MARIANA MORATO MARQUES

**LEUCOTRIENOS COMO MODULADORES
DA IMUNIDADE INATA A FUNGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

MARIANA MORATO MARQUES

**LEUCOTRIENOS COMO MODULADORES
DA IMUNIDADE INATA A FUNGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Jancar

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Marques, Mariana Morato.

Leucotrienos como moduladores da imunidade inata a fungos /
Mariana Morato Marques. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração:
Imunologia. Linha de pesquisa: Imunofarmacologia.

Versão do título para o inglês: Leukotrienes as modulators of innate
immunity to fungi.

1. Leucotrienos 2. *Candida albicans* 3. Fagocitose

I. Negro, Profa. Dra. Sonia Jancar II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0110/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Morato Marques.

Título da Tese: Leucotrienos como moduladores da imunidade inata a fungos.

Orientador(a): Profa. Dra. Sonia Jancar Negro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **048** nas fls. **56** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Sonia Jancar, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Aspectos moleculares da atividade da pentraxina 3 e leucotrienos na fagocitose e atividade microbicida de macrófagos alveolares"** do qual participou(arão) o(s) alunos **Mariana Morato Marques e o pesquisador Richardt Gama Landgraf** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **29.05.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 29 de maio de 2008.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **027** nas fls. **126** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Sonia Jancar**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Aspectos moleculares da atividade da Pentraxina 3 e Leucotrienos na fagocitose e atividade microbicida de macrófagos alveolares*" do qual participam o(s) aluno(s) **Mariana Morato Marques, Camila L.Stumm**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **01.06.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 05 de junho de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Este trabalho recebeu apoio financeiro da FAPESP.

Processo: 2008/03722-9

Ao meu filho Gustavo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

Em especial, agradeço a profa. Sonia Jancar pela orientação, confiança e oportunidade em trabalhar na sua linha de pesquisa. Toda minha admiração por sua competência e elegância.

Agradeço especialmente ao Dr. Carlos Henrique Serezani que me orientou durante todo o percurso, ao vivo ou `a distância. Obrigado pela oportunidade de realizar estágio na Universidade de Michigan (EUA), pela paciência e confiança. Agradeço ao Dr. Marc Peters-Golden, pela especial atenção durante estágio em seu laboratório na Universidade de Michigan (EUA). Sou grata por enriquecerem enormemente minha formação.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, do departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo, pelos excelentes professores e pela qualidade de formação que é oferecida.

Ao grupo da secretaria do departamento de Imunologia – ICB: Jotelma, João, Amanda e Eni.

À Fapesp pelo apoio financeiro, imprescindível para realização deste trabalho.

Aos professores que participaram da minha banca de qualificação: Alexandra Ivo Medeiros, Nancy Starobinas e Sandro Rogério de Almeida. As sugestões e discussões foram essenciais para enriquecerem o trabalho.

A todos os meus amigos do laboratório de imunofarmacologia, Ana Paula Rangel, Camila Stumm, Edson Ishizuka, Franciso Rios, Joilson Martins, Luciano Filgueiras Junior, Marina Campos, Marlise Montes, Matheus Ferracini, Mateus Pecenin, Marianna Koga e Silvana Silva. Trabalhar com vocês foi um prazer e me orgulho muito de ter feito parte de este grupo mais que especial.

Aos amigos de Michigan, Emmilie, Katsuhide, Zibgniew, Tereza, Steven, Ann, Magda, Ana, Karen e Nahid. Agradeço enormemente por estarem no meu caminho, obrigada pelo acolhimento e apoio.

As minhas amigas queridas Maíra Torrecillas, Patrícia Ferreira, Andrea Sendoda, Ana Carolina Cintra e Thais Lavagnolli, pela leal companhia e por estarem sempre dispostas a me ajudar com tanto carinho.

Agradeço a cada um da minha família: minha querida avó Josephina, tio Ivam, tia Angela, Juliana, Fernando, tia Má, tia Quel, tia Cici, Kazuo, tia Cecéu, Thais, tio Sidão, Kelly, Victor, tio Sérgio, Karla e Gabriel.

Ao Gabriel, pelo companheirismo e pelo carinho, fundamental para chegar até aqui.

Aos meus pais, Ronaldo e Áurea, e ao meu irmão Bruno, pelo apoio incondicional. Obrigada por todo esforço para investir na minha formação. Cada conquista minha é um triunfo de vocês.

Ao meu filho querido, Gustavo, que me mostrou o maior amor deste mundo e tornou meus dias muito mais divertidos. Amo você, meu coração.

"A verdade é que pra mim não existe conflito. Pelo contrário, hoje não sei como poderia ser escritor caso não fosse biólogo. E vice-versa. Nenhuma das atividades me basta. O que me alimenta é o diálogo, a intersecção entre os dois saberes. O que me dá prazer é percorrer como um equilibrista essa linha de fronteira entre pensamento e sensibilidade, entre inteligência e intuição, entre poesia e saber científico."

Mia Couto

RESUMO

Morato-Marques M. Leucotrienos como moduladores da imunidade inata a fungos. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Os macrófagos expressam na membrana receptores que reconhecem padrões moleculares presentes em patógenos (PAMPs) dentre eles os TLRs e os receptores Manose e Dectina-1. Macrófagos também expressam receptores para opsoninas tais como anticorpos IgG, C3b e PTX3 além de receptores acoplados a proteína G específicos para os eicosanóides, prostaglandinas e leucotrienos (LTs). Existem evidências de que alguns receptores da imunidade inata interagem com receptores para LTs, e que estas interações amplificam as funções efetoras dos macrófagos, tais como fagocitose e atividade microbicida. No presente trabalho investigamos se os receptores para LTs modulam também a fagocitose e a atividade microbicida mediada pelos receptores Manose, Dectina -1 e PTX3 em macrófagos e os mecanismos moleculares envolvidos. Na primeira parte do trabalho avaliamos o efeito dos LTs na fagocitose de *C. albicans*, que envolve os receptores Manose e Dectina-1, por macrófagos alveolares (AMs). Encontramos que: 1) os LTs aumentam a fagocitose de *C. albicans* por mecanismos que envolvem o aumento da fosforilação de PKC δ e PI3K. O aumento da fagocitose por LTs se deve também a ativação de LIM quinases, as quais inibem a Cofilina-1 com consequente aumento dos níveis de F-actina e polimerização de filamentos de actina. Os efeitos do LTB₄ se dão através do receptor manose e os do LTD₄ através do receptor Dectina-1; 2) O aumento da fagocitose induzido por LTs depende da integridade de microdomínios de membrana chamados de *lipid rafts*. A estimulação de receptores fagocíticos pela *C. albicans* induz a translocação de BLT1, CysLT1 e Dectina-1 para estes microdomínios. 3) Os LTs potencializam a atividade candidacida por mecanismos que envolvem a ativação de NADPH oxidase e produção de espécies reativas de oxigênio. Na segunda parte do trabalho avaliamos o efeito dos LTs na fagocitose via PTX3. Encontramos que, embora os AMs estimulados com Zymosan opsonizado com PTX3 produzem níveis mais elevados de LTB₄ que AMs não estimulados, eles não

potencializam a fagocitose via PTX3. Resultados semelhantes foram obtidos quando o Zymosan opsonizado com PTX3 foi injetado na traquéia de camundongos. Em conjunto nossos resultados mostram que LTs potencializam a fagocitose de *C albicans* por AMs por interferirem com a sinalização intracelular dos receptores manose e dectina e com a polimerização de actina. Os LTs também aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio aumentando a atividade fungicida dos AMs. Este efeito modulador dos LTs é restrito a alguns receptores da imunidade inata que já que LTs não afetaram a fagocitose via PTX3.

Palavras-chave: Leucotrienos. *Candida albicans*. Macrófagos alveolares. Fagocitose. Imunidade inata.

ABSTRACT

Morato-Marques M. Leukotrienes as modulators of innate immunity to fungi. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Macrophages express membrane receptors that recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs) present in microorganisms or by endogenous products, including TLRs, mannose receptor and Dectin-1, termed pathogen recognition receptors (PRRs). They also express receptors that recognize opsonins like IgG, C3b and PTX3 and GPCR agonists, such as the bioactive lipids (eicosanoids) prostaglandins and leukotrienes (LTs). It has been shown that both innate immunity and LT receptors interact to further enhance macrophage antimicrobial effector functions such as phagocytosis, killing and release of proinflammatory cytokines. Here we investigated if LT receptors modulate phagocytosis and killing by acting on the fungal PRRs mannose receptor, Dectin-1 and PTX3 in alveolar macrophage and the molecular events involved. First we analysed the effect of LTs on *C. albicans* phagocytosis and identified some key signaling programs involved. We found that: 1) LT enhancement of phagocytosis involves the activation of PKC δ and PI3K, with subsequent activation of LIMKs, decreased Cofilin-1 activation, and ultimately, F-actin assembly, LTB₄ acts mainly through mannose receptor whereas LTD₄ acts through Dectin-1 to enhance phagocytosis; is required for optimal dectin-1-mediated phagocytosis; 2) LTs effect are dependent on lipid rafts integrity and Dectin-1, BLT1 and CysLT1 translocate to lipid rafts microdomains in AMs stimulated with *C. albicans*; 3) LT enhancement of *C. albicans* killing involves NADPH oxidase activation and ROI generation. We also analyzed the effect of LTs on phagocytosis mediated by PTX3. We found that AMs stimulated with PTX3-opsonized Zymosan released higher levels of LTB₄ than non-opsonized Zymosan. However, PTX3-mediated ingestion is independent on LTs both *in vivo* and *in vitro*. Taken together we showed that LTs enhanced *C. albicans* phagocytosis by AMs

through modulation of intracellular signaling promoted by manose receptor and Dectin-1 and also through actin polymerization. LTs also enhance ROI generation and candidacida capacity of AMs. The fact that phagocytosis via PTX3 is not enhanced by LTs, we postulate that LTs specifically influence signaling programs of key PRRs and emphasize the need for more studies to unveil the role of these lipids in influencing innate and adaptive immune responses.

Keywords: Leukotrienes. *Candida albicans*. Alveolar macrophages. Phagocytosis. Innate immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégia experimental utilizada para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na ação de LTs na fagocitose e atividade microbicida de AMs via MR e Dectina-1.....	48
Figura 2 - Estratégia experimental referente ao estudo da importância dos LTs na fagocitose de Zymosan opsonizado por PTX3.....	50
Figura 3 - <i>C. albicans</i> induz a produção de LTs por macrófagos alveolares.....	63
Figura 4 - Leucotrienos produzidos endogenamente são necessários para ótima fagocitose de <i>C. albicans</i>	64
Figura 5 - A adição de LTB ₄ e LTD ₄ aumenta a fagocitose de <i>C. albicans</i>	66
Figura 6 - O LTB ₄ atua nos receptores Manose e Dectina-1 e o LTD ₄ apenas no Dectina-1 para potencializar a fagocitose de <i>C. albicans</i>	67
Figura 7 - O aumento de fagocitose induzido por LTB ₄ , mas não de LTD ₄ é dependente de Gai.....	68
Figura 8 - A integridade dos <i>lipid rafts</i> é necessária para o efeito potencializador de LTB ₄ e LTD ₄ na fagocitose de <i>C. albicans</i>	70
Figura 9 - <i>C. albicans</i> induz a translocação de BLT1, CysLT1 e Dectina-1 para <i>lipid rafts</i>	72
Figura 10 - LTD ₄ , mas não LTB ₄ , depende de Syk para potencializar a fagocitose de <i>C. albicans</i>	73
Figura 11 - Leucotrienos são necessários para expressão basal de Dectina-1 e MR em macrófagos alveolares.....	74
Figura 12 - O aumento de fagocitose induzido por LTs é dependente de PKC δ , mas não de PKC α	75
Figura 13 - O aumento de fagocitose induzido por LTs é dependente de PI3K, mas não de MAPK.....	76
Figura 14 - LTB ₄ e LTD ₄ aumentam a polimerização de actina através da fosforilação de PI3K e PKC δ	78
Figura 15 - LTB ₄ e LTD ₄ aumentam a polimerização de actina através da fosforilação de PI3K e PKC δ	79

