que no 21º dia após infecção, referente ao 7º dia após o término do tratamento com MS-PGD₂, a carga fúngica manteve-se reduzida nos pulmões, comprovando assim a eficácia deste tratamento. Posteriormente, utilizando inibidores específicos, HQL-79 e CAY10526, mostramos respectivamente o papel protetor da PGD₂ e o deletério da PGE₂ na histoplasbose. Em conjunto, nossos dados contribuíram para o entendimento das funções antagônicas da PGD₂ e PGE₂ nesta micose.

Palavras-chave: Prostaglandina D₂, Prostaglandina E₂, *Histoplasma capsulatum*, macrófago alveolar, PLGA.

ABSTRACT

Pereira, P. A. T. **Opposite effects of prostaglandin D₂ and prostaglandin E₂ in immune response during experimental infection by *Histoplasma capsulatum*.** 2013. 200f. Thesis (Doctor Degree). Faculty of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Histoplasma capsulatum is a pathogenic dimorphic fungus and responsible for severe pulmonary lesions. Infection is acquired by inhalation of conidia and posterior conversion to yeasts in the alveoli and bronchioles, in which they are phagocytosed by resident alveolar macrophages and leukocytes that migrate to the local infection. Recently, we demonstrate that mice infected by *H. capsulatum* and treated with inhibitor of prostaglandins synthesis presented a decrease in fungal burden in lungs and spleen, increase in nitrite production and uptake of yeasts by alveolar macrophages, and more survival, when compared with animals only infected. However, in this study, it was not determined what subtypes of prostaglandins participate in pathogenesis of histoplasmosis. Many research groups have demonstrated that PGD₂ and PGE₂ can have different biological effects regarding to microorganisms elimination in the host. Thus, it is primordial the understanding about the role of PGD₂ and PGE₂ on effector mechanisms of macrophages in host defense, especially in histoplasmosis. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of PGD₂ and PGE₂ on experimental infection by *H. capsulatum*. So, we verify that PGD₂ increased the uptake and microbicidal mechanisms of alveolar macrophages infected *in vitro* by *H. capsulatum*. 15dPGJ₂, a PGD₂ metabolite, increased only the phagocytosis, and PGE₂ inhibited the effector mechanisms of macrophages. Among these results, we showed an increase of BLT1 expression on alveolar macrophages after addition of PGD₂, and a possible binding of this mediator to BLT1, and of LTB₄ to DP2. Later, as tool of therapeutic investigation, we used PGD₂ encapsulation in biodegradable polymer, PLGA, in order to preserve its stability. Size, zeta potential and morphology were adequate for a possible intranasal treatment and uptake by alveolar macrophages. MS-PGD₂ were phagocytosed and able to activate NF-κB, and consequently, to modulate nitrite, IL-1β, TNF-α, IL-6 and TGF-β production. In this context, we purpose a treatment of the infection with MS-

PGD₂, in comparison to treatment with PGE₂. MS-PGD₂ were administrated via intranasal in infected mice, treated or not with celecoxib. We verify a decrease of fungal burden in lungs and spleen, less cellular infiltrate and decrease of some inflammatory cytokines. In contrast, after treatment of MS-PGE₂, we observed greater fungal burden in the lungs and spleen, and an increase of the tissue inflammation and production of IL-10. Furthermore, we show that on day 21 after infection, referring to the 7th day after the treatment with MS-PGD₂, fungal burden remained reduced in the lungs, thus proving the effectiveness of the treatment. Subsequently, using specific inhibitors, HQL-79 and CAY10526, respectively show the protective role of PGD₂ and in deleterious to PGE₂ in histoplasmosis. Together, our data contribute to the understanding of the antagonistic functions of PGD₂ and PGE₂ in this mycosis.

.

Key words: Prostaglandin D₂, Prostaglandin E₂, *Histoplasma capsulatum*, alveolar macrophage, PLGA.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Histoplasmose

A histoplasmose é uma doença que apresenta ampla distribuição pelo mundo e tem alta incidência na América Central e América do Norte (CANO & HAJJEH, 2001), como também em partes da África e da Ásia (LO et al., 2010). No Brasil, esta micose é endêmica em todas as regiões, uma vez que inquéritos epidemiológicos demonstraram sua incidência nas regiões sudeste, centro-oeste, norte e sul (FERREIRA, 2002; UNIS et al., 2004; FERREIRA & BOGES, 2009). Seu agente etiológico é o *Histoplasma capsulatum*, um fungo dimórfico patogênico, parasita intracelular, não encapsulado. Os conídios do *H. capsulatum* podem ser encontrados em solos ou outros locais que contenham excretas contaminadas de pássaros e morcegos, motivo pelo qual a histoplasmose também conhecida como “doença das cavernas” (MEDOFF et al., 1987; FERREIRA & BORGES, 2009). Por isso, ocupações e atividades recreativas envolvendo solo, poeira acumulada, grutas e até mesmo construções antigas são importantes fatores de risco para aquisição da doença fúngica, uma vez que proporcionam a exposição a um grande inóculo do fungo (GOMPERTZ et al., 2004; KAUFFMAN, 2007; WOODS, 2002).

O dimorfismo celular do fungo caracteriza-se pela forma saprofítica com micélios à temperatura ambiente de 25°C, e levedura à temperatura corporal de 37°C nos mamíferos (PINE, 1954; LOPEZ, 2006), sendo a forma de levedura responsável pela patogenia na histoplasmose (GOODWIN et al., 1978; GOODWIN et al., 1980). A infecção é contraída pela inalação de conídios e posterior conversão para leveduras nos os alvéolos e bronquíolos, onde são fagocitadas por macrófagos alveolares residentes e depois por leucócitos que migram para o local da infecção (NEWMAN et al., 1990; MEDEIROS et al., 2004). Um dos mecanismos pelo qual *H. capsulatum* sobrevive dentro da célula fagocítica está relacionado à modulação do microambiente dentro do fagossomo para pH alcalino (NEWMAN et al., 1992; WOODS et al., 2002).

As manifestações clínicas nos pacientes com histoplasmose podem variar de quadros leves, semelhantes à gripe, até formas graves disseminadas, que dependendo das condições imunológicas do hospedeiro e da carga fúngica inalada,

podem levar o indivíduo a morte (HAGE et al., 2008; FERREIRA & BOGES, 2009). As formas clínicas conhecidas são a infecção assintomática, histoplasmose pulmonar aguda, histoplasmose pulmonar crônica e histoplasmose disseminada (SEVERO et al., 2001). Acredita-se que em indivíduos infectados a formação de granulomas compactos ou frouxos no pulmão determina a contenção do fungo ao local da infecção ou disseminação para o baço, fígado, sistema nervoso central e glândulas adrenais (GOODWIN et al., 1980; WHEAT, 1988). Estudos clínicos sugerem que indivíduos que desenvolveram a forma disseminada da doença não apresentavam reação inflamatória eficiente, como também não formavam granulomas compactos (PILLAY et al., 1997). Dados da literatura registram muitos estudos acerca da histoplasmose disseminada em indivíduos portadores de HIV (KHAMBATY & HSU, 2010; RIBEIRO et al., 2009). Com o desenvolvimento da imunidade celular, a resolução da infecção pulmonar é espontânea, ocorrendo em 99% dos casos (HAGE et al., 2008).

1.2) Mediadores proteicos e lipídicos nas infecções fúngicas

Os mecanismos pelo qual o hospedeiro é capaz de controlar e erradicar a infecção por *H. capsulatum* está relacionado com a indução da resposta imune celular do padrão T “helper” 1 (Th1) que é mediada por macrófagos, células dendríticas, linfócitos T, e citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α (DEEP Jr, 2000); produção de leucotrienos (MEDEIROS et al., 1999; MEDEIROS et al., 2004; MEDEIROS et al., 2008), e formação de granuloma (HENINGER, 2006). Os patógenos, uma vez delimitados pelas células inflamatórias, podem morrer ou permanecer em estado de latência, conservando a capacidade de se replicarem e disseminarem, caso ocorra à desorganização do granuloma compacto (GOODWIN et al., 1980; LIMAYE et al., 2000). Nestes contextos, foi demonstrado o importante papel da IL-12 liberada por macrófagos e células dendríticas, do IFN- γ , secretado por células NK e linfócitos T “helper” 1 (Th1); do TNF- α liberado por macrófagos, e dos produtos da iNOS (DEEPE, 2000; MOSMANN & SAD, 1996; SMITH et al., 1990; LANE et al., 1993; ZHOU et al., 1995; ZHOU et al., 1997; ALLENDOERFER et al., 1998). Outras citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e KC (homóloga a IL-8

humana) também têm sido descritas na participação na histoplasmose (WATSON et al., 1985; DEEPE & MCGUINNESS 2006; MEDEIROS et al., 2004; PEREIRA et al., 2013).

Mediadores lipídicos gerados a partir do metabolismo do ácido aracdônico (AA) são coletivamente denominados eicosanóides, e podem ser divididos em classes segundo a via de síntese bioquímica, incluindo: metabólitos da 5-lipoxigenase (5-LO) (leucotrienos - LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄); da 15-lipoxigenase (lipoxinas); das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) (prostaglandinas - PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, e tromboxanos); da P450 (ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico - HETES); e metabólitos não enzimáticos (VANE et al., 1971; LARSEN & HENSON, 1983; MILLER et al., 1990; HARRIS et al., 2002).

Nosso grupo de pesquisa vem investigando nos últimos anos, o papel dos mediadores lipídicos na infecção por *H. capsulatum*. Medeiros e colaboradores (1999) demonstraram que leucotrienos estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para a cavidade peritoneal de animais infectados com leveduras de *H. capsulatum*. Posteriormente, em camundongos infectados via intratraqueal com *H. capsulatum*, e tratados com inibidor da síntese de leucotrienos, o composto MK886, Medeiros e colaboradores (2004), mostraram o papel essencial dos leucotrienos nos mecanismos de defesa dos animais infectados. Mais recentemente, mostraram que estes lipídios possuem importante papel como imunomodulador das respostas imunes primárias e secundárias na histoplasmose, e são fundamentais para o recrutamento de linfócitos efetores para os pulmões (MEDEIROS et al., 2008). Em estudo posterior, demonstramos que macrófagos alveolares de animais deficientes da enzima 5-LO, apresentam diminuição da fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com soro imune (IgG), salientando a importância do LTB₄ na ativação dos macrófagos nesta micose (SECATTO et al., 2012). Recentemente, nosso grupo demonstrou que as prostaglandinas podem estar envolvidas na patogênese da histoplasmose (PEREIRA et al., 2013). O tratamento com inibidor seletivo para COX-2, o celecoxibe, resultou no aumento da sobrevivência dos animais infectados com inóculo letal de *H. capsulatum*, aumento da produção de óxido nítrico (NO) e diminuição de unidades formadoras de colônia (UFC) nos pulmões e baço (PEREIRA et al., 2013). Além disso, demonstramos que inibição da síntese de

prostaglandinas aumentou a fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por macrófagos alveolares (PEREIRA et al., 2013). Por outro lado, observamos redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e no recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o espaço bronco alveolar (PEREIRA et al., 2013). Nestas e em outras infecções, as prostaglandinas em geral têm papel deletério para o hospedeiro (MICHELIN et al., 2003; WOOLARD et al., 2007; TATAKIHARA et al., 2008).

1.3) Atividades biológicas da PGE₂ e PGD₂

A expressão de COX-2 pode ser induzida por citocinas como IL-1, IL-2 e TNF- α , enquanto que as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 inibem a expressão desta enzima (revisto por VANE et al., 1998). Baseado na expressão diferencial tem sido sugerido que a COX-1 é responsável pela produção basal de prostanóides envolvidos em processos fisiológicos (como citoproteção gástrica), enquanto a COX-2 é responsável pelo aumento de prostanóides durante a inflamação e injúria tecidual (FELDMAN & McMAHON, 2000).

As ações biológicas da PGE₂ resultam da ligação em um dos quatro receptores prostanóides E acoplados a proteína G presentes na membrana celular de várias células (EP1-EP4) (BREYER et al., 2001; MEDEIROS et al., 2012). Sabe-se que a fagocitose é inibida pela ligação da PGE₂ ao EP2 pela produção da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) via ativação da adenilato ciclase (ARONOFF et al., 2004). Vários trabalhos demonstraram ainda que PGE₂ pode modular a produção de diferentes citocinas. Snijdwint e colaboradores (1993) demonstraram que a PGE₂ inibe, de modo dose-dependente, a produção de IFN- γ por leucócitos do sangue periférico e linfócitos T CD4⁺, aumenta a liberação de IL-5 por estas células, mas não altera a de IL-4. Ainda, este mediador lipídico inibe a produção de IL-1 e TNF- α por macrófagos (KUNKEL et al., 1986), a de IL-2 por linfócitos (SNIJDEWINT et al., 1993), a de IL-12 por células apresentadoras de antígenos estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS) (VAN DER POUW KRAAN et al., 1995), e aumenta a produção de IL-10 (VAN DER POUW KRAAN et al., 1995). Além disso, suprime a atividade microbicida das células NK (GOTO et al., 1983); e a diferenciação das células Th0 para o padrão Th1, e pode inibir a expressão do receptor IL-12 (IL-12R) (KATAMURA et al., 1995; WU et al., 1998). Outros trabalhos nossos e de outros

grupos, demonstram a participação da PGE_2 nas infecções. O tratamento com inibidor da COX-1/2 favoreceu o parasitismo por *Strongyloides venezuelensis*, mostrando o papel das prostaglandinas nesta parasitose (MACHADO et al., 2010). Medeiros e colaboradores (2009) mostraram que a PGE_2 liberada após fagocitose de células apoptóticas inibe os mecanismos de defesa em pulmão favorecendo a infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Em pacientes com endometrite, as complicações que ocorrem devido à infecção por *Clostridium sordellii* são devidas a PGE_2 liberada localmente, a qual inibe a resposta imune no útero (ARRONOF et al., 2008).

Por outro lado, estudos têm demonstrado que a PGD_2 e seu metabólito a $15dPGJ_2$, apresentam atividades anti-inflamatórias e imunoregulatórias (GILROY et al., 1999). Os efeitos deste mediador se iniciam após a ligação da PGD_2 aos seus dois receptores, o receptor de prostanóide D1 (DP1) e o “chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 lymphocytes” (CRTH2 ou DP2) (HIRAI et al., 2001). Quando a PGD_2 liga-se ao DP1, um receptor transmembrana acoplado a subunidade $G\alpha_s$ da proteína G, aumenta a concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), gerando um sinal inibitório para a produção de IL-12 por células dendríticas, de $IFN-\gamma$ por células T, e a supressão das funções de células NK (FAVEEUW et al., 2003; TANAKA et al., 2004; CHEN et al., 2007). O DP2 também é acoplado à subunidade $G\alpha_i$ da proteína G e induz decréscimo na concentração do AMPC (SAWYER et al., 2002), produção de citocinas do padrão Th2 que participam do recrutamento de eosinófilos, basófilos e linfócitos Th2 (HIRAI et al., 2001; XUE et al., 2005). O DP2 também está presente em células dendríticas (GOSSET et al., 2003), e participa da migração destas células (ANGELI et al., 2001) e de monócitos (ARIMA et al., 2008) em resposta a PGD_2 . A PGD_2 ao se ligar a este receptor induz mobilização de Ca^{2+} intracelular, que exerce importante papel regulatório nos processos de ativação e recrutamento celular (HIRAI et al., 2001).

Outros estudos demonstram papéis controversos da PGD_2 na inflamação, como ação pró-inflamatória na inflamação pulmonar e na asma (MATSUOKA et al., 2000; FUJITANI et al., 2002; SPIK et al., 2005), e com ação anti-inflamatória no processo inflamatório no pulmão induzido por bleomicina ou carregenina (IANARO et al., 2001; ANDO et al., 2003). Joo e colaboradores (2007) demonstraram pela primeira vez a participação da PGD_2 na infecção por *Pseudomonas aureginosa*. Em

animais infectados, o tratamento intratraqueal com PGD₂ aumentou a remoção da bactéria nos pulmões. Em contraste, camundongos deficientes da enzima L-PGDs perderam sua capacidade em remover a *P. aureginosa* do pulmão. Sugerindo, um possível uso terapêutico da L-PGDs ou PGD₂ contra a pneumonia por *P. aureginosa* (JOO et al., 2007). Sabe-se ainda que a PGD₂ pode induzir liberação de IL-4 e IL-5, diminuição de IFN- γ , e participar na fase tardia das reações alérgicas (HIRAI et al., 2001; FUJITANI et al., 2002).

Os mecanismos moleculares envolvidos na atividade anti-inflamatória das PGEs, PGI₂ e PGD₂ tem sido investigados por diferentes grupos. A PGE₁, PGI₂ e PGD₂ podem aumentar a concentração do AMPc, levando à inibição das funções celulares (FAVEEUW et al., 2003; TANAKA et al., 2004; CHEN et al., 2007; TILLEY et al., 2001; ARONOFF et al., 2007). Por outro lado, o metabólito da PGD₂, a 15dPGJ₂ que é ligante endógeno para “peroxisome proliferator-activated receptor γ ” (PPAR γ), pode regular negativamente a inflamação (CLARK, 2002). Sabe-se ainda que em modelos animais a resolução da inflamação coincide com apoptose dos leucócitos, com aumento da produção de PGD₂ e seus metabólitos, e do fator de crescimento tumoral β 1 (TGF- β 1) (LAWRENCE, 2001). Além disso, a PGD₂ e seus metabólitos regulam a ativação do NF- κ B, e consequentemente, regulam a supressão dos genes que codificam moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), ou induzem enzimas iNOS e COX-2 (CASTRILLO et al. 2000).

1.4) Características gerais dos Macrófagos Pulmonares

A maioria dos macrófagos teciduais é derivada das células hematopoiéticas, sendo derivados de monócitos presentes na corrente sanguínea que atingem o local tecidual (LOHMANN-MATTHES et al., 1994). Tradicionalmente os macrófagos são descritos como a primeira linha de defesa contra agentes externos como pequenas partículas e patógenos, além disso, podem ter papel nos processos de desenvolvimento e manutenção da homeostase dos tecidos (LOHMANN-MATTHES et al., 1994; GORDON, 2007; STEFATER et al., 2011)

Os macrófagos encontram-se entre as mais abundantes células no trato respiratório e podem ser divididos em duas populações dependendo da sua

localização: macrófagos alveolares que revestem a superfície dos alvéolos, e macrófagos intersticiais, que residem no espaço entre epitélio alveolar e endotélio vascular (SCHNEBERGER et al., 2011). Além da distribuição anatômica, esses fagócitos diferem entre si pela expressão de moléculas de superfície como F4/80+/CD11c+/CD11b- para macrófagos alveolares e F4/80+/CD11c-/CD11b+ para macrófagos intersticiais, os quais se distinguem das células dendríticas que apresentam a marcação F4/80-/CD11c+/CD11b- (LAGRANDERIE et al., 2003; BEDORET et al., 2009).

Foi sugerido que macrófagos alveolares não se originam diretamente dos monócitos, mas preferivelmente são derivados a partir dos macrófagos intersticiais que, por conseguinte, servem como intermediários entre monócitos e macrófagos alveolares. Comparado com macrófagos alveolares, macrófagos intersticiais são menos eficientes em fagocitar, mas são melhores na estimulação da proliferação de células T *in vitro* (FRANKE-ULLMANN et al., 1996). Além disso, macrófagos intersticiais em oposição a macrófagos alveolares, também produzem níveis elevados de IL-10 e, assim, inibem a migração de células dendríticas (BEDORET et al., 2009). Apesar de macrófagos intersticiais e macrófagos alveolares terem funções distintas, ambos estão entre os primeiros a encontrar patógenos e outras ameaças à homeostase do pulmão.

1.5) Mecanismos moleculares envolvidos na fagocitose e atividade microbicida

Os macrófagos são importantes células envolvidas nos mecanismos de defesa contra microrganismos. A interação entre leveduras e macrófagos é o evento chave na patogenia da histoplasmose (BULLOCK & WRIGHT, 1987), e os mesmos têm papel essencial na defesa do hospedeiro contra o *H. capsulatum*. Sua importância na imunidade inata é de capturar e destruir o patógeno invasor, e iniciar a reação inflamatória local. No entanto, o *H. capsulatum*, parasita intracelular, desenvolveu maneiras de evadir-se dos mecanismos microbicidas dos macrófagos. Estes são a inibição da fusão do fagolisossoma (NEWMAN, 1999; WOODS, 2002); modulação do pH no fagolisossoma, quando formado (KUOKAWA et al., 1998); saída do fungo do vacúolo fagocítico para o citoplasma; inibição ou diminuição da geração de NO, do “burst” oxidativo, e da captura de ferro a partir da transferrina

(elemento importante para a função microbicida do macrófago (NEWMAN, 1999; WOODS, 2002).

A fagocitose envolve uma seqüência de eventos transduccionais que conduzem a rearranjos no citoesqueleto e na membrana e consequente englobamento da partícula (GORDON, 2007). Dentre os receptores presentes na superfície de fagócitos mononucleares responsáveis pela interação e fagocitose de microrganismos opsonizados estão aqueles que interagem com a porção Fc da IgG (FcγR, denominado FcR), ou com o receptor de complemento (denominado CR) (GREENBERG & GRINSTEIN, 2002). A fagocitose mediada via FcγR, é regulada por eicosanóides e AMPc (ARONOFF et al., 2004; ARONOFF et al., 2005). Aronoff e colaboradores (2004) demonstraram que PGE₂ após ligação aos receptores EP2 e EP4, inibe em macrófagos alveolares a fagocitose, a morte de bactérias e a produção de mediadores inflamatórios, todos os eventos dependentes do aumento de AMPc. A inibição da morte bacteriana pela PGE₂ envolve também Epac-1 e PKA (ARONOFF et al., 2005). A PGE₂ e AMPc podem inibir a geração de reativos intermediários de oxigênio (ROI), pela inibição da NADPHox (ARONOFF et al., 2005; SEREZANI et al., 2007). As interações das opsoninas com seus receptores ativam outras cascatas de sinalização que culminam no aumento de Ca²⁺ intracelular, liberação de AA e ativação de kinases como SyK, PI3K, MAPK e PKC (revisado por SEREZANI et al., 2008). Além disso, sabe-se que diferentes isoformas de PKC ativam proteínas do complexo NADPH oxidase, que resultam na geração dos intermediários reativos do oxigênio importantes para atividade microbicida de patógenos (revisado por SEREZANI et al., 2008). No entanto, até o momento nada foi demonstrado sobre a participação das diferentes prostaglandinas na fagocitose e nos mecanismos microbicidas de macrófagos alveolares infectados por *H. capsulatum*.

1.6) Micropartículas Biodegradáveis

Os sistemas de liberação que empregam carreadores poliméricos ganharam interesse nos últimos anos nas pesquisas científicas, por aumentar a resposta imune específica, uma vez que estes sistemas são capazes de direcionar de maneira seletiva o antígeno ou vetor gênico para as células efectoras, e a liberação

sustentada de mediadores lipídicos encapsulados (LIMA et al., 2003; ELDRIDGE et al., 1991; LIMA & RODRIGUES, 1999; NICOLETE et al., 2007; NICOLETE et al., 2008; SANTOS et al., 2011). Os polímeros utilizados são biodegradáveis, e podem ser sintéticos ou naturais, degradando enzimaticamente ou não *in vivo* para produzir subprodutos biocompatíveis e não tóxicos (ELDRIDGE et al., 1991; LIMA & RODRIGUES JR, 1999). As micropartículas (MS) desenvolvidas constituem um sistema de liberação progressiva, de forma sustentada/controlada ou não, das substâncias dissolvidas ou dispersas no seu interior (SINHA et al., 2003). Dentre os sistemas poliméricos de liberação sustentada/controlada, são muitos utilizados as MS constituídas de ésteres derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA, do inglês “poly-lactic-co-glycolic acid”) (50:50). Este polímero permite a construção de MS, cujo tamanho ($< 10 \mu\text{m}$) possibilita sua interação com fagócitos e adequada degradação e estabilidade (LIMA & RODRIGUES, 1999; NICOLETE et al., 2007; NICOLETE et al., 2008; SANTOS et al., 2011). As potencialidades para o uso destes sistemas encapsulados são devidas à: (i) proteção do composto a ser administrado, possibilitando redução na quantidade utilizada e aumento da estabilidade dos mesmos *in vitro* e *in vivo*; (ii) interação com células do Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF), uma vez que partículas com diâmetro inferior a $10 \mu\text{m}$ são fagocitadas de maneira eficiente por macrófagos (ELDRIDGE et al., 1991; O'HAGAN et al., 1993), o que pode contribuir para o desencadeamento e/ou modulação das respostas imune inata ou adquirida; (iii) possibilidade de administração dos compostos por diferentes vias tais como intranasal, intratraqueal, endovenosa ou intramuscular, podendo ser realizados estudos sistêmicos e/ou locais; (iv) facilidade de administração; (v) estabilidade, uma vez que as micropartículas são armazenadas sob a forma de pó liofilizado que pode ser reconstituído imediatamente antes da administração (ELDRIDGE et al., 1991; O'HAGAN et al., 1993). Portanto, essas vantagens possibilitam o estudo de várias moléculas, garantindo suas ações biológicas por maior tempo.

Nosso grupo de pesquisa possui experiência na utilização de MS contendo mediadores lipídicos e suas ações em respostas celulares *in vivo* e *in vitro*. Mostramos que MS poliméricas de PLGA contendo LTB_4 são mais fagocitadas por macrófagos peritoneais murinos e, quando administradas intratraquealmente em camundongos, aumentam o recrutamento de leucócitos para o espaço

broncoalveolar (NICOLETE et al., 2007; NICOLETE et al., 2008). Além disso, foi observado que as MS contendo LTB₄ são capazes de induzir aumento da produção de NO em células endoteliais humanas e em macrófagos peritoneais murinos, aumentando nestes a expressão do receptor nuclear “peroxisome proliferator-activated receptor α ” (PPAR- α) (NICOLETE et al., 2008). Nicolete e colaboradores (2008) demonstraram ainda que MS contendo PGE₂ são menos fagocitadas e que inibem a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Além disso, as MS-PGE₂ induziram a produção de nitrito e MCP-1 por células endoteliais humanas. Desta forma, o uso de mediadores lipídicos encapsulados podem proporcionar uma estratégia para a modulação das respostas inflamatórias.

2) JUSTIFICATIVA

O entendimento do papel das prostaglandinas em doenças causadas por fungos é de interesse da comunidade científica, uma vez que o conceito sobre estes mediadores em geral é que eles suprimem a produção de citocinas e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Recentemente, demonstramos, que animais infectados com *H. capsulatum* e tratados com celecoxibe, um inibidor da síntese de prostaglandinas, apresentam diminuição da carga fúngica nos pulmões e baços, aumento da produção de NO e da fagocitose de leveduras pelos macrófagos alveolares. Em consequência estes animais têm maior tempo de sobrevivência, em comparação com animais somente infectados e não tratados (PEREIRA et al., 2013). Porém, em nosso estudo não foi determinado qual do(s) subtipo(s) de prostaglandina(s) participa(m) da patogênese na histoplasmose. Vários grupos de pesquisa têm investigado o papel dos diferentes prostanóides produzidos durante o processo inflamatório e as infecções. Em alguns modelos, sabe-se que no início da resposta inflamatória ou infecciosa, ocorre maior produção de PGE_2 enquanto que nas fases mais tardias há predomínio de PGD_2 e seu metabólito $15dPGJ_2$. Tendo a $15dPGJ_2$ um ligante endógeno do PPAR- γ , postula-se que este mediador contribui para a resolução da inflamação. Além disso, sabe-se da literatura que a administração intratraqueal de PGD_2 aumenta a eliminação de microrganismos dos pulmões de camundongos infectados por *P. aureginosa* (JOO et. al., 2007), e diminui a inflamação. Desta maneira é de grande interesse o entendimento das atividades biológicas da PGE_2 e PGD_2 na histoplasmose, e seu potencial uso como ferramenta terapêutica para o tratamento auxiliar desta micose

3) OBJETIVOS

Esta tese teve como objetivos:

1. Estudar o papel da PGD_2 e seu metabólito 15dPGJ_2 na histoplasmose, em comparação com a PGE_2 nas funções fagocítica e microbicida de macrófagos alveolares.
2. Desenvolver um sistema de micropartículas para a preservação das atividades biológicas da PGD_2 .
3. Determinar os efeitos na resposta imune da administração de micropartículas contendo PGD_2 ou PGE_2 em camundongos infectados com *H. capsulatum*.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Preparo das soluções das prostaglandinas para as micropartículas

Prostaglandina D₂ (PGD₂) e E₂ (PGE₂) (soluções estoque) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO. USA) foram dissolvidas em etanol absoluto, na concentração de 1 mg/mL (7×10^{-3} M).

4.2) Animais

Utilizados camundongos machos (18–22g), pertencentes à linhagem C57/BL6, e Ratos Wistar pesando entre 220-270g para os experimentos de fagocitose. Todos os animais foram provenientes do Biotério II de criação de animais Isogênicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Após infecção os animais foram mantidos dentro da câmara de isolamento de nível de segurança 3 (NBS3) no Núcleo de Pesquisa em Tuberculose (NPT) do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, com livre acesso a água e alimento. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética do Campus de Ribeirão Preto (Protocolo nº09.1.375.53.5).

4.3) Obtenção do soro imune anti *H. capsulatum* (SI)

Os ratos foram inoculados por via intraperitoneal (i.p.) com inóculo de 1×10^8 leveduras/mL de *H. capsulatum*. Dez dias após a inoculação primária, os ratos foram submetidos à segunda inoculação. Após 7 dias os ratos foram mortos por decapitação, e o sangue coletado, este centrifugado a 1500 rpm por 10 min para obtenção do soro. Logo após, o soro imune anti *H. capsulatum* (SI) foi aquecido a 56°C por 1h para inativação de proteínas do sistema complemento, alíquotado e armazenado a -80°C (adaptado de MANCUSO et al., 2000).

4.4) Obtenção de macrófagos alveolares de ratos

Os macrófagos alveolares de ratos Wistar foram obtidos após eutanásia com CO₂. Os macrófagos alveolares foram obtidos pela lavagem bronco

alveolar através da administração de 50 mL (BD, USA) de PBS estéril gelado pela via intratraqueal com utilização de cateter. Este procedimento foi repetido 2 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. Os lavados coletados foram adicionados em tubos plásticos de 50 mL e submetidos a centrifugação por 10 minutos a 1.500 rpm e ressuspensos em RPMI-I (Gibco, USA). Em algumas ocasiões, anterior a adição do RPMI-I, foram lisadas as hemácias com H₂Od + PBS 2x por 1-2 minutos. A contagem do número total de células e sua viabilidade foi realizada empregando corante de Azul de Trypan (Gibco invitrogen, USA) em câmara de Neubauer. Após ajuste do número de células para 2×10^5 µl/poço, estas foram incubadas em placas de cultura de 96 poços. Após 1 hora de incubação a 37°C a 5 % CO₂, as células foram lavadas com RPMI-C (acrescido de 10% soro bovino fetal) pré aquecidas e incubadas durante 18 horas. No dia seguinte o RPMI-C foi substituído por RPMI-I. Como já estabelecido em nosso laboratório, as células foram infectadas na proporção 2×10^5 leveduras/ 2×10^5 macrófagos ou 2×10^4 leveduras/ 2×10^5 macrófagos.

4.5) Opsonização com IgG e marcação de leveduras de *H. capsulatum* com FITC.

