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

**PAPEL DAS PROSTAGLANDINAS NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Histoplasma capsulatum***

Priscilla Aparecida Tartari Pereira

Ribeirão Preto – SP

2009

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

**PAPEL DAS PROSTAGLANDINAS NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Histoplasma capsulatum***

Priscilla Aparecida Tartari Pereira

**Dissertação de mestrado
apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para
obter o Título de Mestre, pelo
curso de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada –
Área de concentração: Imunologia.**

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

Ribeirão Preto – S.P.

2009

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 a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Priscilla Aparecida Tartari
Papel das prostaglandinas na infecção experimental por *Histoplasma capsulatum*.

/ Priscilla Aparecida Tartari Pereira - Ribeirão Preto, 2009

96 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Medicina Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. Histoplasmose. 2. Prostaglandinas. 3. Celecoxibe. 4.
Ciclooxigenase-2.

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) com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP – USP (FAEPA).
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto –USP

DEDICATÓRIA

A Deus por teu refúgio e proteção. À minha mãe, Benedita Tartari e aos meus avôs, Catharina Sferra Tartari e Dimas Tartari (*in memorian*) pelo amor, esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas. Em especial, meu amado Daniel, pela amizade e compreensão, pelo amor e paciência. Sem vocês, o sonho não seria possível.

“Os esforços para se conseguir bom êxito devem ser feitos com alegria e amor.”

Carlyle

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

“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, admoestando 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)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr. Lucia Helena Faccioli, pela atenção, amizade, paciência, ajuda, compreensão e confiança. Creio que estes dois anos sob sua orientação contribuíram positivamente para minha formação científica.

Agradeço a minha iniciadora na Imunologia, Prof Dr^a Marta Chagas Monteiro, pela dedicação e entusiasmo com que ensinava. Obrigada pela valiosa contribuição na minha formação científica e intelectual, pela disponibilidade, paciência, atenção e pela amizade compartilhada;

Ao meu Pai, Elias, e sua mulher, Marilza, e minhas irmãs Heloisa e Ana Beatriz, pelos laços de afeto que nos unem;

Aos meus avôs paternos, Elísio e Maria, pelo carinho;

À família Bini (Jorge, Vera, Felipe, Márcia, Luciel e Daniel), minha família no Paraná em Guarapuava, pela acolhida, compreensão e carinho;

Agradeço as Prof^{as}(s) Dr^{as}(s) Glória Emília Petto de Souza e Marta Chagas Monteiro pela disponibilidade e contribuição neste projeto;

À 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;

À Prof. Dra. Cláudia Maffei, por fornecer e manter em seu laboratório a cepa de Histoplasma capsulatum utilizada neste trabalho, assim como fornecer permitir a permanência das placas de UFC em seu laboratório;

Ao Dr. Auro Nomizo, pelo companheirismo, incentivo e ensinamentos sobre Imunologia.

Ao Dr. Roberto Nicolete, pela colaboração neste projeto, pelas discussões imunológicas e amizade.

À Dra Camila Matias Peres, pela grande ajuda neste projeto, amizade, alegria e carinho.

Ao Dr. Carlos Artério Sorgi, especialista de laboratório, pela colaboração nas dosagens de citocinas, dedicação, amizade e principalmente pelos momentos de alegria.

À Érika, pela disponibilidade em ajudar no preparo do material e dos reagentes para realização dos experimentos, pela amizade e carinho;

Aos meus amigos do laboratório: Adriana (Drix), Alexandra (Xan), Bruno, Bruna, Camila, Carlos, Cláudia, Dani Carlos, Daiane (Daí), Elyara (Ly), Fabiani (Mix), Franciele, Karina, Laís, Lilian, Livia, Luciana, Marcela, Roberto, Rômulo obrigada pela amizade, discussões, aprendizagens e bons momentos compartilhados.

Em especial aos companheiros de P3, Bruno, Drix e Daiane pela grande amizade, pela ajuda e apoio nestes dois anos de mestrado.

Aos amigos do curso da Farmácia da USP, especialmente a Flávia, Juliana, Marcela, Milena e Rafael obrigada pela amizade, alegrias e participação nas discussões “científicas”;

As meninas da república, Borá, Isabel, Juliana, Marcela e Suelen pelo grande incentivo, força naqueles momentos difíceis e pela grande amizade. Obrigada por tudo!

Às técnicas Izaíra Tincani Brandão e Aninha Masson pela organização dos materiais e reagentes no laboratório e manutenção da P3 e acima de tudo pela simpatia dispensada em todos os momentos;

Aos amigos do laboratório do Dr. Célio e Dr^a Vania: Beraba, Cacá, Cássia, Denise, Marina, Pryscilla, Paola, Patrícia, Rodrigo, Rogério, Sheila e Wendi pela amizade, receptividade espontânea no laboratório, respeito e momentos de descontração;

Ao pessoal do biotério Cleide, Leandro, Reinaldo e Ronaldo pelo bom humor e pelo cuidado dispensado aos animais;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada por todos os ensinamentos;

Aos amigos de Guarapuava, da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) Aline, Andreza, Elaine, Estela, Daniel, Emerson, Fábio, Flávia, Graziela, Gylmar, Karina, Paula (Fish), Marta e Samantha;

A técnica de citometria de fluxo, Fabiana, pela competência dos serviços prestados, pela colaboração, paciência e amizade;

A secretaria da Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine, pela atenção e ajuda a nós alunos da Imuno;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e FAEPA pelo auxílio financeiro no projeto de pesquisa e concessão de bolsa de mestrado, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Resumo

Pereira, Priscilla Aparecida Tartari – **Papel das prostaglandinas na infecção experimental por *Histoplasma capsulatum***. 2009. 98 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A histoplasmose é uma doença granulomatosa crônica, cujo agente etiológico é o fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*. A infecção ocorre pela inalação de conídios ou pequenos fragmentos de micélio que alcançam os alvéolos, onde se transformam em leveduras que é responsável pela patogenia da doença. A imunidade celular do hospedeiro determina o grau das manifestações clínicas na histoplasmose, sendo a interação entre células T e macrófagos, fundamental para o controle da infecção e erradicação do *H. capsulatum*. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a participação de leucotrienos nos mecanismos de defesa do hospedeiro durante a histoplasmose. Neste trabalho descrevemos o papel das prostaglandinas, demonstramos que este mediador lipídico contribui para a patogênese da doença, pois sua inibição, com celecoxibe, resultou na sobrevivência de até 80% dos animais infectados com o inóculo letal de *H. capsulatum*, em contraste com 100% de mortalidade dos animais somente infectados. Além disso, a inibição das prostaglandinas resultou na diminuição (i) da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da resposta imune celular e (ii) do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o espaço bronco-alveolar. Por outro lado, resultou no aumento (iii) de células TCD4⁺ no pulmão, (iv) na síntese de óxido nítrico por células do parênquima pulmonar, (v) na fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por macrófagos alveolares e (vi) da síntese de LTB₄. Nossos resultados sugerem que prostaglandinas têm papel importante na patogênese na infecção por *H. capsulatum*, modulando a resposta imune do hospedeiro.

Palavras-chave: *H. capsulatum*, Prostaglandinas, Celecoxibe, Cicloxigenase-2.

Abstract

Pereira, Priscilla Aparecida Tartari – **The role of prostaglandins in the experimental infection by *Histoplasma capsulatum***. 2009. 98f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The Histoplasmosis is a chronic granulomatous disease whose etiologic agent is pathogenic dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. Infection occurs mainly by fungal inhalation that reaches the alveoli, where it transforms into yeasts that are responsible for pathogenic diseases. The cellular immunity of the host determines the degree of the clinical manifestations in histoplasmosis, being the interaction between cells T and macrophages, basic for the control of the infection and eradication of the *H. capsulatum*. Recently, our group of research demonstrated the participation of leukotrienes in the mechanisms of defense of the host during the Histoplasmosis. Beyond this important lipid mediator who participates in the immune reply against *H. capsulatum*. In this work, we describe another involved mediator, the prostaglandin. In the present work, we demonstrate that the prostaglandins contribute for pathogenicity of the disease, being that during its inhibition with celecoxib it resulted in the survival of up to 80% of the infection-mice with inoculum lethal of *H. capsulatum*, in contrast with 100% of mortality infection-mice. Moreover, the inhibition of prostaglandins resulted in the reduction (i) of the synthesis of pro-inflammatory cytokines and the cellular immune response and (ii) in the migration of neutrophils and macrophages. For other hand, increased (iii) of cells TCD4⁺ in the lung, (iv) of the nitric oxide synthesis, (v) of phagocytosis of yeast of *H. capsulatum* for alveolar macrophages and (vi) of the synthesis of LTB₄. Our results suggest that prostaglandins have important role in pathogenicity in the infection for *H. capsulatum*, modulating the host immune response.

Key words: *H. capsulatum*, prostaglandin, celecoxib, cyclooxygenase-2

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido araquidônico

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

AINES - anti-inflamatórios não esteroidais

APCs – células apresentadoras de antígeno

BHI - infusão de cérebro e coração

CD – célula dendrítica

COX-1 – ciclooxigenase1

COX-2 – ciclooxigenase2

CRTH2 – receptor para PGD₂ presente células Th2

CR3 – receptor do complemento tipo 3

DO – Densidade optica

ELISA – ensaio imunoenzimático

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GMS - prata de Grocott

HE – Hematoxilina-eosina

HETES - ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IC50 – concentração inibitória 50%

IFN- γ – interferon gama

HE – hematoxilina-eosina

IL- – interleucina

IL1R – receptor de interleucina 1

i.p. - intraperitoneal

i.t. - intratraqueal

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

LBA – lavado broncoalveolar

LPS – lipossacarídeo

LTs - leucotrienos

LTB₄ – leucotrieno B₄

MA – macrófago alveolar

mg - miligramas

MIP-2 - “Macrophage inflammatory protein-2”

MIP-1 α - “Macrophage inflammatory protein-1 alpha”

NEED - cloreto de N-(1-naftil) etil-enediamina dihidratado

NK – natural killer

NO – óxido nítrico

NO⁻² - nitrito

OPD – O-fenil-diamina

PBS - solução fosfato tamponada

PE – ficoeritrina

PG – Prostaglandina

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PLA₂ – fosfolipase A₂

PMN – leucócitos polimorfonucleares

RPMI – meio de cultura (Royal Park Memorial Institute)

RPMI-c – RPMI completo

RPMI-i – RPMI incompleto

SBF - Soro bovino fetal

TCD4 – Linfócito CD4

TCD8 – Linfócito CD8

Th1/Th2 – T “helper” 1 / T “helper” 2

Th17 – T “helper” 17

TLR2 – “ toll-like receptor 2”

TLR4 – “ toll-like receptor 4”

TNFR1/TNFR2 – Receptor para TNF- α tipo 1/ tipo 2

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

UFC – unidade formadora de colônia

μ M – micromoles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inibição de PGs aumenta a sobrevivência de camundongos infectados com inóculo letal de *H. capsulatum*

Figura 2 - inibição de PGs contribui para menor carga fúngica nos pulmões e baço de camundongos infectados com *H. capsulatum*.

Figura 3 - Cinética de recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco-alveolar de camundongos injetados i.t. com inóculo letal (1×10^7 leveduras/mL) ou subletal (5×10^6 leveduras/mL) de *H. capsulatum* tratados ou não com celecoxibe

Figura 4 - Inibição das PGs aumenta a fagocitose de leveduras por macrófagos alveolares *in vivo*

Figura 5 - Produção de NO_2^- nos pulmões aumentou pelo tratamento com celecoxibe

Figura 6 - Efeito da inibição de PGs na produção de citocinas inflamatórias no parênquima pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*

Figura 7 - Efeito da inibição de PGs na produção de citocinas da resposta imune celular no parênquima pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*

Figura 8 - Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados ou não com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe

Figura 9 - Fotomicrografia de cortes de pulmão corados com GMS

Figura 10 - Celecoxibe inibe a síntese de PGE₂ em pulmão de animais infectados com *H. capsulatum*

Figura 11 - LTB₄ presente no pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe

Figura 12 - Porcentagem de linfócitos TCD4+, TCD8+ e linfócito B presentes nos pulmões de camundongos infectados ou não com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe

Figura 13 - Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas presentes nos pulmões de camundongos infectados ou não com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract	ii
1. Introdução	01
2. Objetivo.....	15
3. Materiais e Métodos.....	17
3.1. Animais.....	18
3.2. Cultivo de leveduras do <i>H. capsulatum</i> em meios sólidos e líquido ..	18
3.3. Tratamento com o composto celecoxibe – inibidor da síntese de PGs	19
3.4. Infecção pulmonar com <i>H. capsulatum</i> através da inoculação intratraqueal por procedimento cirúrgico	19
3.5. Determinação da curva de sobrevivência dos animais infectados com <i>H. capsulatum</i> , tratados com diferentes doses do inibidor de PGs...	20
3.6. Determinação de Unidades Formadoras de colônia (UFC) no baço e nos pulmões de animais infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com celecoxibe.....	20
3.7. Obtenção, contagem total e diferencial das células do lavado broncoalveolar (LBA).....	21
3.8. Índice fagocítico de macrófagos coletados do lavado bronco- alveolar (LBA) de animais infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com celecoxibe.....	22

3.9. Preparação dos homogeneizados de pulmões para dosagem de citocinas, Nitrito (NO_2^-) e mediadores lipídicos.....	23
3.10. Concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de homogeneizado de pulmões de camundongos infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com celecoxibe.....	23
3.11. Quantificação de PGE_2 e LTB_4 em homogeneizados de pulmão de camundongos infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com celecoxibe	24
3.12. Quantificação de citocinas por ELISA	25
3.13. Histopatologia dos pulmões.....	26
3.14. Imunofenotipagem das células do pulmão	27
3.15. Análise Estatística	28
4. Resultados.....	29
4.1. Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 infectados com inóculo letal ou subletal de <i>H. capsulatum</i> , tratados ou não com diferentes doses do inibidor de prostaglandina, celecoxibe	30
4.2. Unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas dos pulmões e baços de animais infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com celecoxibe.....	33
4.3. Cinética de migração de células inflamatórias para o espaço bronco-alveolar em resposta à inoculação intratraqueal com diferentes inóculos de <i>H. capsulatum</i> em animais tratados ou não com celecoxibe.....	36
4.4. Tratamento com celecoxibe aumenta a fagocitose das leveduras por macrófagos alveolares (MA) in vivo	39

4.5. Detecção 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 celecoxibe	41
4.6. Efeito da inibição da síntese de prostaglandinas durante a infecção por <i>H. capsulatum</i> na produção de citocinas inflamatórias e quimiocina por células do pulmão	43
4.7. Efeito da inibição da síntese de prostaglandinas durante a infecção por <i>H. capsulatum</i> na produção de citocinas da resposta imune celular por células do pulmão	46
4.8. Histopatologia do parênquima pulmonar	49
4.9. Concentração de PGE_2 em homogeneizado de pulmões de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com celecoxibe	53
4.10. A concentração de leucotrieno B_4 é maior no pulmão de camundongos infectados com <i>H. capsulatum</i> e tratados com celecoxibe é menor	55
4.11. Imunofenotipagem de células do parênquima pulmonar de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> e tratados ou não com celecoxibe	57
5. Discussão	61
6. Conclusão.....	73
7. Referências Bibliográficas	76

I

Introdução

Histoplasmose e Reação inflamatória

A histoplasmose é uma doença com ampla distribuição pelo mundo, tendo uma alta incidência no oeste dos Estados Unidos da América, México e Chile (SCHWARTZ, 1981). No Brasil, esta micose é endêmica em todas as regiões, uma vez que inquéritos epidemiológicos demonstraram maior incidência nas regiões sudeste, centro-oeste, norte e sul (FERREIRA *et al.*, 2002; UNIS *et al.*, 2004). Seu agente etiológico é o *Histoplasma capsulatum*, um fungo dimórfico patogênico, parasita intracelular, não encapsulado. Os conídios do *H. capsulatum* encontram-se presentes em fezes de pássaros e morcegos, motivo pelo qual a histoplasmose também conhecida como “doença das cavernas” (MEDOFF *et al.*, 1987). 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; LÓPEZ, 2006). A conversão para levedura pode variar de horas a dias, por ser dependente da mudança da temperatura (KIMBERLIN *et al.*, 1981). Esta mudança é crítica, pois a forma de levedura é responsável pela patogenia na histoplasmose (GOODWIN *et al.*, 1980). A infecção é contraída pela inalação de conídios e, posterior conversão para leveduras que alcançam os alvéolos e bronquíolos, onde são fagocitados por macrófagos alveolares ou neutrófilos que migram para o local da infecção (NEWMAN *et al.*, 1990). Um dos mecanismos pelo qual *H. capsulatum* sobrevive dentro da célula fagocítica está relacionado à modulação do microambiente dentro do fagossomo para um pH alcalino (NEWMAN *et al.*, 1992; WOODS, 2002).