Figura 16 - LTs aumentam a polimerização de actina através da regulação da fosforilação de Cofilina-1.....	81
Figura 17 - LTs regulam a fosforilação de Cofilina-1, LIMK-1 e LIMK-2.....	82
Figura 18 - LTs aumentam a atividade fungicida de AMs contra <i>C. albicans</i>	84
Figura 19 - Ensaio de ligação de rmPTX3 a Zymosan (Zy) e <i>K. Pneumoniae</i>	85
Figura 20 - A ativação do receptor para PTX3 em AMs induz a síntese de LTB4.....	86
Figura 21 - A fagocitose via PTX3 em AMs é independente de LTs.....	88
Figura 22 - Zymosan e Zymosan-PTX3 induzem produção de CysLT nas vias aéreas de WT mas não de 5-LO-/-.....	89
Figura 23 - Fagocitose <i>in vivo</i> de Zymosan opsonizado ou não com rmPTX3 por AMs provenientes de animais deficientes em 5-LO e respectivo tipo selvagem.....	90
Figura 24 - Modelo proposto para ação de leucotrienos na atividade antifúngica.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - ácido araquidônico
AA861 - inibidor de 5-lipoxigenase
AM - macrófagos alveolares
AMP - monofosfato de adenosina
ANOVA - *Analysis of variance*
Arp2/3 - *actin related protein 2/3*
BAL - lavado broncoalveolar
BCL10 - *B cell leukemia/lymphoma 10*
BLT 1 e 2 - receptores de leucotrienos 1 e 2
BSA - Albumina de soro bovina
CARD9 - *caspase recruitment domain family, member 9*
Cdc42 - *cell division cycle 42*
cDNA - DNA complementar
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CFU - unidades formadoras de colônia
CLR - *C-type lectin receptors*
C 3 - fração 3 do sistema complemento
C3b - componente do complemento C3b
iC3b - componente do complemento iC3b
CO₂ - Dióxido de Carbono
cPLA₂ - fosfolipase A₂ citoplasmática
CRP - *C reactive protein*
CR3 - receptor para fração 3 do sistema complemento
CTLD - *C-type lectin-like domains*
CysLT- receptor dos cisteinil leucotrienos
DAG - diacilglicerol
DC-SIGN - *DC specific ICAM grabbing non-integrin*
DEPC - Dietilpirocarbonato
DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico
dNTP - Desoxirribonucleotídeo
DO - densidade óptica
DPI - *diphenylene iodonium*
ECL - *enhanced chemiluminescence*
EDTA - Ácido etileno diaminotetraacético
ERK 1/2 - quinase regulada por sinal extracelular
ETOH - Etanol
FLAP - proteína ativadora da 5-lipoxigenase
FcγR - receptor para fração constante de imunoglobulina G
FcεR - receptor para fração constante de imunoglobulina E
FGF2 - fator de crescimento de fibroblasto 2
FGF8 - fator de crescimento de fibroblasto 8
FITC - isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF - *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*
HIV - vírus da imunodeficiência humana
IgG - imunoglobulina G
IL - interleucina
IL1β - interleucina 1 beta
INF - interferon
IP3 - inositol-trifosfato
ITAM - *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
JAK - Janus quinase
JNK - c-Jun quinase
LDL - *low density lipoprotein*
LPS - lipopolissacarídeo
LT - leucotrienos
LTA₄ - leucotrieno A₄
LTA₄H - LTA₄ hidrolase
LTB₄ - leucotrieno B₄
LTC₄S - LTC₄ sintase

LTC₄ - leucotrieno C₄
LTD₄ - leucotrieno D₄
LY290042 - inibidor de PI3K
MALT1 - *mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*
M α CD - *methyl-alpha-cyclodextrin*
M β CD - *methyl-beta-cyclodextrin*
MK571 - antagonista do receptor de LTD₄
MOC - microscópio óptico comum
MR - *mannose receptor*
mRNA - RNA mensageiro
NADPH - *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NETs - *neutrophil extracellular traps*
NK - células natural killers
NOD - *nucleotide-binding oligomerization domain*
PAK1 - *p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1*
PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*
PBS - *Phosphate buffered saline*
PCR - *Polimerase Chain Reaction*
PGE₂ - prostaglandina E₂
PI3K - Fosfoinosítídeo 3-quinase
PKC - proteína quinase C
PLA₂ - fosfolipase A₂
PLC - fosfolipase C
PLD - fosfolipase D
PMA - *phorbol 12-myristate 13-acetate*
PRR - *pattern recognition receptor*
PTX3 - pentraxina 3
rmPTX3 - pentraxina 3 recombinante murina
Rab - *ras-related gtp-binding protein*
Ran - *member RAS oncogene family*RNA - Ácido Riboxinucleico
RPMI - Meio de Cultura do Roswell Park Memorial Institute

RT-PCR - *Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction*

RAC-1 - *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RAC-2 - *ras-related C3 botulinum toxin substrate 2*

ROCK - *rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*

ROI - *Reactive oxygen species*

Rpm - *rotações por minuto*

Rottlerin - *inibidor de PKC δ*

sRBC - *sheep red blood cells*

SAP - *serum amyloid P*

SCARF1 - *scavenger receptor class F, member 1*

SDS - *dodecil sulfato de sódio*

SFB - *soro fetal bovino*

Syk - *Spleen tyrosine kinase*

TLR - *Receptores do tipo Toll*

TNF - *Fator de necrose tumoral*

TSG-14 - *TNF stimulated gene-14*

WASP - *Wiskott-Aldrich syndrome protein*

Wortmannin - *inibidor de PI3K*

WT - *Wild type*

Zy - *Zymosan*

5-LO - *5-lipoxygenase*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Receptores da imunidade inata	24
1.2 Mecanismos moleculares envolvidos na fagocitose	25
1.2.1 Reorganização do citoesqueleto	25
1.2.2 Sinalização intracelular envolvida na fagocitose	27
1.2.2.1 <i>Proteína tirosina quinase Syk</i>	27
1.2.2.2 <i>Proteína quinase C (PKC)</i>	28
1.2.2.3 <i>Fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K)</i>	28
1.2.2.4 <i>Proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)</i>	29
1.2.2.5 <i>Superfamília das Ras GTPases</i>	29
1.3 Os leucotrienos	30
1.3.1 Biossíntese, receptores e sinalização	30
1.3.2 Os leucotrienos na imunidade inata	32
1.4 Os receptores envolvidos no reconhecimento de Fungos	35
1.4.1 Receptores lectina do tipo C	36
1.4.1.1 <i>Dectina-1</i>	37
1.4.1.2 <i>Receptor Manose (MR)</i>	39
1.4.2 <i>Pentraxina 3</i>	41
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	45
3 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	47
3.1 Parte I - Ação de leucotrienos sobre receptores Manose e Dectina-1	47
3.2 Parte II - Papel dos LTs na fagocitose via receptor para PTX3	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Reagentes	52
4.2 Animais	52
4.3 Obtenção de macrófagos alveolares e cultivo	53
4.4 <i>Candida albicans</i>	53
4.5 Dosagem de mediadores inflamatórios	54
4.5.1 Sobrenadante de cultura de AMs	54

4.5.2 Sobrenadante de lavado broncoalveolar (BAL)	54
4.6 Ensaio de Fagocitose	55
4.6.1 Ensaio de fagocitose por microscopia de luz.....	55
4.6.2 Ensaio de fagocitose por fluorimetria.....	56
4.6.3 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo.....	56
4.6.4 Ensaio fagocitose <i>in vivo</i>	57
4.7 Microscopia confocal	58
4.8 Western Blotting	58
4.9 Fracionamento de lipid rafts	59
4.10 Citometria de fluxo - expressão de Dectina-1 e MR	60
4.11 Ensaio fungicida	60
4.12 Análises dos dados e estatística	61
5 RESULTADOS	63
5.1 Parte I - Ação de leucotrienos sobre receptores manose e Dectina-1	63
5.1.1 Papel dos LTs na fagocitose via receptores Manose e Dectina-1.....	63
5.1.2 Identificação do tipo e local de interação entre receptores de LTs com receptores manose e Dectina-1.....	67
5.1.3 Identificação das vias de sinalização envolvidas no efeito potencializador dos LTs na fagocitose de <i>C. albicans</i>	75
5.1.4 Ação dos LTs na polimerização de actina.....	77
5.1.5 Modulação por LTs da capacidade fungicida de AMs	83
5.2 Parte II - LTs na fagocitose via PTX3	85
6 DISCUSSÃO	92
7 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	110
ANEXOS	132
ANEXO A - Artigo de periódico - <i>Leukotrienes target F-actin/cofilin-1 to enhance alveolar macrophage anti-fungal activity</i> - publicado na revista Journal Biological Chemistry.....	132
ANEXO B - Artigo de periódico - <i>Macrophage Dectin-1 Expression Is Controlled by Leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 Axis</i> - publicado na revista Journal of Immunology.....	146

1.1 Receptores da imunidade inata

Os fagócitos profissionais tais como macrófagos e neutrófilos constituem as células centrais da imunidade inata. Esta é a primeira linha de defesa do organismo e desempenha papel fundamental no controle de infecções. Os fagócitos reconhecem, internalizam e matam os microrganismos por mecanismo dependentes e independentes de oxigênio. Os macrófagos, juntamente com as células dendríticas, estabelecem um elo entre a imunidade inata e adaptativa pela exposição de epítomos do microrganismo fagocitado aos linfócitos e consequente indução da resposta imune adaptativa (Greenberg e Grinstein, 2002; Janeway e Medzhitov, 2002).

As células do sistema fagocítico mononuclear são derivadas de um progenitor comum na medula óssea, e constituem uma população heterogênea de células. Uma vez que atingem a corrente sanguínea, os monócitos adentram todos os compartimentos teciduais do organismo. Populações de macrófagos residentes nos diferentes órgãos (células de Kupffer, alveolares, peritoneais, microglia, osteoblastos) se adaptam ao microambiente ao qual estão expostos. Os macrófagos alveolares (AMs) são fagócitos residentes do pulmão que exercem papel central na imunovigilância do trato respiratório atuando como controladores de infecções através da manutenção da esterilidade das mucosas, da eliminação de microorganismos presentes na superfície dos alvéolos (Gordon e Read, 2002).

Mecanismos da imunidade inata incluem o reconhecimento de patógenos mediado por receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors*, PPRs). Esses receptores são capazes de reconhecer estruturas moleculares altamente conservadas presentes em patógenos conhecidas como PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Os PRRs pertencem a diferentes grupos estruturais e funcionais, que incluem receptores do tipo Toll (*Toll like receptors*, TLR), receptores do tipo “scavengers”, receptores que reconhecem carboidratos similares à lectina C (ex. Dectina-1-2, receptor de manose), receptores do tipo NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) dentre outros.

Além destes, os receptores para opsoninas, que recobrem os microorganismos e medeiam a sua ligação aos receptores presentes na superfície dos fagócitos são

chave no controle de infecções. As partículas opsonizadas com anticorpos da classe IgG são reconhecidas por uma classe de glicoproteínas de membrana, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas chamadas de receptores para $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$). Os receptores mais estudados são os do grupo dos $Fc\gamma R$ e os receptores para os fragmentos C3b e iC3b do sistema complemento (CRs). Entretanto, a lista de opsoninas está crescendo e inclui proteína surfactante A e D (Pastva et al., 2007), as colectinas que são lectinas ligadoras de manose (Kuroki et al., 2007) e as pentraxinas (Diniz et al., 2004; Volanakis 2001).

Após o reconhecimento de microrganismos por estes receptores, inicia-se o processo de fagocitose.

1.2 Mecanismos moleculares envolvidos na fagocitose

Fagocitose é um mecanismo filogeneticamente conservado descrito pela primeira vez por Elie Metchnikoff no final do século XIX, que recebeu prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina por esta descoberta.

Sabemos hoje que o processo de fagocitose envolve uma cascata de ativação de moléculas sinalizadoras que incluem quinases, GTPases, fofatases que atuam em sistema de *feed-back* envolvidos na transdução de sinal de receptores fagocíticos (May e Machesky, 2001) que culminam na ingestão do patógeno de modo dependente ou independente da reorganização do citoesqueleto de actina.