Após a obtenção e contagem de leveduras do fungo estas foram opsonizadas com 10% SI de ratos e incubados a 37°C, por 30 min sob agitação. Em seguida, a suspensão de leveduras foi incubada com solução final de 0,5 µg/mL de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Amresco, USA) e incubada em estufa 37°C por 60 min. Após este período a suspensão de leveduras foi lavada duas vezes em volume de 10 mL de PBS para retirada de excesso de FITC (SECATTO et al., 2012). Após a lavagem o número de leveduras foi acertado para se obter a proporção estimada de 1:1 (2×10^5 leveduras: 2×10^5 macrófagos), 1:5 (4×10^4 leveduras: 2×10^5 macrófagos) ou 1:10 (2×10^4 leveduras: 2×10^5 macrófagos).

4.6) Ensaio de Fagocitose do *H. capsulatum*

Macrófagos alveolares obtidos conforme descrito anteriormente, foram estimulados ou não com 0,1; 1; 10µM PGD₂ ou PGE₂ solúveis (diluídos previamente em RPMI-I) durante 4 minutos. Como controle negativo de fagocitose parte dos macrófagos foram tratados com inibidor, citocalasina D (5µg/mL) (Sigma), por 45

min. Em seguida foram adicionadas as leveduras de *H. capsulatum* previamente opsonizadas e marcadas com FITC (como descrito 4.5) na proporção de uma levedura para uma célula (1:10) por um período de 2 h (tempo pré-estabelecido em nosso laboratório como ideal para fagocitose). Logo após foram adicionados 100 µl de Azul de Tripan (0,25 mg/mL) para queimar a fluorescência das leveduras não fagocitadas, e após 1 minuto de incubação no escuro as amostras foram avaliadas em espectrofluorímetro (SpectraMax-Gemini XPS, USA). A fagocitose foi determinada pela média de intensidade de fluorescência (MIF) emitida de fungos intracelulares marcados com FITC através da leitura em 530 nm (excitação 485 nm e emissão 538 nm) (SECATTO et al., 2012). Os mesmos procedimentos foram realizados na presença de inibidores da síntese de prostaglandinas, o celecoxibe (1, 5, 10 µM), ou indometacina (1, 5, 10 µM) para verificar o papel das prostaglandinas endógenas (adaptado de SEREZANI et al., 2007), sendo que os macrófagos alveolares receberam o pré-tratamento durante 30 minutos. O pré-tratamento com os antagonistas dos receptores DP1, CRTH2, EP2 e EP4 foi de 25 minutos antes da adição do fungo.

4.7) Avaliação da atividade fungicida

Macrófagos alveolares de rato foram pré-incubados com IFN-γ (5 ng/mL) “overnight” e depois infectados com 1 levedura de *H.capsulatum* para 10 macrófagos. Após 2 h de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS1x estéril morno para remover as leveduras não fagocitadas. Nos poços controles foram adicionado 200 µL de saponina 0,05% para lisar as células e uma alíquota foi plaqueada em BHI Agar sangue. As unidades formadoras de colônia (UFC) contadas no período de 2h foram consideradas como UFC controle, pois foi tempo necessário para ocorrer a internalização das leveduras. Após este período, as células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 48 h. Em seguida o sobrenadante dessa cultura foi coletado e armazenado em freezer para posteriores dosagens de leucotrienos, prostaglandinas e citocinas. As células aderentes foram lisadas com 200 µL de saponina 0,05% e uma alíquota de cada poço foi plaqueado em BHI Agar sangue. As placas de ágar sangue foram mantidas em estufa a 37°C por 15-21 dias e o UFC foram contadas. Atividade fungicida foi calculada de acordo

com formula: $[100 - (\text{UFC experimental} \times 100 / \text{UFC controle})]$, onde UFC são as unidades formadoras de colônias.

4.8) Micropartículas Biodegradáveis (MS)

MS contendo PGD₂ ou controle (sem incorporação de mediador lipídico) foram preparadas utilizando o método de simples emulsão óleo-em-água seguido do processo de extração-evaporação do solvente (Figura 1). Na fase orgânica interna, 300 µL de PGD₂ (7×10^{-3} M) foram dissolvidos em etanol e adicionados em 10 mL de diclorometano (J.T. Baker/Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA) contendo 100 mg de PLGA 50:50 (Resomer RG 505, MM 78kda –Boehringer Ingelheim-Ingelheim, Alemanha). Logo após, esta fase foi vertida sobre uma fase aquosa externa contendo surfactante (40 mL de solução de polivinil álcool a 3% (PVA)) (Sigma Aldrich Chemicals) e misturada mecanicamente através de um homogeneizador (RW20: IKA) a 600 rpm, por 4h, favorecendo a evaporação do solvente orgânico. Em seguida, as MS foram lavadas três vezes com água deionizada estéril e centrifugadas (25.000 g, 5 min., 25°C). Em seguida foram congeladas a – 80°C, e então, liofilizadas e armazenadas a 4°C. As MS foram avaliadas quanto ao seu tamanho, morfologia, eficiência de encapsulação da PGD₂, e cinética de liberação *in vitro* (NICOLETE et al., 2008). Para cada lote de MS produzidas foi realizada testes para detecção de endotoxina, empregando o ensaio “Limulus Amebocyte Lysate” (kit comercial LAL, Cambrex Bioscience Inc., Walkersville, MD, EUA) como descrito em Nicolete e colaboradores (2007). Todas as amostras analisadas apresentaram valores de Unidades de Endotoxina (UE) abaixo da faixa de linearidade do método (0,1 a 1 UE/mL). As MS de PGE₂ já se encontram disponíveis em nosso laboratório e foram preparadas pelo mesmo método descrito por Nicolete e colaboradores (2008).

Figura 1. Representação esquemática da obtenção de micropartículas pelos métodos de simples ou dupla emulsão seguida pela evaporação/extração do solvente. Figura adaptada de NICOLETE, tese de doutorado 2008.

4.9) Caracterização das micropartículas biodegradáveis

4.9.1) Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia

A análise de tamanho foi avaliada através do diâmetro das MS com o uso de um analisador de tamanho de partícula (LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer; Beckman Coulter, USA). As MS liofilizadas foram dispersas em água deionizada e submetidas à análise. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão do tamanho (diâmetro) da partícula.

O pontencial zeta foi analisado através do Nano Zeta Sizer (Malvern instruments, Inglaterra). Para esta análise, as MS liofilizadas também foram dispersas em água deionizada. O polímero PLGA (50:50), constituído de ésteres derivados de ácidos láctico e glicólico, possui residual de carga elétrica negativa. Desta forma, a análise de potencial zeta das MS foi realizada a fim de verificar se a encapsulação alteraria o residual de carga elétrica.

A forma e a superfície das MS liofilizadas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (ZEISS, Evo 50, Cambridge, Inglaterra). As MS foram dispostas sobre porta-amostras ("stubs") contendo uma fita adesiva isolante, e adicionada uma fina camada de ouro em pó. Em seguida, depois do seu recobrimento por 90 segundos e foram submetidas corrente elétrica de 40

mA. E posteriormente, à análise microscópica em alto vácuo (1×10^{-5} Torr) e com uma tensão de 5- 20kV.

4.9.2) Eficiência de encapsulação

A taxa de encapsulação da PGD₂ foi feita através da dissolução do polímero (5 mg MS) com 1 mL do solvente orgânico acetonitrila (J.T.Baker. Solusorb®, USA), seguida da agitação em vórtex por 30s, e posterior filtragem e secagem por evaporação do solvente através de um concentrador de amostras (“speed vacuum” Eppendorf, Alemanha). As amostras secas foram ressuspensas em 0,5 mL do tampão EIA (Cayman). Foram realizadas as quantificações da PGD₂ liberadas das MS por ensaio imuno-enzimático de competição, de acordo com instruções do fabricante (EIA, Amershan Biosciences, Piscataway, N.J., USA). Foram preparadas amostras puras e diluídas 1000 vezes (para análise do PGD₂).

4.9.3) Estudo de liberação *in vitro*

Foram utilizadas nos ensaios células de difusão Microette-HANSON RESEARCH CO. (célula de difusão vertical ou célula de Franz, empregada em estudos *in vitro* de permeação cutânea), conforme o esquema seguinte:

Figura 2. Célula de difusão vertical (célula de Franz) adaptada para os ensaios de liberação *in vitro*.

As amostras avaliadas (MS contendo PGD₂) foram devidamente pesadas (10 mg). A solução receptora utilizada foi PBS 0,15 M/etanol (50:50, v/v), pH 7,4, volume de 7 mL, mantida à temperatura de 37°C, em banho termostatzado com água circulante. Esta fase receptora manteve as condições de “sink” (baseada no coeficiente de solubilidade de cada mediador em meio aquoso). As amostras foram colocadas em contato com uma membrana de acetato de celulose (diâmetro dos poros de 0,45 µm), sendo que alíquotas de 300 µL de cada preparação foram aplicadas sobre a membrana. As soluções receptoras foram constantemente agitadas a 300 rpm e alíquotas de 1 mL foram coletadas nos intervalos de tempo pré-estabelecidos: 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 9, 12, 18, 24 e 48 horas. O equipamento manteve automaticamente o volume das soluções receptoras constante, a fim de evitar a saturação do meio. Os mediadores lipídicos presentes nas alíquotas coletadas foram quantificados pelo método de ELISA. Para o cálculo da % liberação acumulativa dos mediadores foi utilizada a seguinte fórmula, no intervalo de tempo analisado:

$$\text{Conc.}_{\text{real}} (\%) = (\text{Conc.}_{\text{encontrada}} (\text{método}) \times \text{Vol.}_{\text{meio receptor}}) + (\text{Conc.}_{\text{anterior}} \times \text{Vol.}_{\text{amostra}})$$

4.10) Ensaio de citotoxicidade *in vitro* pela redução do brometo de tiazolil – (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio – Sal de tetrazólio MTT)

Uma suspensão de macrófagos alveolares foi ajustada para 2×10^5 células/poços/100 µL, em meio de cultura RPMI 1640 com 5% de soro bovino fetal (SBF) e gentamicina. As células foram plaqueadas em microplaca de 96 cavidades e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas para a adesão das células. Após este período, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura contendo 1 mg/mL das micropartículas (MS). Após a adição das MS, a microplaca foi incubada por 24 horas e em seguida o meio de cultura foi substituído por outro meio RPMI 1640 (100 µL/poço) sem soro e sem vermelhode fenol, mas contendo o corante MTT 0,5 mg/mL (MTT Sigma M-5655), previamente filtrado em membrana de 0,22 µm. As células foram incubadas por 4 horas, tempo necessário para ocorrer a redução do sal de tetrazolio em formazan. A absorbância referente a cada poço será determinada a 550 nm.

4.11) Ensaio de Fagocitose das MS

Os macrófagos alveolares (2×10^5 células/poço) foram plaqueados sobre a lamínula estéril (13 mm) depositada no fundo de placas de 24 poços. Após a incubação, as células não-aderentes foram removidas e os macrófagos alveolares aderidos foram co-incubados por 4, 24 e 48h com 1 mg/mL por poço de MS contendo PGD₂ ou PGE₂. MS controle ou somente meio RPMI foram usados como controles. Após os tempos anteriormente especificados, o meio foi aspirado e as MS não fagocitadas foram removidas por cinco lavagens com PBS 1x morno. As lamínulas com os macrófagos alveolares aderidos foram coletadas e coradas com Panótico (Larboclin, Pinhais, Paraná) e fixadas em lamina. Foram contadas as células com no mínimo uma MS fagocitada, e estabelecida a atividade fagocítica dos macrófagos alveolares através do cálculo do índice fagocítico (NICOLETE et al., 2007; NICOLETE et al., 2008).

4.12) Ativação do NFκB

As células RAW-Blue™ [RAW264.7] são macrófagos estavelmente transfectados com o gene repórter NF-κB, quando ativados secretam fosfatase alcalina secretada (SEAP). Estas células foram gentilmente doadas pelo Dr. Ong Huy (Université du Montréal, Canadá). Para o experimento, 2×10^5 células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços em meio DMEM suplementado com Normocin™ (50 mg/mL) a 37° C numa atmosfera umidificada de 5% de CO₂ durante 18 h. Após esse período, as células foram incubadas com 1 mg/mL de MS durante 24 h. LPS de *Rhodobacter sphaeroides* (0,5 ug / ml) foi utilizado como um controle positivo. Após 24 h de estimulação, o meio foi colhido e as amostras de 50µl foram misturadas com QUANTIBLue™ (InvivoGen), um meio de detecção de SEAP (150 µl), em placas de 96 poços à temperatura ambiente durante 18 horas. A densidade óptica foi medida a 650 nm.

4.13) Detecção de prostaglandinas, leucotrieno B₄ por ELISA

Após a coleta do lavado broncoalveolar (LBA), os pulmões dos camundongos C57Bl6 foram retirados após 11, 14 e 28 dias de infecção com *H. capsulatum*, e armazenados em freezer -80°C. Os pulmões foram pesados e em cada 1 mg do tecido foram adicionados em 1 mL de RPMI-I e homogeneizados, e após o lisado

celular foi centrifugado a 4°C por 15 min a 4000 rpm. PGD₂, PGE₂ e LTB₄ foram quantificados pelo Ensaio Imunoenzimático Competitivo seguindo instruções do fabricante (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). A 15dPGJ₂ foi quantificada pelo Ensaio Imunoenzimático Competitivo da Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY).

4.14) Obtenção e cultivo de leveduras do *H. capsulatum* em meio sólido

A cepa selvagem do *H. capsulatum* foi isolada a partir do sangue de um paciente com diagnóstico positivo para histoplasmoses acompanhado clinicamente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). A cepa tem sido mantida na fase filamentosa, a temperatura ambiente (25° C), em ágar sabouraud (Difco). Para a obtenção de leveduras a forma micelial foi convertida através do cultivo a 37°C, em meio sólido BHI- ágar (Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro. Alíquotas desta amostra foram submetidas ao teste de viabilidade com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio, sendo utilizadas somente quando a viabilidade do fungo for superior a 90% (CALICH et al., 1979). Para a recuperação de leveduras no ensaio de UFC foi utilizado meio sólido BHI- ágar suplementado com 5 % de sangue de carneiro.

4.15) Infecção pulmonar com *H. capsulatum* através da inoculação intratraqueal por procedimento cirúrgico e tratamento com celecoxibe.

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com Quetamina (100-150 mg/kg) e Xilasina (10-15 mg/kg), segundo recomendações sugeridas pela Apostila de Manipulação de Animais do Laboratório da Fiocruz.

Logo após a anestesia dos camundongos, e para inoculação do fungo, a traquéia foi exposta e o inóculo subletal de 5×10^5 leveduras/100µl de *H. capsulatum* foi administrado por via intratraqueal (i.t.) conforme descrito por (MEDEIROS et al., 2004). Animais controle serão submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e receber 100 µL PBS estéril. Os camundongos C57BL6 infectados e administrados ou não as MS contendo PGD₂ ou PGE₂, foram também tratados com o composto foi diluído em 100 µL de etanol absoluto e depois acrescido de água de modo a se obter a suspensão de tratamento. Os animais foram tratados diariamente por via oral com 0,5 mL de solução recebendo a dose de 1 mg/kg de celecoxibe (Celebra®, Pfizer, Brasil), sendo a primeira e a última dose administradas 1 hora antes da

infecção e 1 hora antes da morte dos animais, respectivamente. Os animais inoculados via i.t com PBS ou infectados com *H. capsulatum* receberam o mesmo volume do diluente.

4.16) Grupos Experimentais

Esquema 1: Tratamento com Celecoxib e MS

Um dia anterior e uma hora antes da infecção alguns animais receberam por via oral o tratamento com celecoxibe (1mg/kg). Camundongos C57BL/6 foram infectados com inoculo subletal de 5×10^5 leveduras/animal de *H.capsulatum* no dia zero e acompanhados e tratados ou não com celecoxibe e tratados com as MS nos dias 1, 4, 7 e 11 após a infecção. A morte dos camundongos foi realizada no 14º dia após a infecção.

Tabela 1.

Grupos	Tratamento com inibidor COX-2	Tratament o com MS	Estímulo
PBS	H ₂ O	PBS i.n.	PBS
Hc	H ₂ O	PBS i.n.	Inóculo subletal i.t.
Hc+cele	1 mg/kg o	PBS i.n.	Inóculo subletal i.t.
Hc +MSPGD ₂	-	MS-PGD ₂ i.n	Inóculo subletal i.t.
Hc +MSPGE ₂	-	MS-PGE ₂ i.n.	Inóculo subletal i.t.

cele(celecoxib); Hc (*H.capsulatum*); o (oral); i.n. (intranasal); i.t. (intratraqueal)

Esquema 2: Tratamento com MS

Camundongos C57BL/6 foram infectados com inóculo subletal de 5×10^5 leveduras/animal de *H.capsulatum* no dia zero e acompanhados e tratados com as MS nos dias 1, 4, 7 e 11 após a infecção. A morte dos camundongos foi realizada no 14º dia após a infecção.

Tabela 2.

Grupos	Tratamento com MS	Tratamento com PGs	Estímulo
PBS	PBS i.n.	---	PBS
Hc	PBS i.n.	---	Inóculo subletal i.t.
Hc+MSControle	MS-Controle i.n.	---	Inóculo subletal i.t.
Hc+MSPGD ₂	MS-PGD ₂ i.n.	---	Inóculo subletal i.t.
Hc+MSPGE ₂	MS-PGE ₂ i.n.	---	Inóculo subletal i.t.
PGD ₂ solúvel	---	PGD ₂ 3 µM i.n.	Inóculo subletal i.t.
PGE ₂ solúvel	---	PGE ₂ 3 µM i.n.	Inóculo subletal i.t.

cele(celecoxibe); Hc (*H.capsulatum*); i.n. (intranasal); i.t. (intratraqueal); MS-controle (sem mediador lipídico).

Esquema 3: Tratamento com HQL-79

Camundongos C57BL/6 foram infectados com inóculo subletal de 5×10^5 leveduras/animal de *H.capsulatum* no dia zero e acompanhados e tratados ou não com HQL-79 diariamente. A morte dos camundongos foi realizada no 2º, 14º, 28º dia após a infecção. Parte dos animais infectados tratados ou não com HQL-79 foram destinados ao experimento de curva de sobrevivência, com n = 10.

Tabela 3.

Grupos	Tratamento com inibidor PGDs	Estímulo
PBS	H ₂ O	PBS
Hc	H ₂ O	Inóculo subletal i.t.
Hc+HQL-79	3 mg/kg o	Inóculo subletal i.t.

Hc (*H.capsulatum*); o (oral); i.t. (intratraqueal); PGDs (PGD sintase); HQL-79 (composto que inibe a PGDs)

Esquema 4: Tratamento com HQL-79 e MS-PGD₂

Camundongos C57BL/6 foram infectados com inóculo letal de 1×10^6 leveduras/animal de *H.capsulatum* no dia zero e tratados ou não com HQL-79 diariamente e com MS-PGD₂. A morte dos camundongos foi acompanhada e anotada para a curva de sobrevivência.

Tabela 4.

Grupos	Tratamento com inibidor PGDs	Tratamento com MS	Estímulo
PBS	H ₂ O	---	PBS
Hc	H ₂ O	PBS i.n.	Inoculo letal i.t.
Hc+HQL-79	3 mg/kg o	PBS i.n.	Inoculo letal i.t.
Hc+HQL-79+MSPGD ₂	3 mg/kg o	MS-PGD ₂ i.n.	Inoculo letal i.t.

Hc (*H.capsulatum*); o (oral); i.t. (intratraqueal); PGDs (PGD sintase); HQL-79 (composto que inibe a PGDs)

Esquema 5: Tratamento com CAY 10526 e MS-PGE₂

Camundongos C57BL/6 foram infectados com inóculo letal de 1×10^6 leveduras/animal de *H.capsulatum* no dia zero e tratados ou não com CAY 10526 diariamente e com MS-PGE₂. A morte dos camundongos foi acompanhada e anotada para a curva de sobrevivência.

Tabela 5.

Grupos	Tratamento com inibidor PGEs	Tratamento com MS	Estímulo
PBS	H ₂ O	---	PBS
Hc	H ₂ O	PBS i.n.	Inoculo letal i.t.
Hc+CAY	5 mg/kg o	PBS i.n.	Inoculo letal i.t.
Hc+CAY+MSPGE ₂	5 mg/kg o	MS-PGE ₂ i.n.	Inoculo letal i.t.

Hc (*H.capsulatum*); o (oral); i.t. (intratraqueal); PGEs (PGE sintase); CAY 10526 (composto que inibe a PGEs).

4.17) Administração intranasal das micropartículas em camundongos infectados com *H. capsulatum*

Os camundongos C57BL6, infectados ou não com o inóculo subletal do fungo, e tratados ou não com celecoxibe, receberam intranasalmente 20 µL de uma suspensão aquosa contendo 10 mg/mL de MS controle ou MS-PGD₂ ou MS-PGE₂, resuspenso em PBS estéril. As MS vazias ou contendo PGD₂ ou PGE₂, foram administradas em 4 doses distribuídas no 1º, 4º, 7º e 10º dia após a infecção. Os demais animais receberam apenas PBS (veículo das formulações) como controle.

4.18) Determinação da carga fúngica em pulmões e baços após infecção com *H. capsulatum*

Camundongos infectados com *H. capsulatum*, tratados ou não com celecoxibe e/ou MS, foram sacrificados no 7º, 14º e 21º dia após infecção, os pulmões e baços coletados foram pesados em placa de Petri estéreis contendo 3 mL de meio RPMI-I. Para a obtenção da suspensão celular dos pulmões, o segundo lóbulo esquerdo foi pesado e cortado em pequenas porções através do bisturi, adicionados em tubos de polietileno de 50 mL contendo RPMI-I acrescido de 0,5 µg/mL de liberase, e submetidos a agitação por 30 min em rotação de 150 rpm à 37°C. A recuperação da UFC foi avaliada conforme descrito por (ZHOU et al., 1995). A suspensão das células do baço foi obtida através do processamento em peneira de nylon estéril conforme descrito por (MEDEIROS et al., 2004). Em seguida, as suspensões celulares, do pulmão e do baço, foram diluídas (1:50 e 1:25) e, 200 µL distribuídas em placas de Petri contendo BHI-ágar-5% de sangue de carneiro, em duplicata para cada órgão. Após 15 dias do cultivo a 37°C, as UFC foram contadas, e o número de colônias expresso por grama de tecido.

4.19) Obtenção, contagem total e diferencial das células do lavado bronco-alveolar (LBA).

As células do LBA foram coletadas no 7º, 14º e 21º dias após a infecção e administração das MS, através da inserção de um cateter acoplado a uma seringa contendo 1 mL de solução de PBS estéril. Esse procedimento foi repetido 3 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. A contagem do número total de células presentes nos LBA foi realizada em solução de Turk (diluição 1:20) e

câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram feitas em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas com Panótico Rápido.

4.20) Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Sobrenadantes de cultura de macrófagos alveolares de ratos e sobrenadantes do homogenato de pulmão de camundongos foram coletados e armazenados até o momento da dosagem. Empregando o método de ELISA, a quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, KC, IL-10, IL-12, IFN- γ , TGF- β e TNF- α (BD OptEIA – BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) foram realizadas empregando anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e citocinas-padrões, de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica (D.O.) foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca com filtro a 450 nm e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão, sendo o limite de variação de detecção das citocinas de 5000 a 15 pg/mL.

4.21) Histopatologia do pulmão de animais infectados ou não, tratados com MS contendo PGD₂ ou PGE₂

A histopatologia dos pulmões foi realizada em colaboração com a Dra Simone Gusmão Ramos do Departamento de Patologia da FMRP-USP. Para tanto, os fragmentos dos pulmões foram removidos dos animais eutanasiados após 14 dias da infecção, e fixados em tampão fosfato contendo 10% de formalina durante 6 horas, e em seguida foram submetidos ao processo de desidratação em álcool 70% e clarificação em xilol. Os tecidos foram inclusos em blocos de parafina e em seguida realizados os cortes histológicos de 4 μ m de espessura com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. Em seguida, foram mergulhados em xilol para retirar o excesso de parafina e hidratados com concentrações decrescentes de álcool. Os cortes foram corados com Hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de infiltrado inflamatório e celularidade ou preparados para imuno-histoquímica. Também realizamos coloração de prata de Grocott (GMS) e analisados as leveduras de *H. capsulatum* presentes no parênquima pulmonar dos animais infectados e tratados.

4.22) Análise da Expressão de BLT1

Após o ensaio de fagocitose com os mediadores lipídicos solúveis, os macrófagos alveolares foram removidos do fundo das placas e marcados conforme descrição anterior para citometria de fluxo. Utilizamos anticorpos para anti-BLT1. Foram utilizados os respectivos anticorpos controles de isotipo para avaliação de ligações inespecíficas. Após 30 minutos de incubação à 4-8°C, as células foram lavadas duas vezes com 2mL de PBS acrescido de 2% de soro bovino fetal para retirada do excesso de anticorpos não ligados. Em seguida as células foram fixadas em PBS contendo 1% de formaldeído. Todas as amostras foram adquiridas e analisadas em citômetro de fluxo FacSort (Becton and Dickinson, San Jose, CA) com auxílio do software CellQuest.

4.23) Detecção de nitrito (NO_2^-)

Os sobrenadantes de cultura dos macrófagos alveolares de ratos e sobrenadantes do homogenato de pulmão de camundongos infectados foram coletados e armazenados a -80°C até o momento da dosagem. A detecção de óxido nítrico foi avaliada indiretamente pela quantificação NO_2^- através do método de Greiss e determinada com filtro a 540 nm.

4.24) Avaliação da ativação de fator de transcrição NF-kB em macrófagos alveolares estimulados com as MS

A fim de verificar o envolvimento do fator de transcrição NF-kB na ativação de macrófagos alveolares estimulados com as MS, tais células (2×10^5 células/poço) foram plaqueadas em poços contendo lamínulas e coincubadas com 1 mg/mL por poço de MS-PGD₂ ou MS-controle ou com PGD₂ solúvel (3 µM). Meio RPMI e LPS (0,5 µg/mL) foram os controles. Após 4h de estimulação, os sobrenadantes de cultura foram removidos e a translocação de NF-kB para o núcleo foi avaliada por imunofluorescência como descrita a seguir. Após o tempo de estímulo, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas por 15 minutos com PBS contendo 2% de paraformaldeído, e posteriormente, foi feita a lavagem com PBS contendo glicina a 0,1 M por 5 minutos. A partir disso, iniciou-se a permeabilização com PBS contendo 0,01% de saponina (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) por 20 minutos. Em seguida, após lavagem com PBS, realizou-se o bloqueio com PBS contendo 3% de soro normal de jumento (Jackson ImmunoResearch Laboratories),

durante 40 minutos à temperatura ambiente, a fim de impedir a ligação inespecífica de anticorpos em receptores FcγR dos macrófagos. Os Mas foram incubados durante 1 hora com anticorpos policlonais de coelho, cuja especificidade é para subunidade p65 do fator de transcrição NF-κB (Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, foi feita a lavagem com PBS e foram adicionados anticorpos secundários (IgG de jumento) anti-IgG de coelho conjugados com Alexa-Fluor 594 (Invitrogen Molecular Probes) por 30 minutos. Além disso, foi feita marcação para o núcleo celular usando 4',6-diamidino-2-phenylindole, 2 HCl (DAPI; Calbiochem) durante 15 minutos. Após a imunomarcação, as lâminas foram montadas usando Acqua Poly/Mount (Polysciences) e examinadas por microscopia confocal (Leica TCS SP5 AOBS – Leitz, Manheim, Alemanha).

4.25) Técnica de imuno-histoquímica para iNOS.

Secções dos blocos de parafina contendo o material foram desparafinizados, hidratados e marcados com anticorpo primário de coelho anti-camundongo específico para a enzima iNOS (BD). À seguir, os cortes foram lavados em PBS e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente com anticorpo secundário biotinilado. Em seguida, foi realizada a incubação com os complexos avidinabiotina (ABC Vector Kit) por 30 minutos. Após este período, os cortes foram lavados novamente e incubados com o substrato (Diaminoben-Zidine-Dako). Posteriormente, os mesmos foram mergulhados em PBS e montados em Eukitt (Kindler).

4.26) Análise estatística

Utilizamos o teste ANOVA seguido do teste de comparação individual com o teste *t* de Tukey ou teste *t Student* (comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. A significância estatística será considerada para valores de $P < 0,05$.

5) RESULTADOS

PARTE I

5.1) Efeito das PGD₂, PGE₂ e 15dPGJ₂ nos mecanismos efetores de macrófagos alveolares.

5.1.1) Ensaio de Fagocitose para escolha da melhor proporção entre o número de leveduras e de macrófagos.

Inicialmente padronizamos o número de leveduras de *H. capsulatum* por macrófagos para os ensaios de fagocitose. Os macrófagos alveolares na proporção de 2×10^5 foram infectados com 1 levedura (2×10^5 leveduras), ou 1 levedura (4×10^4 leveduras) para 5 macrófagos (2×10^5) ou 1 levedura (1×10^5 leveduras) para 10 macrófagos (2×10^5), correspondentes a 1:1, 1:5 e 1:10. A proporção de 1:1 foi considerada 100%, e através dela comparado com as demais. Sendo assim, os macrófagos incubados na proporção de 1:5 e 1:10 suas intensidades de fluorescência foram de 62% e 23%, respectivamente, daquela obtida com a proporção de 1 levedura por 1 macrófago (Figura 3). Para os demais experimentos, optamos pela proporção de 1:10 de leveduras para macrófagos, pois ao consideramos esta como 100% e comparamos com os diferentes tratamentos teremos confiabilidade nos. Neste sentido, sabe-se que uma quantidade maior de leveduras pode prejudicar as funções fagocítica e microbicida do macrófago, impossibilitando nosso estudo. A próxima etapa foi conduzir o experimento utilizando leveduras opsonizadas ou não com soro imune (IgG). E como comparação do número de leveduras e macrófagos mostramos na Figura 4 (A) que ocorre maior fagocitose das leveduras quando opsonizadas com IgG (20%) tanto na proporção de 1:1 ou para a proporção de 1:10 (25%) (Figura 4 B).

Figura 3. **Multiplicidade de infecção.** O experimento foi realizado uma vez, sendo os resultados obtidos pela leitura de 5 poços por condição (n=5). Os resultados são expressos como media $\pm$ SEM e significância estabelecida para $P<0,05$. A intensidade de fluorescência obtida com a proporção de um macrófago para uma levedura (1:1) foi considerada como 100%.

Figura 4. **A opsonização de leveduras com IgG potencializa sua fagocitose por macrófagos alveolares.** Macrófagos alveolares foram incubados com leveduras não opsonizadas ou opsonizadas por 2 horas. Os resultados são expressos como media $\pm$ SEM de intensidade de fluorescência (MFI) (n = 5), na proporção de 1 levedura para 1 macrófago alveolar (A) e na proporção de 1 levedura para 10 macrófago alveolar (B). Os resultados são expressos como media $\pm$ SEM e significância estabelecida para * $P<0,05$.

5.1.2) Macrófagos alveolares são produtores de prostanoídes.

Nosso próximo passo foi demonstrar se macrófagos alveolares são capazes de produzir as diferentes prostaglandinas após infecção com histoplasma opsonizado. Após 2 e 48 horas de incubação quantificamos PGD_2 , PGE_2 e 15dPGJ_2 no sobrenadante de macrófagos alveolares incubados ou não com *H. capsulatum* opsonizado (IgG). Observamos que macrófagos alveolares (somente meio) são capazes de produzir prostaglandinas após 2 horas e 48 horas. Sendo estas prostaglandinas mais produzidas quando macrófagos alveolares foram incubados com *H.capsulatum* opsonizado.