As manifestações clínicas dos pacientes com histoplasmose podem variar de quadros leves, semelhantes a gripe, até formas graves disseminadas, que dependendo das condições imunológicas do hospedeiro e da carga fúngica inalada, podem levar o indivíduo a morte. Dentre as principais formas clínicas temos: infecção assintomática, histoplasmose pulmonar aguda, histoplasmose pulmonar crônica e histoplasmose disseminada (SEVERO *et al.*, 2001). A infecção assintomática, que ocorre em cerca de 95% dos casos, é leve e benigna, de regressão espontânea e acomete hospedeiros imunocompetentes em áreas endêmicas. A histoplasmose pulmonar aguda acomete hospedeiros imunocompetentes, provenientes de áreas não endêmicas, mais expostos a grande carga fúngica. As manifestações clínicas podem durar semana ou meses e evoluir para formas mais graves levando a insuficiência respiratória. Já na histoplasmose pulmonar crônica, o pulmão do paciente tem colonização fúngica com formações cavitárias muito semelhante à tuberculose pulmonar crônica pós-primária. Neste caso, quando não tratada, a doença é progressiva, com perda de função pulmonar na maioria dos doentes e morte em até 50% dos casos (SEVERO *et al.*, 2001). A histoplasmose disseminada ocorre geralmente em pacientes com imunodeficiências, nos quais há reativação do fungo proveniente das lesões residuais ou devido à reexposição ao patógeno (KAUFFMAN, 2007). Caracteriza-se por ser uma doença sistêmica severa podendo levar o paciente ao óbito devido à insuficiência respiratória, insuficiência adrenal, anemia, leucopenia, hepatoesplenomegalia, meningite e endocardite. Esta é a 4ª doença

oportunista mais freqüente em pacientes portadores do HIV e residentes em áreas endêmicas (revisado por COSTA, 2002)

Em indivíduos imunocompetentes, durante a primeira semana de infecção, ocorre intenso infiltrado de polimorfonucleares (PMN) no pulmão, seguido de infiltrado de células mononucleares e formação de granulomas compactos (DEEPE & BULLOCK, 1992). A forma assintomática da infecção nestes indivíduos evolui para cura espontânea (DEEPE & BULLOCK, 1992). No entanto, 5% dos indivíduos imunocompetentes manifestam a forma sintomática da infecção, nos quais a histoplasmose pulmonar aguda progride a forma crônica, podendo ou não evoluir para a forma disseminada (ZHOU, *et al.*, 1997). 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; DEEPE & BULLOCK, 1992). Estudos sugerem indivíduos que desenvolveram a forma disseminada da doença não apresentaram reação inflamatória eficiente, e nem a formação de granulomas compactos, possibilitando a disseminação do fungo (PILLAY *et al.*, 1997). O recrutamento de células inflamatórias e, conseqüentemente, a formação e manutenção de granulomas são processos dependentes, entre outros fatores, dos mediadores quimioatraentes liberados no local da inflamação (ADAMS, 1976). Os patógenos, uma vez delimitados pelas células inflamatórias recrutadas, podem permanecer em estado latente, conservando a capacidade de se replicarem e disseminarem. Caso estes

indivíduos sejam acometidos por imunodeficiências adquiridas ou submetidos a tratamentos utilizando drogas imunossupressoras, provavelmente ocorrerá a desorganização de granulomas compactos e a disseminação do fungo (SCHWARTZ, 1981; GOODWIN *et al.*, 1980).

Células e mediadores protéicos nas infecções fúngicas

Durante um processo infeccioso a resposta inflamatória tem papel fundamental na circunscrição e controle da disseminação de microrganismos. O mecanismo pelo qual o hospedeiro é capaz de controlar e/ou erradicar a infecção por *H. capsulatum* ocorre através da indução da resposta imune celular mediada por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T (DEEPE, 2000). O recrutamento de células inflamatórias e, conseqüentemente, a formação e manutenção de granulomas nas infecções são processos dependentes, entre outros fatores, dos mediadores quimioatraentes liberados no local da inflamação (ADAMS, 1976). 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; MEDEIROS *et al.*, 2004).

A interação entre leveduras e macrófagos é o evento chave na patogenia da histoplasmose. Os macrófagos pulmonares interagem com as leveduras de *H. capsulatum* através de vários receptores, tais como a integrina CD11b/CD18 (BULLOCK & WRIGHT, 1987), lactosilceramide,

dectinas, TLR2 (DA SILVA *et al.*, 2008). Além disso, a interação do *H. capsulatum* com estes receptores resulta na formação corpúsculos lipídicos com a produção de eicosanóides, atuando na defesa contra infecções fúngicas (SORGI *et al.*, 2009).

Além das células da resposta imune inata, os linfócitos T são essenciais para que ocorra a imunidade adaptativa, responsáveis pela resolução da infecção contra *H. capsulatum* (ALLENDORFER *et al.*, 1999). Tendo as células dendríticas as principais células apresentadoras de antígeno (APCs) capazes de ativar os linfócitos TCD4⁺ diferenciando-os em células de padrão de resposta celular (Th1) ou humoral (Th2) (GILDEA *et al.*, 2001). A ausência de linfócitos T circulantes em animais modificados geneticamente ou através da utilização de anticorpos monoclonais promovem o aumento da susceptibilidade à infecção por *H. capsulatum* (ALLENDORFER *et al.*, 1999). Sendo demonstrado que tanto linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ contribuem para resistência do hospedeiro durante a infecção por *H. capsulatum* (SCHNIZLEIN-BICK *et al.*, 2003). A transferência adotiva de células T CD4⁺ e T CD8⁺ para camundongos “naive” e posteriormente o desafio com o *H. capsulatum* aumentou a proteção e diminui o número das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) recuperadas do baço (DEEPE, 1988). Além disso, depleção de LT CD8⁺ com anticorpos monoclonais aumentou da carga fúngica no baço e no fígado, indicando que células TCD8⁺ são também importantes para a eliminação do fungo de camundongos infectados (DEEPE, 1994).

Estudos sobre o papel das citocinas em doenças micóticas vêm sendo realizados, para determinar a contribuição destas substâncias no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório, e nos mecanismos de defesa do hospedeiro (DEEPE & BULLOCK, 1990; MURPHY *et al.*, 1994). Recentemente, Deepe & Gibbons (2009) demonstraram a participação de linfócitos do padrão Th17 durante a resposta imune protetora na histoplasmose murina, exercida pela IL-17 e IL-23, quando na ausência de IL-12. Vários trabalhos têm demonstrado que citocinas, como a IL-12, liberadas por macrófagos e células dendríticas, e IFN- γ , secretado por células NK e linfócitos T “helper” 1 (Th1), são importantes na resposta imune em camundongos infectados com *H. capsulatum* (MOSMANN & SAD, 1986; ZHOU *et al.*, 1997; DEEPE, 2000). Embora seja necessário um sinal adicional para a ativação celular, estudos *in vitro* têm demonstrado que IFN- γ ativa macrófagos peritoneais murinos, aumentando a atividade fungicida devido o aumento da expressão da enzima oxido nítrico sintase induzida (iNOS) (LANE *et al.*, 1993). Além disso, Zhou e colaboradores (1995) descreveram que animais infectados com *H. capsulatum* tratados com anticorpos neutralizantes para IFN- γ , TNF- α e IL-12 apresentaram aumento na taxa de mortalidade, indicando que estas citocinas têm papel importante na proteção dos animais. Uma vez que, a administração exógena de IL-12 recombinante em animais infectados com *H. capsulatum* preveniu a mortalidade dos mesmos através da indução da síntese de IFN- γ (ZHOU *et al.*, 1995).

Smith e colaboradores (1990) observaram que macrófagos peritoneais infectados com *H. capsulatum* produzem grandes quantidades de TNF- α . Além disso, a presença deste mediador foi também detectada no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos infectados, por via intranasal. O tratamento dos animais infectados com anticorpos neutralizantes contra TNF- α levou a recrudescência da infecção e aumentou a mortalidade dos mesmos (SMITH *et al.*, 1990). Posteriormente, Zhou, Miller & Seder (1998) e Allendorfer & Deepe (1998) demonstraram definitivamente a importância de TNF- α na histoplasmose primária e secundária. A ausência de TNF- α durante a histoplasmose pulmonar primária resulta na diminuição da síntese de IL-12. No entanto, o bloqueio de TNF- α na reinfecção pulmonar resultou no aumento de IL-4 e IL-10 e direcionamento da resposta imune para padrão de resposta Th2 (ZHOU, MILLER & SEDER, 1998; ALLENDORFER & DEEPE, 1998). Além disso, Allendorfer e Deepe (2000) descreveram as funções desempenhadas pelos dois receptores de TNF- α , TNFR1 e TNFR2 no decorrer da infecção. Em infecções primárias, os dois receptores são fundamentais, sendo TNFR1 relacionado à reação inflamatória e TNFR2 à geração de IFN- γ . Em reinfecções, somente TNFR1 é fundamental, sendo que seu bloqueio resultou na síntese exacerbada de IL-4 e IL-10. Também foi demonstrado que o uso de antagonistas de TNF- α resultou no decréscimo da expressão iNOS e aumento da suscetibilidade à infecção por *H. capsulatum* (DEEPE, 2007).

No entanto, além do TNF- α , até o momento pouco se têm descrito sobre a participação de outras citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e KC

(homóloga a IL-8 humana) na histoplasmose. Watson e colaboradores (1985) relataram a presença de IL-1 em sobrenadante de cultura de células do baço de animais infectados com *H. capsulatum*. Outros fungos como *Paracoccidioides brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*, também induzem a liberação de IL-1 durante a infecção, a qual tem um importante papel no recrutamento e na atividade microbicida de neutrófilos (SCHELENZ *et al.*, 1999; KURITA *et al.*, 2000). Deepe & McGuinness (2006) demonstraram que animais deficientes do receptor para IL-1 (IL-1R^{-/-}) infectados com *H. capsulatum* apresentam aumento na recuperação das UFC nos pulmões, diminuição no número de células T CD4⁺, diminuição na expressão de iNOS, diminuição nos níveis de IFN- γ contrastando com aumento nos níveis de IL-4 e IL-10 quando comparado com animais não deficientes. Outros autores têm investigado o papel de KC no recrutamento de neutrófilos em diferentes processos infecciosos (MEHRAD & STANDIFORD, 1999; HACHICHA *et al.*, 1998).

A infecção de camundongos, pela inoculação intratraqueal (i.t.) de conídios de *A. fumigatus*, induziu recrutamento de neutrófilos para o pulmão, dependente de KC e MIP-2 (MEHRAD & STANDIFORD, 1999). Também, Hachicha e colaboradores (1998) descreveram que neutrófilos humanos incubados com leveduras de *C. albicans* sintetizam MIP-1 α e IL-8. Esses dados sugerem um importante papel de IL-1, KC e IL-8 no recrutamento e ativação de neutrófilos em diferentes infecções fúngicas. Desta forma o balanço das citocinas em uma infecção regula a resposta imune e a resolução ou não da infecção.

Metabólitos do ácido araquidônico

O desencadeamento de uma inflamação pode ser mediado por agentes físicos como um trauma mecânico, agentes químicos ou biológicos, como: fungos, bactérias, vírus e protozoários (MEDEIROS *et al.*, 1999; FUNK, 2001; SÁNCHEZ-RAMÍREZ & TALAMÁS-ROHANA, 2002; MEDEIROS *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; PERES *et al.*, 2007). Além destes, outros fatores como a interação antígeno-anticorpo, ativadores da proteína quinase C, ionóforo de cálcio, inibidores de fosfatases e zimosan, ativam a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) que libera o ácido araquidônico (AA) (ROUZER *et al.*, 1982; QIU *et al.*, 1993). Mediadores lipídicos gerados a partir do metabolismo do AA são coletivamente denominados eicosanóides, e estes, podem ser divididos em classes segundo a via de síntese bioquímica em: metabólitos da 5-lipoxigenase (leucotrienos: LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄); da 15-lipoxigenase (lipoxinas); das cicloxigenases 1 e 2 (prostaglandinas: PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, e tromboxanos); da P450 (ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico – HETES); e os metabólitos não enzimáticos (LARSEN & HENSON, 1983).

A enzima COX-1 é constitutivamente expressa na maioria das células, mas a COX-2 é induzida em vários tipos celulares por citocinas e fatores de crescimento. Tradicionalmente, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) exibem diferentes especificidades para as isoformas COX-1 e COX-2 com relação a concentração inibitória 50% (IC₅₀) (FITZGERALD & PATRONO, 2001). Desta forma, COX-1 é inibida por drogas antiinflamatórias como a aspirina e também pela indometacina (VANE, 1971; WARNER &

MITCHELL, 2004). A COX-2 é inibida por glicocorticóides (SMITH, & LANGENBACH, 2001) e por inibidores seletivos, os coxibs (revisado CARVALHO *et al.*, 2004).

A expressão de COX-2 pode ser induzida por citocinas como IL-1, IL-2 e TNF- α , enquanto as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 inibem a expressão de COX-2 (revisado 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).

Prostaglandinas nas infecções

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 LTs 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 com *H. capsulatum* intratraquealmente, e tratados com inibidor da síntese de LTs, o composto MK886, Medeiros e colaboradores (2004), mostraram o papel essencial dos LTs nos mecanismos de defesa dos animais infectados. Mais recentemente, foi demonstrado que estes lipídios possuem 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). Porém, neste modelo de infecção pulmonar por *H. capsulatum* até o momento nada está descrito sobre qual contribuição das PGs.