1.2.1 Reorganização do citoesqueleto

Os filamentos de actina estão dispersos no citoplasma e a montagem de uma trama de actina é essencial para formação de pseudópodos, fundamental no englobamento de partículas. Existem basicamente dois estados da molécula de actina: G-actina (*globular actin*) que é a forma monomérica e F-actina (*filamentous actin*) que é a forma polimérica. Brevemente, os principais eventos envolvidos na dinâmica da actina na reorganização do citoesqueleto são: nucleação, polimerização e despolimerização. A re-organização de actina que ocorre nos copos fagocíticos é

principalmente mediada pelo recrutamento e ativação de *actin nucleating proteins*, em particular o complexo Arp2/3 (May et al., 2000). O complexo Arp2/3 é composto de sete proteínas incluindo as proteínas Arp 2 e Arp 3, e funciona promovendo a polimerização de actina através da promoção de novos braços de filamentos nos filamentos já existentes (Goley e Welch 2006; May et al., 2000). Outras moléculas efetoras importantes na montagem dos filamentos de actina são WASP/N-WASP, efetoras de Cdc42 e Scar/WAVE, efetoras de Rac. WASP e Scar/WAVE são conhecidos como fatores que promovem a nucleação através de ligação em região específica do domínio C terminal do complexo Arp2/3, estimulando sua ativação (Machesky e Insall, 1998).

Durante a fagocitose, a dinâmica da actina não está restrita a nucleação e polimerização, mas também é regulada por *capping/uncapping*, despolimerização e *severing* (Wear et al., 2000). A desmontagem dos filamentos de actina ocorre tanto durante a internalização quanto após a captura da partícula. Esse processo requer uma precisa coordenação espacial e temporal de uma série de *actin depolymerising proteins*. Um grupo particular de proteínas que regulam a desmontagem dos filamentos de actina são as proteínas da família ADF/cofilina. Cofilina-1 é reconhecida como a principal *actin binding protein* em leucócitos e exerce papel importante na fagocitose e explosão respiratória de fagócitos (Adachi et al., 2002). Cofilina-1 causa despolimerização dos filamentos, portanto impede a montagem da trama de actina (Bamburg, 1999) e inibe a fagocitose via FcγR (Adachi et al., 2002). Cofilina-1 é inativada por fosforilação em Ser 3, o que resulta na inibição da desmontagem dos filamentos, permitindo a polimerização de actina. As LIM quinases (LIMK) catalizam a fosforilação de Cofilina-1 e sua super expressão reverte a despolimerização de actina induzida por Cofilina-1, levando a acumulação de filamentos de actina e agregados (Bernard, 2007). As LIMK podem ser ativadas por fosforilação por efetores *downstream* de Rho GTPases, como a quinase ativada por p21 (PAK1, *p21 activated kinase 1*) efetora de Rac e Cdc42 e ROCK, efector de RhoA (Bernard, 2007; Lee e Helfman, 2004).

1.2.2 Sinalização intracelular envolvida na fagocitose

O reconhecimento de microrganismos por receptores em fagócitos desencadeia uma série de eventos intracelulares que culminam na polimerização da actina, formação de pseudópodes e ingestão dos alvos. Estes eventos envolvem a ação de várias moléculas de sinalização que serão discutidas a seguir.

1.2.2.1 Proteína tirosina quinase Syk

Syk (*Spleen tyrosine kinase*) é uma tirosina quinase expressa em células hematopoiéticas, desempenha um papel importante nos eventos iniciais da ativação da cascata de sinalização intracelular necessários para diversas respostas imunes celulares, incluindo a fagocitose via receptor Fc γ (Raeder et al., 1999; Sedlik et al., 2003; Turner et al., 2000) e via Dectina-1 (Rogers et al., 2005; Underhill et al., 2005) por fagócitos.

A ativação do receptor Fc γ desencadeia rápida fosforilação em domínios do receptor denominados “motivos de ativação de imunoreceptor baseados em tirosina” (ITAM, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) (Isakov, 1997). A fosforilação inicial é feita por proteínas tirosina quinases da família Src (Ghazizadeh et al., 1994), Src, Hck, Fgr, Lyn e Fyn. Então, Syk é recrutada para os motivos ITAM fosforilados, onde ela é ativada (Darby et al., 1994). Após ativação, a Syk ativa outras quinases, tais como PI3K e PKC que culminam na polimerização da actina, formação de pseudópodes e consequentemente ingestão dos alvos (Cox e Greenberg, 2001).

Enquanto a fagocitose mediada pelo receptor Fc γ dependente da ativação de Syk (Crowley et al., 1997), alguns autores sugeriram que a fagocitose via receptor Dectina-1 parece não depender da ativação desta quinase (Underhill et al., 2005), mas isto ainda é controverso.

1.2.2.2 Proteína Quinase C (PKC)

São Serina/Treonina quinases ativadas por uma série de fatores, incluindo receptores que apresentam cauda de ITAM e os receptores acoplados à proteína G (GPCR), especialmente os acoplados à proteína G_q . São ativados por sinais que levam ao aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} e diacilglicerol (DAG). Uma vez fosforilada, PKCs podem responder aos segundos mensageiros, como Ca^{2+} e DAG, através da ligação e fosforilação de alvos *downstream*.

Pelo menos 12 isoformas da PKC já foram descritas e podem ser classificadas em três grandes grupos: PKC clássicas ($cPKC\alpha$, β_1 , β_2 e γ) que são dependentes de cálcio e diacilglicerol; PKC novas ($nPKC\delta$, ϵ , τ e η) que são cálcio independente e diacilglicerol dependente e a PKC atípica ζ , que não necessita de cálcio nem diacilglicerol para ativação (Parker e Murray-Rust, 2004).

Durante fagocitose mediada por receptor C3 e $Fc\gamma$ observou-se que as $PKC\alpha$ e δ localizam-se em fagossomos de macrófagos (Breton e Descoteaux, 2000; Larsen et al., 2000). E em macrófagos peritoneiais de rato a ativação de $PKC\alpha$ é necessária para formação e maturação do fagossomo (Allen e Aderem, 1996).

1.2.2.3 Fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K)

PI3K é uma quinase essencial para desencadear a fagocitose mediada por diversos receptores (García-García e Rosales, 2002). Ela fosforila o inositol na posição 3 (Stephens et al., 2002; Toker e Cantley, 1997). A PI3K e seus produtos lipídicos $PI(3,4)P_2$ e $PI(3,4,5)P_3$ estão envolvidos na ativação de diversas vias de sinalização intracelular, dentre elas, ativação de diferentes isoformas de PKC (Singh et al., 1993; Yamamori et al., 2004), Akt/protein kinase B, FAK e ERK 1/2 (García-García e Rosales, 2002; Marshall et al., 2001). Durante a fagocitose mediada por receptores $Fc\gamma$, PI3K está relacionada com o fechamento do fagossomo, um evento necessário para fagocitose de partículas (Cox et al., 1999). Foi observado também o acúmulo de produtos da PI3K nos locais de formação do fagossomo (Marshall et al. 2001).

Em macrófagos, a inibição da PI3K resultou no bloqueio da fagocitose no estágio inicial da ativação das vias de sinalização necessárias para a ocorrência deste evento (Campos et al., 2009; Cox et al., 1999). Demonstrou-se ainda que a inibição da PI3K diminuiu a fagocitose via FcγR por neutrófilos (Kanakaraj et al., 1994).

1.2.2.4 *Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK)*

São proteínas que possuem atividade de serina/treonina quinases, cada uma delas desencadeia uma cascata de quinases, com funções biológicas relacionadas entre si. As proteínas mais estudadas deste grupo são a ERK 1/2 e a p38. Desempenham papel importante em grande número de processos celulares, tais como crescimento, diferenciação, apoptose e ativação de fatores de transcrição (Cargnello e Roux, 2011; Fanger et al., 1997; Seger e Krebs, 1995; Xia et al., 1995).

Em fagócitos esta via é ativada pela ligação dos receptores Fcγ e Fcε (Rose et al., 1997; Trotta et al., 1996). Além disso, existem evidências de que a inibição destas vias pelos patógenos é um mecanismo de escape de alguns microrganismos (Scherle et al., 1998).

Inibidores farmacológicos da ERK 1/2 e p38 diminuíram significativamente o *burst* oxidativo, a aderência e migração de neutrófilos (Nick et al., 1996; Rane et al., 1997). Estudos apontam que a ativação da ERK1/2 pode ser resultado da ativação das PKC (Breton e Descoteaux, 2000; García-García e Rosales, 2002; Raeder et al., 1999) ou da PI3K (Coxon et al., 2000; García-García e Rosales, 2002).

1.2.2.5 *Superfamília Ras GTPases*

É composta por enzimas hidrolases que se ligam e hidrolizam trifosfato de guanosina (GTP). As *small* GTPases são compostas por pequenas proteínas monoméricas homólogas a Ras. Têm peso molecular de aproximadamente 21 kDa e estão envolvidas na sinalização de vários processos celulares. De acordo com a sequência primária de aminoácidos e propriedades bioquímicas, são divididas em 5

subfamílias: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran. A subfamília Rho é subdividida em RhoA, Rac1 e Cdc42 (Scheffzek e Ahmadian, 2005).

Proteínas da família Rho e Arf estão relacionadas com fagocitose. Membros da família Rho, por exemplo, regulam processos como remodelamento de citoesqueleto, ativação da transcrição e produção de superóxido (Aspenström, 1999) e fagocitose (Chimini e Chavrier, 2000). Rac e Cdc42 estão bem caracterizadas como moléculas de sinalização *downstream* de FcγRs. A inibição de qualquer uma delas bloqueia a polimerização de actina nos fagossomos que estão se formando e consequentemente a internalização de partículas opsonizadas por IgG por macrófagos murinos (Caron e Hall, 1998; Cox et al., 1997). Rac1 e Cdc42 não são necessárias para a fagocitose via receptores de complemento (Caron e Hall, 1998). Isso pode ajudar a explicar a diferente morfologia da montagem de actina na fagocitose via receptor de complemento e via receptor Fcγ (Allen e Aderem, 1996). Rho parece não ser essencial para fagocitose via FcγR (Caron e Hall, 1998; May et al., 2000), enquanto que é necessária para fagocitose via CR3 (Caron e Hall, 1998).

1.3 Os leucotrienos

1.3.1 Biossíntese, receptores e sinalização

Leucotrienos são mediadores lipídicos envolvidos em processos inflamatórios e mais recentemente foi demonstrado que estas moléculas são também potentes ativadores de fagócitos, levando ao aumento da fagocitose e da atividade microbicida (Flamand et al., 2007).

A biossíntese de LTs requer a ativação da 5-LO (5-lipoxigenase) presente no citosol e no núcleo em células não ativadas. Após ativação celular, a enzima transloca-se para a membrana nuclear onde a PLA2 hidrolisa os fosfolipídios da membrana nuclear liberando o AA que se liga a uma proteína ativadora de 5-LO (FLAP, *5-LO activating protein*) e nesta forma o AA fica acessível à ação da 5-LO dando origem ao precursor instável de todos os leucotrienos, o LTA4. O LTA4 pode sofrer hidrólise enzimática pela LTA4 hidrolase (LTA4H) gerando o LTB4, ou receber um resíduo de

glutathiona pela LTC4 sintase (LTC4S) gerando o LTC4. Tanto LTB4 quanto LTC4 são exportados para o espaço extracelular. A retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC4 dá origem ao LTD4 e com a retirada da glicina do LTD4 forma-se o LTE4. Estes LTs são conhecidos como cisteinil LTs ou LTs peptídicos (revisto por Okunishi e Peters-Golden, 2011).

Conforme o próprio nome indica, os leucotrienos são produzidos predominantemente por leucócitos já que eles expressam altos níveis de 5-LO e FLAP. No entanto, o perfil de produção de LTs varia de acordo com o tipo de celular. Monócitos humanos, macrófagos alveolares de ratos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos B produzem principalmente LTB4 enquanto que eosinófilos humanos, macrófagos peritoneais e alveolares murinos secretam LTC4 e mastócitos humanos sintetizam mais LTC4 que LTB4 (Henderson et al., 1988; Hirata et al., 1990). Sabe-se que AMs de rato produzem aproximadamente 10 vezes mais LTB4 do que CysLTs e o inverso ocorre em camundongos (Peters-Golden e Henderson, 2007). Esses padrões de produção de leucotrienos podem variar de acordo com o tipo de célula e não ocorrem necessariamente em todas as espécies animais.

Os leucotrienos atuam de modo autócrino e parácrino em concentrações nanomolares nas células alvo, geralmente de 1 a 100 nM, via receptores acoplados à proteína G (Tager e Luster, 2003; Yokomizo et al., 1997). Existem cinco tipos de receptores celulares para estes mediadores. Os receptores para os cisteinil LTs conhecidos são o CysLT1, CysLT2 e CysLT3 e para o LTB4 são o BLT1 e BLT2. Estes receptores apresentam diferentes afinidades pelos seus ligantes, o BLT1 e CysLT1 são descritos como receptores de alta afinidade e BLT2 e CysLT2 CysLT3 de baixa afinidade.