Figura 5. **Produção das prostaglandinas por macrófagos alveolares de rato.** Macrófagos alveolares foram incubados ou não com *H.capsulatum* opsonizado (IgG). Após 2 horas e 48 horas o sobrenadante foi coletado e quantificado PGD_2 , PGE_2 e 15dPGJ_2 por ELISA ($n = 5-6$). * $P < 0,05$ macrófago versus demais condições; # $P < 0,05$ macrófago mais *H.capsulatum* versus macrófago mais *H.capsulatum* opsonizado. ANOVA foi utilizado como teste.

5.1.3) Curva concentração resposta do efeito dos inibidores das cicloxigenases no ensaio de fagocitose.

Para investigar a capacidade das prostaglandinas modularem a fagocitose, macrófagos alveolares foram pré-tratados ou não com diferentes concentrações do inibidor da COX-1/COX-2, a indometacina, ou do inibidor da COX-2, o celecoxibe, e incubados com leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com IgG. A Figura 6 (A) mostra em 2 horas de fagocitose, que o tratamento com indometacina em todas as concentrações foram capazes de aumentar a fagocitose das leveduras. Também, macrófagos alveolares tratados com celecoxibe, e incubados com leveduras opsonizadas com soro imune (IgG) fagocitam mais estas (Figura 6 B). Demonstramos que a inibição da síntese de prostaglandinas aumentou em até 8 vezes a atividade fagocítica de macrófagos alveolares, quando comparado ao controle.

Figura 6. **Inibição das prostaglandinas endógenas aumenta a fagocitose de leveduras de *H.capsulatum* opsonizadas com IgG.** Macrófagos alveolares foram pré-tratados com diferentes concentrações de indometacina (A) ou celecoxibe (B) por 30 min antes da incubação com leveduras opsonizadas por 2 horas. Os resultados são expressos como media $\pm$ SEM de intensidade de fluorescência (MIF) (n = 6), na proporção de 1 levedura para 10 macrófago alveolar. Experimento representativo de 3 experimentos. * $P < 0.05$ comparado com controle (100%).

5.1.4) Curva concentração resposta do efeito da PGD₂, PGE₂ e 15dPGJ₂ no ensaio de fagocitose

Como demonstrado na Figura 6, após 2 horas de incubação houve um aumento na fagocitose quando inibida a síntese de prostaglandinas. Assim para determinar qual das prostaglandinas seria a responsável pela inibição da fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por macrófagos alveolares, nós realizamos a curva concentração resposta das PGE₂, PGD₂ e 15dPGJ₂ na fagocitose. Observamos que a PGE₂ inibe a fagocitose de leveduras opsonizadas, de modo concentração dependente (Figura 7 B). Por outro lado, as PGD₂ e 15dPGJ₂ aumentaram a fagocitose dessas leveduras após 2 horas de incubação (Figura 7 A e C). Em estudo comparativo com 1 µM das prostaglandinas observamos claramente os efeitos antagônicos da PGE₂ e PGD₂ e seu metabólito 15dPGJ₂ (Figura 7 D). Com base nestes resultados, para os demais experimentos empregamos 1µM das prostaglandinas.

Figura 7. Efeito da PGE₂, PGD₂ e 15dPGJ₂ exógenas sobre a fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com IgG. Macrófagos foram pré-tratados com diferentes concentrações de PGD₂ (A), PGE₂ (B) ou 15dPGJ₂ (C) por 5 min antes da incubação com leveduras opsonizadas com IgG por 2 horas. Em (D) estudo comparativo do pré-tratamento com PGD₂, PGE₂ ou 15dPGJ₂. Os resultados são expressos como média ± SEM de intensidade de fluorescência (MIF) (n=6). Experimento representativo de 3 experimentos. **P*<0.05 quando comparado ao controle sem estímulo; #*P*<0.05 quando comparado PGE₂ com PGD₂ e 15dPGJ₂.

5.1.5) PGD₂ aumenta a fagocitose via receptor DP2, mas inibe via receptor DP1.

Investigamos a participação dos receptores DP1 e DP2 na atividade fagocítica de macrófagos alveolares empregando antagonistas específicos destes receptores, os compostos BW A868c e Bay u3405, respectivamente. A Figura 8 mostra o efeito da PGD₂ na presença dos antagonistas de DP1 e DP2. Podemos observar que a PGD₂ exógena na presença de antagonista DP1, aumentou em 160% a fagocitose de leveduras opsonizadas por macrófagos alveolares, quando comparado com macrófagos com estimulados somente PGD₂. No entanto, o pré-tratamento com o antagonista de DP2 (Bay u3405) diminui a fagocitose em 64%, quando comparado ao tratamento dos macrófagos com somente PGD₂ (Figura 8).

Figura 8. O aumento da fagocitose induzida por PGD₂ é mediada pelo receptor DP2. Macrófagos alveolares obtidos de ratos foram pré-tratados com antagonista de DP1 (BW A868c) ou DP2 (Bay u3405) (1μM) por 25 minutos, seguido da adição de PGD₂ (1μM) durante 5 minutos antes da incubação com a levedura. A leitura da fagocitose foi realizada 2 horas após incubação. Os valores são expressos em média da intensidade de fluorescência (MIF) da porcentagem do controle. *macrófagos alveolares incubados com meio (controle) versus os demais tratamentos. # PGD₂ versus antagonista DP1 ou DP2. $P < 0.05$.

5.1.6) PGE₂ aparentemente inibe a fagocitose de leveduras opsonizadas tanto via receptor EP2 como EP4.

Investigamos a participação dos receptores EP2 e EP4 na atividade fagocítica de macrófagos alveolares através da utilização de antagonistas desses receptores, os compostos AH6804 e AH23848, respectivamente. A Figura 9 mostra que mesmo na presença do antagonista de EP2 o efeito da PGE₂ exógena foi de inibir a fagocitose leveduras opsonizadas por macrófagos alveolares, quando comparado com os macrófagos sem tratamento (controle). Também observamos que na presença do antagonista de EP4, a PGE₂ também inibiu a fagocitose, quando comparado aos macrófagos não tratados (controle). Os dados sugerem que a PGE₂ inibe a fagocitose tanto via EP2 e como EP4. Novos experimentos serão realizados na presença simultânea dos dois antagonistas.

Figura 9. A PGE₂ sinaliza via receptor EP2 e EP4 inibindo a fagocitose de leveduras por macrófagos. Macrófagos alveolares obtidos de ratos foram pré-tratados com antagonista de EP2 (AH6804) ou EP4 (AH23848) (1μM), por 25 minutos, seguido da adição de PGE₂ (1μM) durante 5 minutos antes da incubação com a levedura. A leitura da fagocitose foi realizada 2 horas após incubação. Os valores são expressos em média da intensidade de fluorescência (MIF) da porcentagem do controle. * $P < 0.05$ macrófagos alveolares incubados com meio (controle) versus os demais tratamentos.

5.1.7) A 15dPGJ₂ induz aumento da fagocitose por mecanismo mediado pelos receptores DP1 e DP2.

Investigamos a participação 15dPGJ₂ via aos receptores DP1 e DP2 na atividade fagocítica de macrófagos alveolares, através do uso de antagonistas específicos destes receptores, os compostos BW A868c e Bay u3405, respectivamente. Na Figura 10 podemos observar que na presença dos antagonistas de DP1 ou DP2, a indução do aumento na fagocitose pela 15dPGJ₂ foi inibida, embora permaneça maior do que somente o macrófago incubado com o fungo. Estes resultados sugerem que a 15dPGJ₂ sinaliza via DP1 e DP2.

Figura 10. **A 15dPGJ₂ aumenta a fagocitose por mecanismo dependente dos receptores DP1 e DP2.** Macrófagos alveolares obtidos de ratos foram pré-tratados com antagonista de DP1 ou DP2 por 25 minutos (1μM), seguido da adição de 15dPGJ₂ (1μM) durante 5 minutos antes da incubação com a levedura. A leitura da fagocitose foi realizada 2 horas após incubação. Os valores são expressos em média da intensidade de fluorescência (MIF) da porcentagem do controle. *macrófagos alveolares incubados com meio (controle) versus os demais tratamentos. # 15dPGJ₂ versus 15dPGJ₂ mais antagonista DP1 ou DP2. $P < 0,05$.

5.1.8) PPAR- γ pode influenciar a fagocitose de IgG-opsonizado-*H.capsulatum*

Em seguida, avaliamos a participação do PPAR- γ na fagocitose induzida por PGD₂ e 15dPGJ₂. Para isso, os macrófagos alveolares foram pré-tratados com antagonista PPAR- γ , o GW 9656, na presença de PGD₂ ou 15dPGJ₂. Observamos que o antagonista de PPAR- γ inibiu significativamente o aumento da fagocitose induzida pela PGD₂ e 15dPGJ₂, sugerindo a contribuição parcial deste receptor nuclear (Figura 11 A). Como controle positivo utilizamos o Rosiglitazone, um agonista de PPAR- γ , e comparamos a fagocitose do *H.capsulatum* opsonizado e na ausência do mesmo. Na Figura 11 (B) observamos que este o tratamento com o agonista aumentou a fagocitose em 150%.

Figura 11. **Participação de PPAR- γ na fagocitose de *H.capsulatum* opsonizado (IgG) por macrófagos alveolares.** Macrófagos alveolares foram pré-tratados com GW9656 (10 μ M) ou veículo controle durante 25 min, e pré-tratada com PGD₂ (1 μ M) ou 15dPGJ₂ (1 μ M) durante 5 minutos antes da adição de *H.capsulatum* opsonizado (IgG) (A). Em (B) utilizamos o rosiglitazone (10 μ M) ou veículo controle durante 25 min antes da adição de *H.capsulatum* opsonizado (IgG). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de unidades de intensidade de fluorescência média (MIF) (n=6). * $P < 0,05$ comparado com o controle. # $P < 0,05$ comparado com PGD₂ ou 15dPGJ₂ com GW9662. Teste ANOVA foi utilizado.

5.1.9) Avaliação da atividade Fungicida de macrófagos alveolares incubados com diferentes prostanoides.

Após demonstrarmos que PGD_2 e 15dPGJ_2 aumentam a fagocitose de *H.capsulatum* opsonizado (IgG) por macrófagos alveolares, nosso próximo passo foi investigarmos o papel destes e da PGE_2 , e de seus receptores no mecanismo de morte do macrófago. Para isso, os macrófagos alveolares foram pré-tratados com PGD_2 na presença e ausência dos antagonistas para o DP_1 ou DP_2 . A Figura 12 (A) mostra o aumento da atividade fungicida do macrófago induzida pelo PGD_2 , e que este é um fenômeno dependente do receptor DP_2 , uma vez que o antagonista de DP_2 inibiu em aproximadamente 60% a ação da PGD_2 . É sabido que a PGE_2 atua como um supressor da fagocitose e morte de bactérias por macrófagos alveolares (SEREZANI et al., 2007). Para verificar essa supressão por PGE_2 utilizamos os antagonistas do EP_2 e EP_4 . Como esperado, o pré-tratamento com qualquer um dos antagonistas diminuiu a atividade fungicida em 44% e 66%, respectivamente (Figura 12 B). O próximo passo foi investigar a participação da 15dPGJ_2 no mecanismo microbicida dos macrófagos. A Figura 12 (C) mostra que macrófagos pré-tratados com 15dPGJ_2 na ausência ou presença dos antagonistas não alteraram a atividade fungicida.

Figura 12. Efeito da PGE₂, PGD₂ e 15dPGJ₂ exógenas sobre a atividade fungicida dos macrófagos incubados com *H. capsulatum*. Macrófagos alveolares foram pré-tratados com antagonista de DP1 (BWA868c), antagonista de DP2 (Bay-u3405) ou veículo controle, durante 25 min, e pré-tratados com PGD₂ (1 µM) (A), ou tratados os os mesmos antagonistas na presença de 15dPGJ₂ (1 µM) (C) por 5 minutos antes da adição de *H. capsulatum opsonizado (IgG)*. Outros, foram pré-tratados com antagonista de EP2 (AH 6809), de EP4 antagonista (AH 23848) ou veículo somente, durante 25 min e depois incubados com PGE₂ (1 µM) (B) por 5 minutos antes da adição de *H. capsulatum opsonizado (IgG)*. Após 48 horas de incubação, como descrito em material e métodos, a atividade fungicida foi avaliada. Os dados são expressos como a percentagem média de três experiências independentes. * $P < 0,05$

5.1.10) Prostaglandinas podem influenciar no “*killing*” de *H.capsulatum* através da produção de nitrito, H_2O_2 , IL-10 e TNF- α por macrófagos alveolares.

Depois de verificarmos a atividade fungicida, avaliamos se os tratamentos com as prostaglandinas interferiam na produção de citocinas, nitrito e produção de H_2O_2 por macrófagos na presença de IFN- γ após 48 horas de incubação com *H.capsulatum*. Na figura 13 (A) os macrófagos alveolares infectados e estimulados com diferentes tratamentos foram capazes de produzir nitrito, onde apenas o tratamento com $15dPGJ_2$ foi capaz de diminuir em 61% a produção de nitrito, diferente para o LTB_4 que aumentou a produção em 40%. Também quantificamos a produção de H_2O_2 , que foi aumentada durante a infecção de macrófagos com *H.capsulatum* opsonizado (IgG), e diminuída após o tratamento com PGE_2 ou com $15dPGJ_2$ em 27% e 23%, respectivamente (Figura 13 B). Na Figura 13 (C) mostramos que IL-10 é produzida após as 48 horas por macrófagos incubados com *H. capsulatum*, e diminuída durante a incubação com PGD_2 ou LTB_4 em 39% e 53%, respectivamente, quando comparado com *H.capsulatum* opsonizado (IgG). Por fim, a produção de TNF- α foi quantificada, e observou-se a produção desta citocina em todas as condições, quando comparado aos macrófagos alveolares sem infecção por *H.capsulatum*. Apenas o tratamento com PGE_2 foi capaz de diminuir a produção de TNF- α por macrófagos alveolares após as 48 horas de incubação com *H.capsulatum* (Figura 13 D).

Figura 13. **Produção de óxido nítrico, H₂O₂, IL-10 e TNF-α por macrófagos alveolares após pré-tratamento com prostanóides.** Macrófagos alveolares foram pré-tratados com a PGD₂, PGE₂ ou 15dPGJ₂ na concentração de 1 μM por 5 minutos antes da adição de *H.capsulatum* opsonizado (IgG) e após 48 horas quantificados o óxido nítrico, H₂O₂, IL-10 e TNF-α do sobrenadante destas células. Como controle foi utilizado LTB₄ (1 μM). Os dados são apresentados como média ± SEM de um resultado representativo de três experimentos independentes (n = 5-6). * *P* <0,05 comparado com o controle. # Hc-opsonizado versus outros tratamentos. ANOVA foi utilizado como teste.

5.1.11) Produção de LTB₄ por macrófagos alveolares após incubação com *H. capsulatum* e pré-tratamento ou não com PGD₂.

Nossos dados sugerem que o aumento da fagocitose e da atividade microbicida pela PGD₂ pode ser via aumento de LTB₄, portanto, um efeito indireto. Para comprovar isso, quantificamos LTB₄ após o estímulo com PGD₂ sobre macrófagos alveolares. Após 2 horas, demonstramos que a produção de LTB₄ diminuiu quando os macrófagos foram pré-tratados com PGD₂ na presença ou ausência do *H.capsulatum* (Figura 14 A). No entanto, somente em 48 horas de incubação com *H.capsulatum* opsonizado, os macrófagos alveolares que receberam o pretratamento com PGD₂ resultou no aumento da produção de LTB₄ (Figura 14 B).

Figura 14. **Produção de LTB₄ por macrófagos alveolares de rato pré-tratados com PGD₂.** Os macrófagos alveolares foram pré-tratados em presença ou não de PGD₂ (1 μ M) durante 5 minutos antes da adição de *H.capsulatum* opsonizado (IgG) no MOI 1:10 e incubados por 2 horas (A) e 48 horas (B). Após esse período os sobrenadantes foram coletados e quantificados 3o LTB₄. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 4). * $P < 0,05$ comparado com macrófago sem tratamento. # $P < 0,05$ comparado com macrófago incubado com *H.capsulatum* opsonizado (IgG). Teste ANOVA foi utilizado.

5.1.12) O tratamento com PGD₂ aumenta a expressão do receptor BLT1 em macrófagos alveolares.

Nossa próxima etapa foi investigar a possível efeito da PGD₂ na expressão de BLT1 por citometria de fluxo. Inicialmente observamos que os macrófagos alveolares incubados com *H.capsulatum* como descrito em Material e Métodos para Fagocitose, aumentam a expressão de BLT1 após 2 horas de incubação com o fungo. Interessantemente que ocorreu o aumento da expressão de BLT1 na membrana de macrófagos alveolares pré-tratados com PGD₂ (Figura 15), mas não com 15dPGJ₂ ou PGE₂.

Figura 15. **Expressão da molécula BLT1 na membrana de macrófagos alveolares de rato pré-tratados com prostaglandinas.** Os macrófagos alveolares foram pré-tratados em presença de PGD₂ (1 μM), PGE₂ (1μM) ou 15dPGJ₂ (1 μM) durante 5 minutos antes da adição de *H.capsulatum* opsonizado (IgG) no MOI 1:10 e incubados por 2 horas. Após esse período os macrófagos alveolares foram submetidos a marcação com anti-BLT1 (FITC) e analisados por citometria de fluxo. Os dados são expressos como média ± SEM (n = 4). * P < 0,05 comparado com macrófago somente com meio. # P < 0,05 comparado com macrófago infectado com *H.capsulatum* opsonizado (IgG) versus demais tratamentos. Teste ANOVA foi utilizado.

5.1.13) PGD₂ aumenta a fagocitose via BLT1 e DP2, e LTB₄ aumenta a fagocitose também via DP2 e BLT1.

Para confirmar se o aumento de BLT1 induzido pela PGD₂ influencia na fagocitose, utilizamos um antagonista de BLT1 (U75302). A Figura 16 mostra o efeito da concentração resposta de U75302 na fagocitose do fungo. Assim empregamos a concentração de 1µM para os nossos próximos experimentos de fagocitose. Avaliamos se o efeito da PGD₂ além de ser sinalizando via DP2, também poderia ser via BLT1. Na Figura 17, mostra que adição de LTB₄ aumenta a fagocitose, porém o pré-tratamento com o antagonista de BLT1 ou DP2 diminuíram significativamente a internalização do fungo. Este mesmo efeito foi observado com na presença de PGD₂ e dos dois antagonistas. Portanto, demonstramos que LTB₄ pode aumentar a fagocitose via DP2 e BLT1, e que a PGD₂ pode aumentar a fagocitose também via BLT1 e DP2.

Figura 16. **Concentração resposta do efeito do antagonista de BLT1 na fagocitose.** Macrófagos alveolares foram pré-tratados com diferentes concentrações de U75302 por 25 minutos, e na presença de LTB₄ durante 5 minutos antes da adição de *H.capsulatum* opsonizado (IgG) no MOI 1:10 e incubados por 2 horas. Os resultados são expressos como média ± SEM de intensidade de fluorescência (MIF) (n=6). Gráfico representativo de 1 experimento do total de 3 experimentos. * $P < 0.05$ comparado com controle (100%); # $P < 0.05$ comparado com LTB₄ versus demais tratamentos. Teste ANOVA foi utilizado.

Figura 17. **Papel dos receptores BLT1 e DP2 na fagocitose de *H.capsulatum* opsonizado (IgG).** Macrófagos alveolares foram pré-tratados na presença do antagonista BLT1 (U75302) ou antagonista DP2 (Bay-u3405) ou veículo controle, durante 25 minutos, e pré-tratados com PGD₂ (1 µM) ou LTB₄ (1 µM) por 5 minutos antes da adição de *H.capsulatum* opsonizado (IgG) (MOI 1:10) e incubados por 2 horas. Os dados são expressos como média ± SEM (n = 6). * $P < 0,05$ comparado com macrófago somente meio. # $P < 0,05$ comparado com macrófago incubado LTB₄ ou PGD₂ versus os demais tratamentos. Teste ANOVA foi utilizado.

PARTE II

5.2) Caracterização das micropartículas biodegradáveis

5.2.1) Análise de tamanho, potencial zeta e morfologia

Após a liofilização das MS obtidas pelo método de evaporação/extração do solvente, foi realizada a caracterização das mesmas, através da dispersão de seus diâmetros, após a reconstituição em água destilada e deionizada. O método escolhido foi a difratometria a laser em um granulômetro SALD. As Figuras 18 e 19 mostram a distribuição do diâmetro das MS. O diâmetro médio em 50% das MS controle (sem mediador lipídico) foi de $4,2 \pm 2,7 \mu\text{m}$ (Figura 18), e das micropartículas contendo PGD₂ (MS-PGD₂), foi de $5,0 \pm 3,3 \mu\text{m}$ (Figura 19). As Figuras 20 e 21 mostram a distribuição de potencial zeta das MS. As micropartículas contendo os mediadores encapsulados tiveram diâmetros semelhantes quando comparadas com as micropartículas controle sem mediadores lipídicos. Observamos que não houve diferenças relevantes entre as médias do potencial zeta das MS controle ($-13,8\text{mV} \pm 5,4 \text{ mV}$, Figura 20) e da MS-PGD₂ ($-13,8\text{mV} \pm 5,7 \text{ mV}$, Figura 21). Portanto, a encapsulação da PGD₂ proporcionou um bom tamanho e não resultou em alterações de carga elétrica na superfície do polímero (Tabela 6).

Além disto, determinamos a forma e a topografia das MS obtidas, através de microscopia eletrônica de varredura. As mesmas apresentaram formas esféricas, superfícies uniformes e sem poros. A variação de tamanho foi entre de 4 - 10 μm (Figuras 23 A-B). Todas as formulações apresentaram uma distribuição de tamanho heterogêneo e menor que 10 μm . No entanto, algumas das micropartículas apresentaram certa deformação, possivelmente devido à alta tensão elétrica utilizada na aquisição das imagens nos maiores aumentos.

Para verificar se as MS poderiam conter endotoxina (LPS), o teste “Limulus Ameobocyte Lysate” (LAL), cuja sensibilidade é de 0,1 a 1,0 unidade de endotoxina (UE) /mL, foi realizado. A quantidade de endotoxina foi menor que 0,1 UE/ μg de micropartícula. Segundo a Farmacopéia Européia, uma quantidade segura para administração endovenosa é 5,0 UE/kg/hora que corresponde a 0,1 UE por camundongo (20 g) por hora.

Figura 18. **Distribuição de tamanho da MS-control.** Média de diâmetro: 4.2 ± 2.7 μm ; d50: $3.678 \mu\text{m}$ ($< 1 \mu\text{m}$: 6,43 %, $< 10 \mu\text{m}$: 98,2 %, $< 100 \mu\text{m}$: 100 %, $< 1000 \mu\text{m}$: 100 %).

Figura 19. **Distribuição de tamanho da MS-PGD₂.** Média de diâmetro: 5.03 ± 3.3 μm ; d50: $4.658 \mu\text{m}$ ($< 1 \mu\text{m}$: 7,75 %, $< 10 \mu\text{m}$: 91,1 %, $< 100 \mu\text{m}$: 100 %, $< 1000 \mu\text{m}$: 100 %).

Figura 20. **Distribuição de potencial zeta da MS-controle.** Média de potencial zeta: $-13,8 \text{ mV} \pm 5,4 \text{ Mv}$.

Figura 21. **Distribuição de potencial zeta da MS-PGD₂.** Média de potencial zeta: $-13,8 \text{ mV} \pm 5,7 \text{ mV}$.

Tabela 6. Caracterização das MS

PLGA MS	Tamanho	Pontecial Zeta
MS-controle	$4.2 \pm 2.7\mu\text{m}$	$-16.5\text{ mV} \pm 4.7\text{mV}$
MS-PGD ₂	$5.03 \pm 3.3\mu\text{m}$	$-13.8\text{ mV} \pm 5.7\text{mV}$

Figura 22. Foto da Microscopia eletrônica de varredura das MS controle (A), MS-PGD₂ (B).

5.2.2) Eficiência de encapsulação e estudo de liberação *in vitro*.

No início do processo de microencapsulação, adicionamos 300 μL de PGD_2 contendo 750 μg do lipídio em 100 mg do polímero PLGA 50:50, e determinamos as liberações acumulativas de PGD_2 , do interior das MS por difusão, durante 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 9, 12, 24 e 48 horas. Os valores foram representados como media $\pm$ desvio padrão. Os valores foram determinados a partir de 100% de encapsulação, equivalente em 5 mg de micropartícula de PGD_2 o valor de 37.500 ng, porém, determinamos apenas 13.500 ng em 5 mg, ou seja, 2.700 ng em 1mg de PGD_2 . Assim a eficiência de encapsulamento da PGD_2 foi de 36%. Outro experimento foi realizado com um novo lote da PGD_2 e obtivemos uma eficiência de 44%. Desta forma, demonstramos a reprodutividade do método. A Figura 23 mostra a cinética de liberação *in vitro* da PGD_2 das MS. Analisamos

Tabela 7. Taxa de Encapsulação

Lote da MS- PGD_2	Taxa de Encapsulação (%)
Lote 01	36%
Lote 02	44%

Figura 23. **Concentração de PGD_2 liberada *in vitro* das MS de PLGA 50:50 após diferentes períodos de incubação.** Valores determinados conforme descrito em materiais e métodos; n = 3 para cada tempo analisado.

5.2.3) Atividades biológicas das micropartículas, *in vitro*

5.2.3.1) Viabilidade dos macrófagos incubados com as Micropartículas de PLGA

Após a caracterização das MS, foram realizados ensaio de citotoxicidade *in vitro* através da redução do brometo de tiazolil – (3- [4,5-Dimetiltiazol-2- il]-2,5-difeniltetrazólio – Sal de tetrazólio MTT). As MS-controle, MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel foram incubadas por 24 horas com macrófagos alveolares de rato. Nossos resultados mostraram que as MS-controle (PLGA 50:50), MS-PGD₂ ou solúvel não foram citotóxicos para o macrófago alveolar no período avaliado.

Figura 24. **Viabilidade dos macrófagos alveolares.** Macrófagos alveolares foram incubados com MS-controle, MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel. Células em meio foram utilizados como controle negativo (100% de viabilidade), e como controle positivo foi utilizado DMSO (100% de morte). Os valores são expressos como media $\pm$ SEM de citotoxicidade em comparação ao controle negativo (somente meio) com 6 poços de condição. * $P < 0,05$ macrófago somente com meio *versus* as demais incubações com os macrófagos.

5.2.3.2) Fagocitose das MS-PGD₂ ou MS-PGE₂ por macrófagos alveolares.

O ensaio de fagocitose foi realizado utilizando macrófagos alveolares de rato incubados com as diferentes MS durante 4, 24 e 48 h, a 37°C e 5% CO₂. Para comparação empregamos MS-PGE₂, a qual inibe a fagocitose, como já descrita por Nicolette e colaboradores (2008). A fagocitose das micropartículas foi avaliada considerando a porcentagem de células que ingeriu no mínimo uma MS (% Fagocitose) (Figura 25). No período de 4 horas de fagocitose, o número de macrófagos alveolares que fagocitaram no mínimo uma MS-PGD₂ foi maior (Figura 25 A). Em 24 horas, 92% dos macrófagos alveolares fagocitaram as MS-controle ou MS-PGD₂, diferente para MS-PGE₂ com 85% de fagocitose (Figura 25 B). Para 48 horas de incubação com MS-controle ou MS-PGD₂, todos os macrófagos (100%) fagocitaram no mínimo uma micropartícula, contrário para as MS-PGE₂, com 9% de macrófagos alveolares que não havia fagocitado (Figura 25 C).

Avaliamos também o índice fagocítico (IF = número de MS fagocitadas x número de macrófagos alveolares contendo no mínimo uma MS/número total de macrófagos alveolares contados) (Figura 26). No período de 4 horas de incubação os macrófagos alveolares aumentaram a fagocitose com MS-PGD₂, com 216 de índice fagocítico quando comparado à incubação com MS-controle (122 ± 4 IF). Em 24 horas, macrófagos incubados com MS-PGD₂ apresentou índice fagocítico maior (4779 ± 164 IF). O índice fagocítico dos macrófagos incubados com MS-PGE₂ foi de $313,3 \pm 40$ IF, e MS-controle teve IF de $3934 \pm 139,4$ IF (Figura 26B). Após 48 horas, os macrófagos incubados com MS-PGD₂ apresentaram maior IF ($17820 \pm 407,3$), MS-PGE₂ tiveram menor IF ($30547 \pm 99,78$) (Figura 26C). Nossos dados confirmam que MS-PGE₂ inibe a fagocitose enquanto as MS-PGD₂ aumentam.

Figura 25. **Porcentagem de fagocitose dos macrófagos alveolares incubados com as diferentes micropartículas.** A porcentagem de células que ingeriu no mínimo uma MS (% Fagocitose) foi calculada depois de 4 horas (A), 24 horas (B) e 48 horas (C). A quantidade utilizada das MS foi 1mg/mL. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Os resultados são representativos de 1 do total de 3 experimentos com quatro poços em cada condição ($n = 4$). * $P < 0,05$ em relação aos valores obtidos com macrófagos alveolares incubados com MS controle; # $P < 0,05$ em relação aos valores obtidos com macrófagos alveolares incubados com MS-PGD₂.

Figura 26. **O índice fagocítico dos macrófagos alveolares incubados com as diferentes micropartículas.** Índice fagocítico foi calculado depois de 4 horas (A), 24 horas (B) e 48 horas (C). A quantidade utilizada das MS foi 1mg/mL. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio-padrão. Os resultados são representativos de 1 do total de 3 experimentos com quatro poços em cada condição ($n = 4$). * $P < 0,05$ em relação aos valores obtidos com macrófagos alveolares incubados com MS controle; # $P < 0,05$ em relação aos valores obtidos com macrófagos alveolares incubados com MS-PGD₂.

5.2.3.3) MS induzem discreta, mas significativa produção de nitrito por macrófagos alveolares em cultura.

A produção de NO foi determinada a partir da detecção de nitrito (NO^{2-}) a fim de avaliar a ativação dos macrófagos alveolares incubados com as MS. Verificamos que os macrófagos alveolares após 4 horas de incubação com MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel produziram maiores quantidades de NO^{2-} quando comparado com MS controle ou com células somente em meio (Figura 27 A). Neste período também a produção de NO por macrófagos incubados com MS-PGD₂ foi maior do que células somente na presença de PGD₂ solúvel. Após 24 horas de incubação, MS-PGD₂ induziram mais NO^{2-} quando comparada a MS-controle e PGD₂ solúvel (Figura 27 B). Após 48 horas, observamos aumento da produção de NO^{2-} por macrófagos incubados com MS-controle ou MS-PGD₂, mas sem diferença entre estes grupos (Figura 27 C). Utilizamos como controle de nosso ensaio o LPS (0,5µg/mL), o qual induziu uma grande produção de NO^{2-} após 24 e 48 horas de incubação (Figura 31 D).

Figura 27. Nitrito (NO_2^-) no sobrenadante da cultura de macrófagos alveolares estimulados com MS. O nitrito foi quantificado durante 4h (A), 24h (B) e 48h (C) após incubação com as MS. Utilizamos como controle positivo da produção de nitrito o LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$) em diversos tempos (D). A quantidade utilizada das MS foi 1mg/mL e para PGD_2 solúvel 3 μM . Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3-4$). * $P < 0,05$, em comparação aos valores do meio (células sem estímulo); # $P < 0,05$ em relação às MS controle; & $P < 0,05$ em relação às MS- PGD_2 .

5.2.3.4) MS ativam o fator de transcrição NF- κ B em macrófagos alveolares.