As PGs são importantes mediadores da inflamação, podendo regular a resposta imune através da modulação da liberação de citocinas e quimiocinas, dependendo do contexto no quais esses mediadores são liberados (GOODWIN & WEBB, 1980; TILLEY *et al.*, 2001). Snijewint e colaboradores (1993) demonstraram que PGE₂ inibe de modo dose-dependente a produção de IFN- γ e de IL-12 por leucócitos do sangue periférico e por linfócitos T CD4⁺, além de aumentar a liberação de IL-5, mas não alterar a de IL-4. PGE₂ também inibe a produção de IL-1 e TNF- α por macrófagos (KUNKEL *et al.*, 1986), diminui a fagocitose e também suprime a atividade das células NK (GOTO *et al.*, 1983). Além disso, a PGE₂ inibe a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos (APCs) estimuladas com LPS, mas aumenta a produção de IL-10 (TINEKE *et al.*, 1995). Nicolette e colaboradores (2008) demonstraram que microesferas (MES) contendo PGE₂ são menos fagocitadas e inibem a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS. Além disso, as MES induziram a produção de nitrito e MCP-1 por células endoteliais humanas. Por outro lado, Berg e colaboradores (2001) mostraram que algumas citocinas podem regular a produção das PGs, uma vez que em resposta ao LPS, células esplênicas de camundongos depletados de IL-10 produzem mais PGE₂. Outros resultados sugerem ainda que as PGEs e PGI₂ podem aumentar a concentração de AMPc intracelular, fato associado à inibição das

funções celulares (TILLEY *et al.*, 2001; ARONOFF *et al.*, 2007). Kim & Hahn (2000) investigaram o papel regulatório do IFN- γ e da PGE₂ sobre a expressão e a liberação de TNF- α em macrófagos estimulados com LPS. Eles mostraram que o IFN- γ inibe o efeito supressor da PGE₂ sobre a produção de TNF- α , indicando que PGE₂ regula o desenvolvimento da resposta Th1. Por outro lado, alguns estudos demonstraram o papel inflamatório da PGE₂ na doença intestinal inflamatória e na artrite reumatóide, via a produção de citocinas IL-23 e IL-17 (HIROTA *et al.*, 2007, LEMOS *et al.*, 2009). Além disso, a PGE₂ regula a diferenciação de células Th17, via a sinalização dos receptores EP2 e EP4 (BONIFACE, *et al.*, 2009).

Entretanto, efeitos opostos da PGE₂ na produção de citocinas têm sido descritos. Bloom e colaboradores (1999) demonstraram que a produção de IFN- γ por linfócitos Th₁, estimulados com antígeno do vírus da influenza, é significativamente aumentada por concentrações fisiológicas de PGE₂. Porém, quando utilizada somente a PGE₂, na ausência do antígeno, este efeito não foi observado. Além disso, em outro trabalho foi demonstrado que linfócitos do padrão Th2, eosinófilos e basófilos expressam outro receptor denominado CRTH2 para PGD₂. Quando a PGD₂ se liga à este receptor induz mobilização de Ca²⁺ intracelular e promove o recrutamento das células Th₂, de eosinófilos e de basófilos, sugerindo importante papel regulatório das PGs nos processos de ativação e recrutamento celular (HIRAI *et al.*, 2001). Assim, PGE₁ e PGD₂ também induzem a migração de leucócitos, modulação da síntese e liberação de IL-4, IL-5 e IFN- γ tendo a PGD₂ participação na fase tardia das reações alérgicas (HOFBAUER *et al.*, 2000; HIRAI *et al.*,

2001; FUJITANI *et al.*, 2002). Neste sentido, foi demonstrado que as PGs reduzem a liberação de enzimas lisossomais (ZURIER *et al.*, 1974) e de histamina (ORANGE *et al.*, 1971), induzem a apoptose de linfócitos T (PICA *et al.*, 1996) e inibem funções das células dendríticas (KAMBAYASHI *et al.*, 2001) e são broncoprotetores endógenos (PAVORD & TATTERSFIELD, 1995).

Além dos leucócitos, os próprios patógenos podem ser uma grande fonte de mediadores lipídicos. Noverr e colaboradores (2001) mostraram que fungos como *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* produzem PGs, as quais além de serem essenciais para a viabilidade destes fungos podem modular a resposta imune do hospedeiro. Esses pesquisadores demonstraram que células totais de baço, incubadas com PGE₂ produzidas pelo fungo, liberaram menos TNF- α e mais IL-10, quando comparada com células incubadas com meio de cultura. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que outros fungos como *A. fumigatus*, *H. capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., e *Rhizomucor pusillus* produzem PGs e LTs. Além disso, a produção destes mediadores é aumentada com a adição de AA exógena na cultura, sugerindo que estes fungos têm a capacidade de converter-los para metabolização nas vias da lipoxigenase e cicloxigenase (NOVERR *et al.*, 2002). Assim, as funções controversas das PGs demonstram a necessidade de mais investigações sobre o seu papel nas respostas imune inata e adaptativa nas infecções, especialmente na histoplasmose, foco de nosso estudo.

II

Objetivo

Tivemos como objetivo no presente projeto avaliar o papel das prostaglandinas na histoplasmose pulmonar murina.

Para tanto, utilizamos camundongos infectados intratraquealmente com inóculo letal ou subletal de *H. capsulatum* tratados ou não com celecoxibe, e determinamos:

1. A curva de sobrevivência;
2. A melhor dose do inibidor de COX-2;
3. A cinética de recrutamento celular para o espaço bronco alveolar após 2, 14 e 28 dias da infecção;
4. As unidades formadoras de colônias (UFC) nos pulmões e baço;
5. A concentração de Nitrito (NO_2^-) no sobrenadante do homogeneizado de pulmões;
6. O índice fagocítico de macrófagos alveolares.
7. A presença de citocinas relacionadas ao padrão de resposta imune celular e inflamatória no sobrenadante de homogenato pulmonar
8. Histopatologia do parênquima pulmonar
9. Imunofenotipagem de sub-populações celulares do parênquima pulmonar
10. Produção de PGE_2 e LTB_4 nos pulmões

III

_____ *Material e Métodos*

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos adultos (15–22g), pertencentes à linhagem C57/BL6, 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 NBS3 no Centro de Pesquisa em Tuberculose do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, com livre acesso a água e alimento.

O projeto de pesquisa foi realizado conforme as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto (PCARP) da Universidade de São Paulo (nº protocolo 07.1.365.53.8)

3.2. Cultivo de leveduras do *H. capsulatum* em meios sólido e líquido.

A cepa selvagem do *H. capsulatum* foi isolada a partir do sangue de um paciente com diagnóstico positivo para histoplasmose acompanhado clinicamente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A cepa foi mantida na fase filamentosa, a temperatura ambiente (25° C), em ágar sabouraud (Difco, Detroit, Michigan). Para a obtenção de leveduras a forma miceliar, foi convertida através do cultivo a 37° C em meio sólido BHI-ágar (Difco, Detroit, Michigan) suplementado com 5 % de sangue de carneiro. Alíquotas desta amostra foram submetidas ao teste de viabilidade com diacetato de fluoresceína e

brometo de etídio (Sigma Chemical Co., St Louis USA), e por Microscopia de fluorescência analisadas, sendo utilizadas somente quando a viabilidade do fungo for superior a 90 % (CALICH *et al.*, 1979). Para a recuperação de leveduras para o ensaio de unidades formadoras de colônia (UFC) foi utilizado meio sólido BHI-ágar (Difco, Detroit, Michigan) suplementado com 5 % de sangue de carneiro.

3.3. Tratamento com o composto celecoxibe - inibidor da síntese de PGs

Os camundongos infectados ou não foram tratados com o composto Celecoxibe (PHARMACIA, Brasil), que foi diluído em 100 µL de etanol absoluto (MERCK, Montreal, Canadá) e acrescido de água de modo a se obter a solução de tratamento. Os animais foram tratados diariamente, a cada 24 horas, por via oral com 0,5 mL de solução de celecoxibe de modo a receberem 0,5 mg/kg, 1 mg/kg ou 5 mg/kg, sendo a primeira e a última dose administradas 1 hora antes da infecção e morte dos animais, respectivamente. Como controles, os animais foram inoculados i.t. com PBS ou infetados com *H. capsulatum* foram tratados diariamente com o mesmo volume do diluente do celecoxibe.

3.4. Infecção pulmonar com *H. capsulatum* através da inoculação intratraqueal por procedimento cirúrgico.

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com 2,2,2-Tribromoetanol 99% (ACROS, New Jersey, USA) em PBS, de modo a

receberem a dose de 250 mg/kg de animal. Para a inoculação do fungo, os animais tiveram suas traquéias expostas e o inóculo subletal de 5×10^5 leveduras/100µl ou o inóculo letal 1×10^6 leveduras/100µL de *H. capsulatum* foram administrados por via i.t. conforme descrito por Medeiros e colaboradores (2004). Os inóculos foram previamente estipulados através do cálculo da DL50 (MEDEIROS, 2002). Animais controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e receberam 100 µL PBS estéril.

3.5. Determinação da curva de sobrevivência dos animais infectados com *H. capsulatum*, tratados com diferentes doses do inibidor de prostaglandina.

Primeiramente, os animais infectados com o inóculo subletal ou letal de *H. capsulatum* foram tratados com as diferentes doses de celecoxibe (item 3.3) e acompanhados por 30 dias após a infecção. Determinamos a curva de sobrevida e a melhor dose do anti-inflamatório para ser utilizada posteriormente em outros experimentos. A morte dos animais, dos diferentes grupos, foi registrada diariamente para a determinarmos a curva de sobrevivência.

3.6. Determinação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no baço e nos pulmões de animais infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe.

Animais infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe foram sacrificados no 2º, 14º e 28º dias após infecção, os

pulmões e baços coletados foram pesados em placa de Petri estéreis (Falcon, BD, Franklin Lakes, N.J.) contendo 3 mL de meio RPMI-I (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Para a obtenção da suspensão celular dos pulmões, o segundo lóbulo esquerdo foi pesado e cortado em pequenas porções com auxílio de um bisturi, e adicionados em tubos de polietileno de 50 mL contendo RPMI-I acrescido de 0,5 µg/mL de liberase (Sigma St. Louis, MO), e submetidos a agitação por 30 min na rotação de 150 rpm à 37°C (Incubator Shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A recuperação da UFC foi avaliada conforme descrito por Zhou e colaboradores (1995). A suspensão das células do baço foi obtida através do processamento em peneira de nylon estéril conforme descrito por Medeiros e colaboradores (2004). Em seguida, as suspensões celulares, do pulmão e do baço, foram diluídas (1:20 e 1:50) e, para recuperação das UFC, 200 µL das amostras foram distribuídas em placas de Petri contendo BHI-ágar (Difco Laboratories, Detroit, Mich) suplementado com 5% de hemácias de carneiro com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril. Todas as amostras de cada órgão foram semeadas em duplicata. Após 15 dias do cultivo a 37°C, as UFC foram contadas, e o número de colônias expresso por grama de tecido.

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

As células do LBA foram coletadas no 2º, 14º e 28º dias após a infecção, através da inserção de um cateter acoplado a uma seringa

contendo 1 mL de solução de PBS 1X estéril. Esse procedimento foi repetido 3 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. O lavado foi coletado individualmente de cada animal e adicionado separadamente em tubos plásticos, previamente marcados. A contagem do número total de células presentes nos lavados foi realizada empregando a solução de Turk (diluição 1:20) e câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram feitas em lâminas preparadas em citocentrífuga (Cytospin 3, Shadon Souther Products Ltd., Chesshire, UK) e submetidas a coloração por corante Panótico Rápido (Laborclin LTDA, Pinhais, Paraná, Brasil).

3.8. Índice fagocítico de macrófagos coletados do lavado bronco-alveolar (LBA) de animais infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe.

Após a secagem das lâminas preparadas em citocentrífuga, as mesmas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin LTDA, Pinhais, Paraná, Brasil). Um total de 200 células mononucleares do lavado bronco-alveolar foi contado em microscópio de campo claro. Dentre estas células foram registradas aquelas não contendo a levedura e aquelas contendo pelo menos 1 levedura seu interior, assim como, o número total de leveduras em todos os macrófagos. O índice fagocítico foi determinado através da multiplicação do número de células contendo pelo menos uma levedura pelo número total de leveduras contadas em todas as células, divididos pelo número total de células (200 células mononucleares).

$$\text{Índice Fagocítico (IF)} = \frac{\text{nº de macrófagos com leveduras} \times \text{nº total de leveduras}}{\text{Total de macrófagos contados}}$$

3.9. Preparação dos homogeneizados de pulmões para dosagem de citocinas, nitrito (NO₂⁻) e mediadores lipídicos.

Após a infecção i.t. dos camundongos com *H. capsulatum*, os mesmos foram sacrificados nos períodos de 2, 14 e 28 dias após a infecção, em câmara de CO₂. Os pulmões foram coletados e pesados individualmente em placas de Petri. Para a dosagem de citocinas nos pulmões, estes órgãos foram homogeneizados com 1 mL de RPMI-I para cada 100mg de tecido pulmonar, utilizando homogeneizador de tecidos (Ultraturax T 50 IKA – Labortechnik, Germany). Após a homogeneização dos pulmões, o lisado celular total obtido foi centrifugado a 4°C por 15 minutos, a 10.000g (Centrífuga Avanti 30, Beckman). A seguir, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro com membrana de poro de 0,22 µm (Millipore) e utilizado para a dosagem de citocinas, quimiocinas, nitrito e mediadores lipídicos por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os sobrenadantes dos homogenatos de pulmões foram armazenados em freezer -70°C até o momento da dosagem.

3.10. Concentração de nitrito (NO₂⁻) no sobrenadante de homogeneizado de pulmões e no soro de camundongos infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe.

Empregando o método de Greiss, determinamos a concentração de óxido nítrico (NO) pela dosagem de nitrito (NO₂⁻). Para tanto, 100 µL do

sobrenadante de homogeneizado do pulmão foi adicionado a 100 µL do reagente de Greiss, composto em solução de 1:1 de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico (H₃PO₄). Passado 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica (D.O.) foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca (BioTec Instruments, Inc.-Quant) com filtro de 540 nm. Para a determinação quantitativa de nitrito, na mesma placa foi preparada uma curva de nitrito de sódio variando na concentração de 3,12 a 200µM, e adicionado também o reagente de Greiss. Os dados foram apresentados em micromoles (µM) de NO₂⁻.

3.11. Quantificação de PGE₂ e LTB₄ em homogeneizados de pulmão de camundongos infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe

Após a coleta dos sobrenadantes dos homogenatos de pulmões, conforme descrito no item 3.10., estes foram armazenados em freezer -70 °C até o momento da dosagem.

A detecção de PGs e LTs nos homogeneizados de pulmões será determinada por ensaio imunoenzimático de acordo com o método de Pradelles e colaboradores (1990). A detecção de LTB₄ e de PGE₂ nos homogeneizados de pulmões foi realizada por ensaio imunoenzimático (Cayman Chemical's ACETM EIA Kits). Para tanto, a fração lipídica das amostras foi purificada. Inicialmente, as amostras foram acidificadas com HCl 1 N pH 3,4 – 3,6 e vagarosamente passadas através de colunas SEp PAk C18 (Water associates, Milford, Mass.), lavadas previamente com 20

mL de etanol 35% e 20 mL de água. As frações lipídicas foram eluídas em 2 mL de etanol absoluto e posteriormente secas em “speed vacuum”. Em seguida, as amostras foram reconstituídas em 250 µL de solução tamponada (Tampão EIA Cayman Chemical’s ACE™ EIA Kits). Foi adicionado o volume de 100 µL de cada amostra em placa de 96 poços fornecida pelo fabricante e a reação enzimática de competição foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical’s, Ann Arbor, MI, USA). A D.O. foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca (Bio T_{EC} Instruments, Inc. - µQuant) com filtro de 450 nm e a concentração de PGE₂ e LTB₄ foi calculada a partir da curva padrão.