Os receptores acoplados a proteína G (GPCRs) constituem a maior família de proteínas transmembrana em vertebrados. Medeiam respostas fisiológicas a uma grande variedade de ligantes e a sinalização através destes receptores ocorre através da ativação de proteínas G heterotriméricas ($G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$). As proteínas G são classificadas em quatro famílias com base nas subunidades α : $G\alpha_s$, que ativa adenilato ciclase e tirosina quinase Src; $G\alpha_i$, que inibe adenilato ciclase, mas pode ativar a

tirosina quinase Src; $G\alpha_q$, que estimula fosfolipase C; e $G\alpha_{12}$, que ativa Rho GTPase (Landry et al., 2006).

Nos leucócitos, esses receptores podem estar acoplados a proteína $G\alpha_q$ que levam a formação de diacilglicerol e aumento de cálcio intracelular ou a proteína $G\alpha_i$ que inibe adelinato ciclase e conseqüentemente a formação de AMP cíclico (Tager e Luster, 2003). Peres et al. (2007) mostraram que o efeito do BLT1 na atividade microbicida de macrófagos alveolares estimulados com alvos opsonizados com IgG, foi dependente principalmente da ativação da proteína $G\alpha_i3$ e em menor extensão de $G\alpha_q11$, enquanto o efeito do CysLT1 foi exclusivamente desencadeado pela ativação de $G\alpha_q$.

A ligação de LTs aos seus receptores desencadeia diferentes cascatas de sinalização. A sinalização induzida por LTB₄ é caracterizada, basicamente, pela ativação de cPLA₂ (Berkow e Dodson, 1991) fosfolipase C e D (PLC e PLD) (Zhou et al., 1993), ERK1/2 (Woo et al., 2002), p38 MAPK (Campos et al., 2009), PKC α (Campos et al., 2009), PI3K, aumento de Ca²⁺ (Yokomizo et al., 1997), Rac 1 (Woo et al., 2002) e quinases da família Src (Lynch et al., 2000). Em relação aos CysLTs, a ligação também é caracterizada pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Hui e Funk, 2002; Sampson et al., 2003), pela ativação de PKC δ (Campos et al., 2009; Paruchuri et al., 2002; Vegesna et al., 1988), MAPKs (Hoshino et al., 1998; Paruchuri et al., 2002) e PI3K (Paruchuri et al., 2005).

1.3.2. Os leucotrienos na imunidade inata

Nos últimos anos, vêm se acumulando na literatura evidências de que os LTs exercem papel importante na defesa contra infecções. A primeira evidência deste papel dos LTs foi dada por Wirth e Kierszenbaum (1985a, b) pela observação de que a adição de LTB₄ e LTC₄ a macrófagos peritoneais aumenta a fagocitose e a eliminação de *Trypanosoma cruzi*.

Bailie et al. (1996) demonstraram que animais deficientes de 5-LO apresentaram uma taxa de mortalidade decorrente a infecção por *K.pneumoniae* 40% maior que os animais WT e sugeriram que o aumento da susceptibilidade destes

animais deficientes parece estar associado à diminuição da fagocitose e da atividade microbicida.

Demonstrou-se em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) um aumento da suscetibilidade às infecções pulmonares devido à deficiência na síntese de LTs causada por reduzida expressão da FLAP (Coffey et al., 1998a; Krarup et al., 1997). Macrófagos alveolares obtidos destes indivíduos apresentaram redução na atividade microbicida para *Cryptococcus neoformans* e a adição de LTB4 exógena reverteu esta deficiência (Coffey et al., 1998a). Demonstrou-se que LTB4 e LTC4 são capazes de potencializar a fagocitose de *Klebsiella pneumoniae* opsonizada, em AMs (Mancuso et al., 1998) e neutrófilos (Bailie et al., 1996). Os LTs também aumentam a fagocitose de outras espécies de bactérias Gram positivas e negativas (Demitsu et al., 1989a, b; Mancuso et al., 2010).

Serezani et al. (2006) observaram que o LTB4 tem papel importante no controle da infecção por *Leishmania amazonensis* e que isto é dependente do receptor BLT1 e envolve a produção de óxido nítrico. Foi observado também que macrófagos provenientes de animais resistentes (C3H/HePAS) produzem maiores quantidades de LTB4 em resposta à *Leishmania amazonensis* do que macrófagos de animais susceptíveis (BALB/c). Esse trabalho sugere que variações genéticas relacionadas à síntese de LTB4 podem influenciar a resistência ou a susceptibilidade a infecções, uma vez que a diminuição da síntese de LTs endógenos por inibição genética ou farmacológica foi correlacionada com o aumento da severidade da infecção por *L. amazonensis*.

Wan et al. (2007) observaram uma alça de amplificação entre LL-37 e LTB4 em neutrófilos humanos. LL-37 é uma defensina, peptídeo antimicrobiano endógeno. Esse estudo mostrou que LTB4 promove a produção de peptídeos LL-37 em neutrófilos via BLT1. Por outro lado, LL-37 induz a translocação da 5-LO do citosol para a membrana perinuclear, condição essencial para ocorrer a síntese de LTB4, em células estimuladas com LPS ou GM-CSF. Os autores sugerem que esses mediadores, LTB4 e LL-37, são estimulados reciprocamente atuando em sinergismo no sentido de aumentar a resposta imune.

Com relação ao papel dos LTs em infecções fúngicas, Secatto et al. (2012) mostraram que em animais geneticamente deficientes da enzima 5-LO, a deficiência na produção de LTs resultou em diminuição da fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com IgG e causou a disseminação do fungo e morte do hospedeiro.

Muitos esforços têm sido feitos na tentativa de esclarecer os mecanismos intracelulares envolvidos no efeito dos LTs na defesa contra infecções. Canetti et al. (2003) mostraram que em AMs de ratos, o aumento da fagocitose de alvos opsonizados por IgG, promovido pelos LTs é dependente de Syk.

Existem evidências de que as vias de sinalização ativadas por receptores FcγR e por receptores para LTs em AMs convergem e amplificam os sinais individuais, resultando tanto no aumento da fagocitose, como na atividade microbida de AMs infectados por *Klebsiella pneumoniae*. Serezani et al. (2005) relataram que a adição de LTB₄ aumentou a atividade microbida em AMs estimulados com *K. pneumoniae* opsonizada com IgG de modo dependente da PKCδ e subsequente ativação da NADPH oxidase.

O papel das PKC na ativação celular pelos LTs tem sido demonstrado em vários tipos celulares. Mancuso e Peters-Golden (2000a) mostraram que a amplificação da fagocitose induzida pelos LTs é dependente de receptores Fc e também da atividade da PKC. Recentemente, nosso grupo demonstrou que o LTB₄ aumenta a fagocitose mediada por receptores Fc de modo dependente de PKC-α, ERK 1/2 e PI3K, enquanto os efeitos do LTD₄ na fagocitose são dependentes de PKC-δ, p38 e PI3K (Campos et al., 2009). Foi visto ainda que em AMs estimulados com alvos opsonizados com IgG o BLT1 migra para microdomínios de membrana chamados *lipid rafts*. *Lipid rafts* são microdomínios de membrana enriquecidos com colesterol, glicoesfingolípideos, proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol e exercem um papel importante na sinalização de receptores com domínios ITAM. A integridade dos *lipid rafts* é essencial para que LTB₄ promova o aumento da fagocitose e atividade microbida a estes alvos (Serezani et al., 2009).

Entretanto, não existiam estudos sobre os mecanismos envolvidos na interação de receptores de LTs com receptores envolvidos no reconhecimento de fungos, como os receptores manose, dectina-1 e pentraxina 3.

1.4 Os receptores envolvidos no reconhecimento de Fungos

Os fungos estão associados com um vasto espectro de doenças, variando de lesões cutâneas e limitadas em indivíduos imunocompetentes a manifestações sistêmicas de difícil tratamento em pacientes imunocomprometidos. A incidência de doenças fúngicas tem crescido consideravelmente em decorrência do aumento de indivíduos imunosuprimidos, devido a prevalência de câncer, quimioterapia, transplante de órgãos, doenças autoimunes e HIV (Romani, 2011).

Mecanismos de imunidade inata são usados pelo hospedeiro para controlar o crescimento de fungos de maneira rápida. Os componentes principais da parede do fungo encontrados em espécies patogênicas para o homem são: β -glucanos, que são polímeros de glicose, especialmente β -(1,3)-glucanos, variando a β -(1,6)-glucanos; chitina, polímero de N-acetilglucosamina e mananas, que são cadeias de centenas de moléculas de manose que são adicionadas a proteínas do fungo via ligações N- ou O-. No decorrer da infecção por fungos, múltiplos PRRs do hospedeiro podem ser estimulados por estes componentes em diferentes combinações e proporções dependendo da espécie fúngica e do tipo celular envolvido. Dessa forma, a resposta imune dependerá não apenas da intensidade de estimulação dos receptores individualmente, mas do nível de cooperação entre eles e da sua localização celular (Romani, 2011).

Vários receptores que reconhecem β -glucanos foram descritos em mamíferos, incluindo Dectina-1, CR3 e membros da família de receptores do tipo scavenger, CD5, CD36 e SCARF1 (Goodridge et al. 2009; Means et al., 2009; Netea et al., 2006). A contribuição relativa de cada um, entretanto, ainda não foi determinada.

O receptor manose (CD206) e o DC-SIGN (CD209) parecem ser os principais receptores em células mielóides humanas que reconhecem mananas (Levitz e Specht, 2006). Outros receptores que reconhecem resíduos de manose incluem langerin e

Dectina-2. Dectina-2 e receptor de manose também têm afinidade para α -glucanos e chitina, respectivamente, apesar de existirem outros receptores que reconhecem chitina (Bittencourt et al., 2006; Lee et al., 2008). Portanto, existe redundância no que se refere ao reconhecimento de glucanos, mananas e chitinas. Componentes da superfície de fungos podem também estimular receptores do tipo *Toll*. Os fungos são potentes ativadores do sistema complemento, podendo ativar a via clássica, das lectinas e alternativa. Embora os fungos sejam resistentes a lise mediada pelo sistema complemento, a deposição de C3b e iC3b na superfície do fungo facilita sua fagocitose pelos CRs. Além disso, os fungos podem ser opsonizados por anticorpos naturais contra manana e iniciar a ativação da via clássica. Estes anticorpos podem opsonizar o patógeno diretamente e proporcionar o reconhecimento via receptores Fc. Ainda, trabalhos recentes enfatizam o papel da pentraxina 3 na imunidade a fungos (Ma et al., 2009).

1.4.1 Receptores lectina do tipo C

Receptores lectina do tipo C (CLRs, *C-type lectin receptors*) constituem uma superfamília de proteínas caracterizadas pela presença de um ou mais domínios do tipo lectina do tipo C (CTLD, *C-type lectin-like domains*). Esta superfamília está dividida em 17 subgrupos com base na filogenia e organização dos domínios proteicos. (Zelensky e Gready, 2005) CLRs foram originalmente descritos como proteínas ligadoras de carboidratos, dependentes de Ca^{2+} , no entanto, muitos CLRs não se ligam a carboidratos e outros fazem ligação independente de Ca^{2+} (Zelensky e Gready, 2005). Apesar da presença de um domínio altamente conservado, os CLRs são funcionalmente diversos e estão envolvidos em vários processos, além do reconhecimento de microrganismo, incluindo adesão celular, reparo tecidual, ativação de plaquetas, ativação do complemento. Em macrófagos o receptor Manose (grupo VI) e Dectina-1 (grupo V) são os principais receptores capazes de reconhecer β -glucanos e mananas, respectivamente.

1.4.1.1 Dectina-1

Dectina-1, também conhecida como CLEC7A, é uma proteína transmembrana tipo II classificada como uma lectina do tipo C não clássica pertencente ao grupo V. Em sua estrutura estão ausentes os resíduos envolvidos na ligação com cálcio, que geralmente são necessários para a ligação a carboidratos. Dectina-1 é expressa por diversos tipos celulares incluindo macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos entre outros (Olynych et al., 2006; Taylor et al., 2002; Willment et al., 2005). A expressão de Dectina-1 pode ser regulada por diferentes citocinas e fatores microbianos. Foi demonstrado que IL-4, IL-13 e GM-CSF regulam positivamente a expressão de Dectina-1 enquanto que IL-10, LPS e dexametasona inibem a expressão deste receptor (Willment et al., 2003).