Os macrófagos alveolares foram incubados com somente meio, MS-PGD₂ ou PGD₂ durante 4h. Após este período realizamos o ensaio de imunofluorescência para detecção de NF- κ B (subunidade p65) como descrito em materiais e métodos. Verificamos que ocorreu ativação de NF- κ B nos macrófagos alveolares estimulados com as MS-PGD₂, ou PGD₂ solúvel quando comparado com células sem estímulos, através da observação da translocação (subunidade p65) deste fator de transcrição para o núcleo celular.

Figura 28. **Imagens confocais de macrófagos alveolares** incubados com somene meio (A), MS-PGD₂ (B) ou PGD₂ solúvel (C). As imagens mostram a marcação para núcleo celular (DAPI, azul), NF-κB (vermelho) e colocalização das imagens (rosada), respectivamente.

5.2.3.5) Ativação de NFκB em células Raw blue™ incubadas com MS.

Avaliamos a ativação do NFκB pela atividade da SEAP em células RAW-Blue™, como descrito no material e métodos. Após 24 horas com incubação com MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel mostramos na Figura 29 que a incubação com MS-PGD₂ induziu maior ativação NFκB quando comparado ao macrófagos incubados somente com meio ou comparado com PGD₂ solúvel.

Figura 29. **Ativação de NFκB/ atividade SEAP.** Os macrófagos foram incubados com somente meio, MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel por 24 horas. O sobrenadante foi coletado e analisado em meio específico a coloração azul, como descrito em matérias e métodos. Os valores indicam a média ± SEM de um resultado representativo de dois experimentos independentes. O teste ANOVA foi utilizado. * $P < 0.05$ comparado com o meio; # $P < 0.05$ comparado com MS-PGD₂.

5.2.3.6) Concentração de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares incubados com as MS.

As citocinas inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , e antiinflamatória TGF- β foram quantificadas no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares incubados com as diferentes MS por 24 e 48 horas. A Figura 30 mostra a concentração de citocinas nas 24 horas (A, C, E) e 48 horas (B, D, F) após a incubação das MS com macrófagos alveolares. A incubação de macrófagos alveolares com MS-PGD₂ resultou em aumento de TNF- α e IL-1 β após 24 e 48 horas e de TGF- β 48 horas após. Observamos que macrófagos alveolares incubados com a PGD₂ solúvel aumentaram a produção de IL-1 β em 24 hoas e de TGF- β 48 horas após. A PGD₂ solúvel foi utilizada para comparação com a incubação da MS-PGD₂ com os macrófagos alveolares, onde mostramos que esta incubação diminuiu a produção TNF- α em 24 horas e de TNF- α e IL-1 β em 48 horas após. A incubação dos macrófagos alveoalres com MS-controle não induziu significativamente a produção das citocinas em nenhum dos tempos avaliados.

Figura 30. **Produção do TNF- α , IL-1 β e TGF- β por macrófagos alveolares após incubação com MS-controle, MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel.** Os macrófagos foram incubados com somente meio, MS-controle, MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel por 24 horas e 48 horas. A concentração utilizada das MS foi 1 mg/mL e de PGD₂ solúvel foi 3 μ M. Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.E.M. de um representativo de três experimentos ($n = 5-6$), * $P < 0,05$ em relação ao meio; # MS-controle versus os demais tratamentos; & MS-PGD₂ versus PGD₂ solúvel.

5.2.3.7) Tratamento com MS-PGD₂ modifica a liberação de nitrito, IL-1 β e IL-6 por macrófagos alveolares pré-incubados com LPS.

Nosso próximo passo foi investigar o efeito das MS-PGD₂ sobre a produção de NO, TNF- α , IL-1 β e IL-6 por macrófagos pré-tratados com LPS. Após 24 horas de estímulo com LPS e MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel (desenho experimental na Figura 31 A), os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO e citocinas determinada. Como observado na Figura 31 (B) o tratamento com MS-PGD₂ aumentou em 40% a produção de NO por macrófagos alveolares, quando comparado com LPS somente. Para a comparação utilizamos PGD₂ solúvel e observamos que MS-PGD₂ aumentou a produção de NO em 41%. Como mostrado na Figura 31 (C, D, E) o estímulo com LPS aumenta a produção de citocinas por macrófagos alveolares. O tratamento com MS-PGD₂ aumentou produção IL-1 β (Figura 31 D) e diminuiu a produção de IL-6 (Figura 31 E) por macrófagos alveolares, quando estes foram comparados com os macrófagos alveolares incubados somente com LPS. Como comparação ao tratamento dos macrófagos com MS-PGD₂, o tratamento com PGD₂ solúvel diminuiu a produção de IL-1 β por estas células.

Figura 31. **Produção de NO, TNF-α, IL-1β e IL-6 por macrófagos alveolares pré-estimulados com LPS e posteriormente tratados com MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel.** Os macrófagos alveolares foram estimulados com LPS (0,5 μg/ml) e após 2 h foram incubados com MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel (A). A quantidade de NO presente (B) no sobrenadante foi determinada por ensaio de Greiss. A quantidade de TNF-α (C), a IL-1β (D) e de IL-6 (E) presente no sobrenadante foi determinada por ensaio de ELISA. Os sobrenadantes foram recolhidos após 24 h do LPS. A concentração utilizada das MS foi 1 mg/mL e de PGD₂ solúvel foi 3 μM. Os valores são expressos como média ± SD (n = 6) de dois experimentos independentes. * *P* <0,05 em relação às células em meio somente; # *P* <0,05 LPS versus demais incubações, & *P* <0,05 MS-PGD₂ versus PGD₂.

PARTE III

5.3) Avaliação do papel da PGD₂ *in vivo* em comparação com PGE₂ durante a resposta imune celular na infecção por *H.capsulatum* em camundongos.

5.3.1) Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 infectados com inóculo subletal *H. capsulatum*, tratados ou não com inibidor da PGD sintase, composto HQL-79.

Para determinarmos o papel das PGD₂ na histoplasmose pulmonar murina, primeiramente, os animais foram infectados com o inóculo subletal (5×10^5 leveduras/animal) de *H. capsulatum* e tratados ou não com HQL-79 (3 mg/kg) diariamente e acompanhados por até 60 dias após infecção. A morte dos animais foi registrada diariamente, e a curva de sobrevivência determinada. Nossos resultados demonstraram que animais infectados com inóculo subletal e tratados com HQL-79 apresentaram mortalidade de 40%, enquanto animais infectados e não tratados tiveram 20% de mortalidade (Figura 32).

Figura 32. Inibição de PGD_2 diminui sobrevivência de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*. Os animais foram infectados com inóculo de 5×10^5 leveduras e tratados ou não com HQL-79 diariamente (3mg/Kg) via oral. Animais controles receberam i.t. apenas 100 μL de PBS estéril. Os animais foram acompanhados por 60 dias após infecção. Os resultados foram obtidos de um experimento com número de 10 animais por condição.

5.3.2) Efeito da inibição da síntese de PGD₂ na produção de quimiocina e citocinas por células do pulmão durante a infecção por *H. capsulatum*.

O aumento da morte dos animais infectados e tratados com HQL-79 pode ser devido à alteração na produção de citocinas inflamatórias. Desta forma, avaliamos as citocinas e quimiocina presentes nos pulmões dos animais infectados tratados ou não com HQL-79. Como mostra a Figura 33 A, em comparação aos não infectados, a concentração de IL-6 nos pulmões aumentou a partir do 2º dia após infecção, sendo que o pico ocorreu no 14º dia. Contudo, no 14º dia após a infecção, a produção de IL-6 pelas células de pulmões dos animais infectados e tratados com HQL-79 foi significativamente menor, quando comparada com animais infectados e sem tratamento (Figura 37 A). As Figuras 37 (B) (C) (D) (E) (F) mostram que em animais infectados com o inóculo subletal as concentrações de TNF- α , KC, IL-10, IL-1 β e IL-12 aumentaram ao longo da infecção. A inibição da síntese de PGD₂ aumentou significativamente a produção de TNF- α , KC, IL-10, IL-1 β e IL-12 quando comparado com animais somente infectados. A concentração de IFN- γ aumentou no 7º dia e diminuiu após 14 dias da infecção em animais tratados com HQL-79 quando comparado com os animais infectados e sem tratamento (Figura 37 G).

Figura 33. **Efeito da inibição da PGD_2 na produção de quimiocina e citocinas no parênquima pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*.** Concentração de IL-6 (**A**), de $\text{TNF-}\alpha$ (**B**), KC (**C**), IL-10 (**D**), IL-1 β (**E**), IL-12 (**F**) e IFN- γ (**G**) em pulmões de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) e tratados a cada 24 horas ou não com 3 mg/kg de HQL-79 via oral. Animais controles receberam i.t. apenas 100 μL de PBS estéril. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 5-6$). * $P < 0,05$ PBS versus *H.c.* ou *H.c.* tratado com HQL-79; # $P < 0,05$ *H.c.* versus *H.c.* tratado com HQL-79.

5.3.3) Concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de homogeneizado de pulmão de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum* e tratados ou não com HQL-79.

Observamos que nos animais somente infectados com *H. capsulatum* o pico da produção de NO foi no 14º dia após infecção quando comparado com os animais não infectados. Interessantemente que os animais infectados e tratados com HQL-79 tiveram a produção de NO maior no 14º dia e 28º dia após infecção, quando comparado com os animais infectados e não tratados (Figura 34).

Figura 34. **Produção de NO_2^- nos pulmões de animais infectados aumentou com o tratamento com HQL-79.** Produção de NO_2^- no sobrenadante do homogeneizado de pulmões de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) e tratados a cada 24 horas ou não com 3 mg/kg de HQL-79 via oral. Animais controles receberam i.t. apenas 100 µL de PBS estéril. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n=5-6). * $P < 0,05$ PBS versus *H.c.* ou *H.c.* tratado com HQL-79; # $P < 0,05$ *H.c.* versus *H.c.* tratado com HQL-79.

5.3.4) Concentração das prostaglandinas no homogeneizado dos pulmões de camundongos infectados com *H. capsulatum* e tratados com o composto HQL-79.

A Concentração da PGE₂ e PGD₂ foi determinada após infecção de camundongos com o inóculo subletal (5×10^5 leveduras/animal) de *H. capsulatum* e tratados ou não com inibidor de PGD₂, o composto HQL-79 (3 mg/Kg). O tratamento com HQL-79 diminuiu a produção de PGD₂ no pulmão dos animais após 14 e 28 dias da infecção, quando comparado ao pulmão de animais que receberam somente água (Figura 35 A). Por outro lado, o tratamento com HQL-79 aumentou a produção de PGE₂ no pulmão dos animais infectados em todos os períodos avaliados (Figura 35 B).

Figura 35. **Produção de PGD₂ e PGE₂ nos pulmões de animais infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não com HQL-79.** A PGD₂ e PGE₂ foram quantificadas pelo método de ELISA do sobrenadante do homogeneizado de pulmões de animais infectados ou não com inóculo subletal *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) e tratados ou não com HL-79 (3 mg/kg). Animais controles receberam i.t. apenas 100 μ L de PBS estéril. Os animais não infectados foram utilizados como controle (linha tracejada). Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 5-6). * $P < 0,05$ PBS versus *H.c.* ou *H.c.* tratado com HQL-79; # $P < 0,05$ *H.c.* versus *H.c.* tratado com HQL-79.

5.3.5. Histopatologia do parênquima pulmonar dos animais infectados e tratados ou não com HQL-79.

A histopatologia dos fragmentos dos pulmões de animais infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não HQL-79 foi avaliada após 2, 7, 14 e 28 dias de infecção. Os cortes foram submetidos à coloração com hematoxilina-eosina (HE). Conforme esperado, os parênquimas pulmonares de animais não infectados apresentaram-se íntegros com nenhuma ou com mínima reação inflamatória (não demonstrado). No 2º dia de infecção, o parênquima pulmonar apresentou lesão com predominância de neutrófilos e alguns macrófagos (Figura 36 A). No entanto, em pulmões de animais infectados e tratados com 3 mg/kg de HQL-79, observamos desde o 2º dia após a infecção um processo inflamatório com aglomerados de macrófagos e neutrófilos (Figura 36 B). No 7º dia de infecção observamos no pulmão de animais infectados menor comprometimento tecidual quando comparado ao pulmão de animais que receberam o tratamento oral com HQL-79 (Figuras 36 C e D), com predomínio de processo inflamatório granulomatoso confluyente peribronquiolar e alveolar, composto por macrófagos e com intenso influxo de neutrófilos (Figura 36 D). Como observado nas Figuras 36 (E) e (F), no 14º dia da infecção o parênquima pulmonar de animais somente infectados e animais infectados tratados com HQL-79, apresentaram intenso processo inflamatório granulomatoso, composto por macrófagos e muitos neutrófilos. No 28º dia, os cortes histológicos de animais infectados apresentaram o predomínio de macrófagos e poucos neutrófilos no parênquima pulmonar (Figura 36 G), com diminuição do processo inflamatório quando comparado ao 14º dia de infecção (Figura 36 E). Entretanto, observamos o pulmão de animais infectados e tratados com HQL-79, apresentaram infiltrado mononuclear e neutrófilos no parênquima pulmonar (Figura 36 H), semelhante ao corte do pulmão de animais infectados e tratados com HQL-79 (Figura 36 F). Outra coloração utilizada foi GMS, que possibilita a visualização das leveduras presentes nos cortes histológicos do pulmão dos animais infectados. Mostramos no 2º, 7º, 14º e 28º dia de infecção a presença da levedura nos pulmões após coloração de GMS. Demonstramos o aumento do número de leveduras de *H. capsulatum* no parênquima de animais infectados tratados com HQL-79 (Figura 37) para todos os períodos mostrados.

Figura 36. Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados e tratados ou não com HQL-79. Cortes histológicos de pulmões de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e mortos no 2º dia (A), 7º (C) 14º dia (E), e 28º dia (G) após infecção. Animais infectados com o inóculo subletal e tratados diariamente por via oral com HQL-79 (3 mg/kg) e mortos no 2º dia (B), 7º dia (D) 14º dia (F) e 28º dia (H) após infecção. Coloração Hematoxilina- Eosina H.E. (aumento de 100x).

Figura 37. Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados e tratados ou não com HQL-79 corados com GMS. Cortes histológicos de pulmões de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e mortos no 2º dia (A), 7º (C) 14º dia (E), e 28º dia (G) após infecção. Animais infectados com o inóculo subletal e tratados diariamente por via oral com HQL-79 (3 mg/kg) e mortos no 2º dia (B), 7º dia (D) 14º dia (F) e 28º dia (H) após infecção. Coloração Prata de Grocott-GMS (aumento de 400x).

5.3.6) Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas dos pulmões e baços de animais infectados com *H. capsulatum* e tratados com a administração intranasal de MS contendo PGD₂ ou PGE₂.

Nosso próximo passo foi determinar o efeito da administração exógena das PGD₂ e PGE₂ em animais infectados com inóculo subletal (5×10^5 leveduras) de *H.capsulatum*. Neste experimento utilizamos ainda como controle as prostaglandinas solúveis. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com MS-PGD₂ a cada três dias (0,6µg/20µl/i.n.) diminui a carga fúngica no pulmão e baço (Figura 38 A e B), quando comparado com animais somente infectados. O tratamento com PGD₂ solúvel, MS-PGE₂ ou PGE₂ solúvel não alteraram o número de leveduras no pulmão e baço desses animais infectados.

Figura 38. **Carga fúngica dos pulmões e baço de camundongos infectados tratados ou não com prostaglandinas encapsuladas ou solúveis.** UFC recuperadas dos pulmões (A) e baço (B) de animais infectados com inóculo subletal *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) e tratados com MS-controle, MS-PGD₂, PGD₂, MS-PGE₂ ou PGE₂ como descrito em materiais e métodos. Os animais foram mortos 14 dias após infecção. As MS ou prostaglandinas solúveis foram administradas i.n. com a primeira administração no 1º dia após a infecção, com a repetição de 3 em 3 dias ($0,6 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}/\text{i.n.}$). Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM ($n=5-6$). # $P < 0,05$ *H. capsulatum* (Hc) versus *H. capsulatum* (Hc) tratamentos.

5.3.7) Efeito da PGD₂ e PGE₂ encapsuladas ou não no recrutamento de células inflamatórias para os pulmões de animais infectados.

Para analisar qual o efeito das PGD₂ e PGE₂ durante a resposta inflamatória induzida por *H. capsulatum*, determinamos o número total e diferencial das células inflamatórias recrutadas para o espaço broncoalveolar dos animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*, e tratados ou não com MS-PGD₂, MS-PGE₂ ou as respectivas prostaglandinas solúveis. As Figuras 39 (A) (B) mostram aumento do influxo de células totais e neutrófilos após infecção, e que os tratamentos com as diferentes MS ou prostaglandinas solúveis resultou na diminuição do recrutamento destas células para o espaço broncoalveolar. Observamos diferenças somente entre os grupos que receberam da PGE₂ encapsulada e da PGE₂ solúvel, sendo a encapsulada mais eficiente em reduzir o número de células totais e de neutrófilos para o espaço broncoalveolar. Por outro lado, não observamos diferenças estatísticas no número de células mononucleares após os diferentes tratamentos (MS-Controle, MS-PGD₂, MS-PGE₂ ou prostaglandinas solúveis), quando comparado aos animais somente infectados ou tratados com MS-controle (Figura 39 C).

Figura 39. Número de células inflamatórias no espaço broncoalveolar de camundongos infectados e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD₂, MS-PGE₂, PGD₂ ou PGE₂ solúveis. (A) Células totais, (B) neutrófilos e (C) células mononucleares recuperadas do espaço broncoalveolar de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD₂, MS-PGE₂, PGD₂ ou PGE₂, como descrito em materiais e métodos. Os animais foram mortos 14 dias após infecção. As MS ou prostaglandinas solúveis foram administradas i.n. com a primeira administração no 1º dia após a infecção, com a repetição de 3 em 3 dias (0,6µg/20µl/i.n.). Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 6). * $P < 0,05$, PBS versus os demais grupos; # $P < 0,05$, animais infectados com *Hc* versus os demais grupos; & $P < 0,05$, animais infectados tratados MS-PGE₂ versus PGE₂.

5.3.8) Concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de homogeneizado de pulmão de camundongos infectados e tratados com a administração intranasal de MS contendo PGD_2 ou PGE_2 .

Nossos resultados da Figura 40 demonstram no 14º dia após a infecção com inóculo subletal *H. capsulatum* que ocorreu aumento significativo de NO_2^- quando comparado aos animais que receberam PBS. Nos animais somente infectados, observamos aumento discreto, mas significativo, de NO somente naqueles que receberam MS- PGE_2 (45%).

Figura 40. **Concentração de NO_2^- nos pulmões de camundongos infectados e tratados ou não com MS-controle, MS- PGD_2 , MS- PGE_2 , PGD_2 ou PGE_2 solúveis.** Produção de NO_2^- no sobrenadante do homogeneizado de pulmões de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) e tratados ou não com MS-controle, MS- PGD_2 , MS- PGE_2 , PGD_2 ou PGE_2 , como descrito em materiais e métodos. Os animais foram mortos 14 dias após infecção. As MS ou prostaglandinas solúveis foram administradas i.n. com a primeira administração no 1º dia após a infecção, com a repetição de 3 em 3 dias ($0,6 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}/\text{i.n.}$). Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM ($n=5-6$). * $P < 0,05$, PBS versus demais grupos; # $P < 0,05$ *H. capsulatum* (Hc) versus demais grupos.

5.3.9) Marcação da enzima iNOS nos pulmões de camundongos infectados com *H. capsulatum* e tratados com diferentes MS.

Nosso próximo passo foi determinar a expressão da enzima iNOS, por imunohistoquímica (como descrito em materiais e métodos) nos pulmões dos camundongos infectados com inóculo subletal de *H.capsulatum* e tratados ou não com MS-PGD₂, MS-PGE₂ ou as respectivas prostaglandinas solúveis. Nos animais infectados, observamos aumento da expressão da enzima iNOS nos pulmões dos camundongos infectados (Figura 41). Aparentemente, marcação para a enzima iNOs no pulmão de animais infectados e tratados com MS-PGD₂ foi menor (Figura 41 C) e maior para os animais infectados e tratados com MS-PGE₂ (Figura 41E).

Figura 41. **Marcação de imuno-histoquímica para a enzima iNOs nos pulmões de animais infectados com *H.capsulatum* e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD₂, MS-PGE₂, PGD₂ ou PGE₂ solúveis.** Imuno-histoquímica de cortes de pulmões obtidos de camundongos infectados com *H. capsulatum* (A), infectados e tratados com MS-controle (B), infectados e tratados com MS-PGD₂ (C), infectados e tratados com PGD₂ solúvel (D), infectados e tratados com MS-PGE₂ (E), infectado e tratados com PGE₂ (F) foram incubados com o anticorpo primário anti-iNOs e anticorpo secundário biotinilado anti-coelho e revelados com o kit DAB produzindo uma marcação de cor marrom.

5.3.10) Efeito do tratamento com MS contendo prostaglandinas na produção de citocinas e quimiocina por células do pulmão de animais infectados com inóculo subletal de *H.capsulatum*.

Mostramos pela figura 39 que o recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar durante a infecção com inóculo subletal de *H. capsulatum* é parcialmente dependente das prostaglandinas. Além disso, sabemos que outros mediadores estão envolvidos no recrutamento celular nesta infecção. Desta forma, avaliamos as citocinas presentes nos pulmões dos animais dos diferentes grupos experimentais, as quais podem estar envolvidas com o recrutamento celular ou na ativação da resposta imune.

A Figura 42 mostra como esperado e já descrito por nós, que concentração das citocinas e quimiocina produzidas nos pulmões de animais infectados com *H.capsulatum* foi maior quando comparada com os animais não infectados. No entanto, concentração de IL-6, TNF- α , KC e IFN- γ nos pulmões dos animais infectados e tratados com MS-PGD₂ diminuíram após 14 dias da infecção, quando comparado aos animais somente infectados (Figura 42 A, B, C e H). Na Figura 42 (D) mostra que somente em animais infectados e tratados com PGE₂ solúvel ou encapsulada aumentaram a produção da IL-10 por células do pulmão desses animais quando comparado aos animais somente infectados. A produção de TGF- β e IL-1 β por células dos pulmões de animais tratados não foi alterada (Figura 42 E e F). A concentração de IL-12 diminui em animais infectados e tratados com MS-controle, PGD₂ e PGE₂ solúveis, quando comparado aos animais infectados sem tratamento (Figura 42 G).

Figura 42. Tratamento com MS influencia na produção de quimiocina e citocinas no parênquima pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*. Concentração de IL-6 (A), de TNF-α (B), KC (C), IL-10 (D), TGF-β (E), IL-1β (F) IL-12 (G) e IFN-γ (G) em pulmões de animais infectados com inóculo subletal *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) e tratados com MS-control, MS-PGD₂, PGD₂ solúvel, MS-PGE₂ ou PGE₂ solúvel como descrito em materiais e métodos. Os animais foram mortos 14 dias após infecção. As MS ou prostaglandinas solúveis foram administradas i.n. com a primeira administração no 1º dia após a infecção, com a repetição de 3 em 3 dias (0,6µg/20µl/i.n.). Animais controles receberam i.t. apenas 100 µL de PBS estéril. Os resultados são expressos como média ± SEM (n=5-6). * $P < 0,05$ BS versus demais grupos; # $P < 0,05$ *H.c.* versus *H.c.* mais tratamentos; & $P < 0,05$ tratamento com MS-PGE₂ versus tratamento com PGE₂ solúvel.

5.3.11) Histopatologia do parênquima pulmonar dos animais infectados e tratados com MS.

A histopatologia dos fragmentos dos pulmões de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com MS-PGD₂, MS-PGE₂ ou as respectivas prostaglandinas solúveis. Os cortes foram submetidos a coloração com hematoxilina-eosina (HE). No 14º dia de infecção, observamos nos cortes do pulmão de animais infectados maior comprometimento tecidual, com característico processo inflamatório granulomatoso confluyente peribronquiolar e alveolar, composto por macrófagos e com intenso influxo de neutrófilos (Figura 43 A). O mesmo perfil histopatológico de comprometimento tecidual foi observado na Figura 43 (B) no parênquima pulmonar de animais infectados e tratados com MS-controle. Na Figura 43 (C), observamos menor processo inflamatório granulomatoso, composto por muitos macrófagos e alguns neutrófilos, quando os animais foram infectados e tratados com MS-PGD₂. Nos cortes histológicos de animais infectados e tratados com MS-PGE₂ ou PGE₂ solúvel observamos o predomínio de macrófagos e neutrófilos no parênquima pulmonar, e com intenso infiltrado mononuclear e peribronquiolar, e neutrófilos (Figura 43 E, F). Entretanto, quando os animais infectados e tratados com PGD₂ solúvel, apresentaram pouco infiltrado mononuclear no parênquima pulmonar próximo ao eixo peribroncovascular (Figura 43 D), porém com maior infiltrado com observamos os cortes do parênquima pulmonar de animais infectados e tratados com MS-PGD₂ (Figura 43 C).

Através dos cortes histológicos do pulmão destes animais, mostramos no 14º dia de infecção, após coloração de GMS, a presença de leveduras no centro das lesões pulmonares e no interior dos macrófagos alveolares, tanto dos animais infectados como naqueles infectados e tratados (Figura 44). Observamos diferenças na quantidade de leveduras no parênquima nos animais infectados tratados com MS-Controle (Figura 44 B), mas principalmente com diminuição do número de leveduras nos animais tratados com MS-PGD₂ (Figura 44 C). Por outro lado, a MS-PGE₂ em animais infectados e tratados parece ter aumentado a carga fúngica no pulmão (Figura 44 E). Desta forma, observamos o antagonismo entre as duas prostaglandinas encapsuladas, a MS-PGD₂ diminui a carga fúngica nos pulmões,

enquanto a MS-PGE₂ favorece o crescimento do *H. capsulatum* no pulmão dos animais.

Figura 43. Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados com *H.capsulatum* e tratados ou não com MS-control, MS-PGD₂, MS-PGE₂, PGD₂ ou PGE₂ solúveis. Cortes histológicos de pulmões de animais infectados com inóculo subletal *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) (A) e tratados com MS-control (B), MS-PGD₂ (C), PGD₂ solúvel (D), MS-PGE₂ (E) ou PGE₂ solúvel (F). Os animais foram mortos 14 dias após infecção. As MS ou prostaglandinas solúveis foram administradas i.n. com a primeira administração no 1º dia após a infecção, com a repetição de 3 em 3 dias ($0,6 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}/\text{i.n.}$). Coloração Hematoxilina-Eosina (H.E.) (aumento de 100x).

Figura 44. Fotomicrografia de cortes do pulmão de camundongos infectados com *H.capsulatum* e tratados ou não com MS-controle, MS-PGD₂, MS-PGE₂, PGD₂ ou PGE₂ solúveis corados com GMS. Cortes histológicos de pulmões de animais infectados com inóculo subletal *H. capsulatum* (5×10^5 leveduras) (A) e tratados com MS-controle (B), MS-PGD₂ (C), PGD₂ solúvel (D), MS-PGE₂ (E) ou PGE₂ solúvel (F). Os animais foram mortos 14 dias após infecção. As MS ou prostaglandinas solúveis foram administradas i.n. com a primeira administração no 1º dia após a infecção, com a repetição de 3 em 3 dias (0,6µg/20µl/i.n.). Coloração Prata de Grocott – GMS (aumento de 400x).

5.3.12) Concentração de PGD₂, PGE₂ e LTB₄ em homogeneizado de pulmões de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe, MS-PGD₂ ou MS-PGE₂.

A concentração de PGD₂, PGE₂ e LTB₄ foi determinada no 14º dia após infecção com o inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados com celecoxibe, MS-PGD₂ ou MS-PGE₂. A infecção resultou em aumento da produção de mediadores lipídicos no pulmão dos animais (Figura 45), e o tratamento com celecoxibe resultou na diminuição de PGE₂, mas e aumentou a produção de LTB₄ (Figura 45 B e C), sem alteração na produção de PGD₂ (Figura 45 A). Por outro lado, o tratamento com MS-PGD₂ aumentou a concentração de PGD₂ (Figura 45 A), mostrando que as MS-PGD₂ realmente atinge os pulmões e preservam sua integridade. Também observamos que o tratamento com MS-PGE₂ aumentou a concentração de PGE₂, e diminuiu a concentração de LTB₄, e não altera a concentração de PGD₂.

Figura 45. **Concentração dos mediadores lipídicos nos pulmões de animais infectados e tratados com celecoxibe, MS-PGD₂ ou MS-PGE₂.** A PGD₂, PGE₂ e LTB₄ foram quantificados do sobrenadante do homogeneizado de pulmões de animais infectados ou não com inóculo subletal *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe (1 mg/kg/oral/diário), ou tratados com MS-PGD₂ (0,6µg/20µl/i.n.) ou MS-PGE₂ (0,6µg/20µl/i.n.) com a primeira administração no 1º dia após a infecção, com a repetição de 3 em 3 dias. Os animais não infectados foram utilizados como controle (linha tracejada). Os resultados são expressos como média ± SEM (n=6). * $P < 0,05$, PBS versus demais grupos. # $P < 0,05$, H.c. versus H.c. com tratamento.

5.3.13) Os efeitos benéficos do tratamento com MS-PGD₂ se mantem após o término do tratamento.

Demonstramos nas Figuras 39 e 38, no 14º dia após a infecção que o tratamento com MS-PGD₂ diminui o infiltrado celular nos pulmões e a carga fúngica nos pulmões e baço dos animais infectados. Nosso próximo passo foi avaliar se os efeitos benéficos da administração das MS-PGD₂ se mantinham após o término do tratamento. Assim animais infectados e tratados com MS-PGD₂ (4 doses, sendo 1 a cada 3 dias, e a ultima no dia 13 após infecção), foram mantidos 7 dias sem tratamento e sacrificados 21 dias após infecção. Como mostra na Figura 46, o número de leveduras recuperadas de pulmões de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados com MS-PGD₂ se mantiveram menores do que nos animais somente infectados. Estes dados mostram que a administração com MS-PGD₂ é uma alternativa viável para o tratamento da histoplasbose pulmonar.

Figura 46. **Carga fúngica nos pulmões de animais infectados e tratados ou não com MS.** UFC foram recuperadas dos pulmões de animais infectados com *H. capsulatum* ou infectados tratados com MS-control, MS-PGD₂, PGD₂, MS-PGE₂ ou PGE₂. Os animais foram mortos 21 dias após infecção, e 7 dias após o último tratamento. As MS foram administradas em 4 doses via i.n. com a primeira administração no 1º dia após a infecção, com a repetição de 3 em 3 dias, sendo a última no dia 13 após a infecção. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n=5-6). [#] $P < 0,05$ *H. capsulatum* (Hc) x *H. capsulatum* (Hc) tratamentos.

5.3.14) Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 infectados com inóculo letal de *H. capsulatum*, tratados ou não com inibidor da PGD sintase, HQL-79, e submetidos à reposição da PGD₂ em MS.

Para estabelecer o importante papel da PGD₂ na histoplasmose pulmonar murina, os animais foram infectados com o inóculo letal (1×10^6 leveduras/animal) de *H. capsulatum* e tratados ou não com HQL-79. Um grupo de animais tratados com o HQL-79 (3 mg/kg), receberam a PGD₂ encapsulada em PLGA (MS-PGD₂) a cada 3 dias. Todos os animais foram acompanhados por até 40 dias após infecção. Na Figura 47 mostramos que o tratamento com HQL-79 antecipa a morte dos animais infectados em até 12 dias, quando comparado aos animais somente infectados com inóculo letal. Por outro lado, a reposição da PGD₂ veiculada em micropartículas (MS-PGD₂) resultou em maior sobrevivência dos animais. Desta forma, demonstramos que a PGD₂ é um mediador lipídico importante durante a resposta imune do hospedeiro contra a infecção por *H.capsulatum*.