3.12. Quantificação de citocinas por ELISA

Empregando o método de ELISA (Ensaio Imuno-Enzimático), realizamos a quantificação das citocinas IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF-alfa, IL-10, IL-12 e IFN-gama, empregando anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e citocinas-padrões, de acordo com instruções do fabricante. Os anticorpos de captura foram diluídos em tampão carbonato (100 µL/poço), na concentração indicada pelo fabricante, e após incubação das placas durante uma noite à 4°C, as mesmas foram lavadas 3 vezes com solução tamponada com fosfato com 0,05% de Tween (tampão de lavagem). Após as sucessivas lavagens e secagem da placa, foram adicionadas 300 µL/poço de uma solução tamponada com fosfato contendo 1% de BSA (tampão de bloqueio) seguido de incubação à temperatura ambiente no mínimo por 1 hora. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados 3

vezes com o tampão de lavagem, e então adicionados 100 µL das amostras para a quantificação das citocinas, sendo incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Depois de repetido o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 µL/poço dos anticorpos de detecção biotinilados, na concentração indicada pelo fabricante. Anticorpos biotinilados para citocinas foram diluídos em tampão de bloqueio com 0,05 % de Tween durante 1 hora. Após a incubação foi repetido novo ciclo de lavagem, e em seguida feita a amplificação da reação pela adição de 100 µL/poço de estreptoavidina/biotina-peroxidase, diluído em tampão de bloqueio com 0,05% de Tween, na concentração de 1,25 mg/mL com incubação por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço da solução de substrato, contendo H₂O₂ e tetrametilbenzidina (TMB) ou OPD, e as placas foram incubadas por 20-30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi bloqueada adicionando 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M). A densidade ótica (D.O.) foi avaliada em leitor de microplacas com filtro de 450 ou 490 nm e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão.

3.13. Histopatologia dos pulmões

A histopatologia dos órgãos foi realizada em colaboração com a Dr^a. Simone Gusmão do Departamento de Patologia da FMRP-USP. Para tanto, lóbulos de pulmões de camundongos dos diferentes grupos experimentais foram removidos após 2, 14 e 28 dias de infecção. Os tecidos foram fixados em tampão de Millonig (10% de formaldeído), 1,86% de fosfato de potássio

monobásico e 0,42% de hidróxido de sódio e inclusos em parafina. Cortes histológicos, com 5 µm de espessura, foram corados com hematoxilina-eosina (HE) ou prata (prata de Grocott, GMS) e analisados comparativamente os componentes celulares, organização tecidual (granulomas) e leveduras de *H. capsulatum* no parênquima pulmonar dos animais.

3.14. Imunofenotipagem das células do pulmão

A mesma suspensão de células obtidas conforme descrito no item 3.6 foram ajustadas para 1×10^7 células/mL e 100 µl de cada amostra foi adicionada em tubos apropriados para citometria de fluxo. Em seguida, foi adicionado anticorpo Anti-CD16/CD32 para bloqueio de ligações inespecíficas da porção Fc do anticorpo. Após incubação de 40 minutos à 4-8°C, os anticorpos específicos para cada uma das moléculas avaliadas acoplados à diferentes fluorocromos (Isotiocianato de fluoresceína, FITC; Ficoeritrina, PE; ou Percp-Cy5.5) foram adicionados. Os seguintes anticorpos foram utilizados: Anti-Gr1 PerCP Cy5.5, Anti-CD4 FITC, Anti-CD8 APC, Anti-CD19 PE, Anti-CD11c APC, Anti-Mac3 PE (BD bioscienses). 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.

3.15. Análise estatística

Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados por teste ANOVA (análise de variância) seguido do teste de comparação individual com o teste t de Bonferroni (comparações múltiplas) ou teste t Student (comparações entre duas amostras) para amostras não pareadas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e as diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes para $P < 0,05$.

IV

Resultados

4.1. Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 infectados com inóculo letal ou subletal de *H. capsulatum*, tratados ou não com diferentes doses do inibidor de prostaglandina, Celecoxibe.

Para determinarmos o papel das PGs na histoplasmose pulmonar murina, primeiramente, os animais infectados com o inóculo letal (1×10^6 células/animal) de *H. capsulatum* foram tratados ou não com as diferentes doses de Celecoxibe (item 3.3) e acompanhados por até 30 dias após infecção. A morte dos animais dos diferentes grupos foi registrada diariamente, e a curva de sobrevivência determinada e a melhor dose do composto foi estipulada.

Nossos resultados demonstraram que animais infectados com inóculo letal e tratados com diferentes doses de Celecoxibe apresentaram menor mortalidade em comparação ao grupo infectado e não tratados (Figura 1 A). Os animais somente infectados com o inóculo letal tiveram 100% de mortalidade, enquanto naqueles tratados com celecoxibe, a sobrevivência foi de (5 mg/kg) 42%, (1 mg/kg) 75% e (0,5 mg/kg) 80%. Assim, estipulamos como melhor dose, a de 1 mg/kg, para ser empregada nos experimentos posteriores.

Investigamos também a participação das PGs em animais infectados com o inóculo subletal. Nossos resultados mostraram que animais infectados com o inóculo subletal sobreviveram até 30 dias após período final de observação (Figura 1 B). Nenhum dos tratamentos com as diferentes doses de celecoxibe (5 mg/kg, 1 mg/kg e 0.5 mg/kg) modificou a curva de

sobrevivência dos animais, sendo que 100% dos animais também permaneceram vivos até 30 dias após infecção.

Figura 1. Inibição de PGs aumenta a sobrevivência de camundongos infectados com inóculo letal de *H. capsulatum*. (A) Inóculo letal de 1×10^7 leveduras/mL. **(B)** Inóculo subletal de 5×10^6 leveduras/mL. Os animais controles foram injetados i.t. com 100 μ L de PBS estéril. Os animais foram acompanhados por 30 dias após infecção. (n = 6-7). * $P < 0,05$, quando comparado animais somente infectados com os infectados e tratados com celecoxibe.

4.2. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas dos pulmões e baços de animais infectados com *H. capsulatum* e tratados ou não com Celecoxibe.

Nossos resultados demonstraram, através da análise de sobrevivência, aumento na suscetibilidade a infecção em animais infectados com o inóculo letal de *H. capsulatum* quando comparados com animais infectados e tratados com celecoxibe. Nosso próximo passo foi averiguar se a inibição da PG diminuía a multiplicação e disseminação da levedura no pulmão e baço destes animais.

Como mostra a Figura 2 A, o número de leveduras recuperadas de pulmões de animais infectados com inóculo letal de *H. capsulatum* e tratados com celecoxibe diminuíram somente no 28º dia após infecção (UFC recuperadas). Neste período, observamos diminuição de 1,92 log₁₀ de UFC recuperadas, quando comparado com animais infectados e sem tratamento. O número de leveduras no baço de animais infectados com o inóculo letal tratados com celecoxibe diminuiu 1,55 log₁₀ no 28º dia após infecção, comparado com as UFC recuperadas de animais infectados que não receberam tratamento (Figura 2 B). No entanto, os animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados com celecoxibe diminuíram a multiplicação e disseminação das leveduras no 14º e 28º dia da infecção, com a diferença de 0,7 log₁₀ e 1,81 log₁₀, respectivamente, e quando comparada com animais somente infectados (Figura 2 C). Além disso, a Figura 2 (D) mostra no baço de animais infectados com o inóculo subletal e

tratados com celecoxibe, houve diminuição no número de leveduras recuperadas no 14^º dia e no 28^º dia, respectivamente de 0,42 log₁₀ e 0,48 log₁₀.

Figura 2. A inibição de PGs contribui para menor carga fúngica nos pulmões e baço de camundongos infectados com *H. capsulatum*. Animais foram infectados com 1×10^6 leveduras (**A** e **B**) ou com 5×10^5 leveduras de *H. capsulatum* (**C** e **D**) e tratados ou não com celecoxibe (1 mg/kg). As UFC foram determinadas após 2, 14 e 28 dias de infecção nos pulmões (**A** e **C**) e baço (**B** e **D**). Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 4-5). * $P < 0,05$, quando comparado animais somente infectados com os infectados e tratados com celecoxibe.

4.3. Cinética de recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco-alveolar em resposta à inoculação intratraqueal de diferentes inóculos de *H. capsulatum* em animais tratados ou não com Celecoxibe.

Para analisar o envolvimento das PGs na resposta inflamatória induzida por *H. capsulatum*, determinamos o número total e diferencial das células inflamatórias recrutadas para o espaço bronco-alveolar (LBA) dos animais infectados com inóculos letal ou subletal de *H. capsulatum*, e tratados ou não com 1 mg/kg de celecoxibe. A figura 3 (A) e (C) mostra que ocorreu aumento do influxo de neutrófilos para o espaço broncoalveolar ocorreu desde 2º dia, atingindo o pico no 14º dia, com diminuição no 28º dia após a infecção com o inóculo letal e subletal de *H. capsulatum*. Em todos estes períodos, o aumento foi significativo quando comparado com animais que receberam apenas PBS (Figura 3 A e C). Na infecção com inóculo letal e tratamento com celecoxibe, o recrutamento de neutrófilos diminuiu (52%) somente no 14º dia após infecção (Figura 3 A). Nos animais infectados com o inóculo subletal de *H. capsulatum*, o tratamento com celecoxibe diminuiu significativamente o recrutamento de neutrófilos para o espaço bronco-alveolar no 2º dia (31%) e no 14º dia (65%) da infecção, quando comparado com o grupo infectado não tratado (Figura 3 C). O tratamento com celecoxibe não modificou o número de células em animais não infectados, em nenhum dos períodos avaliados.

A Figura 3 (B) e (D) mostra o número de células mononucleares

presentes LBA após infecção com o inóculo letal e subletal de *H. capsulatum*, assim como no LBA dos animais que receberam apenas PBS. O aumento do influxo dessas células foi estatisticamente significativo no 2º, 14º e 28º dia após infecção, quando comparado com animais injetados com PBS. O tratamento com celecoxibe inibiu 41% o recrutamento celular somente no 14º dia após infecção, em comparação aos animais infectados.

Na infecção pelo inóculo subletal de *H. capsulatum*, o influxo de células mononucleares para o espaço bronco-alveolar foi significativo no 2º dia (31%), no 14º dia (240%) e 28º dia (257%) após a infecção, com aumento significativo de, quando comparados com o grupo controle inoculados com PBS (Figura 3 D). O pico de recrutamento de células mononucleares foi no 28º dia após a infecção, contrário ao pico do recrutamento de células mononucleares em animais infectados com o inóculo letal que foi no 14º dia. Também, verificamos diferenças significativas quanto ao influxo de células mononucleares entre os animais infectados e infectados tratados com celecoxibe. Houve diminuição do recrutamento de células mononucleares para o espaço bronco-alveolar a partir do 14º dia de infecção, persistindo no 28º dia, com 23% e 51% de inibição, respectivamente. Diferente para o inóculo letal, no qual a inibição recrutamento de células mononucleares foi somente no 14º dia após infecção (Figura 3 B).

O recrutamento celular para espaço bronco-alveolar após estímulo com o inóculo subletal de *H. capsulatum* foi diferente quando comparado com o inóculo letal.

Figura 3. Cinética de recrutamento de células inflamatórias para o espaço bronco-alveolar de camundongos injetados i.t. com inóculo letal (1×10^7 leveduras/mL) ou subletal (5×10^6 leveduras/mL) de *H. capsulatum* tratados ou não com celecoxibe. (A) Recrutamento de neutrófilos e (B) células mononucleares após 2, 14 e 28 dias da infecção com inóculo letal. (C) Recrutamento de neutrófilos e (D) células mononucleares após 2, 14 e 28 dias infecção com inóculo subletal. Os animais controles receberam i.t. 100 μ L de PBS estéril. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 5 - 6$). $P < 0,05$. (*) representa diferenças significativas entre aos animais infectados com *Hc* versus PBS ou PBS tratado; (#) animais infectados com *Hc* versus *Hc* tratados com celecoxibe.

4.4. Tratamento com celecoxibe aumenta a fagocitose das leveduras por macrófagos alveolares (MA) *in vivo*.

A Figura 4 (A) mostra o índice fagocítico de macrófagos recuperados do espaço broncoalveolar, de animais infectados com o inóculo letal e tratados ou não com celecoxibe. Como podemos notar o tratamento dos animais com celecoxibe aumentou em todos os períodos o número de leveduras fagocitadas, sendo este efeito mais evidente no 2º e no 28º dia após infecção. No 2º dia após infecção teve aumento de 130%, no 14º dia aumentou 101% e no 28º dia aumentou 185% em comparação aos animais infectados não tratados com celecoxibe.

Conforme podemos observar na Figura 4 (B) o índice fagocítico no 2º e 14º dia após infecção com o inóculo subletal de *H. capsulatum*, foi de 105% e 178%, respectivamente, maiores em animais tratados com celecoxibe, quando comparado com animais somente infectados. Estes resultados demonstram que as PGs inibem a fagocitose de leveduras de *H. capsulatum*.

Figura 4. Inibição das PGs aumenta a fagocitose de leveduras por macrófagos alveolares *in vivo*. (A) Fotomicrografia representativa de macrófago alveolar de animal somente infectado e (B) animal infectado tratado com celecoxibe, mostrando a levedura no citoplasma (seta). (C) Macrófagos alveolares de camundongos infectados com inóculo letal, ou (D) subletal de *H. capsulatum* tratados ou não com celecoxibe. A contagem de leveduras no interior dos MAs foi realizada em microscópio de campo claro com aumento de 100X com auxílio de óleo de imersão. O cálculo do índice fagocítico foi determinado conforme descrito em material e métodos. Dados são expressos como média $\pm$ SE (n = 5-6). * *H. capsulatum* (*H.c.*) versus *H. capsulatum* (*H.c.*) tratado com celecoxibe. $P < 0,05$

4.5. Concentração de nitrito (NO_2^-) no sobrenadante de homogeneizado de pulmão e no soro de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe.

Nossos resultados com o inóculo letal demonstraram que no 2º dia após a infecção não houve diferenças na produção de NO entre os grupos experimentais. No entanto, no 14º dia após infecção observamos igualmente aumento na produção de NO tanto em animais infectados como nos animais infectados e tratados com celecoxibe. Somente no 28º dia após infecção a produção de NO_2^- aumentou significativamente (25%) em animais que síntese de PGs foi inibida (Figura 5 A).

Nos animais somente infectados com o inóculo subletal de *H. capsulatum* o aumento da produção de NO foi significativa no 14º dia (48%) e 28º dia (102%), quando comparado com os animais não infectados. Por outro lado, animais infectados e tratados com celecoxibe o aumento de NO foi de 100% no 14º dia e de 246% no 28º dia após infecção, quando comparado com os animais não infectados. Não houve diferença significativa para o 2º dia após a infecção. No entanto, ao comparamos a produção de NO entre os animais infectados e os infectados tratados com celecoxibe, o aumento foi de 35% e 54%, respectivamente no 14º e 28º dia após infecção.

Figura 5. Produção de NO_2^- nos pulmões aumentou pelo tratamento com celecoxibe. Produção de NO_2^- no sobrenadante do homogeneizado de pulmões de animais infectados com **(A)** inóculo letal e **(B)** subletal de *H. capsulatum*. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 5-6). * PBS ou PBS tratado versus *H.c.* ou *H.c.* tratado com celecoxibe; # *H.c.* versus *H.c.* tratado com celecoxibe. $P < 0,05$.

4.6. Efeito da inibição da síntese de PGs durante a infecção por *H. capsulatum* na produção de citocinas inflamatórias e quimiocina por células do pulmão.