Dectina-1 é considerado o principal PRR que reconhece β -glucanos, polímeros de carboidratos encontrados em parede celular de fungos, algumas plantas e bactérias, (Brown e Gordon, 2001, 2003) desencadeando atividade microbicida, e pela produção de espécies reativas de oxigênio (Goodridge e Underhill, 2007). Por sua capacidade de reconhecer β -glucanos, Dectina-1 pode reconhecer diversas espécies de fungos, incluindo *C. albicans* (Brown et al., 2003), *P. carinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Coccidioides posadasii* and *Aspergillus fumigatus* (Brown et al., 2003; Gersuk et al., 2006; Saijo et al., 2007; Steele et al., 2003; Taylor et al., 2007; Viriyakosol et al., 2005).

Dectina-1 possui um domínio N-terminal citoplasmático, seguido por um domínio transmembrana e um domínio C-terminal extracelular. O domínio citoplasmático contém um motivo de ativação baseado em tirosina (ITAM) e o extracelular contém um domínio do tipo lectina do tipo C.

A presença de um motivo semelhante a ITAM na cauda citoplasmática de Dectina-1 inicialmente indicou similaridade com Fc γ R. Durante a fagocitose mediada por Fc γ R, quinases Src fosforilam os resíduos de tirosina presentes no ITAM levando ao recrutamento e ativação de quinase Syk. A ativação de Syk, por sua vez, desencadeia uma cascata de sinalização de culmina em várias respostas celulares, incluindo a fagocitose (García-García e Rosales, 2002). PI3K é solicitada para extensão dos pseudópodes e fechamento do fagossomo durante a ingestão mediada por Fc γ R,

assim como as GTPases Rho e Cdc42 são recrutadas para reorganização do esqueleto de actina.

A fagocitose via Dectina-1, diferente da via FcγR, requer fosforilação de apenas da tirosina proximal da membrana do motivo do tipo ITAM (Herre et al., 2004). Ainda é controverso, mas foi reportado que Syk não é necessária para fagocitose mediada por Dectina-1 em macrófagos, indicando a existência de outras vias de sinalização (Herre et al., 2004). Por outro lado, Syk é necessária, pelo menos em parte, para a internalização via Dectina-1 em células dendríticas e células NIH-3T3, sugerindo que os eventos de sinalização podem diferir de acordo com o tipo celular (Herre et al., 2004; Rogers et al., 2005). Estudos de inibição mostraram que PI3 quinases não são essenciais para fagocitose mediada por Dectina-1, enquanto que as PKCs são necessárias. Foi demonstrado ainda que Cdc42 e Rac-1 estão envolvidos, enquanto que Rho não está (Herre et al., 2004; Ueyama et al., 2004).

Gross et al. (2006) identificaram CARD9 como um transdutor essencial para a sinalização de Dectina-1. CARD9 controla a ativação celular, produção de citocinas e resposta inata antifúngica de células mielóides. CARD9 acopla a BCL10 e regula a ativação de NFκB mediada por BCL10-MALT1 induzida por Zymosan, o principal componente da parede celular de fungos cujo receptor é Dectina-1.

Xu et al. (2009) demonstraram que em células dendríticas estimuladas com Zymosan ou β-glucanos, Dectina-1 migra para microdomínios de membrana chamados *lipid rafts*. *Lipid rafts* são microdomínios de membrana enriquecidos com colesterol, glicoesfingolípideos, proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol e exercem um papel importante na sinalização de receptores com domínios ITAM. Após ativação de Dectina-1, Syk e PLC2 também são recrutadas para os *lipid rafts*, sugerindo que esses microdomínios facilitam a sinalização de Dectina-1. Goodridge et al. (2011) mostraram que, apesar da habilidade de Dectina-1 se ligar a polímeros de β-glucanos particulados e solúveis, a sinalização é ativada apenas por β-glucanos particulados, por promoverem um agrupamento de proteínas de membrana, formando estrutura semelhante a sinapse nas quais as tirosinas fosfatases regulatórias CD45 e CD148 estão excluídas. Os autores propuseram que essa sinapse fagocítica proporciona um mecanismo pelo qual receptores do sistema imune inato podem

distinguir o contato direto com o patógeno da detecção do patógeno a distância, providenciando resposta celular microbicida apenas quando necessário.

Taylor et al. (2007) geraram animais deficientes em *dectina-1* e observaram falha no reconhecimento de Zymosan e aumento da susceptibilidade a infecção por *C. albicans* nestes animais. Leucócitos provenientes de animais *dectina-1*^{-/-} mostraram menor capacidade de reconhecimento de fungo mesmo na presença de opsoninas. Os autores concluíram que o reconhecimento de β -glucanos por Dectina-1 é fundamental para imunidade antifúngica. Entretanto, o trabalho de Saijo et al. (2007) não confirma este resultado. Os autores relatam que os animais *dectina-1*^{-/-} são mais susceptíveis a *Pneumocystis carinii* do que os animais do tipo selvagem. Células dendríticas e macrófagos de animais *dectina-1*^{-/-} mostraram reduzida produção de citocinas e de espécies reativas de oxigênio induzidas por β -glucanos (Saijo et al., 2007; Taylor et al., 2007).

Usando modelo de aspergilose pulmonar, Cunha et al. (2010) mostraram que a carga fúngica foi maior em animais *dectina1*^{-/-} do que animais do tipo selvagem em ambos os *backgrounds*, BABL/c e C57BL/6. A diferença no recrutamento de células inflamatórias e a patologia pulmonar foi mais pronunciada nos animais de *background* BALB/c.

Em estudo com 205 pacientes, Cunha et al. (2010) concluíram que um polimorfismo no gene de Dectina-1 (Y238X) está associado com aspergilose invasiva em transplante de células tronco hematopoiéticas devido a diminuição de mecanismos envolvidos na imunidade antifúngica.

1.4.1.2 Receptor Manose (MR)

O receptor manose (MR), também conhecido como CD206, é uma proteína transmembrana tipo II, classificada como uma lectina tipo C pertencente ao grupo VI. Estruturalmente consiste em uma região extracelular contendo um domínio N-terminal rico em cisteína, domínio fibronectina tipo II e oito CTLDs, uma região transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática. O receptor de manose tem apenas um resíduo de tirosina em sua cauda citoplasmática (Kruskal et al., 1992). A

maior parte de MR está localizado intracelularmente, mas especificamente na via endocítica, com pequena porção localizada na superfície celular. Sua expressão é aumentada por IL-4, IL-13 e IL-10 enquanto que IFN γ têm efeito inibitório (Doyle et al., 1994; Harris et al., 1992; Martinez-Pomares et al., 2003; Stein et al., 1992). O receptor ligado na membrana pode sofrer clivagem proteolítica por metaloproteases resultando em uma forma funcional solúvel deste receptor (Martínez-Pomares et al., 1998).

O MR se liga a manose, fucose ou resíduos de açúcar N-acetil glicosamina presentes na superfície de microorganismos.(Largent et al., 1984). O MR se liga a diversos microorganismos, dentre eles *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Leishmania donovani*, *Mycobacterium tuberculosis*, and capsular polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus pneumonia* (Chakraborty et al., 2001; Ezekowitz et al., 1991; Maródi et al., 1991; O’Riordan et al., 1995; Schlesinger, 1993; Zamze et al., 2002).

A primeira evidência de que MR era um receptor fagocítico foi baseada num estudo em que foi observada diminuição na fagocitose de Zymosan em macrofagos peritoneais tratados com manana (Sung et al., 1983). Mais tarde, com a demonstração de que manana pode ser reconhecida por outros tipos de receptores como DC-SIGN (*DC specific ICAM grabbing non-integrin*), colocou-se em dúvida que MR fosse um receptor fagocítico. Poucos estudos examinaram os mecanismos envolvidos na fagocitose mediada por MR. Kruskal et al. (1992) mostraram que a cauda citoplasmática é necessária para a ingestão por células transfectadas com MR, no entanto, mutação na única tirosina citoplasmática, reduziu, mas não aboliu a fagocitose. Alguns estudos em macrófagos sugerem que o mecanismo requer polimerização de F-actina, ativação de Cdc42 e Rho, promovendo ativação de PAK1 com envolvimento de ROCK, mas não Rac (Zhang et al., 2005). Foi demonstrado que Zymosan não opsonizado é fagocitado via MR de maneira dependente de PI3K (Lee et al., 2007). No entanto, a ausência de um motivo citoplasmático de sinalização dificulta o entendimento de como a ativação da via de sinalização ocorre.

1.4.2 Pentraxina 3

As pentraxinas são uma superfamília de proteínas altamente conservadas caracterizada pela organização estrutural composta de 5 subunidades idênticas ligadas não covalentemente em simetria radial pentamérica e pelo domínio conservado chamado de assinatura da família HxCxS/TWxS (onde x representa qualquer aminoácido). A superfamília das pentraxinas pode ser dividida em duas subfamílias: a das pentraxinas curtas ou clássicas, representada por CRP (*C reactive protein*) e SAP (*serum amyloid protein*) e a das pentraxinas longas, cujo protótipo é a PTX3.

A PTX3 foi a primeira pentraxina longa a ser identificada tendo sido inicialmente conhecida como TSG-14 (TNF stimulated gene-14). Sua expressão foi originalmente detectada em fibroblastos humanos tratados com TNF (Lee et al., 1990) e, posteriormente em células endoteliais humanas tratadas com IL1 β (Breviario et al., 1992). Diferentemente das pentraxinas clássicas (CRP e SAP) que são produzidas no fígado, a PTX3 é produzida por diversos tipos celulares em resposta a estímulos pró-inflamatórios primários como TNF, IL1 β , LDL oxidada e produtos microbianos (ex. LPS, lipoarabinomanana). Dentre os tipos celulares produtores de PTX3, além dos fibroblastos e células endoteliais, estão os fagócitos mononucleares, neutrófilos e células dendríticas (Alles et al., 1994; Imamura et al., 2007; Introna et al., 1996; Jaillon et al., 2007; Vouret-Craviari et al., 1997).

A produção de PTX3 pode ser induzida por uma grande variedade de produtos microbianos inclusive aqueles que ativam receptores TLR (Alles et al., 1994; Breviario et al., 1992; Diniz et al., 2004; Imamura et al., 2007; Polentarutti et al., 2000; Vouret-Craviari et al., 1997). O fato da PTX3 ser produzida por células presentes no foco inflamatório sugere que ela tenha um papel local na inflamação ou infecção, complementando a ação das pentraxinas clássicas (CRP e SAP) que se destacam pela ação sistêmica. Em estudo recente foi demonstrado que PTX3 está estocada em grânulos específicos de neutrófilos e secretada prontamente em resposta a estímulos microbianos ou fatores pró-inflamatórios e que neutrófilos que não produzem PTX3

apresentam deficiência no reconhecimento, fagocitose e atividade microbicida contra conídios do fungo *Aspergillus fumigatus* (Jaillon et al., 2007).

A PTX3 tem capacidade de se ligar a diversos patógenos como *Aspergillus fumigatus* (Garlanda et al., 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (Garlanda et al., 2002), *Salmonella typhimurium* (Garlanda et al., 2002), *Paracoccidioides brasilienses* (Diniz et al., 2004) além de um componente da parede de *Saccharomyces cereavisiae*, o Zymosan (Diniz et al., 2004) e o componente de membrana externa de *K. pneumoniae*, KOmpA (Jeannin et al., 2005).

Foi observado por Garlanda et al. (2002) que a PTX3 facilita o reconhecimento de conídios de *Aspergillus fumigatus* pelos macrófagos. Os autores demonstraram ainda que esta proteína tem a capacidade de se ligar diretamente a fagócitos mononucleares e células dendríticas tanto em humanos quanto em camundongos. Esses dados sugerem que a PTX3 possa ser um receptor solúvel capaz de reconhecer motivos comumente encontrados em patógenos e que têm papel não redundante na resistência a certos tipos de agentes microbianos. Animais nocautes para PTX3 são susceptíveis ao *Aspergillus fumigatus* Gaziano et al. (2004) mostraram recentemente que PTX3 tem potencial terapêutico, tanto sozinha quanto em combinação com anti-fúngicos, no tratamento de infecções por *A. fumigatus*. No caso da infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*, trabalho de Soares et al. (2006) evidenciou que a PTX3 modula a resposta a infecção de modo depende da severidade da infecção.