Figura 47. A reposição da PGD₂ aumenta a sobrevivência de camundongos infectados com inóculo letal de *H. capsulatum* e tratados com o composto HQL-79. Os animais foram infectados com inóculo letal de 1×10^6 leveduras e tratados ou não com HQL-79 a cada 24 horas (3mg/Kg) por via oral. Um grupo de animais infectados e tratados com HQL-79 receberam intranasalmente MS-PGD₂ (0,6 μ g/20 μ l) a cada 3 dias. Os animais foram acompanhados por 40 dias após infecção. (n = 10). # $P < 0,05$, animais infectados com os infectados versus HQL-79 ou HQL-79 + MS-PGD₂; & $P < 0,05$, animais infectados e tratados com HQL-79 versus HQL-79 + MS-PGD₂.

5.3.15) Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 infectados com inóculo letal *H. capsulatum*, tratados ou não com inibidor da PGE sintase, o composto CAY 10526, e submetidos à reposição da PGE₂ em MS.

Dados da literatura mostram os papéis antagônicos da PGD₂ e da PGE₂ durante uma resposta inflamatória. Assim, nosso próximo passo foi investigar o efeito da PGE₂ nesta infecção. Primeiramente, os animais foram infectados com o inóculo letal (1×10^6 células/animal) de *H. capsulatum* e tratados ou não com o inibidor da PGE sintase, o composto CAY 10526, diariamente por via oral. Um grupo de animais nestas condições teve resposta a PGE₂ através da administração a cada 3 dias de MS-PGE₂. Todos os animais foram acompanhados por até 40 dias após infecção (Figura 48). O tratamento com o inibidor CAY 10526 resultou em maior sobrevivência dos animais infectados com o inóculo letal (50%), quando comparado aos animais somente infectados. A reposição com MS-PGE₂ nos animais tratados com CAY 10526 tiveram 100% de mortalidade. Portanto, nossos resultados demonstram claramente o papel deletério da PGE₂ durante a infecção por *H. capsulatum*.

Figura 48. A reposição da PGE_2 aumenta a mortalidade de camundongos infectados com inóculo letal de *H. capsulatum* e tratados com inibidor da sintase de PGE_2 . Os animais foram infectados com inóculo letal de 1×10^6 leveduras e tratados ou não com CAY 10526 diariamente (5 mg/Kg) via oral. Um grupo de animais infectados e tratados com CAY 10526 receberam intranasalmente MS- PGE_2 (1,3 μ g/20 μ l) a cada 3 dias. Os animais foram acompanhados por 40 dias após infecção. (n = 10). [#] $P < 0,05$, animais infectados versus infectados e tratados com CAY 10526 ou CAY 10526 + MS- PGE_2 ; [&] $P < 0,05$, animais infectados e tratados com CAY 10526 versus CAY 10526 + MS- PGE_2 .

6) DISCUSSÃO

Os macrófagos alveolares são células residentes no pulmão cuja ação efetora é fagocitar e eliminar os microrganismos invasores (LASKING et al., 2001). Além disso, estas células são as primeiras a reconhecerem e internalizarem o fungo *H. capsulatum* (BULLOCK & WRIGHT, 1987; NEWMAN, 1999; DEEPE, 2000), e que as prostaglandinas podem inibir os mecanismos efetores dos macrófagos alveolares (SEREZANI et al., 2007). Por estes motivos, em nosso trabalho, inicialmente investigamos o papel das prostaglandinas neste tipo celular durante a infecção com *H. capsulatum*. Prostaglandinas são reconhecidas como importantes mediadores inflamatórios nas respostas imunológicas (GOODWIN et al., 1977; PLESCIA et al., 1975, GILROY et al., 1999; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; KALINSKI, 2012; HARIZI, 2013). Nos últimos anos, estudos referentes às funções das prostaglandinas nos processos infecciosos demonstraram não apenas a sua participação no recrutamento celular, mas também na modulação dos mecanismos efetores da resposta imune, apoptose, produção de citocinas, na fagocitose e morte do patógeno (GILROY et al., 1999; ARONOFF et al., 2004; ARRONOF et al., 2008; MEDEIROS et al., 2009; PEREIRA et al., 2013). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que animais infectados com *H. capsulatum* e tratados com o inibidor da síntese das prostaglandinas, o fármaco celecoxibe, exibiram diminuição no recrutamento de neutrófilos e na produção de citocinas inflamatórias, aumentos na síntese de NO, produção de LTB₄, e na fagocitose das leveduras, resultando em maior sobrevivência dos animais infectados. No entanto, em nosso estudo não foi possível determinar o papel das diferentes prostaglandinas na histoplasmose. Desta forma neste projeto, tivemos como objetivo determinar o papel das PGE₂ e PGD₂, na infecção por *H. capsulatum*.

Dentre os receptores presentes na superfície de fagócitos responsáveis pela interação e fagocitose de microrganismos estão aqueles que interagem com a porção Fc da IgG (FcγR, denominado FcR), (GREENBERG & GRINSTEIN, 2002). Sabe-se que a fagocitose mediada via FcγR é regulada por eicosanóides, dentre eles as prostaglandinas, e outros fatores como o AMPc (ARONOFF et al., 2004; ARONOFF et al., 2005; CANETTI et al., 2007). Além disso, já se tem descrito que as interações das opsoninas com seus receptores ativam outras cascatas de sinalização que culminam no aumento de Ca²⁺ intracelular, liberação de AA e

ativação de kinases como SyK, PI3K, MAPK e PKC (revisado por SEREZANI et al., 2008). Durante a infecção por fungos, os mesmos podem ser reconhecidos por anticorpos IgG que se ligam a receptores Fcγ e dessa forma podem regular a via da COX (FERNÁNDEZ et al., 2002). Por este motivo, optamos por realizar nossos estudos *in vitro* com o fungo opsonizado com anticorpos específicos. Como esperado, nossos resultados *in vitro* mostraram que macrófagos alveolares de ratos, fagocitam mais leveduras opsonizadas com IgG, do que fungo não opsonizado (Figura 4). Resultados semelhantes foram descritos anteriormente por Mancuso e colaboradores (1998), empregando *K. pneumoniae*. Neste caso, as bactérias foram mais fagocitada por macrófagos quando opsonizadas, e na presença dessas opsoninas os macrófagos produziram mais eicosanoides. Também, Quan e colaboradores (2009) verificaram que na presença de soro imune houve aumento da fagocitose de *Staphylococcus aureus* por macrófagos do sistema nervoso central. Uma vez demonstrado que a opsonização com IgG aumenta a fagocitose das leveduras pelos macrófagos alveolares, e que após a infecção dos fagócitos com o fungo as PGE₂, PGD₂ e 15dPGJ₂ são liberadas no sobrenadante de cultura de macrófagos (Figura 5), nosso próximo passo foi determinar o papel das prostaglandinas endógenas neste processo. Assim, empregando inibidores das enzimas COX-1/COX-2 e COX-2, observamos que o tratamento dos macrófagos tanto com indometacina como com celecoxibe, potencializaram a fagocitose (Figura 6). E como descrito na literatura, o tratamento com indometacina ou celecoxibe diminui a produção das prostaglandinas (DAVE & AMIN, 2013; PEREIRA et al., 2013).

Uma vez determinado o papel das prostaglandinas endógenas nos mecanismos efetores dos macrófagos, próxima etapa foi investigar os efeitos da adição exógena destes prostanóides na fagocitose. Como esperado, a adição de PGE₂ inibiu a fagocitose das leveduras (Figura 7B e D), enquanto PGD₂ exógena (Figura 7 A e D), e seu metabólito final, a 15dPGJ₂ (Figura 7C e D), aumentaram a fagocitose do *H. capsulatum* por macrófagos alveolares. Estes resultados mostram claramente que PGE₂ e PGD₂, embora sejam originadas a partir do mesmo precursor, possuem atividades biológicas antagônicas (GILROY et al., 1999; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). Dados da literatura suportam parte dos nossos achados, pois Serezani e colaboradores (2008) mostraram que PGE₂, por induzir

AMPC e esse ativar EPAC e PKA, contribuem para inibição da fagocitose, da morte e inibição da geração de mediadores inflamatórios. Por outro lado, nossos resultados mostram que a PGD₂ aumenta as funções efetoras do macrófago, e são contrários aos descritos por Hellmann e colaboradores (2013), que mostraram macrófagos tratados com PGD₂ fagocitando menos zimozan. Semelhante aos dados aqui obtidos, a 15dPGJ₂, já descrita por Aronoff e colaboradores (2007), aumentou a fagocitose das partículas opsonizadas com IgG por macrófagos alveolares via receptor Fcγ. Em conjunto, nossos resultados são os primeiros a demonstrarem que estes mediadores lipídicos podem regular de modo distinto as funções dos macrófagos infectados com um fungo potencialmente patogênico, o *H. capsulatum*. Estes dados abrem uma nova linha de investigação, importante para a compreensão do papel das prostaglandinas nas doenças fúngicas, em especial na histoplasmose.

Uma vez que a resposta desencadeada pelas prostaglandinas ocorre via seus receptores (Ricciotti & FitzGerald, 2011), nosso próximo passo foi investigar quais receptores de prostanóides estariam envolvidos nos mecanismos efetores de macrófagos alveolares. Constatamos que, conforme outros dados da literatura, a PGE₂ inibe a fagocitose via EP2 e EP4. Neste sentido, Aronoff e colaboradores (2004) demonstraram a inibição da fagocitose, pela ligação da PGE₂ ao EP2 e aumento de AMPc via ativação da adenilato ciclase. Outros mostraram a inibição da fagocitose de *Streptococcus pyogenes* por macrófagos peritoneais após tratamento *in vitro* com PGE₂, fato dependente de EP2 e EP4 (MASON et al., 2013). Nossos resultados mostraram pela primeira vez, em macrófagos alveolares, que a adição de PGD₂ aumentou a fagocitose de *H. capsulatum* (Figura 7). Estudos mostram que a PGD₂ se liga ao receptor DP1 com alta afinidade, quando comparado ao DP2 (KOSTENIS & ULVEN, 2006), e que metabólitos da PGD₂ podem se ligar a tais receptores também com grande afinidade, como o TXA₂ e seu metabólito 11-deidro, TXB₂, PGF₂ e a indometacina (KOSTENIS & ULVEN, 2006). Quando a PGD₂ liga-se ao DP₁, um receptor transmembrana acoplado à subunidade Gα_s da proteína G, induz elevação da concentração de AMPc gerando um sinal inibitório (CHEN et al., 2007). O DP2, também é acoplado a à subunidade Gα_i da proteína G que ao contrário, induz decréscimo na concentração do AMPc (SAWYER et al., 2002). Em nossos resultados, a PGD₂ sinaliza via receptor DP1 diminuindo a fagocitose das leveduras opsonizadas, e ao se ligar ao receptor DP2 aumenta a

fagocitose em macrófagos alveolares (Figura 8). Também para compreendermos os mecanismos envolvidos na atividade microbida dos macrófagos, investigamos a participação dos receptores específicos para PGE_2 e PGD_2 . No entanto, somente o receptor DP2 parece participar dos mecanismos de morte do fungo pelo macrófago, uma vez que somente o antagonista deste receptor, diminui a capacidade microbida dos macrófagos (Figura 12 A). Semelhante ao nosso resultado, Hellmann e colaboradores (2013) mostraram o aumento da fagocitose de partículas de zimosan, quando os macrófagos foram pré-tratados com antagonista de DP1, mostrando a participação do receptor DP2 neste aumento. Na literatura, a participação da PGD_2 na remoção de *P. aeruginosa* tem sido descrita (JOO et al., 2007), mas não há relatos sobre a participação do receptor DP2 nesta remoção de patógenos. Até o momento a contribuição da $15dPGJ_2$ na fagocitose foi descrita em um único artigo. Aronoff e colaboradores (2007) demonstraram que ligantes de $PPAR\gamma$ (troglitazone, rosiglitazone e $15dPGJ_2$) aumentaram a fagocitose das partículas opsonizadas com IgG por macrófagos alveolares. Diferentemente de Han e colaboradores (2012) que demonstraram monócitos/macrófagos derivados da medula óssea e pré-tratados com $15dPGJ_2$ fagocitando menos partículas de látex. Outros pesquisadores obtiveram um aumento da atividade microbida de macrófagos na infecção por *Salmonella enterica Typhimurium* após adição da $15dPGJ_2$. Porém nesta mesma infecção, contrário aos nossos resultados, os macrófagos fagocitaram menos as bactérias (BUCKNER et al., 2013).

Em nossos resultados mostramos que a atividade microbida dos macrófagos é regulada diferentemente pelos subtipos de prostaglandinas, uma vez que a adição de PGD_2 aumentou a atividade microbida, diferentemente para PGE_2 e $15dPGJ_2$ que diminuiu os efeitos microbicidas dos macrófagos alveolares contra *H. capsulatum*. Sabe-se que citocinas e reativos do oxigênio e do nitrogênio, podem ativar os macrófagos ou mediar a atividade microbida destas células. Além disso, as prostaglandinas podem regular a produção de citocinas (MEDEIROS et al., 2012; PEREIRA et al., 2013, MURATA et al., 2013), óxido nítrico (MEDEIROS et al., 2012; PEREIRA et al., 2013) e água oxigenada (SPORN et al., 1988). Por isso, o próximo passo foi determinamos o impacto da adição de PGE_2 , PGD_2 e $15dPGJ_2$ na produção de NO, H_2O_2 , IL-10 e TNF- α . Observamos que a adição de PGD_2 diminuiu a produção de IL-10, sem alterar H_2O_2 , NO e TNF- α quando comparado ao macrófago

somente incubado com *H. capsulatum*. Igualmente ao nosso resultado, Theiner e colaboradores (2006) mostraram a diminuição da produção de IL-10 após adição de PGD₂ em modelo de asma. Também demonstramos que o pré-tratamento com 15dPGJ₂ aumentou a fagocitose, porém, não foi eficaz em eliminar o *H. capsulatum*, fato este relacionado à diminuição de nitrito e H₂O₂ em macrófagos alveolares. Diferentemente dos nossos resultados, a 15dPGJ₂ induziu a produção de intermediários reativos do oxigênio em outras células (LEVONEN et al., 2004; KIM et al., 2008). Por outro lado, Lin e colaboradores (2007) demonstraram em osteoblastos a inibição da expressão de iNOS e da produção de nitrito após incubação com 15dPGJ₂. Quanto à PGE₂, Serezani e colaboradores (2008) demonstraram sua participação na inibição de citocinas inflamatórias e Sporn e colaboradores (1988) demonstraram a participação da PGE₂ na produção de H₂O₂. Em conjunto aos nossos resultados demonstramos que a adição da PGE₂ diminuiu a produção de TNF- α e a produção de H₂O₂ por macrófagos alveolares na presença do *H. capsulatum* (Figura 13). Já é descrito que em tecidos e células infectadas por *H. capsulatum*, citocinas endógenas, tais como a IL-12, IFN- γ e TNF- α são importantes na eliminação da levedura (ALLENDORFER et al., 1998; ZHOU et al., 1995; ALLENDORFER et al., 2000). Além disso, o papel de NO na defesa do hospedeiro durante a histoplasmose é bem estabelecido (BUMMER & STEVENS, 1995), assim como para H₂O₂ que participa na morte fúngica (MOREIRA et al., 2010, CARMO et al., 2006). Portanto, a importância do estudo das prostaglandinas na regulação da produção de citocinas contribui para entender a resposta imune específica no mecanismo de eliminação dos patógenos por macrófagos, pois as citocinas participam no potencial microbicida destes.

Uma vez descrito por nosso grupo de pesquisa que o LTB₄ é produzido por macrófagos durante a infecção pelo fungo, e que este aumenta a fagocitose e atividade microbicida de *H. capsulatum* (SECATTO et al., 2012) podemos comparar esses efeitos com os nossos resultados com a PGD₂, onde também macrófagos alveolares fagocitaram e mataram mais *H. capsulatum*. Estes achados conduziram a uma hipótese na qual o LTB₄ e a PGD₂ podem estar atuando juntamente nos mecanismos efetores dos macrófagos alveolares. Em particular, em infecções bacterianas, mediadores derivados da COX, como a PGE₂ inibem a atividade fagocítica e microbicida de macrófagos alveolares, enquanto derivados da 5-

lipoxigenase (5-LO), como o LTB₄ aumentam a atividade efetora dessas células (ARONOFF et al., 2004, PERES et al., 2007). Sabidamente, durante a infecção por *H.capsulatum* as prostaglandinas e os leucotrienos são produzidos, e estes podem regular a produção de citocinas e nitrito (MEDEIROS et al., 2004, NICOLETE et al., 2008, PEREIRA et al., 2013, SECATTO et al., 2012). Neste sentido, também quantificamos nitrito, H₂O₂, TNF-α e IL-10 no sobrenadante de macrófagos alveolares pré-tratados com LTB₄. Como LTB₄ é importante na resposta efetora dos macrófagos (ARONOFF et al., 2004), e em nosso estudo mostramos que a produção de citocinas pelos macrófagos alveolares na presença de LTB₄ foi similar quando estes foram pré-incubados com PGD₂. Além disso, o receptor DP2 é acoplado à subunidade G_{ai}, (SAWYER et al., 2002) que é a subunidade também acoplada ao receptor BLT₁ (PERES et al., 2007), sendo que ambos, resultam na diminuição da concentração de AMPc (KIM et al., 2007; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011). A partir da importância do LTB₄ na fagocitose de leveduras de *H.capsulatum* por macrófagos (SECATTO et al., 2012), demonstramos o aumento da expressão de BLT₁ e produção de LTB₄ após o tratamento com PGD₂ (Figuras 14 e 15). Nossos resultados são os primeiros na literatura a demonstrar esta relação, enfatizando ainda mais a importância do estudo das prostaglandinas nas infecções fúngicas. Alguns trabalhos da literatura mostram a relação com PGD₂ e LTC₄ em eosinófilos (MACKAY & STEWART, 2011; MESQUITA-SANTOS et al., 2011), mas com LTB₄, nosso estudo é o primeiro a mostrar a modulação do receptor BLT1 e o aumento da produção de LTB₄ em macrófagos alveolares. O DP2 é estruturalmente distinto dos outros receptores para prostaglandinas, mas pertence filogeneticamente à família dos receptores BLT₁ e BLT₂ (HIRAI et al., 2001). Hirai e colaboradores (2001) mostraram através de ensaio de competição de liberação em linhagens de linfócitos Th2, uma alta afinidade de ligação de PGD₂ ao DP2 e DP1, e que o LTB₄ em altas concentrações pode se ligar também ao DP2. Até o momento, não há na literatura científica demonstrando a possível ligação de PGD₂ ao BLT1. Neste sentido, fazendo uso de antagonistas dos receptores de BLT1 e DP2, demonstramos a possível relação de PGD₂ ao BLT1 e de LTB₄ ao DP2. Nossos resultados demonstraram que a adição da PGD₂ na presença do antagonista de BLT1 ou a adição de LTB₄ na presença do antagonista de DP2 diminuíram a fagocitose de *H.capsulatum* opsonizado por macrófagos alveolares. Nossos resultados foram

interessantes e promissores, mas novos experimentos serão necessários para demonstrar esta nova ligação da PGD_2 ao BLT1 e da ligação de LTB_4 ao DP2 (Figura 17). Utilizamos antagonistas que são ditos seletivos para os receptores, porém, para certificarmos precisamos realizar experimentos que comprovem molecularmente esta relação.

Mediadores lipídicos podem ser facilmente degradados, via reações de oxidação e hidrólise, e conseqüentemente, perder suas propriedades biológicas, além de serem pouco solúveis em solução aquosa, dificultando seu uso *in vivo* (FITZPATRICK & WYNALDA, 1983; SHIBATA et al., 2002; MURPHY & GIJON, 2007). Nossos resultados com a PGD_2 são bastante promissores, além disso, vários trabalhos descrevem a importância deste mediador. A PGD_2 pode atuar como um mediador inflamatório ou antiinflamatório, fato dependente do agente etiológico e do local do processo inflamatório (RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; JOO & SADIKOT, 2012). Neste sentido, para estudar o papel da PGD_2 *in vivo*, optamos por encapsular este mediador em polímero biodegradável, e desta maneira, preservar a estrutura bioquímica da PGD_2 . Inicialmente, desenvolvemos um sistema de microencapsulação de PGD_2 , empregando PLGA e avaliamos a preservação das atividades biológicas *in vitro*. Utilizamos como comparação, a MS-PGE₂, uma vez que esta micropartícula já foi estudada e caracterizada em nosso laboratório por Nicolete e colaboradores (2008). Polímeros biodegradáveis constituídos por PLGA permitem a liberação sustentada/prolongada de várias substâncias, e estes polímeros vêm sendo estudados por diversos grupos de pesquisa. A micro ou nanoencapsulação de moléculas instáveis, como polipeptídios, proteínas, DNA e dentre outras em sistemas poliméricos têm sido empregada como uma estratégia de veiculação para imunizações (JONES, 2008; FENG et al., 2006; FAISAL et al., 2009). Este polímero permite a construção de micropartículas, cujo tamanho ($< 10 \mu m$) permite sua interação com fagócitos (NICOLETE et al., 2007; NICOLETE et al., 2008; CHAMPION et al., 2008, dos SANTOS et al., 2011). Além disso, possui adequada degradação e estabilidade (LIMA & RODRIGUES, 1999). Nossas formulações apresentaram uma distribuição de tamanho inferior a $10 \mu m$ (Figuras 18 e 19), além de preservar o potencial zeta negativo (Figuras 20 e 21), pois o polímero PLGA 50:50, constituído por ésteres derivados de ácidos láctico e glicólico, possui residual de carga elétrica negativa (BAZILE et al., 1992). Nos sistemas de

micropartículas poliméricas, a quantificação precisa do princípio ativo encapsulado é uma importante etapa (FENG et al., 2006; GUPTA et al., 1997). Neste sentido, obtivemos uma boa eficiência de encapsulação para PGD₂ (Figura 23), assim como, Nicolete e colaboradores (2008) obtiveram para a encapsulação da PGE₂.

A utilização de MS contendo mediadores lipídicos e suas ações em respostas celulares *in vivo* e *in vitro* já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa e outros. MS poliméricas contendo LTB₄ (MS-LTB₄) são mais fagocitadas por macrófagos peritoneais murinos e, quando administradas intratraquealmente em camundongos, aumentam o recrutamento de leucócitos para o espaço broncoalveolar (NICOLETE et al., 2007; NICOLETE et al., 2008). Também, MS-LTB₄ são capazes de induzir o aumento da produção de NO em células endoteliais humanas e em macrófagos peritoneais murinos, e aumentam nestes a expressão do receptor nuclear PPAR- α (NICOLETE et al., 2008). Por outro lado, MS-PGE₂ são menos fagocitadas e inibem a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e induzem a produção de nitrito e MCP-1 por células endoteliais humanas (NICOLETE et al., 2008). Outros, mostraram o potencial antiinflamatório da 15dPGJ₂ nanoencapsulada (ALVES et al., 2011). Desta forma, o uso de mediadores lipídicos proporcionam uma estratégia na modulação da resposta inflamatória. Neste estudo, encapsulamos a PGD₂ e, *in vitro*, incubando macrófagos alveolares com essas formulações, demonstramos maior índice fagocítico de MS-PGD₂ e diminuição do índice fagocítico para MS-PGE₂ (Figuras 25 e 26). O aumento da fagocitose ocorreu juntamente com aumento da produção de nitrito (Figura 27), citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e antiinflamatórias (TGF- β) (Figura 30), além da ativação de NF κ B quando macrófagos foram incubados com MS-PGD₂ (Figuras 28 e 29). Sabe-se que o NO exógeno pode aumentar as concentrações de PGD₂, dependente da ativação de COX-2 através da via MAPK p38 (MOON & BEFUS, 2008). Neste sentido, o NF- κ B é um importante fator de transcrição relacionado com a expressão de vários genes envolvidos durante as respostas inflamatória e imune (PERKINS, 2007). A produção mediadores inflamatórios por macrófagos sugere que estes foram ativados classicamente (MOSSER, 2003; MANTOVANI et al., 2004). E isso relaciona-se ao processo de fagocitose e ativação celular, onde macrófagos podem produzir citocinas inflamatórias e NO (UNDERHILL & OZINSKY, 2002). Uma vez que a produção de citocinas, tais como TNF- α e IL-1 β , são essenciais para o

desenvolvimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro (DEEPE Jr. & GIBBONS, 2006; DEEPE Jr. & McGUINNESS, 2006; CAIN & DEEPE Jr., 2000) e a resposta de padrão Th1 contribui para a geração de anticorpos opsonizantes (CUTLER et al., 2007), nossas formulações podem ser usadas como uma estratégia de estudo de um tipo celular ou durante uma determinada infecção. O aumento de nitrito, TNF- α , IL-1 β e TGF- β após 24 e 48 horas de incubação com MS-PGD₂ pode explicar em parte o papel inflamatório e ativação de macrófagos pela PGD₂. Em processos inflamatórios, a PGD₂ é a principal PG liberada por mastócitos e macrófagos ativados, medeia a vasodilatação ou vasoconstrição, broncoconstrição, inibe a agregação plaquetária, e pode modular respostas alérgicas e quimiotaxia de eosinófilos e linfócitos Th2, dentre outros (MATSUOKA et al., 2000; HIRAI et al., 2001; KANAOKA & URADE, 2003; SADIKOT & JOO, 2012). E a PGD₂ participa na reparação e remodelação dos tecidos (KOHYAMA et al., 2002). Sabe-se ainda que em modelos animais a resolução da inflamação coincide com apoptose dos leucócitos, com aumento de PGD₂ e seu metabólito 15dPGJ₂ (LAWRENCE, 2001). Também, a PGD₂ e seus metabólitos regulam a ativação do NF- κ B, e consequentemente, regulam a supressão dos genes que codificam moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1), ou na regulação das enzimas iNOS e COX-2 (CASTRILLO et al., 2000). Por outro lado, em outros estudos a PGD₂ pode inibir a produção de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (KIYOMIA & OH-ISHI, 1985; JIANG et al., 1998; MURATA et al., 2013). Em nosso estudo, a preservação das atividades biológicas das MS-PGD₂ permitiu mostrarmos sua ação inflamatória quando incubadas e fagocitadas por macrófagos alveolares. Este efeito inflamatório pode ser temporal, já que quantificamos as citocinas até 48 horas após a incubação, e após este período a PGD₂ pode ter um outro efeito sobre as citocinas. Como já descrito, a participação da PGD₂ na resposta imune é mais tardia e pode exercer uma ação antinflamatória contribuindo na resolução da inflamação (GILROY et al., 1999; SADIKOT & JOO, 2012). Sendo assim, realizamos outra abordagem neste estudo, no qual macrófagos alveolares de rato foram estimulados com LPS (0,5 μ g/mL) e após 2 horas desse estímulo, foram incubados ou não com MS-PGD₂ ou PGD₂ solúvel por 22 horas. O LPS ativa os macrófagos via *Toll-like receptor* (TLR) 4 (AKIRA et al., 2001) e, assim, potencializa a produção e secreção de mediadores inflamatórios e lipídicos (ULEVITCH & TOBIAS, 1999; TAJIMA et al., 2008). As

prostaglandinas podem recrutar leucócitos, e induzir diferentes células a liberarem citocinas e quimiocinas (PERES-BUZALAF et al., 2011; PEREIRA et al., 2013). Nossos resultados também demonstraram a liberação de NO, IL-1 β , IL-6 e TNF- α no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares de rato estimulados com LPS (Figura 31), assim como descrito por Yoon e colaboradores (2010). Após o estímulo com LPS, o tratamento com MS-PGD₂ resultou no aumento da produção de IL-1 β e NO, diminuição da produção de IL-6, mas não afetou a produção de TNF- α por macrófagos alveolares. Dados da literatura, podem explicar em parte nossos resultados, uma vez que a estimulação com LPS regula a expressão da enzima COX-2 de uma forma dependente do tempo, resultando na produção de PGD₂ e de PGE₂ (HORI et al., 2001; ROUZER et al., 2005). Outros resultados demonstraram que doadores de NO podem aumentar a produção de PGD₂ e IL-6, além de expressão de COX-2 em mastócitos (MOON & BEFUS, 2008). Por outro lado, animais deficientes da enzima H-PGDS produzem mais IL-6 (MURATA et al., 2011). Em conjunto esses resultados e a incubação com MS-PGD₂ potencializou a produção de citocinas inflamatórias, porém diminui a produção de IL-6. Além disso, a relação de NO e PGD₂, pode explicar o aumento de NO observado no sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com LPS e tratados com MS-PGD₂. Dados contrários aos nossos, mostraram que PGD₂ exógena (solúvel) inibe a produção de NO e iNOs (BELLOWS et al., 2006). Porém, como descrito anteriormente, estas diferenças podem ser explicadas em partes pelo processo de fagocitose que pode ativar o macrófago a produzir mediadores inflamatórios. Em macrófagos peritoneais a PGD₂ diminuiu a produção de TNF- α , mas não alterou a produção de nitrito por estas células (GUYTON et. al., 2001). Enquanto para IL-1 β , sua produção pode ser aumentada por condrócitos incubados com PGD₂ (ZAUED et al., 2010). Sabe-se que a IL-1 β aumenta a produção de prostaglandinas por estimular a expressão de COX-2 (TSUZAKI et al., 2003) e a adição de PGD₂ ou PGE₂ pode aumentar a expressão de COX-2 (BURKE & COLLIER, 2011). Neste contexto, as prostaglandinas são moléculas biologicamente ativas que têm diversos efeitos sobre várias células e tecidos, sob condições fisiológicas e fisiopatológicas (HARIZI et al., 2008). Conhecidas como potentes mediadores inflamatórios lipídicos, as prostaglandinas, como a PGD₂, podem funcionar dualmente promovendo ou resolvendo a resposta inflamatória (SADING et al., 2007; RICCIOTTI & FITZGERALD, 2011; JOO &

SADIKOT, 2012). Por conseguinte, consideramos que MS-PGD₂ podem ativar de modo mais eficiente os mecanismos de defesa do hospedeiro, e constituir uma nova alternativa para estudar o papel da PGD₂ na infecção por *H. capsulatum*. Como até o presente, nada tem descrito sobre a PGD₂ encapsulada, nossos resultados *in vitro* garantiram a eficácia do método de encapsulação, e assim, possibilitam avaliar esta formulação como possível terapêutica na histoplasmose pulmonar murina.