Demonstramos que o recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar durante a infecção por *H. capsulatum* é dependente das PGs. 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.

Como mostra a Figura 6 A, a concentração de IL-1 nos pulmões aumentou a partir do 2º dia após infecção, sendo que o pico ocorreu no 14º dia. Contudo, no 2º e 14º dias após a infecção, a produção de IL-1 pelas células de pulmões dos animais infectados e tratados com 1 mg/kg de celecoxibe foi significativamente menor, quando comparada com animais infectados e sem tratamento (Figura 6 A).

A Figura 6 (B) mostra que em animais infectados com o inóculo subletal a concentração de IL-6 aumentou ao longo da infecção, sendo significativa em todos os períodos analisados. A inibição da síntese da síntese de PGs com o celecoxibe inibiu significativamente a produção de IL-6 no 2º dia e 28º dia da infecção (Figura 6 B).

A IL-8, denominada KC em camundongos, é uma quimiocina presente principalmente durante a resposta imune inata. Nossos resultados mostram que KC está aumentada desde a fase inicial da infecção com o inóculo

subletal, com o pico no 14^o dia (Figura 6 C). Nos animais infectados e tratados com celecoxibe a produção desta quimiocina diminui significativamente somente no 14^o dia e no 28^o dia após a infecção, quando comparado com animais somente infectados (Figura 6 C).

Ao compararmos a produção de TNF no parênquima pulmonar de animais que receberam apenas PBS com aquela de animais somente infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*, observamos aumento no 2^o e 14^o dias após infecção (Figura 6 D). A concentração de TNF- α no parênquima pulmonar de animais infectados tratados com celecoxibe diminui significativamente no 2^o e 14^o dia da infecção (Figura 6 D). No 28^o dia após infecção não observamos diferenças entre os diferentes grupos.

Figura 6. Efeito da inibição de PGs na produção de citocinas inflamatórias no parênquima pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*. Concentração de IL-1 (A), de IL-6 (B), KC (C) e TNF-α (D) em pulmões de animais infectados com *H. capsulatum* tratados diariamente ou não com 1 mg/kg de celecoxibe. Animais controles receberam i.t. apenas 100 μL de PBS estéril. Os resultados são expressos como média ± SEM (n=6). * PBS ou PBS tratado versus *H.c.* ou *H.c.* tratado com celecoxibe; # *H.c.* versus *H.c.* tratado com celecoxibe. $P < 0,05$.

4.7. Efeito da inibição da síntese de PGs durante a infecção por *H. capsulatum* na produção de citocinas da resposta imune celular por células do pulmão.

A concentração de IL-5 nos pulmões aumentou no 2º dia após infecção com o inóculo subletal de *H. capsulatum* (Figura 7 A). Contudo, no 2º e 28º dias após a infecção a produção de IL-5 pelas células de pulmões dos animais infectados e tratados com 1 mg/kg de celecoxibe foi significativamente menor, quando comparada com animais infectados e sem tratamento (Figura 7 A).

A figura 7 (B) mostra a concentração de IL-4 em sobrenadante do homogeneizado de pulmões obtidos de animais infectados com o inóculo subletal de *H. capsulatum*, é maior no 2º e 14º dias após infecção, quando comparada com o grupo que recebeu PBS. O tratamento dos animais com 1 mg/kg de celecoxibe diminui a produção de IL-4 no 2º e 14º dia da infecção (Figura 7 B).

Como mostra a figura 7 (C) a concentração de IL-10 aumentou significativamente nos pulmões no 2º, 14º e 28º dia após infecção com o inóculo subletal de *H. capsulatum*, quando comparada com o grupo que recebeu PBS (Figura 7 C). O tratamento dos animais infectados com 1 mg/kg de celecoxibe diminuiu significativamente a concentração de IL-10 no 2º e 28º dia após a infecção, quando comparados com animais somente infectados (Figura 7 C).

A concentração de IL-12 aumentou significativamente nos pulmões no

2º dia, com o pico no 14º dia permanecendo elevada até o 28º dia após infecção (Figura 7 D), tanto nos animais somente infectados e nos animais infectados tratados com celecoxibe. No entanto, a concentração de IL-12 nos pulmões de animais infectados tratados com celecoxibe não foi alterada, quando comparado com os animais somente infectados (Figura 7 D).

Na Figura 7 (E) mostra a concentração de IFN- γ aumentou a partir do 2º dia após infecção, tendo o pico no 14º dia, quando comparado com o grupo PBS. Por outro lado, animais infectados e tratados com celecoxibe a concentração de IFN- γ diminuiu no 14º dia após infecção.

Figura 7. Efeito da inibição de PGs na produção de citocinas da resposta imune celular no parênquima pulmonar de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum*. Concentração de IL-5 (A), de IL-4 (B), IL-10 (C), IL-12 (D) e IFN-γ (E) em pulmões de animais infectados com *H. capsulatum* tratados diariamente ou não com 1 mg/kg de celecoxibe. Animais controles receberam i.t. apenas 100 µL de PBS estéril. Os resultados são expressos como média ± SEM (n=6). * PBS ou PBS tratado versus *H.c.* ou *H.c.* tratado com celecoxibe; # *H.c.* versus *H.c.* tratado com celecoxibe. $P < 0,05$.

4.8. Histopatologia do parênquima pulmonar

A histopatologia dos fragmentos dos pulmões de animais infectados ou não com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe foi avaliada após 2, 14 e 28 dias de infecção. Os cortes foram colorados com hematoxilina-eosina (HE) e GMS. Conforme esperado, o parênquima pulmonar de animais não infectados e tratados ou não com celecoxibe, apresentaram-se íntegros com nenhuma ou com mínima reação inflamatória do período de estudo (Figuras 8 A e B). No 2º dia de infecção, o parênquima pulmonar apresentou lesão com predominância de neutrófilos e presença de alguns macrófagos, com grande desorganização da arquitetura (Figura 8 C). No entanto, em pulmões de animais infectados e tratados com 1 mg/kg de celecoxibe, observamos no 2º dia após a infecção processo inflamatório restrito à pequenos aglomerados de macrófagos e neutrófilos, mas com preservação dos alvéolos e brônquios (Figura 8 D).

No 14º dia de infecção observamos no pulmão de animais infectados maior comprometimento tecidual, com processo inflamatório granulomatoso confluyente peribronquiolar e alveolar, composto por macrófagos e com intenso influxo de neutrófilos (Figura 8 E). Entretanto, como observado na Figura 8 (F) o parênquima pulmonar de animais infectados e tratados com celecoxibe, apresentou menor processo inflamatório granulomatoso, o qual é confluyente, peribronquiolar e alveolar, composto por muitos macrófagos e alguns neutrófilos (Figura 8 F). Finalmente, após 28 dias de infecção em animais somente infectados, observamos nos cortes histológicos o

predomínio de macrófagos no parênquima pulmonar de animais infectados com o inóculo subletal, e raríssimos neutrófilos, caracterizando um infiltrado inflamatório mononuclear moderado e peribronquiolar (Figura 8 G). Já, animais infectados e tratados com celecoxibe apresentaram no parênquima pulmonar mínimo infiltrado mononuclear e peribronquiolar, sem a presença de neutrófilos (Figura 8 H).

No 2º dia de infecção, após coloração de GMS, observamos a presença de leveduras no centro das lesões pulmonares e no interior dos macrófagos alveolares, tanto dos animais infectados como naqueles infectados tratados com celecoxibe (Figura 9 A e B). Após 14º dia de infecção observamos lesão granulomatosa confluyente com a presença das leveduras de *H. capsulatum* no parênquima pulmonar de animais infectados e infectados tratados com celecoxibe (Figura 9 C e D). Por outro lado, observamos diferenças na quantidade de leveduras no parênquima entre os animais infectados e os animais infectados tratados, sendo que a inibição da síntese de PGs resultou na diminuição de leveduras de *H. capsulatum*. O mesmo ocorreu no 28º dia de infecção em animais infectados e tratados com celecoxibe (Figura 9 E e F).

Figura 8. Fotomicrografia de cortes de pulmão de camundongos infectados ou não com inóculo subletal de *H.capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe. Cortes histológicos de pulmões de animais mortos no 2º dia após a infecção que receberam PBS i.t. (A) ou PBS e foram tratados diariamente com celecoxibe (B). Animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e mortos no 2º dia (C), 14º dia (E) e 28º dia (G) após infecção. Animais infectados com o inóculo subletal e tratados diariamente com celecoxibe e mortos no 2º dia (D), 14º dia (F) e 28º dia (H) após infecção. Coloração Hematoxilina- Eosina H.E. (aumento de 100x).

Figura 9. Fotomicrografia de cortes de pulmão corados com GMS. Cortes histológicos de pulmões de animais infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e mortos no 2º dia (**A**), 14º dia (**C**) e 28º dia (**E**) após infecção. Animais infectados com o inóculo subletal e tratados diariamente com celecoxibe e mortos no 2º dia (**B**), 14º dia (**D**) e 28º dia (**F**) após infecção. Coloração Prata de Grocott- GMS (aumento de 640x).

4.9. Concentração de PGE₂ em homogeneizado de pulmões de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*, e tratados ou não com celecoxibe.

A concentração de PGE₂ foi determinada no 2º, 14º e 28º dias após infecção com o inóculo subletal de *H. capsulatum*. Observamos aumento de PGE₂ no 2º, 14º e 28º dias da infecção, sendo que o pico de produção ocorreu no 28º dia, quando comparado com animais que receberam somente PBS (Figura 10). O tratamento dos animais infectados com celecoxibe inibiu significativamente a síntese de PGE₂ no 14º e 28º dia após a infecção (Figura 10).

Figura 10. Celecoxibe inibe a síntese de PGE₂ em pulmão de animais infectados com *H. capsulatum*. PGE₂ foi determinada no sobrenadante de homogeneizado de pulmões de animais infectados ou não com inóculo subletal *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe, e mortos no 2º, 14º e 28º dias após infecção. Os animais não infectados foram utilizados como controle (linha contínua), e animais não infectados tratados com celecoxibe expressos em linha tracejada. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n=6). * PBS ou PBS tratado *versus* *H.c.* ou *H.c.* tratado com celecoxibe; # *H.c.* *versus* *H.c.* tratado com celecoxibe. $P < 0,05$.

4.10. A concentração de LTB₄ é maior no pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados com celecoxibe.

A concentração de LTB₄ foi determinada no 2º, 14º e 28º dia após infecção com o inóculo subletal de *H. capsulatum*. Observamos aumento de LTB₄ no 2º e 14º dias da infecção em animais infectados, sendo o pico de produção no 14º dia, quando comparado com animais que receberam somente PBS (Figura 11). Por outro lado, observamos no 14º dia de infecção aumento de 56% de LTB₄ em animais tratados com celecoxibe, quando comparados com animais somente infectados (Figura 11).

Figura 11. LTB₄ presente no pulmão de camundongos infectados com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe. LTB₄ foi determinado no sobrenadante de homogeneizado de pulmões de animais infectados ou não com inóculo subletal *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe, e mortos no 2º, 14º e 28º dias após infecção. Os animais não infectados foram utilizados como controle (linha contínua), e animais não infectados tratados com celecoxibe expressos em linha tracejada. Os resultados são expressos como média ± SEM (n=6). * PBS ou PBS tratado x *H.c.* ou *H.c.* tratado com celecoxibe; # *H.c.* x *H.c.* tratado com celecoxibe. & PBS x PBS tratado. $P < 0,05$.

4.11. Imunofenotipagem de células do parênquima pulmonar de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe.

Após 2, 14 e 28 dias da infecção com o inóculo subletal de *H. capsulatum*, as sub-populações celulares do parênquima pulmonar foram identificadas através da marcação com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19, respectivamente para linfócito T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B. Outras marcações foram realizadas para macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, através dos respectivos anticorpos, anti-MAC-3, anti-GR1⁺ e anti-CD11c. A porcentagem total de células positivas foi determinada através de Dot Plot ou por intensidade de fluorescência.

A figura 12 (A) mostra a delimitação dos linfócitos de acordo com parâmetros de tamanho (SSC) e granularidade (FSC). Quando analisados números totais de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e linfócitos B dos animais infectados com *H. capsulatum* e tratados com celecoxibe apresentaram aumento significativo em relação a animais não infectados, após 14 e 28 dias de infecção (Figura 12 B, 12 C e 12 D). Não foram observadas diferenças entre o total de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B, de animais infectados e os infectados tratados com celecoxibe (Figura 12 C e 12 D). Por outro lado, observamos no 14^o dia o aumento da população de Linfócitos T CD4⁺ nas células do pulmão de animais infectados e tratados com celecoxibe (Figura 12 B).

Os números totais de macrófagos (MAC-3), neutrófilos (GR1⁺) e células dendríticas (CD11c) em isolados do pulmão de animais infectados e animais infectados tratados com celecoxibe apresentaram aumento significativo em relação a animais não infectados no 14^o e 28^o dias após a infecção (Figura 13 A, 13 B e 13 C). Contudo, não observamos diferenças significativas entre as células do pulmão de animais infectados dos animais infectados tratados (Figura 13 B e 13 C). No entanto, a população de macrófagos obtidos do pulmão de animais infectados tratados com celecoxibe foi maior no 2^o dia da infecção, com diminuição desta população no 14^o dia após a infecção, quando comparado com células obtidas de pulmão de animais somente infectados com o inóculo subletal de *H. capsulatum* (Figura 13 A).

Figura 12. Porcentagem de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e linfócito B presentes nos pulmões de camundongos infectados ou não com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe. Células de pulmão foram obtidas após 2, 14 e 28 dias da infecção. **(A)** Delimitação dos linfócitos de acordo com parâmetros de tamanho (SSC) e granularidade (FSC). **(B)** Linfócitos T CD4⁺. **(C)** Linfócitos T CD8⁺. **(D)** Linfócitos B. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n=5). * PBS ou PBS tratado *versus* H.c. ou H.c. tratado com celecoxibe; # H.c. *versus* H.c. tratado com celecoxibe. $P < 0,05$.

Figura 13. Macrófagos, neutrófilos e células dendríticas presentes nos pulmões de camundongos infectados ou não com inóculo subletal de *H. capsulatum* e tratados ou não com celecoxibe. Células de pulmão foram obtidas após 2, 14 e 28 dias da infecção. **(A)** Macrófagos – MAC3⁺. **(B)** Neutrófilos - GR1⁺. **(C)** Células dendríticas – CD11c⁺. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n=5). * PBS ou PBS tratado *versus* H.c. ou H.c. tratado com celecoxibe; # H.c. *versus* H.c. tratado com celecoxibe. $P < 0,05$.

v

Discussão

Nos últimos anos, estudos referentes à função dos mediadores lipídicos nos processos infecciosos demonstram não apenas a participação destes no recrutamento celular, mas também na modulação dos mecanismos efetores da resposta imune, como fagocitose e morte. Com relação à infecção pelo *H. capsulatum*, estudos conduzidos em nosso laboratório (MEDEIROS *et al.*, 1999, 2004, 2008) demonstraram que os LTs participam do recrutamento celular e da indução da resposta imune protetora nesta micose. No entanto, sobre o papel das PGs nada tem descrito quanto a sua participação na resposta imune na histoplasmose.

Para tanto, neste trabalho investigamos o papel das PGs na histoplasmose pulmonar murina, empregando um inibidor da COX-2, o composto celecoxibe. Este composto, assim como outros inibidores seletivos de COX-2, são potentes inibidores da síntese de PGs liberadas em sítios inflamatórios, além de apresentarem menos efeitos colaterais gastrointestinais e renais, comparado a outros anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), como por exemplo a indometacina (SLOMIANY *et al.*, 1997; revisado por CARVALHO *et.al.*, 2004).