Diniz et al. (2004) mostraram que os macrófagos provenientes de animais transgênicos para PTX3 fagocitaram mais eficientemente partículas de Zymosan, além de apresentarem capacidade aumentada de fagocitar e matar *Paracoccidioides brasiliensis*. Nesse trabalho foi demonstrado também que a PTX3 pode agir como uma opsonina, pois a proteína PTX3 recombinante humana, adicionada nas culturas de macrófagos, se ligou a partículas de Zy e de *P. brasiliensis* e levou a um aumento do índice de fagocitose equiparável ao índice fagocítico dos macrófagos dos animais transgênicos para PTX3.

Mais recentemente foi descrito que PTX3 pode mediar a fagocitose via reconhecimento por receptores Fc presentes em fagócitos, mecanismo compartilhado com pentraxinas curtas (Lu et al., 2008; Moalli et al., 2010). Moalli et al. (2010)

reportaram que PTX3 age como opsonina, facilitando o reconhecimento e fagocitose de maneira dependente de complemento e de receptores Fc. Particularmente, a atividade de opsonina de PTX3 foi mediada por ativação do CR3 e do $Fc\gamma RII$.

PTX3 é um componente da imunidade inata conservado evolutivamente e conhecido por apresentar papel essencial na resistência a certos patógenos. Ela se liga a motivos microbianos, participa da ativação do sistema complemento e tem atividade de opsonina. Por compartilhar muitas dessas funções com as imunoglobulinas, a pentraxina 3 é reconhecida como um precursor dos anticorpos.

O cenário exposto mostra que os receptores mais importantes para o reconhecimento de fungos, são Dectina-1, receptor Manose e pentraxina 3 a qual apresenta um papel não redundante na imunidade a fungos. Mostra ainda que os LTs convergem e amplificam os sinais de reconhecimento de receptores fagocíticos, conferindo papel relevante na resistência a infecções. Entretanto, em relação aos receptores envolvidos no reconhecimento de fungos quase nada se conhece.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o papel dos LTs na fagocitose e atividade fungicida de macrófagos alveolares abordando a interação de receptores para LTs com receptores manose, Dectina-1 e PTX3 e os mecanismos moleculares envolvidos. Pretendemos com isso aumentar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na ação de leucotrienos na imunidade contra fungos e possivelmente contribuir para o desenvolvimento de novas formas de intervenção farmacológicas contra patógenos oportunistas.

Para estudar o papel dos LTs no reconhecimento através de MR e Dectina-1 utilizamos como alvo *C. albicans*. Esta parte do estudo foi desenvolvida com intuito de responder as questões detalhadas na seção 3.1 e a estratégia experimental está esquematizada na **Figura 1**. Para estudar o papel dos LTs no reconhecimento através do receptor para PTX3 utilizamos como alvo o Zymosan opsonizado com PTX3. Esta parte do estudo foi desenvolvida com intuito de responder as questões detalhadas na seção 3.2 e a estratégia experimental está esquematizada na **Figura 2**.

3.1 Ação de leucotrienos sobre receptores manose e Dectina-1

Nesta parte do estudo (Figura 1) nos propusemos a responder as seguintes questões:

- a) os LTs modulam a fagocitose *C. albicans*?
- b) em quais programas de sinalização intracelular os LTs atuam para modular a fagocitose?
- c) os LTs atuam no processo de polimerização de actina para modular a fagocitose?
- d) os LTs modulam a capacidade candidacida dos AMs?
- e) os LTs atuam por mecanismos dependentes da ativação de NADPH oxidase?
- f) em que PRRs (MR ou dectina-1) os LTs atuam para exercer seu efeito potencializador da fagocitose de *C. albicans* ?
- g) o efeito modulador de LTs na fagocitose de *C. albicans* envolve a co-localização dos PRRs com os receptores para LTs em *lipid rafts*?
- e) os LTs afetam a expressão de MR e Dectina-1?

Figura 1 - Estratégia experimental utilizada para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na ação de LTs na fagocitose e atividade microbicida de AMs via MR e dectina-1 (Parte I).

AMs de camundongos do tipo selvagem ou deficientes na produção de LTs (provenientes de animais *5-lo -/-*) foram tratados ou não com LTs e estimulados ou não com *C. albicans* 1:10 (AM:Ca) por 90 min e foram analisados: fagocitose (ensaio de fagocitose por fluorimetria); atividade microbicida (CFU); proporção F-actina/G-actina (microscopia confocal); vias de sinalização (*western blotting*); AMs de ratos Wistar foram tratados ou não com diferentes inibidores de vias de sinalização, estimulados ou não com LTs e infectados com *C. albicans* 1:30 (AM:Ca) por 90 min. Foram analisados: fagocitose (ensaio de fagocitose por microscopia ótica); atividade microbicida (CFU); vias de sinalização (*western blotting*) e produção de LTs (EIA – ensaio imunoenzimático).

Fonte: Morato-Marques (2012).

3.2 Papel dos LTs na fagocitose via receptor para PTX3

Nesta parte do estudo (**Figura 2**) nos propusemos a responder às seguintes questões:

- a) os LTs modulam a fagocitose de Zymosan opsonizado com PTX3 *in vitro*?
- b) os LTs modulam a fagocitose de Zymosan opsonizado com PTX3 *in vivo*?
- c) dependendo dos resultados acima, quais os mecanismos pelos quais os LTs atuam para modular a fagocitose via PTX3?

Figura 2 - Estratégia experimental referente ao estudo da importância dos LTs na fagocitose de Zymosan opsonizado por PTX3.

(A) Estratégia *in vitro* - AMs de animais do tipo selvagem ou deficientes na produção de LTs (provenientes de animais 5-lo-/- ou tratados com inibidor farmacológico) foram estimulados com Zy ou Zy-PTX3 e a fagocitose foi avaliada por microscopia. **(B)** Estratégia *in vivo* - animais do tipo selvagem e 5-lo-/- receberam instilação intratraqueal de salina, Zy e Zy-PTX3. Após 3 horas o BAL foi recuperado para avaliação da fagocitose e quantificação de LTB4 e CysLTs.

Fonte: Morato-Marques(2012).

4.1 Reagentes

RPMI e lipofectina foram obtidos da invitrogen. LTB₄, LTD₄, MK886 (inibidor de FLAP), AA861 (inibidor de 5-LO), MK571 (antagonista para o receptor CysLT₁), U75302 (antagonista do receptor BLT₁), DPI (inibidor da NADPHox-like flavoproteína) foram obtidos da Biomol (Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, EUA). Os inibidores de proteína quinase C α (PKC α) (RO-32-0432) e PKC δ (rottlerin) foram comprados da Calbiochemistry (Merck, Darmstadt, Germany). Os inibidores de PI3K (LY290042 e wortmannin), inibidor de 5-LO (zileuton) foram obtidos da Enzo. CP105696 foi gentilmente cedido pela Pfizer (Pfizer, New York, NY, USA). Alexa488-phalloidina and Alexa594-deoxiribonuclease I (DNase I) foram provenientes da Molecular Probes (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). A pentraxina 3 recombinante murina (rmPTX3) foi comprada da R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Zymosan, Laminarina (β -glucano solúvel derivado de *Laminaria digitata*), manana (preparado de *Saccharomyces cerevisiae*) e as ciclodextrinas (M β CD e M α CD) foram obtidos da Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Inibidores de Syk (Piceatannol e BAY 61-3606) foram comprados da Calbiochemistry. Compostos que requerem reconstituição foram dissolvidos em etanol ou DMSO. As diluições desejadas foram preparadas imediatamente antes do uso e quantidades equivalentes do veículo controle foram adicionadas aos controles.

4.2 Animais

Camundongos machos da linhagem sv129 deficiente de 5-LO (Chen et al., 1994) (129-Alox5^{tm1Fun}, 5-LO^{-/-}) e a respectiva linhagem do tipo selvagem (WT) de aproximadamente 8-10 semanas foram obtidos inicialmente da Jackson Laboratories (Sacramento, CA, USA) e mantidos no Biotério do Laboratório de Medicina Animal da Universidade de Michigan e no Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas I (ICB I) da Universidade de São Paulo (USP-SP). Ratos Wistar fêmeas, de 8 a 12 semanas foram obtidos do Biotério de Experimentação de animais do Departamento de Imunologia, ICB-IV, USP.

Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com controle de temperatura (23 ± 2 °C) e tiveram livre acesso à água e alimento. Os protocolos utilizando animais foram aprovados pelos comitês de Ética Animal da Universidade de São Paulo e da Universidade de Michigan.

4.3 Obtenção de macrófagos alveolares e cultivo

Os macrófagos alveolares residentes de ratos ou de camundongos foram obtidos por lavagem pulmonar ex-vivo como descrito anteriormente (Bailie et al., 1996; Peters-Golden et al., 1990). A suspensão de células foi centrifugada a 200 g por 10 minutos a 4 °C o *pellet* foi ressuspensionado em RPMI na concentração desejada. As células foram plaqueadas e aderidas por 1 hora a 37 °C em 5% de CO₂, em seguida foram lavadas com PBS pré-aquecido, resultando em >99% de células aderentes, identificadas como AMs pela coloração de Wright-Giemsa. Os AMs foram cultivados por 18 h em meio contendo 2% de soro fetal bovino para restabelecer os níveis de AA na membrana das células (Babior, 2002). No outro dia, as células foram lavadas duas vezes com meio pré-aquecido para remoção das células não aderentes.

4.4 *Candida albicans*

A cepa de *C. albicans* foi obtida a partir de lavado broncoalveolar de paciente do Sancet – Laboratório Médico, Mogi das Cruzes, SP, Brasil. Para identificação da espécie de *Candida*, foram realizados exame direto, cultura e microcultivo. O exame microscópico direto foi realizado com hidróxido de potássio a 10% onde foram observados blastoconídios ovais. O material foi cultivado em tubos contendo ágar-Sabouraud com antibióticos e mantidos a temperatura ambiente. As culturas foram examinadas após 48 horas. As colônias da *C. albicans* se apresentaram com coloração branca a creme, lisas e brilhantes.

O cultivo em lâmina com ágar-batata foi mantido a temperatura ambiente e após 48 horas observou-se microscopicamente a presença de clamidoconídios, esféricos, com parede celular espessa nas extremidades das pseudo-hifas. O estágio inicial da formação da hifa pelo blastoconídio é denominado tubo germinativo. O

clamidoconídio e o tubo germinativo são estruturas formadas apenas pela espécie *C. albicans*, auxiliando de maneira significativa na identificação deste fungo (Lacaz et al., 2002). As amostras de levedura obtidas no cultivo foram também identificadas por provas de assimilação e fermentação dos carboidratos, tais como: Zimograma (fermentação de açúcares) – *C. albicans* fermentou glicose, maltose, sacarose e galactose com produção de gás e Auxanograma (assimilação de açúcares) – *C. albicans* sobreviveu nos meios contendo glicose, maltose e sacarose.

4.5 Dosagem de mediadores inflamatórios

4.5.1 Sobrenadante de cultura de AM

Os níveis de LTB₄ e CysLTs no sobrenadante de AMs (5×10^5) estimulados com 10:1 de *C. albicans* e 5:1 de Zymosan em diferentes tempos foram determinados por EIA (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, EUA) seguindo as especificações do fabricante.

4.5.2 Sobrenadante do lavado broncoalveolar (BAL)

Camundongo foram submetidos a três lavagens broncoalveolares com 0.5 mL de PBS gelado cada e a suspensão de células foi centrifugada a 200 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e os níveis de LTB₄, CysLTs e PGE₂ foram determinados por EIA (Cayman Chemical Co) seguindo as especificações do fabricante.

4.6 Ensaios de Fagocitose

4.6.1 Ensaio de fagocitose por microscopia de luz

AMs (2×10^5 /poço) foram plaqueados e cultivados em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços (Becton BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) a 37 °C em 5% de CO₂ conforme descrito acima. As células foram então tratadas com inibidor de PKC δ (6 μ M rottlerin), PKC α (9 nM RO-32-0432), PI3K (10 μ M LY 290042 e 10 nM wortmannin) ou ERK1/2 (2 μ M, PD98059) e p38 (10 μ M, SB20190) por 20 min antes da adição de LTB₄ e LTD₄ (ambos a 10 ou 100 nM conforme indicado nas legendas das figuras). Em outro tipo de experimento, AMs foram pretratados por 20 min com inibidor de 5-LO (AA-861 ou Zileuton, ambos 10 μ M), antagonista de BLT1 (CP105,696, 10 μ M) ou antagonista de CysLT1 (MK571, 10 μ M)(Monget et al., 2002) seguido pela adição de 30:1 de *C. albicans*:AM por 90 min. As doses inibidoras utilizadas foram baseadas em estudos prévios (Dudley et al., 1995; Hu et al., 2002; Lee et al., 2005; Monget et al., 2002; Mugnai et al., 1997). Após 10 min de incubação com ou sem LTs, AMs foram desafiados com 30:1 de *C. albicans*:AM por 90 min a 37 °C. Após esse tempo, os poços foram lavados três vezes com PBS pré-aquecido para remover as leveduras que não foram ingeridas. Os resultados foram expressos como índice de fagocitose, que é o resultado da multiplicação da porcentagem de macrófagos contendo pelo menos uma levedura internalizada pela média do número de alvos fagocitados por macrófago positivo.