A resposta inflamatória inicial durante uma infecção é caracterizada por maior produção de PGE₂, e na fase mais tardia com a produção de PGD₂ e seu metabólito 15dPGJ₂ (HOFBAUER et al., 2000; HIRAI et al., 2001; FUJITANI et al., 2002). Neste sentido, recentemente demonstramos que o tratamento de camundongos infectados com o *H. capsulatum* e tratados com celecoxibe, apresentaram menor carga fúngica nos pulmões e sobreviveram mais do que aqueles somente infectados com inóculo letal (PEREIRA et al., 2013). Considerando nossos dados já publicados e os discutidos acima, que mostram pela primeira vez que PGE₂ tem um papel deletério, enquanto a PGD₂ um papel benéfico na infecção pelo fungo *H. capsulatum*, decidimos investigar os papel destes dois mediadores nesta infecção *in vivo*. Para tanto, determinarmos inicialmente se além de PGE₂, também PGD₂ é produzida nos pulmões após a infecção, e qual o impacto do tratamento dos animais infectados com celecoxibe, na liberação destas prostaglandinas (Figura 45). Como já descrito por nós, observamos que celecoxibe inibe PGE₂ (PEREIRA et al., 2013), no entanto, curiosamente o tratamento com celecoxibe não alterou a liberação de PGD₂ *in vivo*, porém aumenta síntese de LTB₄ (Figura 45), um potente ativador das atividades efectoras de macrófagos (MEDEIROS et al., 2004; SECATO et al., 2008) e também mediador essencial para o controle da histoplasmose (MEDEIROS et al., 2004, MEDEIROS et al., 2008). Contrário aos nossos resultados, em modelo de osteoartrite o tratamento com celecoxibe diminui a produção de PGD₂ e de LTB₄ (DAVE & AMIN, 2013). Com base nestes dados, e considerando os efeitos benéficos da inibição das prostaglandinas (PEREIRA et al., 2013), nosso próximo passo foi investigar em camundongos infectados com inóculo subletal do fungo os efeitos da inibição seletiva das enzimas envolvidas na produção de PGD₂. Nossos resultados *in vivo*, confirmam aqueles obtidos *in vitro*, pois mostram claramente que o composto HQL-97 inibe a síntese de PGD₂ (Figura 35) e isto resultou em diminuição da sobrevivência dos animais infectados, uma vez que aumentou em 40% a

mortalidade (Figura 32). A inibição da síntese de PGD_2 teve um impacto relevante na produção de citocinas, de modo que o aumento da mortalidade pode ser ambos, devido ao aumento da carga fúngica, e/ou da reação inflamatória nos pulmões. Nos animais infectados e tratados, observamos aumento da liberação de $\text{TNF-}\alpha$, KC, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 , NO, e diminuição de IL-6 (Figura 33 e 34). Como já discutido acima, e de acordo com os nossos resultados, a PGD_2 pode inibir produção de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-12 (GUYTON et.al., 2001; GOSSET et al., 2003; HARIZI, 2013). Dados da literatura demonstraram os efeitos do tratamento com HQL-79, melhorando a fisiopatologia na asma (MATSUSHITA et al., 1998). Este tratamento dose dependente diminui a produção de PGD_2 , LTB_4 , LTC_4 e histamina, porém aumentou a produção de PGE_2 por células do pulmão desses animais tratados (MATSUSHITA et al., 1998). Sabido que durante a inibição da PGD_2 ocorre maior produção de PGE_2 (Figura 35), este aumento pode refletir na maior produção de citocinas inflamatórias como $\text{TNF-}\alpha$ (PEREIRA et al., 2013), $\text{IL-1}\beta$ (PEREIRA et al., 2013); quimiocina, como KC (VAN LY et al., 2012), citocinas imunossupressoras, como IL-10 (MACKENZIE et al., 2013) e na produção de NO (FONSECA, 2003; AKAMA & VAN ELDIK, 2000). Os aumentos das citocinas inflamatórias corroboram com as análises histopatológicas, que mostram realmente aumento da reação inflamatória com maior infiltrado no pulmão dos animais tratados com HQL-79 (Figura 36). No entanto, observamos que houve um aumento muito expressivo de IL-10 , o que poderia explicar o aumento da mortalidade, uma vez que já tem descrito que a produção exagerada desta citocina resulta na imunossupressão de alguns tipos celulares (HARIZI et al., 2002; HUNT et al., 2012). Não foi possível determinarmos a carga fúngica nestes animais para confirmar nossa hipótese, mas a análise do corte histológico dos pulmões dos animais infectados tratados com o composto HQL-79 claramente mostra aumento expressivo de leveduras nos pulmões (Figura 37).

Determinamos que a PGD_2 veiculada em micropartículas é uma estratégia promissora para o tratamento das infecções, já que observamos que este mediador foi eficientemente liberado (Figuras 23 e 45), suas atividades biológicas preservadas, como determinado pelo aumento da fagocitose (Figuras 25 e 26), e modulação da produção de citocinas por macrófagos estimulados *in vitro* com LPS (Figura 31), e diminuição da sobrevivência dos animais infectados com o inóculo subletal e tratados com o composto HQL-79 (Figura 32). Sendo assim, demos continuidade

com nossos estudos avaliando a administração de MS-PGD₂ ou MS-PGE₂ em animais infectados com inóculo subletal. Nossos resultados confirmaram que a administração de MS-PGD₂ resultou em diminuição carga fúngica, mas que MS-PGE₂ não aumentou o número de leveduras nos pulmões e baço dos animais infectados (Figura 38). No intuito de entendermos os mecanismos, determinamos o efeito da administração das prostaglandinas encapsuladas ou solúveis, no recrutamento celular, na produção de citocinas e NO. Constatamos que o tratamento com a MS-PGD₂ diminuiu o recrutamento de células mononucleares e de neutrófilos para o espaço broncoalveolar (Figura 39), o infiltrado celular no pulmão (Figura 43), diminuição de citocinas como IL-6, TNF- α e KC (Figura 42). Por outro lado, somente com administração i.n. de PGD₂ solúvel diminuiu a concentração de IL-12. Anteriormente mencionado, o mecanismo pelo qual o hospedeiro é capaz de controlar e erradicar a infecção por *H. capsulatum* é através da indução da resposta imune celular do padrão T “helper” 1 (Th1) que é mediada por macrófagos, células dendríticas, linfócitos T, e citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α (DEEP Jr, 2000, KROETZ & DEEP, 2012), e da produção de leucotrienos e NO (MEDEIROS et al., 2004). Além disso, neutrófilos e células mononucleares são igualmente recrutados para o espaço broncoalveolar dos animais infectados com *H. capsulatum* (MEDEIROS et al., 2004; PEREIRA et al., 2013), onde desempenham suas funções de fagocitose, produção de reativos do oxigênio, NO, citocinas e quimiocinas imunorreguladoras (HOWARD et al., 1965; BRUMMER et al., 1991; KURITA et al., 1991; NEWMAN, 2001). Estes resultados, juntamente com os nossos, mostram que o recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar durante a infecção por *H. capsulatum* é dependente das prostaglandinas (PEREIRA et al., 2013). Em nossa hipótese, achávamos que o tratamento com MS-PGE₂ em animais infectados com *H. capsulatum* aumentaria o infiltrado celular no espaço broncoalveolar, contrariamente, o número de células mononucleares e de neutrófilos (Figura 39) foi menor. Neste contexto, Mason e colaboradores (2013) demonstraram após tratamento com PGE₂ em animais infectados com *S.pyogenes* ocorreu aumento no número de neutrófilos e diminuição de macrófagos no útero desses animais infectados. Porém ao analisarmos os cortes histológicos observamos maior infiltrado no parênquima pulmonar (Figura 43) após o tratamento com MS-PGE₂. Além disso, sabemos que outros mediadores estão envolvidos no recrutamento

celular na infecção por *H. capsulatum* (MEDEIROS et al., 2004; PEREIRA et al., 2013). Desta forma, avaliamos as citocinas presentes nos pulmões dos animais tratados com MS-PGE₂, porém a produção das citocinas inflamatórias não foi alterada. Como demonstrado acima, a participação benéfica do tratamento com MS-PGD₂ na reposta imune contra *H. capsulatum*, ao contrário da MS-PGE₂ que suprimiu a resposta imune, pela produção de IL-10 e diminuição de IL-12 (Figura 42). Em conjunto aos nossos resultados e outros, demonstraram que as prostaglandinas podem participar no recrutamento de leucócitos, e induzir diferentes células a liberarem citocinas e quimiocinas (PERES-BUZALAF et al., 2011; MEDEIROS et al., 2012; PEREIRA et al., 2013). Vários trabalhos também mostram os efeitos da PGE₂ que variam de indutor da reparação tecidual e remodelamento vascular pulmonar (LUNDEQUIST et al., 2010) a supressor das respostas imunológicas (HARRIS et al., 2002). Nosso grupo de pesquisa demonstrou ainda que MS-PGE₂ são menos fagocitadas e que inibem a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Além disso, semelhante aos nossos resultados (Figuras 40 e 41), as MS-PGE₂ induziram a produção de nitrito em células endoteliais (NICOLETE et al., 2008). É bem estabelecido que PGE₂ contribui para o aumento de AMPc, além disso, modula APCs bloqueando sua maturação e suprimindo a liberação da IL-12, desta forma impedindo o estabelecimento do padrão Th₁ da resposta imune (NATARAJ et al., 2001; YANG et al., 2003; MEDEIROS et al., 2012). Também, Harizi e colaboradores (2002) mostraram que o tratamento de células dendríticas com PGE₂ exógena induziu a produção de IL-10. Como dito anteriormente, durante a infecção por *H. capsulatum* além das citocinas, os mediadores lipídicos, como os leucotrienos e as prostaglandinas são importantes na resposta imune na doença. Os resultados encontrados por nosso grupo, demonstram que os leucotrienos estão envolvidos com o influxo de células inflamatórias para o local da infecção, (MEDEIROS et al., 1999), e que a inibição da síntese deste mediador aumentou a mortalidade de animais infectados com o fungo, além de aumentar a produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e KC (MEDEIROS et al., 2004).. Em outro modelo de infecção por *S. pyogenes*, evidenciamos que o LTB₄ é importante na defesa do organismo contra esta infecção (SOARES et al., 2013), e o LTB₄ tem sua função suprimida quando na presença de PGE₂ *in vitro*, pela modulação na produção de AMPc (LEE et al., 2009). Neste

sentido, nosso estudo demonstrou que o tratamento com MS-PGE₂ foi capaz de diminuir a produção de LTB₄ (Figura 45) , e por isso, pode estar relacionado a não diminuição da carga fúngica nos pulmões e baço desses animais infectados (Figura 38).

A importância da PGD₂ durante a resposta inflamatória foi demonstrada por Joo e colaboradores (2007), através da administração intratraqueal de PGD₂ durante a infecção por *P. aureginosa* que resultou na eliminação da bactéria do pulmão de camundongos infectados. Demonstramos que o tratamento com MS-PGD₂ diminui o infiltrado celular nos pulmões e diminuição da carga fúngica nos pulmões e baço dos animais infectados submetidos a este tratamento no 14º dia após a infecção. Murata e colaboradores (2013) em modelo de lesão pulmonar aguda demonstraram o papel antiinflamatório da PGD₂, através de camundongos deficientes da enzima H-PGDS provou que o aumento do infiltrado celular e da produção de TNF- α foram dependentes da PGD₂. Diante destes dados e dos nossos, onde demonstramos que o tratamento com MS-PGD₂ diminuiu a carga fúngica no pulmão, de citocinas inflamatórias, diminuição do infiltrado celular no pulmão, nosso próximo passo foi testar o efeito protetor do tratamento com MS-PGD₂ na diminuição do número de leveduras após o termino do tratamento. Para tanto, no 21º dia após infecção e 7º dia após a última administração de MS-PGD₂ os pulmões dos animais infectados e tratados foram removidos, onde podemos conferir a proteção estabelecida com o tratamento com a MS-PGD₂ com menor recuperação das UFC (Figura 46). Evidenciando mais uma vez o papel benéfico da PGD₂ na infecção por *H. capsulatum*, e também, da importância da administração deste mediador veiculado a polímeros, como podemos observar nos nossos resultados os diferentes efeitos da PGD₂ quando ora encapsulada ou ora solúvel.

Dando sequência aos nossos estudos, animais infectados com inóculo letal foram tratados com inibidor da síntese de PGD₂, e um grupo destes, recebeu micropartículas contendo PGD₂, como estratégia de reposição deste mediador. Como observado na Figura 46 à inibição da síntese de PGD₂ antecipa a morte dos animais, e a reposição de PGD₂ veiculada em micropartículas, restaura em 50% a proteção dos mesmos, confirmando o papel essencial deste mediador nos mecanismos de proteção do hospedeiro. Dados da literatura mostram que a PGD₂ possui atividade antiinflamatória (JOO & SADIKOT, 2012; MURATA et al., 2013) e

que são essenciais para remoção de bactérias dos pulmões (JOO et al., 2007). Como 100% dos animais morreram, não foi possível avaliar os mecanismos envolvidos. Assim, um experimento adicional deverá ser realizado, provavelmente no 14º dia após a infecção, para avaliar o impacto da inibição da síntese e da reposição da PGD₂ na produção de citocinas, inflamação e carga fúngica. Para comparar os efeitos antagônicos das prostaglandinas, avaliamos o impacto da inibição da síntese de PGE₂. Deste modo, em nossos resultados confirmam que este mediador lipídico tem um papel oposto ao da PGD₂, e sua presença é deletéria na histoplasmose. Demonstramos que a inibição da enzima PGEs aumentou a sobrevivência de animais infectados com inóculo letal, e a reposição do lipídio veiculado em micropartículas, aumentou a mortalidade (Figura 47). Resultados da literatura suportam nossos achados, pois demonstram que PGE₂ pode suprimir os mecanismos efetores dos macrófagos (MEDEIROS et al., 2012), a resposta imune protetora (GUERRERO et al., 2009; HARIZI, 2013). Como já descrito anteriormente, Mason e colaboradores demonstraram que a administração *in vivo* de PGE₂ via intrauterina aumenta a mortalidade de animais infectados com *S.pyogenes*. Neste sentido, Guerrero e colaboradores (2009) mostraram que o inibidor CAY 10526, diminui a expressão de mPGEs-1 e conseqüentemente diminui a produção de PGE₂ em modelo de artrite. Sabendo que animais deficientes de mPGEs, e conseqüente não produção de PGE₂, sobrevivem mais após infecção com *S.pyogenes* (MASON et al., 2013). Sendo assim, demonstramos que a PGE₂ participa na patogênese da doença, pois o tratamento com o inibidor garantiu a sobrevivência de 50% dos animais infectados.

Desta forma, os resultados obtidos nesse estudo nos permitem sugerir que o tratamento com MS-PGD₂ é eficaz em controlar a proliferação fúngica, além de contribuir para os mecanismos efetores de macrófagos e na resolução da inflamação, fatos contrários ao tratamento com MS-PGE₂. Estes dados mostram novamente os papéis antagônicos destes dois prostanóides, e que a encapsulamento das prostaglandinas em polímeros preservam seus efeitos biológicos, e assim representam uma nova ferramenta para o tratamento da histoplasmose pulmonar.

7) CONCLUSÕES

1. O pré-tratamento com PGD₂, PGE₂, ou 15dPGJ₂ solúveis influenciam distintamente nos mecanismos efetores de macrófagos alveolares. A PGD₂ aumenta a atividade fagocítica e fungicida, a 15dPGJ₂ aumenta somente a atividade fagocítica e a PGE₂ inibe atividade fagocítica e fungicida de macrófagos alveolares incubados com *H.capsulatum* opsonizado com IgG..
2. O método de microencapsulação empregado para obtenção das MS permitiu uma eficiente encapsulação e uma liberação prolongada/sustentada de PGD₂. Não ocorreram significativas alterações no potencial zeta e morfologia das diferentes MS. As MS-PGD₂ apresentaram uma distribuição de diâmetro adequada, a qual proporcionou a sua fagocitose pelos macrófagos alveolares. Além disso, as MS foram capazes de ativar macrófagos, pela produção de citocinas, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e TGF- β , e nitrito.
3. As MS-PGD₂ e MS-PGE₂ administradas durante a infecção experimental por *H. capsulatum* permitiram concluir que esses dois prostanoídes possuem efeitos antagônicos na resposta imune. O tratamento com MS-PGD₂ protege o animal infectado, enquanto com a MS-PGE₂ favorece a doença.

8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akama, K.T.; Van Eldik, L.J. Beta-Amyloid stimulation of inducible nitricoxide synthase in astrocytes is interleukin-1- and tumor necrosis factor- α (TNF- α)-dependent, and involves a TNF α receptor-associated factor- and NF κ B-inducing kinase-dependent signaling mechanism. **J Biol Chem.**, v.275, p. 7918–7924, 2000.
- Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol.**, v.2, p.675–680, 2001.
- Allendoerfer, R.; Deepe, G.S Jr. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. **J Immunol**, v.160, n.12, p.6072-82, 1998.
- Allendorfer, R.; Deepe, G.S. Jr. Regulation of infection with *H.capsulatum* by TNFR1 and -2. **J. Immunol.**, v.165, p.2657-2664, 2000.
- Alves, C.F.; Demelo, N.F.S.; Fraceto, L.F.; De Araujo, D.R.; Napimoga, M.H. Effects of 15d-PGJ(2)-loaded poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.162, p.623–632, 2011.
- Ando, M., et al., *Retrovirally introduced prostaglandin D2 synthase suppresses lung injury induced by bleomycin.* . **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.28, p.582–591, 2003.
- Angeli, V., et al., Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. **J Exp Med.**, v.193, n.10, p.1135-47, 2001.
- Arima, M.; Fukuda, T. Prostaglandin D2 receptors DP and CRTH2 in the pathogenesis of asthma. **Curr Mol Med.**, v.8, n.5, p.365-75, 2008.
- Aronoff, D.M.; Canetti, C.; Peters-Golden, M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. **J Immunol**, v.173, n.1, p.559-65, 2004.
- Aronoff, D.M., et al., Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. **J Immunol**, v.174, n.2, p.595-9, 2005.
- Aronoff, D.M., et al., Stimulatory Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma on Fcgamma Receptor-Mediated Phagocytosis by Alveolar Macrophages. **PPAR Res**, p.525-46, 2007.

- Aronoff, D.M., et al., Misoprostol impairs female reproductive tract innate immunity against *Clostridium sordellii*. **J Immunol**. v.180, n.12, p.8222-30, 2008.
- Asada, K.; Sasaki, S.; Suda, T.; Chida, K.; Nakamura, H. Antiinflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human alveolar macrophages. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.169, n.2, p.195–200, 2004.
- Bazile, D.V., et al., Body distribution of fully biodegradable [^{14}C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. **Biomaterials**. v.13, n.15, p.1093-102, 1992.
- Bedoret, D.; Wallemacq. H.; Marichal. T.; Desmet, C.; Calvo, F.Q.; Henry, E.; Closset, R.; Dewals, B.; Thielen, C.; Gustin, P.; Leval, L.; Van Rooijen, N.; Le Moine, A.; Vanderplasschen, A.; Cataldo, D.; Drion, P.V.; Moser, M.; Lekeux, P.; Bureau, F. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. **J. Clin. Invest**. v.119, p.3723–3738, 2009
- Bellows, C.F.; Alder, A.; Wludyka, P.; Jaffe, B.M. Modulation of macrophage nitric oxide production by prostaglandin D_2 . **J Surg Res**. v.32, n.1, p.92-7, 2006.
- Betz, M.; Fox, B.S. Prostaglandin E_2 inhibits production of Th1 lymphokines but no to Th2 lymphokines. **J. Immunol**. v.146, p. 108- 113, 1991.
- Breyer, R.M., et al., Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.41, p.661-90, 2001.
- Brummer, E.; Kurita, N.; Yoshida, S.; Nishimura, K.; Miyaji, M. Fungistatic activity of human neutrophils against *Histoplasma capsulatum*: correlation with phagocytosis. **J Infect Dis**. v.164, p.158- 162, 1991.
- Brummer, E; Stevens, D.A. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. **Clin Exp Immunol**, v.102, n.1, p.65-70, 1995.
- Bullock, W.E.; Wright, S.D. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. **J Exp Med**, v.165, n.1, p.195-210, 1987.
- Burke, S.J.; Collier, J.J. The gene encoding cyclooxygenase-2 is regulated by IL- 1β and prostaglandins in 832/13 rat insulinoma cells. **Cellular Immunology**. v.271, n.2, p.379–384, 2011.

- Buckner, M.M.C.; Antunes, L.C.M.; Gill, N.; Russel, S.L.; Shames, S.R.; Finlay, B.B. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 Inhibits Macrophage Colonization by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **PLoS ONE**, v.8, n.7, e69759, 2013
- Cain, J. A.; Deepe Jr., G. S. Interleukin-12 neutralization alters lung inflammation and leukocyte expression of CD80, CD86 and major histocompatibility complex class II in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** v.68, n.4, p.2069-2076, 2000.
- Calich, V.L.; Purchio, A.; Paula, C.R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v.66, n.3, p.175-7, 1979.
- Canetti, C.; Serezani, C.H.; Atrasz, R.G.; White, E.S.; Aronoff, D.M.; Peters-Golden, M. Activation of phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 mediates the inhibition of Fc γ R phagocytosis by prostaglandin E_2 in alveolar macrophages. **J Immunol.** v.179, n.12, p.8350-6, 2007.
- Cano, M.V.; Hajjeh, R.A. The Epidemiology of Histoplasmosis: a review. **Semin Respir Infect.** p.109-18, 2001.
- Carmo, J.P.M.; Dias-Melicio, L.A.; Calvi, S.A.; Peraçoli, M.T.S.; Soares, A.M.V.C. TNF α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H_2O_2 -dependent mechanism. **Med. Mycol.** v.44, p.363–368, 2006.
- Carvalho, W. A.; Carvalho, R.D.S.; Rio-Santos, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: **Avanços Terapêuticos. Rev Bras Anesthesiol.** v.54, n.3, p.448 - 464, 2004.
- Castrillo, A., et al., Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin $J(2)$ in activated murine macrophages. **Mol Cell Biol.** v.20, n.5, p.1692-8, 2000.
- Champion, J. A.; Walker, A.; Mitragotri, S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. **Pharmaceutical Research.** v.25, n.8, p.1815-1821, 2008.
- Chen, Y.; Perussia, B.; Campbell, K.S. Prostaglandin D_2 suppresses human NK cell function via signaling through D prostanoid receptor. **J Immunol.** v.179, n.5, p.2766-73, 2007.
- Clark, R.B. The role of PPARs in inflammation and immunity. **J Leukoc Biol.** v.71, n.3, p.388-400, 2002.

- Cutler, J. E.; Deepe Jr., G. S.; Klein, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. **Nat. Rev. Microbiol.** v.5, p.13-28, 2007.
- Daito, K.; Azuma, Y.; Watanase, S.; Shirasu, S.; Kato, M.; Daito, M.; Ohura, K. DP receptor signaling increased LPS-induced TNF- α production by macrophages. **Oral Therapeutics and Pharmacology.** v.22, p.153-159, 2003.
- Dave, M.; Amin, A.R. Yin-Yang regulation of prostaglandins and nitric oxide by PGD₂ in human arthrititis: Reversal by celecoxib. **Immunology Letters.** p.47-54, 2013.
- Deepe, G.S. Jr., Immune response to early and late *Histoplasma capsulatum* infections. **Curr Opin Microbiol.** v.3, n.4, p.359-62, 2000.
- Deepe Jr., G. S.; Gibbons, R. S. T Cells require tumor necrosis factor- α to provide protective immunity in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. **J. Infect. Dis.** v.193, n.2, p.322-330, 2006.
- Deepe, G.S., Jr; McGuinness, M. Interleukin-1 and host control of pulmonary histoplasmosis. **J Infect Dis.** v.194, n.6, p.855-64, 2006.
- Eldridge, J.H.; et al., Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. **Mol Immunol.** v.28, n.3, p.287-94, 1991.
- Faveeuw, C.; et al., Prostaglandin D₂ inhibits the production of interleukin-12 in murine dendritic cells through multiple signaling pathways. **Eur J Immunol.** v.33, n.4, p.889-98, 2003.
- Faisal, S. M.; Weiwei, Y.; McDonough, S. P.; Chang, Y. Leptospira immunoglobulin-like protein A variable region (LigAvar) incorporated in liposomes and PLGA microspheres produces a robust immune response correlating to protective immunity. **Vaccine.** v.27, p.378-387, 2009.
- Feng, Li; Qi, X. R.; Zhou, X. J.; Maitani, Y.; Wang, S. C.; Jiang, Y.; Nagai, T. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. **J. Control. Release,** v.112, p.35-42, 2006.
- Feldman, M.; McMahon, A.T. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity? **Ann Intern Med,** v.132, n.2, p.134-43, 2000.
- Fernández, N.; Renedo, M.; Sánchez Crespo, M. Fc γ R receptors activate MAP kinase and up-regulate the cyclooxygenase pathway without increasing

- arachidonic acid release in monocytic cells. **Eur J Immunol.** v.32, n.2, p.383-92, 2002.
- Ferreira, M.S.; Borges, A.S. Histoplasmoses. **Ver. Soc. Bras.Med.Trop.** v.42, n.2, p.192-98, 2009.
- Ferreira, O.G.; et al., Oral histoplasmosis in Brazil. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** p.654-9, 2002.
- Fitzpatrick, F.A.; Wynalda, M.A. Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D₂. Identification of products formed in vitro. **J. Biol. Chem.,** v.258, p.11713–11718, 1983.
- Fonseca, S.G.; Romão, P.R.T.; Figueiredo, F.; Moraes, R.H.; Lima, H.C.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. TNF- α mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.** v.33, p.2297- 2306, 2003.
- Franke-Ullmann, G.; Pfortner, C.; Walter, P.; Steinmüller, C.; Lohmann-Matthes, M.L.; Kobzik, L. Characterization of murine lung interstitial macrophages in comparison with alveolar macrophages *in vitro*. **J. Immunol.**v.157, p.3097–3104, 1996.
- Fujitani, Y;et al., Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. **J Immunol.** v.168, n.1, p.443-9. 2002.
- Gilroy, D.W.; et al., Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nat Med**, v.5, n.6, p.698-701, 1999.
- Goodwin, J. S.; Bankhurst, A. D.; Messner, R. P. Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell. **J. Exp. Medicine.** v.146, p.1719–1734, 1977
- Goodwin, R.A.D.P. Histoplasmosis. **Am. Rev. Respir. Dis.** v.117, p.929-56, 1978.
- Goodwin, R.A.; Loyd, J.E.; Des Prez, R.M. Histoplasmosis in patients normal host. **Medicine.** v.60, p.231-266, 1980
- Gompertz, O. F. et al. Micoses Sistêmicas. In: TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p. 490-491, 2004.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. **Nature Rev. Immunol.** v.3, p.23–35, 2003.

- Gordon, S. The macrophage: past, present and future. **Eur J Immunol.** v.37 Suppl 1: p.9-17, 2007.
- Goto, T., et al., Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. **J Immunol.** v.130, n.3, p.1350-5, 1983.
- Gosset, P., et al., Prostaglandin D₂ affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. **J Immunol.** v.170, n.10, p.4943-52, 2003.
- Greenberg, S.; Grinstein, S., Phagocytosis and innate immunity. **Curr Opin Immunol.** v.14, n.1, p.136-45, 2002.
- Guerrero, M.D.; Aquino, M.; Bruno, I.; Riccio, R.; Terencio, M.C.; Payá, M. Anti-inflammatory and analgesic activity of a novel inhibitor of microsomal prostaglandin E synthase-1 expression. **Eur J Pharmacol.** v.620, p.112-119, 2009.
- Gupta, R.K.; Chang, A.C.; Griffin, P.; Rivera, R.; Guo, Y.Y.; Siber, G.R. Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid. **Vaccine.** v.15, n.6/7, p.672-678, 1997.
- Guyton, K.; Bond, R.; Reilly, C.; Gilkeson, G.; Halushka, P.; Cook, J. Differential effects of 15-deoxy-D 12,14-prostaglandin J₂ and a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist on macrophage activation. **J. Leukoc. Biol.** v.69, p.631–638, 2001.
- Hage, C.A., et al., Pulmonary Histoplasmosis. **Seminars in Respiratory and critical Care Medicine.** v.29, n.2, p.151-165, 2008.
- Harizi, H.; Juzan, M.; Pitard, V.; Moreau, J.F.; Gualde, N. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E₂ enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. **J. Immunol.** v.168, n.5, p.2255-63, 2002.
- Harizi, H.; Corcuff, J.B.; Gualde, N. "Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology". **Trends in Molecular Medicine.** v. 14, p. 461–469, 2008.
- Harizi, H. The Immunobiology of Prostanoid Receptor Signaling in Connecting Innate and adaptive immunity. **Biomed Res Int.** 683405. 2013.
- Harris, S.G., et al., Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol.** v.23, n.3, p.144-50, 2002.

- Hellmann, J.; Zhang, M.J.; Tang, Y.; Rane, M.; Bhatnagar, A., Spite, M. Increased saturated Fatty acids in obesity alter resolution of inflammation in part by stimulating prostaglandin production. **J Immunol.** v.191, n.3, p.1383-92, 2013.
- Heninger, E.; Hogan, L. H.; Karman, J.; Macvilay, S.; Hill, B.; Woods, J. P.; Sandor, M. Characterization of the *Histoplasma capsulatum* induced granuloma. **J. Immunol.** v.177, p.3303-3313, 2006.
- Hirai, H., et al., Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **J Exp Med.** v.193, n.2, p.255-61, 2001.
- Hofbauer, R., et al., Prostaglandin E(1) is able to increase migration of leukocytes through endothelial cell monolayers. **Microvasc Res.** v.59, n.3, p.354-60, 2000.
- Hori, M.; Kita, M.; Torihashi, S.; Miyamoto, S.; Won, K.J.; Sato, K.; OZaki, H.; Karaki, H. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** v.280, p.930–938, 2001.
- Howard, D. H. Intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Bacteriology.** v.89, p.518-523, 1965.
- Ianaro, A., et al., Role of cyclopentenone prostaglandins in rat carrageenin pleurisy. **FEBS Lett.** v.508, n.1, p.61-6, 2001.
- Jiang, C.; Ting, A.T.; Seed, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v.391, n.6662, p.82-86, 1998.
- Jones, C.L.; Li, T.; Cowley, E.A. The prostaglandin E type 4 receptor participates in the response to acute oxidant stress in airway epithelial cells. **J Pharmacol Exp Ther.** v.341, n.2, p.552-63, 2012.
- Jones, K. S. Biomaterials as vaccine adjuvants. **Biotechnol. Prog.** v.24, p.807- 814, 2008.
- Joo, M., et al., Induction and function of lipocalin prostaglandin D synthase in host immunity. **J Immunol**, v.179, n.4, p.2565-75, 2007.
- Joo, M.; Sadikot, R.T. PGD synthase and PGD₂ in immune response. **Mediators Inflamm.** 503128, 2012.
- Kalinski, P. Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E₂. **J. Immunology**, v.188, p.21–28, 2012.

- Kanaoka, Y.; Urade, Y. Hematopoietic prostaglanin D synthase. *Prostaglandins Leukot. Essent.Fatty Acids*. v.69, n.2-3, p.163-167, 2003.
- Katamura, K., et al., Prostaglandin E₂ at priming of naive CD4⁺ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J Immunol*. v.155, n.10, p.4604-12, 1995.
- Kauffman, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin. Microbiol. Rev.* v.20, n.1, p.115-132, 2007.
- Khambaty, M.M.; Hsu, S.S. Dermatology of the patient with HIV. *Emerg Med Clin North Am.* v.28, n.2, p.355-358, 2010.
- Kyomiya, K.; Oh-Ishi, S. Involvement of arachidonic acid metabolites in acute inflammation: detection of 6-keto-PGF₁ alpha, thromboxan B₂ and PGD₂ in rat pleurisy induced by phorbol myristate acetate. *Jpn. J. Pharmacol.*, v.39, n.2, p.201-206, 1985.
- Kohyama, T.; Wyatt, T.A.; X Liu, Wen, F.; Kobayashi, T.; Fang, Q.; Kim, H.J.; Rennard, S.I. PGD₂ Modulates Fibroblast-Mediated Native Collagen Gel Contraction. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* v.27, p.375–381, 2002.
- Kostenis, E.; Ulven, T. Emerging roles of DP and CRTH2 in allergic inflammation. *TRENDS in Molecular Medicine*. v.12, n.4, p.148-158, 2006.
- Kroetz, D.N.; Deepe, G.S. The role of cytokines and chemokines in *Histoplasma capsulatum* infection. *Cytokine*. v.58, n.1, p.112-7, 2012.
- Kunkel, S.L.; Chensue, S.W. Phan, S.H. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J Immunol*. v.136, n.1, p.186-92, 1986.
- Kurita, N.; Oarada, M.; Miyaji, M.; Ito, E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* v.38, p.177-182, 2000.
- Kuroda, E.; Sugiura, T.; Zeki, K.; Yoshida, Y.; Yamashita, U. Sensitivity difference to the suppressive effect of prostaglandin E₂ among mouse strain: a possible mechanism to polarize Th2 type response in BALB/c mice. *J. Immunol.*, v. 164, p. 2386-95, 2000.
- Kvirkvelia, N., Vojnovic, I., Warner, T.D., Athie-Morales, V., Free, P. Rayment, N., Chain, B.M., Rademacher, T.W., Lund, T., Roitt, I.M., Delves, P.J. Placentally derived prostaglandin E₂ acts via the EP4 receptor to inhibit IL-2-dependent proliferation of CTLL-2 T cells. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 127, p. 263-269. 2002.