Ao iniciarmos nossos estudos sobre a participação de PGs na histoplasmose pulmonar aguda e crônica empregamos dois inóculos do *H. capsulatum*, um letal (1×10^6) e o outro subletal (5×10^5). Anteriormente descritos em nosso laboratório já determinados anteriormente em nosso laboratório (MEDEIROS *et.al.*, 2004; SÁ-NUNES *et al.*, 2004). Empregando estes inóculos e o inibidor da COX-2, observamos que a inibição de PGs diminui o número de leveduras nos pulmões e a disseminação destas para o

baço, resultando no aumento da sobrevivência dos animais infectados. Estes fenômenos foram também acompanhados pela diminuição do infiltrado de leucócitos nos pulmões, assim como pelo aumento da atividade fagocítica dos MAs e da produção de NO_2^- por células do pulmão.

Nos últimos anos, vem crescendo estudos sobre a participação das PGs em infecções por diferentes patógenos. Michelin e colaboradores (2003), empregando inibidores seletivos da COX-2, observaram redução do granuloma nos pulmões e no fígado de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Outros grupos também demonstraram diminuição da suscetibilidade, assim como aumento na sobrevivência de animais tratados com inibidores da síntese de PGs e infectados com *Trypanossoma cruzi* (MICHELIN *et al.*, 2005; TATAKIHARA *et al.*, 2008), *Legionella sp* ou *F. tularensis* (NEILD *et al.*, 2005; WOOLARD *et al.*, 2007), *C. neoformans*, *C. albicans*, *Aspergillus sp* e *P. brasiliensis* (NOVERR *et al.*, 2001; TSITSIGIANNIS *et al.*, 2005; BORDON *et al.*, 2007) ou vírus *Influenza* (MORI *et al.*, 2001; CAREY *et al.*, 2005). Em conjunto, nossos resultados e os da literatura sugerem que as PGs tem efeito supressor da resposta efetora nas infecções.

Em resposta aos diferentes agente agressores, os leucócitos são recrutados para o local da infecção. Como descrito por nós, neutrófilos e células mononucleares são igualmente recrutadas para o espaço brancoalveolar dos animais infectados com *H. capsulatum* (MEDEIROS *et al.*, 2004), 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 *et al.* 1993). Neste contexto, demonstramos anteriormente, que a depleção de neutrófilos por anticorpos específicos, resulta no aumento da carga fúngica e da mortalidade de camundongos infectados com *H. capsulatum* (SÁ-NUNES, 2006). Estudos *in vitro*, também sugerem que neutrófilos apresentam atividade fungicida ou fungistática contra leveduras e conídeos de *H. capsulatum* (NEWMAN *et al.* 1993). Em relação ao papel de macrófagos nesta micose, dados da literatura mostram que estes são capazes de controlar e erradicar a infecção, através da interação com seus receptores, como o CR3 (integrina CD11b/CD18) (DEEPE, 2000; BULLOCK & WRIGHT, 1987). Nossos resultados mostraram que animais tratados com celecoxibe apresentam, em diferentes períodos, redução do número de neutrófilos e células mononucleares, fenômeno que parece estar relacionado com a inibição de citocinas inflamatórias e quimiocinas liberadas no pulmão (Figura 8). Trabalhos na literatura também tem mostrado que o influxo de leucócitos podem ser inibidos pelo tratamento com inibidores de PGs. Fruscella e colaboradores (2001) mostraram que a inibição de PGs inibe a permeabilidade vascular e o recrutamento celular induzido pela carragenina. Em outro estudo, López-Armada e colaboradores (2002), demonstraram que o influxo de neutrófilos, na artrite reumatóide, está associado à alta produção de PGE₂, e que a administração de drogas inibidoras da enzima COX inibe o recrutamento de PMN por um mecanismo dependente da inibição de IL-8. No entanto, em relação as células mononucleares, os dados da literatura são contraditórios. López-Armada e colaboradores (2002)

demonstraram que o influxo destas células não foi alterado após tratamento com inibidores de PGE₂ na artrite reumatóide e que este efeito estava associado ao aumento de MCP-1. Já, Panzer & Uguccioni (2004) demonstraram o aumento da quimiotaxia de monócitos após o tratamento com PGE₂, associado ao aumento de MCP-1, RANTES e SDF-1. Outro trabalho mostra que a PGE₂ tem efeito supressor ao MCP-1, impedindo à quimiotaxia de monócitos/macrófagos (SCHNEIDER *et al.*, 1999).

Sabe-se que MAs representam à primeira linha de defesa do pulmão, mantendo a esterilidade pulmonar através da fagocitose e morte dos patógenos inalados (LOHMANN-MATTHES *et al.*, 1994), e que a PGs pode inibir os mecanismos efetores dos MAs (SEREZANI *et al.*, 2007). Nossos resultados também demonstraram que a inibição das PGs potencializa a atividade fagocítica de MAs (Figura 4) e aumenta a produção de NO (Figura 5), confirmando dados na literatura que descreveram o papel supressor das PGs sobre os mecanismos efetores de MAs (RASGOTI *et al.*, 1992; SEREZANI *et al.*, 2007, ARONOFF *et al.*, 2007). Rasgoti e colaboradores (1992) mostraram que a cepa virulenta de *M. avium* cresce ativamente no interior de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico, e que a incapacidade desses macrófagos em controlar a replicação desse microrganismo deve-se à produção de PGE₂. Também, Serezani e colaboradores (2007) demonstraram que PGE₂ inibe a morte da bactéria *Klebsiella pneumoniae* e a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) por MAs de ratos. Estas atividades foram revertidas pelo tratamento das células com indometacina ou com antagonistas dos receptores EP2 e

EP4. As ações supressoras da PGE₂ estão associadas com o aumento da cAMP, PKA, e fosforilação e translocação da NADPH (ARONOFF *et al.*, 2004; ARONOFF *et al.*, 2005; SEREZANI *et al.*, 2007, ARONOFF *et al.*, 2007). É sabido que reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio produzidos por macrófagos estão entre os principais fatores envolvidos na inibição do crescimento de *H. capsulatum* (BRUMMER *et al.*, 1991; BRUMMER *et al.*, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1994) e que PGE₂ inibe a transcrição da enzima iNOS, e conseqüente morte de microrganismos (HARBRECHT *et al.*, 1997; D' ACQUISTO *et al.*, 1998; RANGEL MORENO *et al.*, 2002). Em conjunto nossos dados sugerem as PGs inibem a fagocitose e a morte de *H. capsulatum* em MAs por mecanismos dependentes da inibição de NO.

Como mencionado anteriormente, as PGs podem recrutar leucócitos por mecanismo direto ou indireto, e induzir diferentes células a liberarem citocinas e quimiocinas. Nossos resultados também demonstraram que a liberação de TNF- α , IL-1, IL-6 e KC em parênquima pulmonar de animais infectados com inóculo subletal *H. capsulatum*, são regulados por PGs. Fenômeno semelhante foi descrito por Kimura e colaboradores (2003), que demonstraram que os compostos NS-398 e nimesulide, inibidores seletivos de COX-2, quando em cultura de neutrófilos estimulados com zimosan, inibiram a produção de PGE₂ e também a síntese de citocinas como IL-1, IL-6, KC e TNF- α . A liberação destas citocinas na infecção pelo *H. capsulatum* foi demonstrada anteriormente (MEDEIROS *et al.*, 2004) e o papel relevante destas citocinas demonstrados por diferentes investigadores (SMITH *et al.*,

1990, ZHOU *et al.*, 1998; ALLENDORFER & DEEPE, 1998; DEEPE, 2000 DEEPE & MCGUINNESS, 2006; DEEPE & GIBBONS, 2009).

Vários trabalhos também mostram o papel supressor das PGs sobre as respostas Th₁. Sabendo que na histoplasmose a resolução da infecção está associada com padrão de resposta celular Th₁, com produção de IL-12 por APCs, e IFN- γ por linfócitos Th₁ (MOSMANN & SAD, 1986; ZHOU *et al.*, 1997; DEEPE, 2000), também avaliamos o impacto da inibição das PGs, na produção destas, e de IL-4, IL-5 e IL-10. Nossos resultados mostram que a inibição das PGs, resultou em diminuição das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10, em diferentes períodos, mas não modificou a produção de IL-12. O significado da inibição da liberação IFN- γ e TNF- α precisa ser melhor investigado, assim como a não correlação entre estas citocinas e o aumento da produção de NO, pela ativação da iNOS (AKAMA & VAN ELDIK, 2000; FONSECA *et al.*, 2003). No entanto, podemos sugerir que nesta infecção, as PGs parecem ser mais relevantes que as citocinas na modulação de iNOS, como mostrado por outros (HARBRECHT *et al.*, 1997; D' ACQUISTO *et al.*, 1998; RANGEL MORENO *et al.*, 2002). Nossos dados são conflitantes aqueles descritos por Kuroda e colaboradores (2000) que mostraram a PGE₂ produzida por macrófagos de camundongos BALB/c, inibe a produção de IL-12 por estas células e IFN- γ por linfócitos T. Além disso, demonstraram que a inibição seletiva de citocinas do padrão Th₁ pela PGE₂, via inibição da produção de IL-12 por APCs, resulta no direcionamento da resposta para o padrão Th₂. É bem estabelecido que PGE₂ contribui para o aumento de cAMP em linfócitos T, fato este que resulta na diminuição da produção de

IFN- γ e IL-2 e a proliferação celular, e induzem aumento na produção de citocinas do padrão Th₂, como a IL-5 (BETZ & FOX, 1991; KVIRKVELIA *et al.*, 2002; HARRIS *et al.*, 2002). Snijewint e colaboradores (1993) demonstraram em leucócitos do sangue periférico e em linfócitos T CD4⁺ que PGE₂ aumenta de modo dose-dependente a produção de IL-5, sem alterar a de IL-4. Além disso, a PGE₂ 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). No entanto, nossos resultados são semelhantes a outros da literatura. Michellin e colaboradores (2003) em infecção experimental por *P. brasilienses* demonstraram que anti-inflamatórios não estereoidais, tais como o salicilato de sódio, meloxicam e indometacina diminuíram a síntese de IFN- γ por células do baço infectados por este fungo. Também, Harizi e colaboradores (2002) mostraram que o tratamento de células dendríticas com PGE₂ exógena induziu a produção de IL-10 e que o tratamento com inibidor seletivo de COX-2 inibiu a produção desta citocina. O papel regulatório de PGs na síntese de diferentes citocinas foi claramente demonstrado em nossos resultados.

A formação de granulomas em resposta a macrófagos infectados por *H. capsulatum* é um componente dominante e altamente efetivo durante a resposta imune antifúngica nos pulmões. O granuloma contribui para a delimitação da inflamação, proteção do tecido saudável local, controle do crescimento do patógeno e prevenção de sua disseminação para outros tecidos. O granuloma na histoplasmose é formado por macrófagos contendo

leveduras fagocitadas e células gigantes, além de linfócitos T CD4⁺ (KOBAYASHI *et al.*, 2001; CHAN & FLYNN, 2004). A falha na formação do granuloma nesta micose pode resultar na disseminação sistêmica do fungo (NEWMAN, 2001; HENINGER *et al.*, 2006). Nossos resultados mostram que ocorre intenso recrutamento de neutrófilos e células mononucleares, fato que parece estar associado com a liberação de citocinas inflamatórias e formação do granuloma, como demonstrado por outros (MEDEIROS *et al.*, 2004). Análise histopatológica (HE) dos pulmões de animais infectados mostrou intenso recrutamento de células inflamatórias e perda da arquitetura característica do parênquima pulmonar com a presença de lesões granulomatosas contendo leveduras de *H. capsulatum*. A inibição da síntese de PGs resultou em menor infiltrado celular nos pulmões, fato este que parece relacionar com a diminuição da produção de citocinas inflamatórias. Por outro lado, os resultados da caracterização fenotípica dos leucócitos mostraram que ocorre maior influxo de células T CD4⁺ nos pulmões dos animais infectados e tratados com celecoxibe (Figura 16 B). Vários trabalhos na literatura demonstraram que as células T CD4⁺ são muito importantes por iniciarem e regularem a formação dos granulomas, mesmo sendo o macrófago, o tipo celular mais abundante nesta lesão (KOBAYASHI *et al.*, 2001; CHAN & FLYNN, 2004, HENINGER *et al.*, 2006). O aumento de LT CD4⁺ parece não estar relacionado com o aumento da ativação dos mecanismos efetores e com a diminuição do número de levedura nos pulmões, uma vez que observamos que não aumentou da concentração de IFN- γ , após tratamento com celecoxibe. Estes dados sugerem que outro

mecanismo independente de LT CD4⁺ podem contribuir para o aumento de NO (Figura 5) e diminuição da carga fúngica nos pulmões (Figura 2). Neste contexto, podemos sugerir que estes fenômenos estão relacionados com o aumento de LTB₄, observado nos pulmões, dos animais tratados com celecoxibe. Sabe-se que LTs aumentam as funções fagocítica e microbicida dos macrófagos (PETERS-GOLDEN & COFFEY, 1998), e que são mediadores essenciais para a imunoproteção na histoplasmose (MEDEIROS *et.al.*, 2004). Além de participar como imunomodulador das respostas imunes primárias e secundárias na histoplasmose, sendo fundamentais para o recrutamento de linfócitos efetores para os pulmões (MEDEIROS *et al.*, 2009). Vários trabalhos sugerem que o bloqueio da via COX, pela administração de drogas como os anti-inflamatórios não-esteroidais, resulta no direcionamento do metabolismo do AA, para a via das lipoxigenases e consequente aumento da produção de LTs e vice-versa (SESTINI *et al.*, 1996; MAO *et.al.*, 2004). Além disso, a mudança na produção de prostanoídes para a produção de LTs, e destes para as lipoxinas, diminui a reação inflamatória como demonstrado por Levy e colaboradores (2001). Assim, nos animais infectados e tratados com celecoxibe, a diminuição de UFC nos pulmões e baço, o aumento da atividade fagocítica e da microbicida dos macrófagos, podem ser resultados do aumento de LTs (Figura 11), concomitante com a diminuição da produção de PGs (Figura 10). Lee e colaboradores (2009) demonstraram o “crosstalk” entre PGs e LTs. O balanço dos sinais inibitórios e estimulatórios destes eicosanóides podem regular a fagocitose via FcγR por macrófagos alveolares via AMPc.

Tendo, a PGE₂ ação imune supressora sobre LTB₄ e LTD₄ (LEE *et al.*, 2009). Serezani e colaboradores (2007) demonstraram que tanto PGE₂ endógena quanto exógena inibe a atividade microbicida de MA infectados com *K. pneumoniae* e que estes efeitos são mediados pelos receptores EP₂ e EP₄, os quais podem levar ao aumento de cAMP. Também, em pacientes com endometrite, as complicações que ocorrem devido à infecção por *Clostridium sordellii* estão relacionadas com PGE₂ liberada localmente, a qual inibe a resposta imune no útero (ARONOFF *et al.*, 2008). Recentemente, Medeiros e colaboradores (2009) mostraram que a PGE₂ liberada após fagocitose de células apoptóticas inibe os mecanismos de defesa em pulmão favorecendo a infecção por *Streptococcus pneumoniae*. Peres e colaboradores (submetido, 2009) demonstraram ainda que o tratamento com celecoxibe aumenta a sobrevivência de animais infectados e diminui a recuperação dos bacilos *M. tuberculosis* nos pulmões. No entanto, dados da literatura mostram que outras classes de PGs podem ser importantes durante o curso da infecção, uma vez que estas apresentar ações anti-inflamatórias (CIPOLLONE *et al.*, 2004). Neste contexto, Joo e colaboradores (2007) demonstraram que pela primeira vez que a administração intratraqueal de PGD₂ durante infecção por *P. aureginosa*, aumenta a remoção da bactéria nos pulmões de camundongos infectados.