Em outro tipo de experimentos, AMs provenientes de camundongos 5-LO^{-/-} e WT foram plaqueados conforme descrito acima e pré-tratados ou não com zileuton (10 μ M) por 20 min, tratados com rmPTX3 (20 μ g/mL) seguido da adição de Zymosan na proporção de 10:1 (Zy: AM). As células foram incubadas a 37 °C 5% de CO₂ durante 120 min. A fagocitose foi avaliada conforme descrito acima.

4.6.2 Ensaio fluorimétrico

A capacidade fagocítica de AMs também foi determinada usando protocolo previamente reportado (Aronoff et al., 2004) para a determinação da internalização de *C. albicans* marcada com fluoresceína (FITC). Resumidamente, 4×10^5 AMs de rato ou camundongo foram plaqueadas em quintuplicata em placas de cultura de 96 poços com lados opacos e fundo translúcido (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, EUA). No dia seguinte, AMs foram pré-tratados com inibidores de Syk (Piceatannol 25 mM e BAY 61-3606 10 mM), PKC α (9 nM RO-32-0432) e PKC δ (6 μ M rottlerin) ou com M β CD (1 mM) e seu controle negativo M α CD (1 mM) por 20 min antes do tratamento ou não com LTB₄ (100 nM) ou LTD₄ (100 nM) por 5 min e estimulados com *C. albicans* morta pelo calor e marcada com FITC (Káposzta et al., 1999) na proporção de 10:1 por 90 min para permitir que a fagocitose ocorra. Em outro grupo de experimentos, AMs foram incubados com laminarina e/ou manana (100 μ g/mL) ou anticorpo anti-dectina-1 (clone 2 A11, 1 mg/mL) ou anti-receptor de manose (clone 15-2, 10 μ g/mL) por 30 min antes da adição de LTs ou *C. albicans* ou Zymosan. Azul de Tripán (250 μ g/mL; Molecular Probes) foi adicionado por 10 min para quelar a fluorescência de leveduras que permaneceram extracelular e a fluorescência foi determinada usando o fluorímetro Spectramax Gemini EM no comprimento de onda 485 para excitação e 535 para emissão (Molecular Devices, Downingtown, PA, EUA). O índice de fagocitose foi calculado conforme descrito anteriormente e foi expresso em unidade relativas de fluorescência (Aronoff et al., 2004).

4.6.3 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo

A fagocitose de Zymosan^{FITC} foi quantificada por citometria de fluxo conforme descrito previamente (Xu et al., 2009). Brevemente, 2×10^5 AMs provenientes de animais WT e 5-LO^{-/-} foram plaqueados em placas de 24 poços conforme descrito acima ou na seção 4.3 Zymosan^{FITC} foi adicionado às células na proporção de 10:1 partículas/célula por 1 hora para permitir que a fagocitose ocorra, e em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS para remover as partículas de Zymosan

não internalizadas. As células foram removidas usando PBS gelado e *cell scraper* e o azul de Tripan (250 µg/ml; Molecular Probes) foi adicionado por 10 min para quelar a fluorescência de partículas que permaneceram extracelular. A fagocitose foi examinada no FACSCalibur (Becton BD Biosciences) e analisada com o software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

4.6.4 Fagocitose *in vivo*

Zymosan (Zy) (Sigma Aldrich) foi diluído na concentração de 2.5 mg/mL em PBS e sonificados até as partículas estarem dispersas homogeneamente e congelados a -20°C. Antes do uso, o estoque de Zymosan foi diluído a 0.8 mg/mL. Zymosan foi opsonizado ou não com rmPTX3 (50 µg/mL) (Zy-PTX3) por incubação a 37 °C por 2 horas (Moalli et al., 2010). Camundongos 5-LO^{-/-} e WT foram anestesiados com 150 µL de injeção intraperitoneal (i.p.) de xilazina 10 a 15 mg/Kg misturados a 100 a 150 mg/Kg quetamina. Em seguida, foram removidos os pêlos da garganta dos animais e a área foi limpa com etanol 70%. Foi feito um corte na pele da garganta e a seringa foi inserida acima da bifurcação e 25 µL da suspensão de Zy, Zy-PTX3 ou salina seguido de 25 µL de ar foram injetados. A incisão foi fechada com sutura. Em seguida, os animais receberam 1 mL de salina estéril i.p. para rehidratação e colocados em ambiente aquecido durante a recuperação (Segal et al., 2010).

Após 3 horas, foi feitas três lavagens broncoalveolar com 0.5 mL de PBS gelado cada. O lavado alveolar (BAL) foi centrifugado a 200 g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi coletado para dosagem de mediadores LTB₄ e LTD₄ e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL. Parte da suspensão celular foi usada para análise do infiltrado celular por contagem na câmara de Neubauer e parte foi usada para fixação em lâminas de vidro por citospin (200 µL) a 200 g por 5 min para quantificação da fagocitose e contagem celular diferencial.

4.7 Microscopia confocal

AMs (2×10^5) foram plaqueados em lâminas de vidro contendo 4 poços de cultura celular (Nunc, chamber slides), incubados com *C. albicans* 10:1 por 15 min e em seguida lavados com PBS. As lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 30 min. As células foram bloqueadas com BSA 2% em PBS e incubadas com fosfo-Cofilina-1 (Ser-3, 1:200) em solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário (1:200) em solução de bloqueio por 1 hora. As células também foram marcadas com FITC-paloidina (1 mM) ou DNase I-Alexa 594 (1 mM) para corar F- ou G-actina, respectivamente, de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante (Molecular Probes). Células coradas com anticorpo de isotipo controle foram usadas para controle do background de cada fluoróforo. As lâminas foram montadas usando *Prolong Gold mounting media*, com DAPI (4,6 diamidino-2-fenilindole) (Molecular Probes). As imagens foram capturadas em microscópio confocal Zeiss LSM510, para excitação foram usados os lasers argon -488nm e He/Ne 543 e 633-nm. As imagens foram obtidas de AMs contendo *C. albicans* ligada ou 1-2 leveduras internalizadas e analisadas usando o software de análise de imagens LS 2.5 (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA). Todas as imagens foram obtidas utilizando os mesmos parâmetros para permitir comparação da marcação entre os grupos. Cada imagem de uma dada condição de tratamento é representativa de 20 células analisadas.

4.8 Western Blotting

AMs (5×10^5) foram plaqueados em placas de cultura de 6 poços e foram estimulados ou não com 100 nM de LTB₄ ou 100 nM de LTD₄ por 5 min seguido da adição de *C. albicans* 10:1 por 15 min e as células foram lisadas com tampão de lise (50mM Tris-HCl (pH 7.4), 25 μ M KCl, 5 mM MgCl₂, e 0.2% NP-40) suplementado com inibidores de proteases (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). A concentração de proteínas foi determinada utilizando o kit *Coomassie dye-binding assay* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, EUA). Para análise por *immunoblotting*, 30

µg de proteína com tampão de corrida (50 mM Tris HCl (pH 6.8), 2% SDS, 100 mM DTT, 10% glicerol, and 0.1% azul de bromofenol), foram fervidas e aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-*polyacrylamide gel electrophoresis* - PAGE 10%) e submetidas a eletroforese transferidas para a membrana de nitrocelulose. Após a transferência, foram sondadas com anticorpos primários contra fosfo-Cofilina-1 (Ser-3) (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), Cofilina-1 total, fosfo LIMK-1 (Thr-508), LIMK-1 total, fosfo-LIMK2 (Thr-505) (1:1000, Abcam) e β -actin (1:10,000, Sigma Aldrich). As membranas foram então marcadas com anticorpo secundário apropriado, conjugado a peroxidase e as bandas foram visualizadas utilizando ECL (*enhanced chemiluminescence* - ECL; Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, EUA). A intensidade de fosforilação foi quantificada como a densidade da banda da proteína fosforilada dividido pela densidade da banda da respectiva proteína total ou de β -actina. A densidade relativa das bandas foi determinada utilizando o software DigiDoc. Em todos os experimentos, os valores das densidades relativas das bandas corrigidos pelos valores do *background* das membranas.

4.9 Fracionamento de *lipid rafts*

A separação de microdomínios de *lipid rafts* foi feita com base em protocolo sugerido por MacDonald e Pike (2005) e Weerth et al. (2007), com modificações. Os *pellets* de membrana em 400 µL de tampão HEPES foram misturados a 550 µL de 60% OptiPrep para obter solução 45%. Nesta mistura foi adicionado 950 µL of 35% and 475 µL de 5% OptiPrep/tampãoHEPES sem NaCl. As amostras foram centrifugadas 18 h a Tubes 100 000g. Após a centrifugação, é observado uma banda distinta e aparente na interface entre o final da camada a 35% e a camada com 5% OptiPrep. Dez frações de igual volume foram coletadas a partir do topo dos tubos e foram submetidas a *immunoblotting* e a presença do marcador de *lipid rafts*, Flotilina-1, foi analisada. As frações enriquecidas de Flotilina-1 foram misturadas e denominadas de frações *lipid rafts* (LR) e as demais frações com menor expressão foram também agrupadas e denominadas de frações não *lipid rafts* (NR).

4.10 Citometria de fluxo – expressão de Dectina-1 e MR

AMs (2×10^5) provenientes de animais WT e 5-LO-/- foram plaqueados em placas de 96 poços em RPMI a 37 °C 5% de CO₂. Após 60 min de incubação, o meio e as células não aderentes foram removidos, e meio novo RPMI + 2% SFB foi adicionado. No dia seguinte, AMs foram lavados duas vezes com PBS pré-aquecido, PBS gelado foi adicionado e as placas foram colocados no gelo por 30 min. Após esse tempo, AMs foram removidos com *cell scraper* e centrifugados a 300 g por 10 min, lavados e ressuspensos em solução de bloqueio (PBS 10% BSA) por 15 min 4 °C. As células foram então lavadas com PBS e incubadas com tampão de marcação (PBS, SFB 1% e azida 0.1 %) contendo anticorpos monoclonais marcados 1:100, PE-anti-mouse-Dectina-1/CLEC7A (R&D), FITC-anti-mouse-MR/CD206 (R&D) ou com o isotipo controle a temperatura ambiente por 30 min. As células foram lavadas duas vezes com PBS e a expressão de Dectina-1 e MR foi obtida por citometria de fluxo (FACS Canto - Becton BD Biosciences) e analisada com o software FlowJo (Tree Star).

4.11 Ensaio de atividade fungicida

A capacidade AMs matar *C. albicans* foi avaliada usando ensaio de unidades formadoras de colônias conforme descrito (Galès et al., 2010; Balestrieri et al., 2009). Brevemente, AMs provenientes de rato (1×10^6), ou 5-LO-/- e WT (5×10^5) foram plaqueados em placas de cultura de 12 poços. No dia seguinte, *C. albicans* foi adicionada a AMs na proporção de 5:1 (*C. albicans*/ AM) por 1 hora para permitir que ocorra a fagocitose. Em seguida, as células foram tratadas com compostos de interesse por 20 min ou conforme indicado nas legendas das figuras e incubadas a 37 °C por 3 horas. Em seguida, os poços foram lavados extensivamente com PBS para remoção de leveduras que permaneceram extracelular e as células foram coletadas e centrifugadas a 4500 g por 5 min. O *pellet* foi ressuspensionado com 1 mL de água estéril para lisar as células. O conteúdo foi homogenizado e submetido a diluições seriadas para plaqueamento em ágar Sabouraud. Após 24 de incubação a 37 °C, foi feita a contagem de CFU e a porcentagem de *C. albicans* morta foi calculada comparando a

CFU do inóculo original, que também foi quantificado por diluição seriada a plaqueamento. Os resultados são expressos como porcentagem de leveduras ingeridas sobreviventes onde leveduras ingeridas sobreviventes = $100\% \times \text{CFU antes do inóculo} / \text{CFU 3h após incubação dos AMs}$.