- Lagranderie, M.; Nahori, M.A.; Balazuc, A.M.; Kiefer-Biasizzo, H.; Lapa e Silva, J.R.; Milon, G.; Marchal, G.; Vargaftig, B.B. Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. **Immunology**, v.108, p.352–364, 2003.
- Lane, T.E.; Wu-Hsieh, B.A.; Howard, D.H. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. **Infect Immun**, v.61, n.4, p.1468-73, 1993.
- Larsen, G.L.; Henson, P.M. Mediators of inflammation. **Annu Rev Immunol**, v.1, p.335-59, 1983.
- Laskin, D. L.; B. Weinberger, Laskin.; J.D. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. **J. Leukocyte Biol**, v.70, p.163–170, 2001.
- Lawrence, D.A. Latent-TGF-beta: an overview. **Mol Cell Biochem**, v.219, n.1-2, p. 163-70, 2001.
- Lagranderie, M; Nahori, M.A.; Balazuc, A.M.; Kiefer-Biasizzo, H; Lapa e Silva, J.R.; Milon, G.; Marchal, G.; Vargaftig, B.B. Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of *Mycobacterium bovis* BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. **Immunology**, v.108, p.352–364, 2003.
- Lee, S.P.; Serezani, C. H.; Medeiros, A. I.; Ballinger, M. N.; Peters-Golden, M. Crosstalk between prostaglandin E₂ and leukotriene B₄ regulates phagocytosis in alveolar macrophages via combinatorial effects on cyclic AMP. **J. Immunol**, v.182, p.530–537, 2009.
- Levonen, A.L.; Landar, A.; Ramachandran, A.; Ceaser, E.K.; Dickinson, D.A.; Zanoni, G.; Morrow, J.D.; Darley-Usmar, V.M. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defenses in response to electrophilic lipid oxidation products. **Biochem J**, v.378, p.373–382, 2004.
- Lima, K.M., et al., Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene Ther**, v.10, n.8, p.678-85, 2003.

- Lima, K.M. Rodrigues Junior, J.M. Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. **Braz J Med Biol Res**, v.32, n.2, p.171-80, 1999.
- Limaye, A.P., et al., Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. **N Engl J Med**, v.343, n.16, p.1163-6, 2000.
- Lo, M.M., et al., Disseminated Histoplasmosis associated with Hemophagocytic lymphohistiocytosis in Kidney Transplant Recipients. **American Journal of transplantation**. v.10, p.687-691, 2010.
- Lohmann-Matthes, C.; Steinmüller, G.; Franke-Ullmann. Pulmonary macrophages. **Eur Respir J**, v.7, p.1678–1689, 1994,
- Lopez, C.E. [Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*]. **Rev Argent Microbiol**, v.38, n.4: p.235-42, 2006.
- Lundquist, A.; Nallamshetty, S.N.; Xing, W.; et al., Prostaglandin E₂ exerts homeostatic regulation of pulmonary vascular remodeling in allergic airway inflammation. **J. Immunol.**, v.184, p.433–441, 2010.
- Machado, E.L., et al., Counterregulation of Th2 immunity by interleukin 12 reduces host defenses against *Strongyloides venezuelensis* infection. **Microbes and Infection**. p.1-8, 2009.
- Machado, E.R.; Carlos, D.; Lourenço, E.V.; Souza, G.E.; Sorgi, C.A.; Silva, E.V.; Ueta, M.T.; Ramos, S.G.; Aronoff, D.M.; Faccioli, L.H. Cyclooxygenase-derived mediators regulate the immunological control of *Strongyloides venezuelensis* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.59, n.1, p.18-32, 2010.
- Mackay, G.A.; Stewart, A.G. R2D(2) for C(4)Eo: an 'alliance' of PGD(2) receptors is required for LTC(4) production by human eosinophils. **Br J Pharmacol.**, v.162, n.8, p.1671-3, 2011.

- Mackenzie, K.F.; Clark, K.; Naqvi, S.; McGuire, V.A.; Nöehren, G.; Kristarivanto, Y.; Van Den Bosch, M.; Mudaliar, M.; McCarthy P.C.; Pattinson, M.J.; Pedrioli, P.G.A.; Barton, G.J.; Toth, R.; Prescott, A.; Arthur, J.S.C. PGE₂ Induces Macrophage IL-10 Production and a Regulatory-like Phenotype via a Protein Kinase A–SIK–CRTC3 Pathway. **J. Immunol.**, v.190, p.564-567, 2013.
- Mancuso, P.; Peters-Golden, M. Modulation of alveolar macrophage phagocytosis by leukotrienes is Fc receptor-mediated and protein kinase C-dependent. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.23, n.6, p.727-33, 2000.
- Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v.25, n.12, p.677-686, 2004.
- Mason, K.L., Rogers, L.M., Soares, E.M., Bani-Hashemi, T., Downward, J.E., Agnew, D., Peters-Golden, M. Weinberg, J.B., Crofford, L.J., and Aronoff, D.M. Intrauterine Group A Streptococcal Infections Are Exacerbated by Prostaglandin E₂. **J. Immunol.**, v.191, p.2457–2465, 2013.
- Masoodi, M.; Nicolaou, A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** v.20, p.3023–3029, 2006.
- Matsuoka, T., et al., Prostaglandin D₂ as a mediator of allergic asthma. **Science**, v.287, n.5460, p.2013-7, 2000.
- Matsushita, N.; Aritake, K.; Takada, A.; Hizue, M.; Hayashi, K.; Mitsui, K.; Hayashi, M.; Hirotsu, I.; Kimura, Y.; Tani, T.; Nakajima, H. Pharmacological studies on the novel antiallergic drug HQL-79: II. Elucidation of mechanisms for antiallergic and antiasthmatic effects. **J Pharmacol.** v.78, n.1, p.11-22. 1998.
- Means, T.K.; Mylonakis, E.; Tampakakis, E.; Colvin, R.A.; Seung, E.; Puckett, L.; Tai, M.F.; Stewart, C.R.; Pukkila-Worley, R.; Hickman, S.E.; Moore, K.J.; Calderwood, S.B.; Hacohen, N.; Luster, A.D.; El Khoury, J. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. **J Exp Med.** v.206, n.3, p.637-53, 2009.
- Medeiros, A.I., et al., Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. **Br J Pharmacol**, v.128, n.7, p.1529-37, 1999.

- Medeiros, A.I., et al., Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun*, v.72, n.3, p.1637-44, 2004.
- Medeiros, A.I., et al., Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. **J Immunol**, v.181, n.12, p.8544-51, 2008.
- Medeiros, A.I., et al., Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE₂/EP2 signaling. **J Exp Med**, v.206, n.1, p.61-8, 2009.
- Medeiros, A.I.; Peres-Buzalaf, C.; Verdan, F.F.; Serezani, C.H. Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte Innate immune responses in different organs. **Mediators of inflammation**, ID327568, 2012.
- Medoff, G.; Painter, A.; Kobayashi, G.S. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v.169, n.9, p.4055-60, 1987.
- Mesquita-Santos, F.P.; Bakker-Abreu, T.; Luna-Gomes, J.; Bozza, P.T.; Diaz, B.L.; Bandeira-Melo, C. Co-operative signalling through DP1 and DP2 prostanoid receptors is required to enhance leukotriene C4 synthesis induced by prostaglandin D₂ in eosinophils. **Br J Pharmacol**. v.162, n.8, p.1674–1685, 2011
- Miller, D.K., et al., Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. **Nature**, v.343, n.6255, p.278-81, 1990.
- Michelin, M.A.; Figueiredo, F.; Cunha, F.Q. Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Exp Parasitology**. v. 102, p. 170-177, 2003.
- Monneret, G.; Li, H.; Vasilescu, J.; Rokach, J.; Powell, W.S. 15-Deoxydelta 12,14-prostaglandins D₂ and J₂ are potent activators of human eosinophils. **J. Immunol**. v.168, p. 3563– 3569, 2002.
- Monneret, G.; Cossette, C.; Gravel, S.; Rokach, J.; Powell, W.S. 15Rmethyl-prostaglandin D₂ is a potent and selective CRTH2/DP2 receptor agonist in human eosinophils. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.304, p. 349– 355, 2003.
- Moon, T.C.; Befus, A.D. Exogenous nitric oxide regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin D(2) generation through p38 MAPK in mouse bone marrow- derived mast cells. **Free Radic Biol Med.**, v.45, n.6, p.780-8, 2008.

- Moreira, A.P.; Dias-Melicio, L.A.; Soares, A.M.V.C. Interleukin-10 but not Transforming Growth Factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: Effect on H₂O₂ and NO production. **Cellular Immunology**. v.263, p.196–203. 2010.
- Mosmann, T.R.; Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol Today**, v.17, n.3, p.138-46, 1996.
- Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* v.73, p.209-212, 2003.
- Murata, T.; Aritakeb, K.; Matsumotoa, S.; Kamauchib, S.; Nakagawac, T.; Horia, M.; Momotanid, E.; Uradeb, Y.; Ozaki, H. Prostaglandin D₂ is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.108, n. 49, p.19802–19807, 2011.
- Murata, T.; Aritake, K.; Tsubosaka, Y.; Maruyama, T.; Nakagawa, T.; Hori, M.; Hirai, H.; Nakamura, M.; Narumiya, S.; Urade, Y.; Ozaki, H. Anti-inflammatory role of PGD₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.110, n.13, p.5205-10, 2013.
- Murphy, R.C.; GIJ ´ON, M.A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. **Biochem. J.**, v.405, p.379-395. 2007.
- Nakamura, L.T.; Wu-Hsieh, B.A.; Howard, D.H. Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun.*, v. 62, p. 680-684. 1994.
- Nataraj, C.; Thomas, D.W.; Tilley, S.L.; Nguyen, M.T.; Mannon, R.; Koller, B.H.; Coffman, T.M. Receptors for prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses on the mouse. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 1229-1235. 2001.
- Newman, S.L., et al., Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. **J Clin Invest**, v.85, n.1, p. 223-30, 1990.
- Newman, S.L., et al., Digestion of *Histoplasma capsulatum* yeasts by human macrophages. **J Immunol**, v.149, n.2, p.574-80, 1992.
- Newman, S. L. Macrophages in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **Trends Microbiol.** v.7, n.2, p.67-71, 1999.

- Newman, S. L. Cell-mediated immunity to *Histoplasma capsulatum*. *Semin. Respir. Infect.* v. 16, p. 102–108, 2001.
- Nicolete, R., et al., *In vitro* and *in vivo* activities of leukotriene B₄-loaded biodegradable microspheres. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.83, n.1-2, p.121-9, 2007.
- Nicolete, R., et al., Leukotriene B₄-loaded microspheres: a new therapeutic strategy to modulate cell activation. **BMC Immunol**, v.9, p. 36, 2008
- Nicolete, R., et al., Prostaglandin E(2)-loaded microspheres as strategy to inhibit phagocytosis and modulate inflammatory mediators release. **Eur J Pharm Biopharm**, v.70,n.3, p. 784-90, 2008.
- O'hagan, D.T.; JEFFERY, H.; DAVIS, S.S. Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. **Vaccine**, v.11, p. 965-969, 1993.
- Pereira, P.A.T., et al., Celecoxib Improves Host Defense through Prostaglandin Inhibition during *Histoplasma capsulatum* Infection. **Mediators of Inflammation**, 2013.
- Peres, C. M.; Aronoff, D. M.; Serezani, C. H.; Flamand, N.; Faccioli, L. H.; Peters-Golden, M. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. **J. Immunol.** v.179, p.5454–5461, 2007.
- Peres-Buzalaf, C., de Paula, L., Frantz, F.G., Soares, EM, Medeiros, A.I.; Peters-Golden, M.; Silva, C.L.; Faccioli, L.H. Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v.85, n.2, p.75-81, 2011.
- Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-κB and IKK function. **Nat. Rev. Mol. Cell Bio.** vol. 8, p. 49-62, 2007.
- Pillay, T.; Pillay, D.G. Bramdev, A. Disseminated histoplasmosis in a human immunodeficiency virus-infected African child. **Pediatr Infect Dis J**, v.16, n.4, p.417-8, 1997.
- Pine, L. Studies on the growth of *Histoplasma capsulatum*. I. Growth of the yeast phase in liquid media. *J Bacteriol*, v.68, n.6, p.671-9, 1954.

- Plescia, O. J.; Smith, A.H.; Grinwich, K. Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.72, p.1848–1851. 1975.
- Powell, W.S. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ₂: endogenous PPARgamma ligand or minor eicosanoid degradation product? **J. Clin. Invest.** v.112, p.828– 830, 2003.
- Quan, Y.; Möller, T.; Weinstein, J.R. Regulation of Fcgamma receptors and immunoglobulin G-mediated phagocytosis in mouse microglia. **Neurosci Lett.** v.464, n.1, p.29-33, 2009.
- Ribeiro, L.C. et al. Systemic mycosis: factors associated with death among patients infected with the human immunodeficiency virus, Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil, 2005-2008. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.42, n. 6, p. 698-705, 2009.
- Ricciotti, E.; FitzGerald, G.A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.31, n.5, p.986-1000, 2011.
- Rouzer, C.A.; Jacobs, A.T.; Nirodi, C.S.; Kingsley, P.J.; Morrow, J.D.; Marnett, L. RAW264.7 cells lack prostaglandin-dependent autoregulation of tumor necrosis factor-alpha secretion. **J Lipid Res.** v.46, p.1027–1037, 2005.
- Sá-Nunes, A., et al., Efficacy of cell-free antigens in evaluating cell immunity and inducing protection in a murine model of histoplasmosis. **Microbes Infect.** 2005. 7: 584-92.
- Sanding, H.; Pease, J.E.; Sabore, I. Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD₂ and its metabolites in leukocyte function. **J. Leukoc. Biol.**, v.81, p. 372-382, 2007.
- Santos, D.F.; Bitencourt, C.S.; Gelfuso, G.M.; Pereira, P.A.; de Souza, P.R.; Sorgi, C.A.; Nicolete, R.; Faccioli, L.H. Biodegradable microspheres containing leukotriene B(4) and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* activate murine bone marrow-derived macrophages. **Eur J Pharm Sci.** v.44, n.5, p.580-8, 2011.
- Sawyer, N., et al., Molecular pharmacology of the human prostaglandin D₂ receptor, CRTH2. **Br J Pharmacol**, v.137, n.8, p.1163-72, 2002.
- Scher, J.U.; Pillinger, M.H. The anti-inflammatory effects of prostaglandins. **J Investig Med.** v.57, n.6, p.703-8, 2009.

- Schneberger D.; Aharonson-Raz, K.; Singh, B. "Monocyte and macrophage heterogeneity and Toll-like receptors in the lung," **Cell and Tissue Research**, v. 343, n.1, p. 97–106, 2011.
- Secatto, A. et al. 5-Lipoxygenase Deficiency Impairs Innate and Adaptive Immune Responses during Fungal Infection. **PLoS One**. v.7, n.3, e31701. doi:10.1371/journal.pone.0031701, 2012.
- Serezani, C.H., et al., Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. **Blood**, v.106, n.3, p.1067-75. 2005.
- Serezani, C.H., et al., Prostaglandin E₂ suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.37, n.5, p.562-70, 2007.
- Serezani, C.H., et al., Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v.39,n.2, p.127-32, 2008.
- Severo, L.C., et al., Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.43, n.4, p.183-7, 2001.
- Shibata, T.; Kondo, M.; Osawa, T.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Uchida, K. 15-Deoxy-12,14-prostaglandin J₂. A prostaglandin D₂ metabolite generated during inflammatory processes. **J. Biol. Chem**,. v.277, p.10459–10466, 2002.
- Shimizu, K.; Kobayashi, M.; Tahara, J.; Shiratori, K. Cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand regulate phagocytosis by pancreatic stellate cells. **Gastroenterology**, v.128, n.7, p.2105–2118, 2005.
- Soares, E.M.; Mason, K.L.; Rogers, L.M.; Serezani, C.H.; Faccioli, L.H.; Aronoff, D.M. Leukotriene B₄ enhances innate immune defense against the puerperal sepsis agent *Streptococcus pyogenes*. **J. Immunol**, v.190, p.1614–1622, 2013.
- Suda, K.; Udagawa, N.; Sato, N.; Takami, M.; Itoh, K.; Woo, J.T.; Takahashi, N.; Nagai, K. Suppression of osteoprotegerin expression by prostaglandin E₂ is crucially involved in lipopolysaccharide-induced osteoclasto formation. **J Immunol**, v.172, p. 2504-2510, 2004.
- Sinha, V. R.; Trehan, A. Biodegradable microspheres for protein delivery. **J. Control. Release**, v. 90, p. 261-280, 2003.

- Smith, J.G., et al., Tumor necrosis factor-alpha plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **J Infect Dis**, v.162, n.6, p.1349-53, 1990.
- Snijdewint, F.G., et al., Prostaglandin E₂ differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. **J Immunol**, v.150, n.12, p.5321-9, 1993.
- Spik, I., et al., Activation of the prostaglandin D₂ receptor DP2/CRT2 increases allergic inflammation in mouse. **J Immunol**, v. 174, n.6, p.3703-8, 2005.
- Stefater, J.; A.III, S.; Ren, R.A. Lang, and J. S. Duffield, "Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration," **Trends in Molecular Medicine**, v.17, n.12, p.743–752, 2011.
- Tajima, T.; Murata, T.; Aritake, K.; Urade, Y.; Hirai, H.; Nakamura, M.; Ozaki, H.; Hori, M. Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D(2) and prostaglandin E(2). *J Pharmacol Exp Ther.* v.326, n.2, p.493-501, 2008.
- Tanaka, K., et al., Effects of prostaglandin D₂ on helper T cell functions. **Biochem Biophys Res Commun**, v.316, n.4, p.1009-14, 2004.
- Tatakihara, V.L.H.; Cecchini, R.; Borges, C.L.; Malvezi, A.D.; Graça-de Souza, V.K.; Yamada-ogatta, S.F.; Rizzo, L.V.; Pinge-Filho, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.52, p.47-58, 2008.
- Theiner, G.; Gessner, A.; Lutz, M.B. The mast cell mediator PGD₂ suppresses IL-12 release by dendritic cells leading to Th2 polarized immune responses in vivo. **Immunobiology**, v.211, p.463-472, 2007.
- Tsuzaki, M.; Guyton, G.; Garrett, W.; Archambault, J.M.; Herzog, W.; Almekinders, L.; Bynum, D.; Yang, X.; Banes, A.J. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. **J Orthop Res.** v.21, n.2, p.256-64, 2003.
- Tilley, S.L.; Coffman, T.M.; Koller, B.H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J Clin Invest**, v.108, n.1, p.15-23, 2001.
- Ulevitch, R.J.; Tobias, P.S. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. **Curr Opin Immunol**, v.11, p.19–22, 1999.

- Underhill, D.M.; Ozinsky, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.** v.20, p.825-852, 2002.
- Unis, G.; Oliveira Fde, M.; Severo, L.C. Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop.** p.463-8, 2004.
- Vaidya, S.; Somers, E.P.; Wright, S.D.; Detmers, P.A. and Bansal, V.S. 15-Deoxy-D 12,14-prostaglandin J₂ Inhibits the b2 Integrin-Dependent Oxidative Burst: Involvement of a Mechanism Distinct from Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Ligand. **J. Immunol.** v.163, p. 6187–6192, 1999.
- Van der Pouw Kraan, T., et al., Prostaglandin-E₂ is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **J Exp Med**, v.181, n.2, p.775-9, 1995.
- Van Ly, D.; Burgess, J.K.; Brock, T.G.; Lee, T.H.; Black, J.L.; Oliver, B.G.G. Prostaglandins but not leukotrienes alter extracellular matrix protein deposition and cytokine release in primary human airway smooth muscle cells and fibroblasts. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.303, p. 239-250, 2012.
- Yang, L.; Yamagata, N.; Yadav, R.; Brandon, S.; Courtney, R.L.; Morrow, J.D.; Shyr, Y.; Boothby, M.; Joyce, S.; Carbone, D.P. Breyer, R.M. Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 727-735. 2003.
- Yoon, W.J.; Lee, N.H.; Hyun, C.G. Limonene Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide, Prostaglandin E₂, and Pro-inflammatory Cytokines in RAW 264.7 Macrophages. **J. Oleo Science**, v.59, n.8, p.415-421, 2010.
- Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v.231, n.25, p.232-5, 1971.
- Vane, J.R.; Bakhle, Y.S.; Botting, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.38, p.97-120, 1998.
- Watson, S.R., et al., Immunoregulation in disseminated murine histoplasmosis: disturbances in the production of interleukins 1 and 2. **J Immunol**, v.135, n.5, p.3487-93, 1985.
- Wheat, L.J. Systemic fungal infections: diagnosis and treatment. I. Histoplasmosis. **Infect Dis Clin North Am**, v.2, n.4, p.841-59, 1988.

- Woods, J.P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. **Fungal Genet Biol**, v.35, n.2: p.81-97. 2002.
- Woolard, M.D.; Wilson, J.E.; Hensley, L.L.; Jania, L.A.; Kawula, T.H.; Drake, J.R.; Frelinger, J.A. *Francisella tularensis*-infected macrophages release prostaglandin E₂ that blocks T cell proliferation and promotes a Th2-like response. **J Immunol**, v.178, n.4, p.2065-2074, 2007.
- Wright, D.H.; Metters, K.M.; Abramovitz, M.; Ford-Hutchinson, A.W. Characterization of the recombinant human prostanoid DP receptor and identification of L-644,698, a novel selective DP agonist, **Br. J. Pharmacol.** v.123,p. 1317–1324, 1998.
- Wu, C.Y., et al., Prostaglandin E₂ and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. **J Immunol**, v.161, n.6, p.2723-30, 1998.
- Xue, L., et al., Prostaglandin D₂ causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. **J Immunol**, v.175, n.10, p.6531-6, 2005.
- Zayed, N.; Mansouri, F.E.El.; Chabane, N.; Martel-Pelletier, J.; Pelletier, J.P.; Fahmi, H. Prostaglandin D₂ enhances interleukin- 1beta- induced cyclooxygenase-2 expression in osteoarthritic cartilage.**Journal of Translational Medicine**, v.8(Suppl 1),p.61, 2010.
- Zhang, X.; Young, H.A. PPAR and immune system—what do we know? **Int. Immunopharmacol.** v.2, p. 1029– 1044, 2002.
- Zhou, P., et al., IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN-gamma. **J Immunol**, v.155, n.2, p.785-95, 1995.
- Zhou, P., et al., Interleukin-12 modulates the protective immune response in SCID mice infected with *Histoplasma capsulatum*. **Infect Immun**, v. 65, n.3, p.936-42, 1997.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.375.53.5), intitulado: "Avaliação do Papel da PGD₂ e da PGE₂ nos mecanismos Efetores de Macrófagos Alveolares Infectados *in vitro* com *Histoplasma capsulatum* e na Resposta Imune Durante Infecção Experimental *in vivo*", de autoria de **Priscila Aparecida Tartari Pereira** e de **Lúcia Helena Faccioli**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 02/06/2009.

Ribeirão Preto, 3 de junho de 2009

Presidente da CEUA em exercício
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretaria da CEUA
Maria Angélica Depiro

ProstaglandinD₂-loaded microspheres: characterization and activities on alveolar macrophages

Priscilla Aparecida Tartari Pereira¹, Claudia da Silva Bitencourt¹, Guilherme Gelfuso¹, Roberto Nicolete², Daiane Fernanda dos Santos¹, Lúcia Helena Faccioli^{1*}.

¹*Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 14040-903, Brazil.*

²*Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Rondônia), Rua da Beira, 7671, CEP 76812-245, Porto Velho-RO, Brazil.*

Abstract

Biodegradable polymeric carriers, such as poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) particles, can loading lipid mediators and its efficient transport to target cell. The lipid mediators may provide a strategy for modulating the inflammatory response or infectious processes. The aim of this study was to develop and characterize microparticles loaded with Prostaglandin D₂ (MS-PGD₂) in order to provide a strategy for cellular activation. MS-PGD₂ were developed by an o/w emulsion solvent extraction-evaporation method, characterized as size, zeta potential, morphology, encapsulation efficiency and *in vitro* activities using alveolar macrophages. We demonstrated the high uptake of MS-PGD₂ by those cells and further increase on nitric oxide and cytokines production, such as TNF- α , IL-1 β and TGF- β after incubation period. Using another strategy, we stimulated macrophages for 2 h with LPS, and then with MS-PGD₂ 24 h after initial stimulus. We evaluated the increase on NO and IL-1 β and also decrease on IL-6 productions by macrophages. In conclusion, the biodegradable MS-PGD₂ were able to activate alveolar macrophage and demonstrated to have potential to be used in the treatment for inflammation.

Keywords: PLGA, microparticles, PGD₂, phagocytosis, alveolar macrophages

Introduction

Drug delivery systems that employ polymeric carriers to increase the specific immune response, or are capable of selectively targeting the antigen or gene vector to the effector cells, and sustained release of encapsulated lipid mediators [1-5]. In the context of controlled release polymeric systems, many studies have employed microparticles consisting of esters derived from lactic and glycolic acid (PLGA) [3-5]. This approach allows the construction of polymeric particles which size ($<10\ \mu\text{m}$) provides more efficient interaction with phagocytes [4-5]. Furthermore, it has adequate stability and degradation [3]. The polymers derived from lactic acid are more hydrophobic than glycolic acid derivatives [6-8], which allow the suitability of different rates of encapsulation, based on chemical characteristics of the target molecules in the process [9]. PLGA microparticles are hydrolyzed and once degraded, can release lactic and glycolic acids, which are innocuous substrates [8, 9].

The potential for using these encapsulated systems, which are efficiently engulfed by macrophages, may contribute to the initiation and modulation of innate or acquired immune responses. Also, they can provide the administration of compounds by different routes such as intranasal, intratracheal, intramuscular, and/or systemic [2,10]. Therefore, these advantages allow the study of various molecules, ensuring their biological actions for a longer time.

Our research group has experience in the use of microspheres (MS) containing lipid mediators and their actions on cellular responses both *in vivo* and *in vitro*. We showed that PLGA MS containing LTB_4 (MS- LTB_4) are greater uptaken by murine peritoneal macrophages than control particles, they induced the production of NO in murine macrophages and also human endothelial cells with significant increase in the expression of nuclear receptor PPAR- α [5]. In mice, when administered intratracheally, those microspheres containing LTB_4 were able to increase the recruitment of leukocytes into the bronchoalveolar space [4]. Other study showed that MS- PGE_2 are phagocytosed by murine macrophages and were able to inhibit TNF- α production when cells were stimulated with LPS. Also, those MS induced the production of nitrites and MCP-1 by human endothelial cells [11].

The administration of lipid mediators to cells may provide a strategy for modulating the inflammatory response or infectious processes. In mice model of inflammation, the resolution of inflammation ratio with increase PGD_2 production and

its metabolism product (15PGJ₂) and TGF- β [12-13]. Also, it was shown that the intratracheal administration with PGD₂ decreased CFU counts in the lung of *Pseudomonas aeruginosa*-infected mice [14]. PGD₂ and its metabolic, such 15dPGJ₂ can modulate NF- κ B activation, provoking ICAM-1 and VCAM-1 suppression or iNOS and COX-2 induction [15].

Regarding the features of PGD₂ molecule, when in solution form, it is very unstable and the encapsulation in PLGA MS can be an attractive approach to confer protection and also a sustained release of this lipid mediator. So, the aim of this study was to develop and characterize biodegradable PLGA MS containing PGD₂ (MS-PGD₂) and to evaluate their biological activities on alveolar macrophages. The MS-PGD₂ were evaluated as the size, zeta potential, morphology and encapsulation efficiency. We demonstrated that MS were discharged phagocytosed by cells as expected. MS-PGD₂ presented higher phagocytic index and percentage of phagocytosis when compared with unloaded-MS. In addition, alveolar macrophages incubated with MS-PGD₂ were able to produced nitrites, TNF- α , IL-1 β (24 h) and TGF- β , IL-6 (48 h). The microparticulated delivery system obtained in this study showed potential applications for its intranasal administration during inflammatory or infectious processes. The MS-PGD₂ can constitute an alternative approach to the development of novel therapeutics based on the lipid mediators, since PGD₂ is involved with the modulation of inflammation converging to its resolution.

Materials and methods

2.1. Animals

Wistar rats were obtained from Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil and maintained under standard laboratory conditions. All experiments were approved by and conducted in accordance with the guidelines established by the Animal Care Committee of the University (Protocol 09.1.375.53.5).

2.2. Materials

This study utilized LPS of *Escherichia coli* (serotype 0127:B8), Griess reagent mixtures from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Poly(d,l-lactide-coglycolide) (PLGA) with a co-monomer ratio of 50:50 (lactic/glycolic acid) and molecular weight

of 78 kDa was obtained from Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Germany). Poly(vinyl-alcohol) (Mowiol 40–88) was obtained from Aldrich Chemicals (Waukee, WI, USA). Methylene dichloride and acetonitrile were purchased from Merck (Dietikon, Switzerland). Acqua Poly/Mount was obtained from Polysciences, Inc. (Warrington, PA). The PGE2 and PGD2 were from Cayman. Panoptic staining was from Laborclin (Paraná, Brazil). For the detection of endotoxin in formulations a Limulus Amoebocyte Lysate test (LAL test, QCL-1000, Bio Whittaker, CAMBREX Company, Walkersville, MD, USA) was used. RPMI-1640 medium, FBS and antibiotics (penicillin and gentamicin) were from Gibco (Grand Island, NY, USA). For cell cultures, non-tissue culture treated plates from Becton Dickinson (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) were used. Commercially enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) antibodies were used to measure TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.3. MS preparation

MS-PGD₂ or MS-unloaded were prepared using the emulsion/solvent evaporation method, as previously described with some modifications [5, 16]. Briefly, 10 ml of methylene dichloride containing 100mg of polymer (PLGA 50:50) were emulsified with 0.3 ml of inner aqueous phase containing PGD₂. This emulsion was then mixed with 20 ml of an external aqueous phase containing surfactant (PVA at 3%, w/v), in order to form a stable water-in-oil in-water emulsion. The mixture was stirred for 4 h in RW20 homogenizer (IKA, Labortechnik, Germany) at 600rpm for solvent evaporation. MS were collected and washed three times with distilled and sterile water and freeze-dried until the use. Unloaded MS were prepared at the same conditions without PGD₂ addition.