Assim podemos sugerir que as PGs liberadas pelas células pulmonares durante a infecção por *H. capsulatum* contribuem com a patogenia nesta doença, e que o emprego de fármacos que inibem seletivamente a produção

de PGE_2 podem ser utilizados como coadjuvantes no tratamento desta micose.

VI

Conclusões

1. A inibição de PGs, pelo composto celecoxibe, aumentou a sobrevivência dos animais infectados com o inóculo letal.
2. A infecção pelo *H. capsulatum* induziu a produção de IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ . A inibição de PGs diminuiu a produção de IL-1, IL-6, TNF- α , IL-5, IL-4 e IL-10, no 2º dia após infecção. No 14º dia diminuiu a produção de IL-1, IL-8, TNF- α , IL-4 e IFN- γ , já no 28º dia após infecção a diminuição de IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10.
3. A inibição de PGs, pelo composto celecoxibe, diminuiu o número de leveduras nos pulmões dos animais infectados;
4. A inibição de PGs, pelo composto celecoxibe, inibiu o recrutamento de neutrófilos e células mononucleares.
5. A inibição da síntese de PGs aumentou a fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por macrófagos alveolares *in vivo*;
6. A produção de NO foi maior em células de pulmões de animais infectados e tratados com celecoxibe;
7. Os linfócitos T CD4⁺ estão em maior quantidade no parênquima pulmonar de animais infectados e tratados com celecoxibe
8. A inibição da síntese de PGs aumentou a síntese de LTB₄.

Nossos resultados mostram pela primeira vez na Histoplasmose pulmonar murina que as PGs participam na reação inflamatória inicial e crônica, exercendo o papel na patogênese da doença. Demonstrando que relação entre PGs e LTs parece ser fundamental no mecanismo de defesa contra a infecção pelo *H. capsulatum*.

VII

Referências Bibliográficas

- ADAMS, D.O. The granulomatous inflammatory response. A review. **Am. J. Pathol.** v. 84, p. 164-191. 1976.
- AKAMA, K.T., VAN ELDIK, L.J. Beta-Amyloid stimulation of inducible nitric-oxide 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.
- ALLENDORFER, R.; DEEPE, G. S., JR. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, p. 6072-6082. 1998.
- ALLENDORFER, R., G. D. BRUNNER, AND G. S. DEEPE, JR. Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis. **J Immunol.** v. 162, p. 7389-7396. 1999.
- ALLENDORFER, R.; DEEPE, G.S. JR. Regulation of infection with *H.capsulatum* by TNFR1 and -2. **J. Immunol.**, v. 165, p. 2657-2664. 2000.
- 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, p. 559-565. 2004.
- ARONOFF, D.M., CANETTI, C., SEREZANI, C.H., LUO, M., PETERS-GOLDEN, M. 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, p. 595-599. 2005.
- ARONOFF, D.M., PERES, C.M., SEREZANI, C.H., BALLINGER, M.N., CARSTENS, J.K., COLEMAN, N., MOORE, B.B., PEEBLES, R.S., FACCIOLI, L.H., PETERS-GOLDEN, M. Synthetic Prostacyclin Analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. **J Immunol.**, v.178, p. 1628-1634. 2007.
- ARONOFF, D. M., HAO, Y., CHUNG, J., COLEMAN, N., LEWIS, C., PERES, C. M., SEREZANI, C. H., CHEN, G. H., FLAMAND, N., BROCK, T. G., PETERS-GOLDEN, M. Misoprostol impairs female reproductive tract innate immunity against *Clostridium sordellii*. **J Immunol.**, v. 180 (12), p. 8222-8230. 2008.
- BERG, D.J., ZHANG, J., LAURICELLA, D.M., MOORE, S.A. Il-10 is a central regulator of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. **J Immunol.**, v.166 (4), p.2674-2680. 2001.
- BETZ, M., FOX, B.S. Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not Th2 lymphokines. **J. Immunol.** v. 146, p. 108-113. 1991.
- BONIFACE, K., BAK-JENSEN, K.S., LI, Y., BLUMENSCHNIG, W.M., MCGEACHY, M.J., MCCLANAHAN, T.K., MCKENZIE, B.S., KASTELEIN, R.A., CUA, D.N., MALEFYT, R.W. Prostaglandin E₂ regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. **JEM.**, v. 206 (3), p. 535-548. 2009.

- BORDON, A.P., DIAS-MELICIO, L.A., ACORCI, M.J., BIONDO, G.A., FECCHIO, D., PERACOLI, M.T., de SOARES, A.M. Prostaglandin E(2) production by high and low virulent strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**. Mar; v. 163(3), p.129-35. 2007.
- BRUMMER, E., KURITA, N., YOSIHIDA, 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, 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(1): p. 195-210. 1987.
- CALICH, V. L.; PURCHIO, A.; PAULA, C. R. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 66, p. 175-177. 1979.
- CAREY, M.A., BRADBURY, J.A., SEUBERT, J.M., LANGENBACH, R., ZELDIN, D.C., GERMOLÉC, D.R. Contrasting effects of cyclooxygenase-1(COX-1) and COX-2 deficiency on the host response to influenza A viral infection. **J Immunol**. v. 175, p. 6878-6884. 2005.
- CARVALHO, W. A., CARVALHO, R. D.S., RIO-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol**. v. 54(3), p. 448 - 464. 2004.

- CHAN, J., FLYNN, F. The immunological aspects of latency in tuberculosis. ***Clin. Immunol.*** v.110, p. 2–12. 2004.
- CIPOLLONE, F., FAZIA, M., IEZZI, A., CIABATTONI, G., PINI, B., CUCCURULLO, C., UCCHINO, S., SPIGONARDO, F., DE LUCA, M., PRONTERA, C., CHIARELLI, F., CUCCURULLO, F., MEZZETTI, A. Balance Between PGD Synthase and PGE Synthase Is a Major Determinant of Atherosclerotic Plaque Instability in Humans. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol.***, v. 24, p. 1259-1265. 2004.
- D'ACQUISTO, F., SAUTEBIN, L., IUVONE, T., DI ROSA, M., CARNUCCIO, R. Prostaglandins prevent inducible nitric oxide synthase protein expression by inhibiting nuclear factor- κ B activation in J774 macrophages. ***FEBS Lett.*** v. 440, p. 76-80. 1998.
- DA SILVA, C.A., HARTL, D., LIU, W., LEE, C.G., ELIAS, J.A. TLR-2 and IL-17A in chitin-induced macrophage activation and acute inflammation. ***J Immunol.***, v.181, p.4279-4286. 2008.
- DEEPE, G. S., Jr. Protective immunity in murine histoplasmosis: functional comparison of adoptively transferred T-cell clones and splenic T cells. ***Infect Immun.***, v. 56, p. 2350-2355. 1988.
- DEEPE, G.S. Jr., BULLOCK, W.E. Immunological aspects of fungal pathogenesis. ***Eur. J. Clin.***, v. 9, p. 567-579. 1990.
- DEEPE, G.S. Jr., BULLOCK, W.E. Histoplasmosis. A granulomatous inflammatory response. GALLIN, J.I., GOLDSTEIN, I.M., SNYDERMAM, R. Inflammation: basic principle and clinical correlates. 2^a ed. Ravan Press, LTd., New York, v. 47, p. 943-958. 1992.

- DEEPE, G. S., JR. Role of CD8+ T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice. **J Immunol**, v. 152, p. 3491-3500. 1994.
- DEEPE, G. S., JR. Immune response to early and late *Histoplasma capsulatum* infections. **Curr Opin Microbiol**. v. 3, p. 359-362. 2000.
- DEEPE, G.S., McGUINNESS, M. Interleukin-1 and Host Control of Pulmonary Histoplasmosis. **J Infect Dis**. v. 194(6), p. 855–864. 2006.
- DEEPE, G.S. Tumor necrosis factor-alpha antagonism by the murine tumor necrosis factor-alpha receptor 2-Fc fusion protein exacerbates histoplasmosis in mice. **J Interferon Cytokine Res**. Jun; v. 27(6), p. 471-480. 2007.
- DEEPE, G.S., GIBBONS, R.S. Interleukins 17 and 23 Influence the Host Response to *Histoplasma capsulatum*. **J Infect Dis**., Jul 1, v. 200(1), p. 142-151. 2009.
- 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(2), p.134-143. 2000.
- FERREIRA, O.G., CARDOSO, S.V., BORGES, A.S., FERREIRA, M.S., LOYOLA, A.M. Oral histoplasmosis in Brazil. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 6, p. 654-659. 2002.
- FITZGERALD, G.A., PATRONO, C. The antiinflammatory properties and safety of the Coxibs, selective inhibitors of COX-2. **N Engl J Med**., v. 345, p. 433-442. 2001.

- FONSECA, S.G., ROMÃO, P.R.T., FIGUEIREDO, F., MORAIS, 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.
- FRUSCELLA, P.; SOTTOCORNO, M.; DI BIACCIO, M.; DIONIEDE, L.; PICCARD, N.; CAGNOTTO, A.; GIOSSI, G.; ROMANO, M.; MENNINI, T.; ROMA, G. 1,5-Benzodiazepine tricyclic derivatives exerting anti-inflammatory effects in mice by inhibiting interleukin-6 and prostaglandin E₂ production. **Pharmaceutical Research**, v. 43, p. 445-451. 2001.
- FUJITANI, Y., KANAOKA, Y., ARITANE, K., UODOME, N., OKAZAKI-HATAKE, K., URADE, Y. Pronounced eosinophilic lung inflammation and th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. **J Immunol.**, v. 168, p. 443-49. 2002.
- FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: avances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, p. 1871-1878. 2001.
- GILDEA, L. A., MORRIS, R. E., NEWMAN, S.L.. *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *J Immunol* 166:1049-1056. 2001
- GOODWIN, R.A.; LOYD, J. E.; DES PREZ, R.M. Histoplasmosis in patients normal host. **Medicine**, v. 60, p. 231-266. 1980.

- GOODWIN, J.S, WEBB, D.R. Regulation of the immune response by prostaglandins. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 15, p. 106-122. 1980.
- GOTO, T., HERBERMAN, R.B., MALUISH, A., STONG, D.M. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. **J Immunol.**, v. 130, p. 1350-55. 1983.
- HACHICHA, M.; RATHANASWAMI, P.; NACCACHE, P.H.; MICCOLL, S.R. Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. **J. Immunol.**, v. 160, p. 449-254, 1998.
- HARBRECHT, B.G., KIM, Y.M., WIRANT, E.A., SIMMONS, R.L. BILIR, T.R. Timing of prostaglandin exposure is critical for the inhibition of LPS- or IFN- γ -induced macrophage NO synthases by PGE₂. **J. Leukocyte Biol.**, v. 61, p. 712-720. 1997.
- 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(5), p. 2255-63, 2002.
- HARRIS, S.G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D., PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunol.**, v. 23(3), p. 144-150. 2002.
- HENINGER, E., HOGAN, L.H., KARMAN, J., MACVILAY, S., HILL, B., WOODS, J.P., SANDOR, M. Characterization of the *Histoplasma*

- capsulatum*-Induced Granuloma. **The Journal of Immunology**, v.177, p. 3303–3313. 2006.
- HIRAI, H., TANAKA,K., YOSHIE, O., OGAWA, K., KENMOTSU,K., TAKAMORI, Y., ICHIMASA,M., SUGAMURA,K., NAKAMURA,M., TAKANO,S., NAGATA,K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **J Exp Med.**, v. 193, p. 255-261. 2001.
- HIROTA, K., YOSHITOMI, H., HASHIMOTO, M., MAEDA, S., TERADAIRA, S., SUGIMOTO, N., YAMAGUCHI, T., NOMURA, T., ITO, H., NAKAMURA, T. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 2803 – 2812. 2007
- HOFBAUER,R., MOSER,D., KAYE,A.D., KNAPP,S., GMEINER, B., KAPIOTIS,S., WAGNER,O., FRASS,M. Prostaglandin E1 is able to increase migration of leukocytes through endothelial cell monolayers. **Microvasc Res.**, v. 59, p. 354-60. 2000.
- HOWARD, D. H. Intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Bacteriology**, Washington D.C., v. 89, p. 518-523, 1965.
- JOO, M.,KWON, M.,SADIKOT, R. T., KINGSLEY, P. J., MARNETT, L. J., BLACKWELL, T. S., PEEBLES, R. S., JR., URADE, Y., CHRISTMAN, J. W. Induction and function of lipocalin prostaglandin D synthase in host immunity. **J Immunol.**, Aug 15., v. 179 (4), p. 2565-2575. 2007.

- KAMBAYASHI, T., WALLIN, R.P., LJUNGGEREN, H.G. cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function. **J Leukoc Biol.**, v. 70, p. 903-910. 2001.
- KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev.**, v. 20, p. 115-132. 2007.
- KIM, J. G., HAHN, Y. S. IFN-gamma inhibits the suppressive effects of PGE2 on the production of tumor necrosis factor-alpha by mouse macrophage. **Immunol. Invest.**, v. 29 (3), p. 257-69. 2000.
- KIMBERLIN, C.L., HARIRI, A.R., HEMPEL, H.O., GODMAN, N.L. Interaction between *Histoplasma capsulatum* and macrophages from normal and treated mice: comparison of the mycelial and yeast in alveolar and peritoneal macrophages. **Infect. Immunol.**, v. 34, p. 6-10. 1981.
- KIMURA, T., IWASE, M., GONDO, G., WATANABE, H., OHASHI, M., ITO, D., NAGUMO, M. Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 1519-1528. 2003
- KOBAYASHI, K., KANEDA, K., KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed- type hypersensitivity. **Microsc. Res. Tec.**, v. 53, p. 241-245. 2001.
- KUNKEL, S. L., CHENSUE, S. W., PHAN, S. H. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. **J. Immunol.**, v. 136 (1), p. 186-92. 1986.
- KURITA, N.; TERAOKA, K.; BRUMMER, E.; ITO, E.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Resistance of *Histoplasma capsulatum* to killing by human

neutrophils. Evasion of oxidative burst and lysosomal-fusion products.

Mycopathologia, Dordrecht, v. 115, p. 207-213, 1991

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.

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, p.1468-1473. 1993.

LARSEN, G.L., HENSON, P.M. Mediators of inflammation. **Annu. Rev. Immunol.**, v.1, p. 335-359. 1983.