2.4. MS characterization

2.4.1. Size, zeta potential and morphology

Particles' diameters were characterized using a particle size analyzer (LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer; Beckman Coulter, USA). All samples (1mg) were dispersed in distilled water (0.4 ml) and analyzed at 25°C. Zeta potential analysis of the MS was performed using a Nano Zeta Sizer (Malvern instruments, England) under the same condition described above. To determine whether the MS

were contaminated by LPS, a LAL test was performed. According to the European Pharmacopoeia, the safety level for endovenous administration is 5 EU/kg/h. The shape and surface of the dried microparticles were observed by scanning electron microscopy (SEM), using a ZEISS scanning microscope (ZEISS, Evo 50, Cambridge, England).

2.4.2. Encapsulation efficiency and *in vitro* release study

The encapsulation efficiency of PGD₂ in solution from MS was performed using ELISA. The samples from MS-PGD₂ (4mg) were dissolved in 1 ml of acetonitrile/ethanol (7:3 v/v), and the solvents were evaporated in vacuum concentrator centrifuge for 4 h. The samples were resuspended in 0.05 ml of ELISA buffer and was performed using a specific enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, Mich.) according to the instructions of the manufacturer. For *in vitro* release study MS-PGD₂ (4 mg) were suspended in 1 ml of PBS/ethanol medium (50:50, v/v), pH 7.4 and incubated at 37°C on a rotating incubator. Samples were withdrawn at 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 9, 18, 24 and 48 h and centrifuged (500 x g, 10 min). An equal volume of fresh medium was immediately added to the compartment after each sampling. The concentration of PGD₂ present in the medium was determined by ELISA, as described above. The optical density at 450 nm was determined using a plate reader. The sample values were calculated based on the equation obtained from the calibration curve: $y = -16.28 \ln(x) + 158.35$; $r^2 = 0.9924$, where y is the absorbance, x is the lipid mediator concentration (pg/ml), and r is the coefficient of determination. Results correspond to the average of three different batches.

2.5. Uptake of MS by alveolar macrophages (AMs)

AMs from rats were obtained by ex vivo lung lavage, as previously described [15]. Firmly adhered cells in 24-well plates (2×10^5 cells/well) on cover glass (13mm) were co-incubated for 4h, 8h, 24h and 48h with 1 mg/ml of MS-unloaded, MS-PGD₂ or MS-PGE₂ (described by Nicolette et al., 2008), as a comparison experiment. After incubation, the medium was aspirated and non-ingested MS were washed off with additional medium. The cover glasses were stained with Panoptic (similar to Diff-Quick®; Laborclin, Paraná, Brazil). MS uptake was assessed microscopically by

counting the percentage of macrophages that had ingested at least one MS. The number of MS per cell was also evaluated.

2.6. NO and cytokines production by AMs

NO production was assessed by measuring the amount of nitrites (NO_2^-) in lung homogenates using the Griess reaction as described [11]. Values were determined using a standard curve with serial dilutions of NaNO_2 (Sigma). AMs ($2 \times 10^5/\text{ml}$) were placed in a 24-well culture plate and after 24 and 48h incubation in a humidified atmosphere (37°C , 5% CO_2) with 1 mg/mL of MS-unloaded, MS-PGD₂ or PGD₂ in solution (3×10^{-6} M), the supernatants were collected for assaying cytokines. As positive control, cells were stimulated with LPS (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Only medium was used as negative control. Another experiment was conducted to test of inflammatory and anti-inflammatory potential of MS-PGD₂. AMs were pre-stimulated with LPS (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and after 2 h they were incubated with the same compounds described above. After 24 h of incubation the supernatants were collected. All supernatants from AMs culture were incubated with specific antiserum in 96-well plates pre-coated with anti-rabbit IgG antibodies and the cytokines IL-1 β , TNF- α and TGF- β were assessed by commercial Kit (R&D Systems, Minneapolis, Minn.), according to the instructions of the manufacturer.

2.7. Statistical analysis

The data are presented as mean $\pm$ S.E.M. and analyzed using unpaired t-test. Data were normalized by log transformation, when appropriate. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3.Results

3.1.Characterization of MS-PGD₂

The lyophilized MS-PGD₂ and MS-Unloaded were dispersed in distilled water and analyzed of size distribution, with diameter of $5,03 \pm 3,3 \mu\text{m}$ (Fig 1A) and $4.2 \pm 2.7 \mu\text{m}$ (Tabele1), respectively. Zeta potential was evaluated for both MS and no change on ionic profile was achieved. The average potential zeta was $-13,8 \pm 5,7 \text{ mV}$ for MS-PGD₂ and $-13,8 \pm 5,4 \text{ mV}$ for MS-unloaded. SEM of the particles was shown in Fig 1 with spherical format and smooth surface.

Tabele 1. Characterization of microparticles

PLGA MS	Size	Negative Zeta Potential
Unloaded MS	$4.2 \pm 2.7 \mu\text{m}$	$-16.5\text{mV} \pm 4.7\text{mV}$
MS-PGD ₂	$5.0 \pm 3.3 \mu\text{m}$	$-13.8\text{mV} \pm 5.7\text{mV}$

Figure 1. (A) MS-Unloaded and (B) MS-PGD₂ morphologies assessed by scanning electronic microscopy (SEM).

3.2. Encapsulation efficiency and *in vitro* release of PGD₂

The encapsulation efficiency of PGD₂ was determined with EIA kit. The amount of PGD₂ was found to be $2,957 \pm 8.3$ ng in 1mg of microspheres. This value represents an encapsulation efficiency of 39.48%. The 48 h cumulative release and diffusion of PGD₂ from the PLGA microspheres (mean $\pm$ SD) is shown in Fig 3. In the present study, a burst effect was observed, in which the release of the entrapped mediator reached approximately 16% 4 h later. At the end point of the study (48 h), a 26% release was reached. Nevertheless, the remaining 74% of the PGD₂ encapsulated could be released over a longer period of time.

Figure 2. *In vitro* cumulative release of PGD₂ from PLGA microspheres in PBS/ethanol medium, pH 7.4; data are representative of three batches.

3.3. Efficient uptake of the MS-PGD₂ by AMs

To test the preservation of the biological activity of encapsulated PGD₂, we performed the uptake assay (Fig 3). At every time evaluated the uptake assay of AMs revealed a greater number of engulfed MS-PGD₂ when compared with those incubated with MS-unloaded. For comparison purposes, we incubated another batch of particles produced in our lab (MS-PGE₂) and these were less uptaken when compared with MS-unloaded and MS-PGD₂.

Figure 3. Uptake of MS-unloaded, MS-PGD₂ or MS-PGE₂ by AMs. In the uptake assay, the phagocytic index (PI) was calculated after 4 h (A), 24h (B) or 48h (C). $PI = (\text{number of engulfed MS} \times \text{number of AMs containing at least one MS}) / \text{total number of AMs}$. Results are presented as mean $\pm$ S.E.M. of one representative of three experiments ($n = 4$); * $P < 0.05$, relative to values in the MS-unloaded and # $P < 0.05$, relative to values in MS-PGD₂.

3.4. The input of the MS is inside the AMs through the phagocytosis.

As expected, there was decrease particle uptake after pre-treatment of AMs with cytochalasin D, because this metabolite that have the ability to bind to actin filaments and block polymerization and the elongation of actin. Therefore, reduces their phagocytotic capacity (Fig 4).

Figure 4. Control of uptake of MS-unloaded and MS-PGD₂ by AMs. In the uptake assay, the phagocytic index (PI) was calculated after 4 h of incubation. PI = (number of engulfed MS × number of AMs containing at least one MS)/total number of AMs. Results are presented as mean ± S.E.M. of one representative of three experiments (n = 4); # P < 0.05, relative to values in cytochalasin D pre-treatment. ANOVA test was used.

3.5. AMs incubation with MS-PGD₂ induces NO production

To evaluate the biological activities of MS-PGD₂ on AMs, firstly we determined nitrite levels, as an indirect measure of NO production. Fig 5 shows that MS-unloaded and MS-PGD₂ were able to stimulate NO production by AMs. In addition to this, after 4h and 24 h incubation (Fig. 5 A and B), MS-PGD₂ could confer the highest NO levels compared with MS-unloaded and PGD₂-soluble. There was no difference between 48 hs incubation with MS-unloaded and MS-PGD₂. Both particles were able to stimulate NO production by AMs when compared to AMs without stimulation (Fig 5 C).

Figure 5. NO production by AMs. The nitrite levels were quantified by Griess reaction in the supernatants of unloaded microspheres (MS), MS-PGD₂ or PGD₂-soluble after 4h (A), 24h (B) and 48h (C) of incubation. Results are presented as mean $\pm$ S.E.M. of one representative of three experiments ($n = 4$); * $P < 0.05$, relative to values in the medium, # $P < 0.05$, relative to values the group control (unloaded MS) and & $P < 0.05$, relative to values the MS-PGD₂ versus PGD₂-soluble.

3.6. Uptake of MS-PGD₂ by AMs induces TNF- α , IL-1 β and TGF- β production.

After 24 h incubation with MS-PGD₂ increased concentration of TNF- α and IL-1 β (Fig. 6 A and C), in 48 hours remained increased for TNF- α , IL-1 β and to increase TGF- β (Fig 6 B , D and F), compared to AMs without stimulus. The encapsulation of PGD₂ resulted in increased TNF- α and IL-1 β at 24 and 48 hours of incubation, and increased to TGF- β in 48 hours, compared to incubation with MS-unloaded (Fig 6). We also compare the PGD₂ encapsulated with soluble PGD₂. We obtained in 24 and 48 hours an increase of concentration of TNF- α and in 48 hours an increase to IL-1 β , when AMs were incubated with MS-PGD₂.

Figure 6. TNF- α , IL-1 β and TGF- β production by AMs in 24h and 48h after incubation without stimulus, with 1mg/ml of MS-unloaded, MS-PGD₂ or PGD₂ soluble. Results are presented as mean $\pm$ S.E.M. of one representative of three experiments (n = 5-6); * P < 0.05, relative to values in the medium; # relative to values in the MS-unloaded; & MS-PGD₂ in compared with PGD₂ soluble.

3.7.Effects therapeutics from MS-PGD₂ in inflammation.

Considering inflammatory effect that LPS was able to induce NO and cytokines production, we investigated their ability to stimulate macrophage to production TNF- α , IL-1 β and IL-6, and what effect of treatment with MS-PGD₂. After 24hours of LPS stimulus, as represented by the experimental design in Figure 8 (A), we collected the culture supernatant and next quantified an increase of NO production to LPS stimulus (Fig 7 B). Treatment with MS-PGD₂ increased NO production by AMs, when compared with LPS stimulation or MS-unloaded treatment. To the compared to treatment with soluble PGD₂, the treatment with MS-PGD₂ was able to increase production of NO (Fig 7 C). The second step was to quantify the cytokines produced by AMs after stimulation with LPS. As shown in Figure 7 (C),(D) and (E) the LPS stimulation provides the production of TNF- α , IL-1 β and IL-6, respectively. Treatment with MS-unloaded was able to decrease of production these inflammatory cytokines by AMs. On the other hand, the treatment MS-PGD₂ increased IL-1 β , decreased production of IL-6, but did not affect production of TNF- α by AMs, when compared with AMs incubated only with LPS. The encapsulation of PGD₂ provided an increase of TNF- α , IL-1 β and IL-6 when compared with the control, the MS unloaded. For the control of MS-PGD₂ also treat AMs LPS stimulated with PGD₂ soluble. Only treatment with soluble PGD₂ compared with MS-PGD₂ resulted in decreased IL-1 β .

Figure 7. Effects of MS-PGD₂ and PGD₂ soluble on NO, TNF-α, IL-1β and IL-6 release in the presence of LPS. Adherent AMs were stimulated with pre-stimulated with LPS (0.5 μg/mL) and after 2 h with MS-unloaded, MS-PGD₂ or PGD₂ soluble were added (A). The supernatants were collected after 24 h. The amount of NO present (B) in the supernatant was determined by Greiss assay. The amount of TNF-α (C), IL-1β (D) and IL-6 (E) present in the supernatant was determined by ELISA assay. Values are expressed as mean ± SD (*n* = 6) of two independent experiments. **P* < 0.05 compared to cells without stimulation; ***P* < 0.05 compared to cells LPS stimulation; #*P* < 0.05 compared to cells LPS stimulus & *P* < 0.05 compared to cells MS-PGD₂ treatment.

4. Discussion

PGD₂ can present different activities, such as proinflammatory action as in the lung inflammation and asthma [17-20], or showing anti-inflammatory profile as in the lung inflammatory process induced by bleomycin or carrageenan [21,22]. Also, it is known that the intratracheal administration of PGD₂ enhances clearance of microorganisms from the lungs of infected mice [14]. Due to the fact that prostaglandins are very unstable, susceptible to easy oxidation, as an auxiliary tool for research regarding drug delivery systems we employed the method of microencapsulation by loading lipid mediators in biodegradable polymers in order to preserve PGD₂ biological activities. The prolonged/sustained release of bioactive conferred by these systems, which employ polymeric carriers have gained great interest in recent years by increasing the specific immune response. They are capable of selectively targeting the antigen or genetic vector for the effector cells and, as reported in this study, releasing of lipid mediators from PLGA MS [2-5,23]. Biodegradable MS containing PGD₂ were prepared, characterized and evaluated as their ability to modulate pro/anti-inflammatory activity in AMs. PLGA polymer allows the construction of biodegradable microparticles which size (<10 µm) enables their prompt interaction with phagocytes [4,5]. Here, MS-PGD₂ had an ideal average size (5.03 ± 3.3 µm), negative zeta potential (-13.8 ± 5.7 mV) and smooth surface. The same technique based on the evaporation and emulsion solvent extraction method was employed in other studies to obtain microspheres containing LTB₄ or PGE₂ [4,5,24,25]. We demonstrated MS-PGD₂ prolonged *in vitro* release until 48 h with a rate of 26% (Fig 3). The precise measurement of the encapsulated content is a critical step for the employment of polymeric microparticulated system [26,27]. In this context, we determined the encapsulation efficiency of PGD₂ by extracting the encapsulated molecule from the polymeric matrix and dosing it by EIA kit. Our results showed that the encapsulation rate achieved for PGD₂ was 36%. Similar results in the efficient incorporation of PGE₂ and LTB₄ in MS were described by our group [4,5]. In this study, MS-PGD₂ showed a greater phagocytic index when compared to MS-PGE₂ (Fig 4). Nicolette et al., (2008) showed that PGE₂ released from MS inhibits the uptake of particles by peritoneal macrophages. PGD₂ soluble when administered intratracheally increases the elimination of bacteria from the lungs of infected mice [14]. This fact could contribute to the development of future studies to elucidate the

action of this mediator during the inflammatory diseases. Macrophages are important cells involved in defense mechanisms against microorganisms. Phagocytosis involves a sequence of events that lead to transduction rearrangements in cytoskeleton and membrane with consequent particle aggregation [28]. The increase of phagocytosis occurred along with an increase in nitrite production (Fig 5), inflammatory cytokines (TNF- α , IL- 1 β) and anti-inflammatory (TGF- β) (Fig 6). It is known that exogenous NO can increase the concentrations of PGD₂-dependent activation of COX - 2 via the p38 MAPK [29]. In this regard, NF-kB is a key transcription factor associated with expression of many genes involved in immune and inflammatory responses [30]. The production of inflammatory mediators by macrophages suggests that these classically been activated [31,32]. And this relates to the process of phagocytosis and cell activation, where macrophages can produce inflammatory cytokines and NO [33]. Since the production of cytokines such as TNF - α and IL - 1 β , are essential for the development of the defense mechanisms of the host [34-36] Th1 response and contributes to the generation of opsonizing antibodies [37], our formulations can be used as a strategy to study a cell type or for a given infection. The increase of nitrite, TNF- α , IL- 1 β and TGF- β after 24 and 48 hours of incubation with MS- PGD₂ may explain in part the inflammatory role for macrophage activation and PGD₂. In inflammatory processes, PGD₂ is the major PG released by mast cells and activated macrophages, mediates vasoconstriction or vasodilation, bronchoconstriction, inhibits platelet aggregation, and allergic response and can modulate chemotaxis of eosinophils and Th2 lymphocytes, among others [18, 38-40]. PGD₂ and participates in tissue remodeling and repair [41]. It is known that the resolution in animal models of inflammation coincides with leukocyte apoptosis, increasing PGD₂ and its metabolites 15dPGJ₂ [12]. Also, PGD₂ and its metabolites regulate the activation of NF- κ B, and consequently regulate the suppression of genes encoding adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM -1), or in the regulation of iNOS and COX -2 [42]. Moreover, other studies PGD₂ can inhibit the production of cytokines such as TNF- α , IL- 6 and IL- 1 β [43-45]. In our study, the preservation of the biological activities of MS-PGD₂ allowed show their inflammatory action when incubated and phagocytosed by alveolar macrophages. This inflammatory effect may be temporal, since quantify the cytokines for 48 hours after incubation, and after this period PGD₂ can have an effect on other cytokines. As

already described, the involvement of PGD_2 in immune response is delayed and can exert an anti-inflammatory action contributing to the resolution of inflammation [40]. Thus, this approach did another study, in which rat alveolar macrophages were stimulated with LPS (0.5 mg / ml) and after 2 hours this stimulus were incubated or not with MS- PGD_2 or soluble PGD_2 by 22 hours. LPS activates macrophages via Toll-like receptor (TLR) 4 [46] and thus enhances the production and secretion of inflammatory mediators and lipid [47,48]. Prostaglandins can recruit leukocytes, and induce cell to release various cytokines and chemokines [49,50]. Our results also demonstrated the release of NO, IL- 1β , IL-6 and TNF- α in the culture supernatant of rat alveolar macrophages stimulated with LPS (Fig 7), as described by Yoon et al [51]. After stimulation with LPS, treatment with MS- PGD_2 resulted in increased production of IL- 1β and NO, decreased production of IL- 6 but did not affect production of TNF- α by alveolar macrophages. Others datas may partly explain our results, since LPS stimulation regulates the expression of the COX-2 enzyme in a time dependent manner, resulting in the production of PGD_2 and PGE_2 [52,53]. Other results demonstrated that NO donors can increase the production of PGD_2 and IL-6, and expression of COX- 2 in mast cell [29]. On the other hand, mice deficient H- PGDS enzyme produced more IL-6 [54]. Taken together these results and incubation with MS- PGD_2 enhanced the production of inflammatory cytokines, but decreases the production of IL-6. In addition, the ratio of NO and PGD_2 , may explain the observed increase of NO in the culture supernatants of macrophages stimulated with LPS and treated with MS- PGD_2 . Contrary to our data showed that exogenous PGD_2 (soluble) inhibits the production of NO and iNOS [55]. However, as described above, these differences can be explained in part by phagocytosis that can activate the macrophage to produce inflammatory mediators. Peritoneal macrophages PGD_2 decreased the production of TNF- α , but do not alter the nitrite production by these cells [56]. As for IL- 1β , its production can be increased by chondrocytes incubated with PGD_2 [57]. It is known that IL- 1β increases the production of prostaglandins by stimulating the expression of COX -2 [58] and the addition of PGD_2 or PGE_2 can increase the expression of COX-2 [59]. In this context, prostaglandins are biologically active molecules that have different effects on various cells and tissues under physiological and pathophysiological conditions [60]. Known as potent lipid inflammatory mediators, prostaglandins such as PGD_2 , can function

dually promoting or resolving inflammatory response [61,62]. Therefore, we believe that MS-PGD₂ can more efficiently activate the defense mechanisms of the host. As to date, nothing has described about the PGD₂ encapsulated, our in vitro results ensured the effectiveness of the encapsulation method, and thus enable the evaluation of this formulation as a possible therapy in infection disease.

5. Reference

- 1.Lima, K.M., et al., Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Ther*, 2003. **10**(8): p. 678-85.
- 2.Eldridge, J.H., et al., Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol Immunol*, 1991. **28**(3): p. 287-94.
- 3.Lima, K.M. and J.M. Rodrigues Junior, Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. *Braz J Med Biol Res*, 1999. **32**(2): p. 171-80.
- 4.Nicolete, R., et al., *In vitro* and *in vivo* activities of leukotriene B4-loaded biodegradable microspheres. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007. **83** (1-2): p. 121-9.
- 5.Nicolete, R., et al., Leukotriene B4-loaded microspheres: a new therapeutic strategy to modulate cell activation. *BMC Immunol*, 2008. **9**: p. 36.
- 6.Cohen, S., M.J. ALONSO, and R. LANGER, Novel approaches to controlled release antigen delivery. *Int J Technol Assessment Health Care* 1994. **10**: p. 121-130.
- 7.Wu, X.S., Synthesis and properties of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. In: Wise, D. L. . *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. Nova Iorque, Marcel Dekker, 1995: p. 1015-1054.
- 8.Bazile, D.V., et al., Body distribution of fully biodegradable [¹⁴C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials*, 1992. **13**(15): p. 1093-102.
- 9.Gupta, V., Rawat, A., Ahsan, F. Wu-Hsieh, and D. H. Howard. Feasibility Study of Aerosolized Prostaglandin E1 Microspheres as a Noninvasive Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *J Pharmaceutical Sciences*, 2010; **99**:1774-1789.
- 10.O'hagan, D.T., H. JEFFERY, and S.S. DAVIS, Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable microparticles. *Vaccine*, 1993. **11**: p. 965-969.
- 11.Nicolete, R., et al., Prostaglandin E(2)-loaded microspheres as strategy to inhibit phagocytosis and modulate inflammatory mediators release. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008. **70**(3): p. 784-90.
- 12.Lawrence, D.A., *Latent-TGF-beta: an overview*. *Mol Cell Biochem*, 2001. **219**(1-2): p. 163-70.
13. Young-Joon Surh, Hye-Kyung Na, Jong-Min Park, Ha-Na Lee, Wonki Kim, In-Soo Yoon, Dae-Duk Kim. 15-Deoxy-D12,14-prostaglandin J 2, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochemical Pharmacology*, 2011. **82**: p. 1335–1351.
14. Joo M, Kwon M, Sadikot RT, Kingsley PJ, Marnett LJ, Blackwell TS, Peebles RS, Jr., Urade Y, Christman JW: Induction and function of lipocalin prostaglandin D synthase in host immunity. *J Immunol* 2007, **179**(4):2565-2575.
- 15.Castrillo, A., et al., *Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(5): p. 1692-8.
16. Trombone, A. P. F.; Silva, C. L.; Almeida, I. P.; Rosada, R. S.; Lima, K. M; Oliver, C.; Jamur, M. C.; Coelho-Castelo, A. A. M. Tissue distribution of DNA-HSP65/TDM-loaded PLGA microspheres and uptake by phagocytic cells. **Genetic Vaccines and Therapy**. vol. 5 (9), p. 1-8, 2007.

17. Arima, M. and T. Fukuda, Prostaglandin D2 receptors DP and CRTH2 in the pathogenesis of asthma. *Curr Mol Med*, 2008. 8(5): p. 365-75.
18. Matsuoka, T., et al., Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science*, 2000. 287(5460): p. 2013-7.
19. Fujitani, Y., et al., Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J Immunol*, 2002. 168(1): p. 443-9.
20. Spik, I., et al., Activation of the prostaglandin D2 receptor DP2/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse. *J Immunol*, 2005. 174(6): p. 3703-8.
21. Ianaro, A., et al., *Role of cyclopentenone prostaglandins in rat carrageenin pleurisy*. *FEBS Lett*, 2001. 508(1): p. 61-6.
22. Ando, M., et al., *Retrovirally introduced prostaglandin D2 synthase suppresses lung injury induced by bleomycin*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2003. 28: p. 582-591.
23. Lima, K.M. and J.M. Rodrigues Junior, *Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system*. *Braz J Med Biol Res*, 1999. 32(2): p. 171-80.
24. Nicolette R, dos Santos DF, Faccioli LH. The uptake of PLGA micro or nanoparticles by macrophages provokes distinct in vitro inflammatory response. *Int Immunopharmacol*. 2011. 11(10):1557-63.
25. Dos Santos DF, Bitencourt CS, Gelfuso GM, Pereira PA, de Souza PR, Sorgi CA, Nicolette R, Faccioli LH. Biodegradable microspheres containing leukotriene B(4) and cell-free antigens from *Histoplasma capsulatum* activate murine bone marrow-derived macrophages. *Eur J Pharm Sci*. 2011. 18;44(5):580-8.
26. Feng, Li; Gi, X. R.; Zhou, X. J.; Maitani, Y.; Wang, S. C.; Jiang, Y.; Nagai, T. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-dose hepatitis B vaccine using PLGA microspheres. *J. Control. Release*, 2006. 112: p. 35-42.
27. Gupta, R. K.; Chang, A.C.; Griffin, P.; Rivera, R.; Guo, Y.Y.; Siber, G. R. Determination of protein loading in biodegradable polymer microspheres containing tetanus toxoid. *Vaccine*. 1997, 15 (6/7): p. 672-678, 1997.
28. Gordon, S., *The macrophage: past, present and future*. *Eur J Immunol*, 2007. 37 **Suppl 1**: p. S9-17.
29. Moon, T.C.; Befus, A.D. Exogenous nitric oxide regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin D(2) generation through p38 MAPK in mouse bone marrow-erived mast cells. **Free Radic Biol Med.**, v.45, n.6, p.780-8. 2008.
30. Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kB and IKK function. **Nat. Rev. Mol. Cell Bio.** vol. 8, p. 49-62, 2007.
31. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* v.73, p.209-212, 2003.
32. Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.**, v.25, n.12, p.677-686, 2004.
33. Underhill, D.M, Ozinsky, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol*. 2002, 20:825-52.
34. Deepe, G.S. Jr., Immune response to early and late *Histoplasma capsulatum* infections. **Curr Opin Microbiol.** v.3, n.4, p.359-62, 2000.
35. Deepe Jr., G. S.; Gibbons, R. S. T Cells require tumor necrosis factor- α to provide protective immunity in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. **J. Infect. Dis.** v.193, n.2, p.322-330, 2006.

36. Deepe, G.S., Jr; McGuinness, M. Interleukin-1 and host control of pulmonary histoplasmosis. **J Infect Dis.** v.194, n.6, p.855-64, 2006.
37. Cutler, J. E.; Deepe Jr., G. S.; Klein, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. **Nat. Rev. Microbiol.** v.5, p.13-28, 2007.
38. Hirai, H., et al., Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **J Exp Med.** v.193, n.2, p.255-61, 2001.
39. Kanaoka, Y.; Urade, Y. Hematopoietic prostaglanin D synthase. *Prostaglandins Leukot. Essent.Fatty Acids.* v.69, n.2-3, p.163-167, 2003.
40. Joo, M.; Sadikot, R.T. PGD synthase and PGD₂ in immune resposne. **Mediators Inflamm.** 503128, 2012.
41. Kohyama, T.; Wyatt, T.A.; X Liu, Wen, F.; Kobayashi, T.; Fang, Q.; Kim, H.J.; Rennard, S.I. PGD₂ Modulates Fibroblast-Mediated Native Collagen Gel Contraction. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v.27, p.375–381, 2002.
- 42.Castrillo, A., et al., Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. **Mol Cell Biol.** v.20, n.5, p.1692-8, 2000.
- 43.Kyomiya, K.; Oh-Ishi, S. Involvement of arachidonic acid metabolites in acute inflammation: detection of 6-keto-PGF1 alpha, thromboxan B2 and PGD₂ in rat pleurisy induced by phorbol myristate acetate. **Jpn. J. Pharmacol.**, v.39, n.2, p.201-206, 1985.
44. Jiang, C.; Ting, A.T.; Seed, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v.391, n.6662, p.82-86, 1998
45. Murata, T.; Aritake, K.; Tsubosaka, Y.; Maruyama, T.; Nakagawa, T.; Hori, M.; Hirai, H.; Nakamura, M.; Narumiya, S.; Urade, Y.; Ozaki, H. Anti-inflammatory role of PGD₂ in acute lung inflammation and therapeutic application of its signal enhancement. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.110, n.13, p.5205-10, 2013.
46. Akira, S.; Takeda, K.; Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat Immunol.**, v.2, p.675–680, 2001.
47. Ulevitch, R.J.; Tobias, P.S. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. **Curr Opin Immunol**, v.11, p.19–22, 1999.
48. Tajima, T.; Murata, T.; Aritake, K.; Urade, Y.; Hirai, H.; Nakamura, M.; Ozaki, H.; Hori, M. Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D(2) and prostaglandin E(2). *J Pharmacol Exp Ther.* v.326, n.2, p.493-501, 2008.
49. Peres-Buzalaf, C., de Paula, L., Frantz, F.G., Soares, EM, Medeiros, A.I.; Peters-Golden, M.; Silva, C.L.; Faccioli, L.H. Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.** v.85, n.2, p.75-81, 2011
- 50.Pereira, P.A.T., et al., Celecoxib Improves Host Defense through Prostaglandin Inhibition during *Histoplasma capsulatum* Infection. **Mediators of Inflammation**, 2013.
- 51.Yoon,W.J.; Lee, N.H.; Hyun, C.G. Limonene Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Production of Nitric Oxide, Prostaglandin E₂, and Pro-inflammatory Cytokines in RAW 264.7 Macrophages. **J. Oleo Science**,v.59, n.8, p.415-421, 2010.
52. Hori, M.; Kita, M.; Torihashi, S.; Miyamoto, S.; Won, K.J.; Sato, K.; OZaki, H.; Karaki, H. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** v.280, p.930–938, 2001.

53. Rouzer, C.A.; Jacobs, A.T.; Nirodi, C.S.; Kingsley, P.J.; Morrow, J.D.; Marnett, L. RAW264.7 cells lack prostaglandin-dependent autoregulation of tumor necrosis factor- α secretion. **J Lipid Res.** v.46, p.1027–1037, 2005.
54. Murata, T.; Aritakeb, K.; Matsumotoa, S.; Kamauchib, S.; Nakagawac, T.; Horia, M.; Momotanid, E.; Uradeb, Y.; Ozaki, H. Prostaglandin D₂ is a mast cell-derived antiangiogenic factor in lung carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.108, n. 49, p.19802–19807, 2011.
55. Bellows, C.F.; Alder, A.; Wludyka, P.; Jaffe, B.M. Modulation of macrophage nitric oxide production by prostaglandin D₂. **J Surg Res.** v.32, n.1, p.92-7, 2006.
56. Guyton, K.; Bond, R.; Reilly, C.; Gilkeson, G.; Halushka, P.; Cook, J. Differential effects of 15-deoxy-D 12,14-prostaglandin J₂ and a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist on macrophage activation. **J. Leukoc. Biol.** v.69, p.631–638, 2001.
57. Zayed, N.; Mansouri, F.E.El.; Chabane, N.; Martel-Pelletier, J.; Pelletier, J.P.; Fahmi, H. Prostaglandin D₂ enhances interleukin-1 β - induced cyclooxygenase-2 expression in osteoarthritic cartilage. **Journal of Translational Medicine**, v.8(Suppl 1), p.61, 2010.
58. Tsuzaki, M.; Guyton, G.; Garrett, W.; Archambault, J.M.; Herzog, W.; Almekinders, L.; Bynum, D.; Yang, X.; Banes, A.J. IL-1 β induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 β and IL-6 in human tendon cells. **J Orthop Res.** v.21, n.2, p.256-64, 2003.
59. Burke, S.J.; Collier, J.J. The gene encoding cyclooxygenase-2 is regulated by IL-1 β and prostaglandins in 832/13 rat insulinoma cells. **Cellular Immunology.** v.271, n.2, p.379–384, 2011.
60. Harizi, H.; Corcuff, J.B.; Gualde, N. "Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology". **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, p. 461–469, 2008
61. Sanding, H.; Pease, J.E.; Sabore, I. Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD₂ and its metabolites in leukocyte function. **J. Leukoc. Biol.**, v.81, p. 372-382, 2007.
62. Ricciotti, E.; FitzGerald, G.A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.31, n.5, p.986-1000, 2011.