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. **The Journal of Immunology**. v. 182, p. 530 – 537. 2009.
- LEMONS, H.P., GRESPLAN, R., VIEIRA, S.M., CUNHA, T.M., VERRI, W.A., FERNANDES, K.S.S., SOUTO, F.O., MCILNNE, I.B., FERREIRA, S.H., LIEW, F.Y., CUNHA, F.Q. Prostaglandin mediates IL-23/IL-17-induced neutrophils migration in inflammation by inhibiting IL-12 and IFN γ production. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Apr 7; v.106(14), p. 5954-5959. 2009.
- LEVY, B. D., CLISH, C. B., SCHMIDT, B., GRONERT, K., SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat. Immunol.**, v. 2 (7), p. 612-619. 2001.
- LIMAYE, A.P., CONNOLLY, P.A., SAGAR, M. ETAL. Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. **N Engl J Med.**, v. 343, p.1163. 2000.
- LOHMANN-MATTHES, M. L., STEINMULLER, C. FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **Eur Respir J.**, v. 7, p. 1678-1689. 1994.
- LÓPEZ-ARMADA, M. J., SÁNCHEZ-PERNAUTE, O., LARGO, R., DIEZ-ORTEGO, I., PALACIOS, I., EGIDO, J., HERRERO-BEAUMONT, G. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 61, p. 1027-1030. 2002.
- LÓPEZ, C.E. Dimorphism and pathogenesis of *Histoplasma capsulatum*. **Rev Argent Microbiol.**, Oct-Dec; v. 38(4), p. 235-242. 2006.
- MACHADO, E.R., UETA, M.T., LOURENÇO, E.V., ANIBAL, F.F., SORGI, C.A., SOARES, E.G., ROQUE-BARREIRA, M.C., MEDEIROS,

- A.I., FACCIOLI, L.H. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. **J Immunol.**, v.175(6), p. 3892-3899. 2005.
- MAO, J.T., TSU, I.H., DUBINETT, S.M., ADAMS, T.S., BARATELLI, F., ROTH, M.D., SERIO, K.J. Modulation of pulmonary leukotriene B4 production by cyclooxygenase-2 inhibitors and lipopolysaccharide. **Clinical cancer research**, v. 10, p. 6872-6878. 2004.
- MEDEIROS, A.I., SILVA, C.L., MALHEIRO, A., MAFFEI, C., FACCIOLI, L.H. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1529-1537. 1999.
- MEDEIROS, A. I. **Papel de Leucotrienos na Histoplasmose Pulmonar murina**. 2002. 111 f.Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.
- MEDEIROS, A. I.; SA-NUNES, A.; SOARES, E. G.; PERES, C. M.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 72, p.1637-1644. 2004.
- MEDEIROS, A.I., SÁ-NUNES, A., TURATO, W.M., SECATTO, A., FRANTZ, F.G., SORGI, C.A., SEREZANI, C.H., DEEPE, G.S.Jr., FACCIOLI, L.H. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: Effects on memory T cells. **The Journal of Immunology**. V. 181, p. 8544-8551. 2008.

- MEDEIROS, A.I., SEREZANI, C.H., LEE, S.P., PETERS-GOLDEN, M. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE₂/EP2 signaling. **J Exp Med.**, v.206 (1), p. 61-68. 2009.
- 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, p. 4055-4060. 1987.
- MEHRAD, B.; STANDFORD, T.J. Role of cytokines in pulmonary antimicrobial host defense. **Immunol. Res.**, v. 20, p. 15-27, 1999.
- 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.
- MICHELIN, M.A., SILVA, J.S., CUNHA, F.Q. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitology.** v. 111, p. 71-79. 2005.
- MORI, N., INOUE, H., YOSHIDA, T., TANABE, T., YAMAMOTO, N. Constitutive expression of the cyclooxygenase-2 gene in t-cell lines infected with human T cell leukemia virus type I. **Int J Câncer**, v. 94, p. 813-819. 2001.
- MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th₁, Th₂ and more. **Immunol. Today**, v. 17, p.138-146. 1986.
- MURPHY, J.W.; WU-HSIEH, B.A.; SINGER-VERMES, L.M.; FERRANTE, A.; MOSER, S.; RUSSO, M.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; CALICH, V.L.;

- KOWANKO, I.C., *et al.* Cytokines in the host response to mycotic agents. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 203-210. 1994.
- 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.
- NEILD, A L., SHIN, S., ROY, C.R. Activated Macrophages Infected with *Legionella* Inhibit T Cells by Means of MyD88-Dependent Production of Prostaglandins. **J Immunol.**, v. 175, p. 8181–8190. 2005.
- NEWMAN, S.L., BUTCHER, C., RHODES, J. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeast and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p. 223-30. 1990.
- NEWMAN, S.L., GOOTEE, L., MORRIS, R., BULLOCK, W.E. Digestion of *Histoplasma capsulatum* yeast by human macrophages. **J Immunology**, Baltimore, MD., v. 149, p. 574-580. 1992.
- NEWMAN, S. L.; GOOTEE, L.; GABAY, J. E. Human neutrophil-mediated fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. Localization of fungistatic activity to the azurophil granules. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 92, p. 624-631, 1993.

- NEWMAN, S. L. Cell-mediated immunity to *Histoplasma capsulatum*. **Semin. Respir. Infect.** v. 16, p. 102–108. 2001.
- NICOLETE, R., LIMA, K.M., JUNIOR, J.M., JOSE, P.J., SANZ, M.J., FACCIOLI, L.H. Prostaglandin E(2)-loaded microspheres as strategy to inhibit phagocytosis and modulate inflammatory mediators release. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 70(3), p.784-790, 2008.
- NOVERR, M.C., PHARE, S.M., TOEWS, G.B., COFFEY, M.J., HUFFNAGLE, G.B. Pathogenic Yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* Produce Immunomodulatory Prostaglandins. **Infect Immun.**, May; v. 69(5), p. 2957-63. 2001.
- NOVERR, M.C., TOEWS, G.B., HUFFNAGLE, G.B. Production of Prostaglandins and Leukotrienes by Pathogenic Fungi. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 400-402. 2002.
- ORANGE, R.P. KALINER, M.A., LARAIA, P.J., AUSTEN, K.F. Immunological release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from human lung.II. Influence of cellular levels of cyclic AMP. **Fed Proc.**, v. 30, p. 1725-25. 1971.
- PANZER, U., UGUCCIONI, M. Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. **Eur J Immunol.**, v. 34(12), p. 3682-3689. 2004.
- PAVORD, I.D., TATTERSFIELD, A.E. Bronchoprotective role for endogenous prostaglandin E2. **Lancet.**, v. 344, p. 436-438. 1995.
- PERES CM, DE PAULA L, MEDEIROS AI, SORGI CA, SOARES EG, CARLOS D, PETERS-GOLDEN M, SILVA CL, FACCIOLI LH. Inhibition

- of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect.**, v.9(4), p.483-489. 2007.
- PERES, C.M., PAULA, L., MEDEIROS, A.I., FRANTZ, F.G., SILVA, C.L., FACCIOLI, L.H. Leukotriene presence more than prostaglandin absence is essential to control the experimental pulmonary tuberculosis. (Submetido 2009).
- PETERS-GOLDEN, M., COFFEY, M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. **J Lab Clin Med.**, v. 132, p. 251-257. 1998.
- PICA, F., FRANZESE, O., D'ONOFIO, C., BONMASSAR, E., FAVALLI, C., GARACI, E. Prostaglandin E₂ induces apoptosis in resting immature and mature human lymphocytes: Ac-Myc-dependent and Bcl-2-independent associated pathway. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 277, p. 1793-1800, 1996.
- PILLAY, T., PILLAY, D.G., BRAMDEV, A. Disseminated histoplasmosis in a human immunodeficiency virus-infected African child. **Pediatr Infect Dis J.**, v. 16, p. 417-418. 1997.
- PINE, L. Studies on the growth of *Histoplasma capsulatum* yeast phase in liquid medium. **J. Bacteriol.**, v. 68, p. 671-679. 1954.
- PRADELLES, P.; ANTOINE, C.; LELLOUCHE, J.P.; MACLOUF, J. Enzyme immunoassays for leukotrienes C₄ and E₄ using acetylcholinesterase. **Methods Enzymol.**, v. 187, p. 82-89, 1990.
- QIU, Z.L., de CARVALHO, M.S., LESLIE, C.C. Phosphorylation of a high molecular mass, arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ in macrophages. **J Biol Chem.**, v. 268, p.24506-24513. 1993.

- RANGEL MORENO, J., ESTRADA GARCIA, I., LA LUZ GARCIA HERNANDEZ, D., AGUILAR LEUON, R. MARQUEZ, R., HERNANDEZ PANDO, R. The role of prostaglandin E₂ in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**. v. 106, p. 257-266. 2002.
- RASGOTI, N., BACHELETE, M., CARVALHO de SOUZA, J.P. Intracellular growth of *Mycobacterium avium* in human macrophages is linked to the increased synthesis of prostaglandin E₂ and inhibition of the phagosome-lysosome fusions. **FEMS Microbiol Immunol.**, v. 89, p. 273-2780. 1992.
- ROUZER, C.A., SCOTT, W.A., HAMILL, A.L., LIU, F.T., KATZ, D.H., COHN, Z.A. Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes. **J Exp Med.**, v. 156, p. 1077-1086. 1982.
- SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B., TALAMÁS-ROHANA, P. Importancia de las prostaglandinas en la amibiasis hepática. **Salud. Publica Mex.**, v. 44, p. 247-257. 2002.
- SÁ-NUNES, A. **Contribuições ao estudo da histoplasmose experimental murina**. 2004. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
- SÁ-NUNES, A., MEDEIROS, A.I., SORGI, C.A., SOARES, E.G., MAFFEI, C.M., SILVA, C.L., FACCIOLI, L.H. Gr-1+ cells play an essential role in

- an experimental model of disseminated histoplasmosis. **Microbes Infect.**, v 9(12-13), p1393-1401. 2006.
- SCHLENZ, S.; SMITH, D.A., BANCROFT, G.J. Cytokine and chemokine responses following pulmonary challenge with *Aspergillus fumigatus*: obligatory role of TNF-alpha and GM-CSF in neutrophil recruitment. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 183-194. 1999.
- SCHNEIDER, A. HARENDZA, S., ZAHNER, G., JACKS, T., WENZEL, U., WALF, G. Cyclooxygenase metabolites mediate glomerular MCP-1 formation and monocyte recruitment in experimental glomerulonephritis. **Kidney Int.**, v. 55, p. 430-441. 1999.
- SCHWARTZ, J. Histoplasmosis. New York: Praeger Publishers, Eastbourne, United Kingdom. p.1-102, 1981.
- SEREZANI, C.H., CHUNG, J., BALLINGER, M.N., MOORE, B.B., ARONOFF, D.M., PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E₂ suppress bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 37(5): p. 562-570. 2007.
- SESTINI, P., ARMETI, L., GAMBARO, G., PIERONI, M.G., REFINI, R.M., SALA, A., VAGHI, A., FOLCO, G.C., BIANCO, S., ROBUSCHI, M. Inhaled PGE₂ prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTB₄ excretion in aspirin-sensitive asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 153, p. 572-575. 1996.
- SEVERO, L.C., OLOIVEIRA, F.M., IRION, K., PORTO, N.S., LONDERO, A.T. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Rev. Inst. Méd. Tro., São Paulo**, v. 43, p. 183-187. 2001.

- SESTINI, P., ARMETI, L., GAMBARO, G., PIERONI, M.G., REFINI, R.M., SALA, A., VAGHI, A., FOLCO, G.C., BIANCO, S., ROBUSCHI, M. Inhaled PGE₂ prevents aspirin-induced bronchoconstriction and urinary LTB₄ excretion in aspirin-sensitive asthma. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 153, p. 572-5, 1996.
- SCHNIZLEIN-BICK, C., DURKIN, M., KOHLER, S., CONNOLLY, P., LEMONTE, A., GARRINGER, T., GOLDBERG, J., SMEDEMA, M., BRIZENDINE, E., WHEAT, L.J. Effects of CD4 and CD8 T lymphocyte depletion on the course of histoplasmosis following pulmonary challenge. **Med Mycol.**, v.41, p.189-197. 2003.
- SLOMIANY, B.L., PIOTROWSKI, J., SLOMIANY, A. Induction of tumor necrosis factor-alpha and apoptosis in gastric mucosal injury by indomethacin: effect of omeprazole and ebrotidine. **Scand J Gastroenterol.**, v. 32 (7), p. 638-42. 1997.
- SMITH, W.L., LANGENBACH, R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. **J Clin Invest.**, v. 107, p. 1491-1495. 2001.
- SMITH, J.G., MAGDEE, D.M., WILLIAMS, D.M., GRAYBILL, J.R. Tumor necrosis factor-alpha plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. The **J infect diseases**, chigaco, IL., v. 162, p. 1349-1353. 1990.
- SNIJDEWINT, F.G., KALINSKI, P., WIERENGA, E.A., BOS, J.D., KAPSENBERG, M.L. Prostaglandin E₂ differentially modulates cytokine secretion of human T helper lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 150 (12), p. 5321-29. 1993.

- SORGI, C.A., SECATTO, A., FANTANARI, C., TURATO, W.M., BELANGER, C., MEDEIROS, A.I., KASHIMA, S., MARLEAU, S., COVAS, D.T., BOZZA, P.T., FACCIOLI, L.H. *Histoplasma capsulatum* Cell Wall β -Glucan Induces Lipid Body Formation through CD18, TLR2, and Dectin-1 Receptors: Correlation with Leukotriene B4 Generation and Role in HIV-1 Infection. **The Journal of Immunology**.v. 182, p: 4025–4035. 2009.
- 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.
- 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, p.15-23. 2001.
- TINEKE, C.T.M., Van Der POUW KRAAN, T.C., KRAAN, V.D.P., BOEIJE, L.C.M., SMEENK, R.J.T., WIJDENES, J., AARDEN, L.A. Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. **J. Exp. Méd.**, v. 181, p. 775-779. 1995.
- TSITSIGIANNIS, D.I., BOK, J., ANDES, D., NIELSEN, K.F., FRISVAD, J.C., KELLER, N.P. *Aspergillus* Cyclooxygenase-Like Enzymes Are Associated with Prostaglandin Production and Virulence. **Infect Immun.** Aug; v. 73(8), p. 4548-59. 2005.

- UNIS, G., OLIVEIRA, FDE.M., SEVERO, L.C. Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, Nov-Dec., v. 37(6), p. 463-468. 2004.
- VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v. 231(25), p. 232-235. 1971.
- VANE, J.R., BAKULE, Y.S., BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 38, p. 97-120. 1998.
- 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. Cance-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 727-735. 2003.
- ZHOU, P.; SIEVE, M.C.; BENNETT, J.; KWON-CHUNG, K.J.; GAZZINELLI, R.T.; SHER, A.; SEDER, R.A. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN-gamma. **J. Immunol.**, v. 15, p. 785-795. 1995.
- ZHOU, P., SIEVE, M.C., TEWARI, R.P., SEDER, R.A. Interleukin modulates the protective immune response in SCID mice infected with *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 936-947. 1997.
- ZHOU, P.; MILLER, G.; SEDER, R. A. Factors involved in regulating primary and secondary immunity to infection with *Histoplasma capsulatum*: TNF-alpha plays a critical role in maintaining secondary immunity in the absence of IFN-gamma. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 160, p. 1359-68. 1998.

- ZURIER, R.B., WEISSMANN, G., HOFFSTEINS, K., AMMERMAN, S., TAI, H.H. Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effects cAMP and cGMP, autonomic agonists and agents which affect microtubule function. **J Clin Invest.**, v. 53(1), p. 297-309. 1974.
- WARNER, T.D., MITCHELL, J.A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **FABESB J.**, v. 18, p. 790-804. 2004.
- WATSON, S.R.; SCHMITT, S.K.; HENDRICKS, D.E.; BULLOCK, W.E. Immunoregulation in disseminated murine histoplasmosis: disturbances in the production of interleukins 1 and 2. **J. Immunol.**, v. 135, p. 3487-3493, 1985.
- WHEAT, L.J. Histoplasmosis. **Infect. Dis.**, v. 2, p. 841-859. 1985.
- WOODS, J. P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 35, 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(4), p.2065-2074. 2007.