4.12 Análise dos dados e estatística

Os dados foram representados como a média $\pm$ SEM e analisados com o programa de estatística *Prism 5.0 (GraphPad Software)*. As comparações entre dois grupos experimentais foram realizadas com o teste *t-Student*. Comparações entre ≥ 3 grupos experimentais foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) seguido da análise por Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$. Todos os experimentos foram realizados em dias diferentes, por pelo menos 3 vezes.

5.1 Parte I – Ação de leucotrienos sobre receptores Manose e Dectina-1

5.1.1 Papel dos LTs na fagocitose via receptores Manose e Dectina-1

Primeiramente verificamos que AMs estimulados com *C. albicans*, tanto viva quanto morta pelo calor, são capazes de induzir a produção de LTB₄ e CysLTs (Figura 3).

Figura 3 - *C. albicans* induz a produção de LTs por macrófagos alveolares.

Os níveis de LTB₄ e CysLT foram quantificados no sobrenadante de AMs estimulados com *C. albicans* 10:1 viva ou morta pelo calor após 5, 15 e 30 min como descrito em *Material e Métodos*. Os gráficos são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *, $p < 0.05$ vs não AMs estimulados; # $p < 0.05$ vs *C. albicans* viva.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Em seguida, perguntamos se os LTs produzidos durante estimulação com *C. albicans* são importantes para a atividade fagocítica de AMs. Através de abordagem genética e farmacológica mostramos que os LTs estão relacionados com a ótima fagocitose de *C. albicans*. Inibição de 5-LO e FLAP reduziram em 60% a fagocitose de *C. albicans* em comparação com as células não tratadas (Fig. 4 A). Para confirmar, utilizamos macrófagos provenientes de animais deficientes em 5-LO e WT em ensaio fluorimétrico. Observamos em macrófagos alveolares (Fig. 4 B) uma redução da

capacidade fagocítica em aproximadamente 60%. A importância de cada classe de LT foi avaliada pela utilização de antagonistas específicos para BLT1 ou CysLT1, o que resultou em redução da fagocitose em 45 e 60%, respectivamente (**Fig. 4 C**).

Figura 4 - Leucotrienos produzidos endogenamente são necessários para ótima fagocitose de *C. albicans*.

(A) AMs foram pré-tratados ou não com inibidor de 5-LO, AA861 (10 μ M) ou inibidor de FLAP, MK886 (10 μ M) por 10 min e estimulados com *C. albicans* por 90 min e a fagocitose foi determinada por microscopia ótica, como descrito em Material e Métodos. (B) AMs de animais 5-LO^{-/-} e WT foram estimulados com *C. albicans* marcada com FITC por 1 hora e a fagocitose foi medida por ensaio fluorimétrico. (C) AMs foram pré-tratados ou não com por 10 min com antagonista de BLT1, CP 105,696 (10 μ M) ou antagonista de CysLT1, MK571 (10 μ M) antes da adição de *C. albicans* por 90 min e a fagocitose foi determinada por microscopia ótica, como descrito em Material e Métodos. O índice de fagocitose foi calculado e expresso como porcentagem do controle. Os gráficos são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 3 – 5 experimentos independentes. *, $p < 0.05$ comparando tratados com não tratados ou 5-LO^{-/-} e WT.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Estabelecemos que os LTs produzidos endogenamente são necessários para ótima fagocitose de AMs, investigamos então se a adição de LTs a AMs seria capaz de aumentar a fagocitose basal de *C. albicans*. Como pode ser observado na **Figura 5**, a fagocitose do fungo foi aumentada por ambos os LTs, LTB4 (**Fig. 5 A**) e LTD4 (**Fig. 5 B**) de maneira dose-dependente. A concentração ótima para aumentar a fagocitose foi de 100 nM, para ambos os LTs, sendo a dose escolhida para os experimentos subsequentes. A adição de LTB4 e LTD4 reverteu a capacidade fagocítica deficiente de AMs 5-LO/- e a combinação de ambos os LTs teve maior efeito na fagocitose de *C. albicans* do que o efeito de cada LT individualmente (**Fig. 5 C**). O mesmo padrão foi observado utilizando *C. albicans* viva (**Fig. 5 D**). Em conjunto esses dados mostram que ambas as classes de LTs são necessárias para ótima fagocitose de *C. albicans* por AMs.

Figura 5 - A adição de LTB₄ e LTD₄ aumenta a fagocitose de *C. albicans*.

AMs de ratos foram pré-tratados ou não com LTB₄ (A) e LTD₄ (B) nas doses indicadas antes da adição de *C. albicans* por 90 min e a fagocitose foi medida por microscopia ótica. (C) AMs provenientes de 5-LO^{-/-} e WT foram pré-tratados ou não com LTB₄ e/ou LTD₄ 10 nM por 10 min antes da adição de *C. albicans* marcada com FITC por 90 min e a fagocitose foi avaliada por ensaio fluorimétrico. (D) AMs de WT e 5-LO^{-/-} foram pré-tratados ou não com LTB₄ e/ou LTD₄ 10 nM por 10 min antes da adição de *C. albicans* viva por 90 min e a fagocitose foi avaliada por microscopia ótica. Os gráficos são expressos como média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes. *, $p < 0.05$ comparando tratados com não tratados ou 5-LO^{-/-} e WT; #, $p < 0.05$ comparando AMs de animais 5-LO^{-/-} com AMs de animais 5-LO^{-/-} estimulados com LTs; &, $p < 0.05$ comparando com LTB₄ ou LTD₄ sozinhos.

Fonte: Morato-Marques (2012).

5.1.2 Identificação do tipo e local de interação entre receptores de LTs com receptores Manose e Dectina-1

Em seguida, determinamos em qual receptor, Manose ou Dectina-1, cada classe de LTs atua para exercer seu efeito amplificador. O bloqueio de MR com manana e com anticorpo bloqueador inibiu a fagocitose do fungo em ~ 40% e o bloqueio de Dectina-1 com laminarina ou anticorpo bloqueador inibiu a fagocitose em ~60%. A combinação de ambos, manana e laminarina, inibiu a ingestão do fungo em 80% (**Fig. 6 A**). O efeito de LTB₄ foi abolido quando os AMs foram tratados com manana e parcialmente inibido quando os AMs foram tratados com laminarina. O efeito de LTD₄ foi dependente do reconhecimento via Dectina-1. A inibição de MR e Dectina-1 resultou na inibição do efeito de ambos os LTs (**Fig. 6 B**).

Figura 6 - O LTB₄ atua nos receptores Manose e Dectina-1 e o LTD₄ apenas no Dectina-1 para potencializar a fagocitose de *C. albicans*.

(A) AMs de ratos foram pré-tratados com manana e laminarina (ambos a 100 µg/mL) ou anti-Dectina-1 (clone 2A11, Abd Serotec) e receptor de manose (clone 15-1, Biolegend) (ambos a 10 µg/mL) por 30 min antes da adição de *C. albicans* marcada com FITC 1:10 por 90 min e a fagocitose foi medida por fluorimetria. Os gráficos são expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. *, $p < 0.05$ comparado com controle não tratado. **(B)** AMs de ratos foram pré-tratados com manana e laminarina como em A seguido da adição de LTB₄ e LTD₄ por 10 min antes da adição de *C. albicans* marcada com FITC na proporção de 10:1. A fagocitose foi avaliada por fluorimetria após 90 min. Os gráficos são expressos como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. *, $p < 0.05$ comparado com controle não tratado; #, $p < 0.05$ vs LTB₄ ou LTD₄ sozinhos. Fonte: Morato-Marques (2012).

Mostramos previamente que BLT1, mas não CysLT1, atua via $G_{\alpha i}$ para aumentar a função microbicida de alvos opsonizados com IgG. No entanto, não se sabe qual subunidade da proteína G é usada pelos LTs para aumentar a fagocitose alvos não opsonizados. Para isso, $G_{\alpha i}$ foi inibida através do pré-tratamento de AMs com toxina pertussis (PTX). PTX é um clássico inibidor de proteínas $G_{\alpha i}$ que funciona através da ribosilação covalente de ADP em suas subunidades, promovendo desacoplamento destas subunidades dos seus receptores ligados a membrana e impedindo a ativação destes receptores (Landry et al., 2006). Observamos que a inibição de $G_{\alpha i}$ aboliu o efeito de LTB₄, mas não de LTD₄, na fagocitose de *C. albicans* (Fig. 7), mostrando o efeito de BLT1 em aumentar a fagocitose mediada por PRRs que reconhecem fungos é dependente de $G_{\alpha i}$.

Figura 7 - O aumento de fagocitose induzido por LTB₄, mas não de LTD₄ é dependente de $G_{\alpha i}$.

AMs de ratos foram pré-tratados ou não com toxina pertussis (PTX) por 18 h seguido 10 min de tratamento com LTB₄ ou LTD₄ ambos a 100 nM. *C. albicans* marcada com FITC foi adicionada e a fagocitose foi avaliada 90 min depois por ensaio fluorimétrico. Os índices de fagocitose foram calculados e expressos como porcentagem do controle. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. *, $p < 0.05$ comparado tratados com LTs com não tratados; #, $p < 0.05$ vs LTB₄ ou LTD₄ sozinhos.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Lipid rafts são microdomínios da membrana celular, ricos em colesterol, importantes para facilitar a sinalização de alguns receptores transmembranas. Eles e funcionam como plataformas que permitem a aproximação de múltiplos receptores e moléculas de sinalização capazes de integrar e amplificar sinais. Em 2009, Serezani et al. (Serezani et al., 2009) demonstraram que BLT1 migra de porções não *lipid rafts* (NR) para porções *lipid rafts* (LR) em resposta a estimulação com hemácias opsonizadas com IgG. Os autores observaram que a depleção de colesterol, que desfaz os LRs, impediu o aumento da fagocitose, atividade microbicida e sinalização induzida por LTB₄.

Com base no estudo descrito acima e nos resultados mostrados na **Figura 6**, que indicam uma interação entre BLT1/MR e Dectina-1 e CysLT1/Dectina1, fomos investigar se os *lipid rafts* poderiam estar envolvidos nessa interação diferencial. Inicialmente analisamos se a integridade dos *lipid rafts* é fundamental para o efeito de LTB₄ e LTD₄ na fagocitose de *C. albicans*. AMs foram tratados com droga que depleta colesterol (M β CD), em seguida foram estimulados ou não com LTs e o alvo foi adicionado. Nossos resultados mostram que ambos os LTs dependem da integridade de *lipid rafts* para aumentar a fagocitose de *C. albicans* (**Figura 8**).

Figura 8 - A integridade dos *lipid rafts* é necessária para o efeito potencializador de LTB4 e LTD4 na fagocitose de *C. albicans*.

AMs foram pré-tratados por 5 min com 1mM de veículo controle, ou MαCB, MβCD, seguido por 5 min da incubação com 100 nM de LTB4 (A) ou LTD4 (B). Em seguida, as células foram incubadas com *C. albicans* na proporção de 1:10 por 1 hora e a fagocitose foi avaliada conforme descrito em *Material e Métodos*. A fagocitose está expressa como porcentagem do controle no qual nenhuma droga foi adicionada e cada barra representa média ± erro padrão da média de 3 experimentos independentes, cada um em quintuplicata. * $p < 0.05$ comparando controle e tratado com leucotrienos; # $p < 0.05$ comparando tratado com LTs e tratados com LTs pré tratados com MβCD.

Fonte: Morato-Marques (2012).

A seguir investigamos se estes receptores translocam para microdomínios ricos em *lipid rafts* em resposta a *C. albicans*. Para isso, usamos microscopia confocal (Figura 9 A) e fracionamento da membrana plasmática, seguido de *immunoblotting* (Figura 9 B) em AMs estimulados ou não com *C. albicans*. Primeiramente verificamos se receptores de LTs, BLT1 e CysLT1, se translocam para *lipid rafts* em AMs não estimulados ou estimulados com *C. albicans* 1:10 por 15 min por microscopia confocal. Essa metodologia de marcação dos rafts está baseada no fato de que as moléculas de gangliosídeos GM1 presentes em *lipid rafts* se agrupam e esses agrupamentos são grandes o suficiente para serem detectados por microscopia pelos anticorpos anti-GM1 (Serezani et al., 2009). Assim, GM1 foi ligado a CTxB e o anticorpo que reconhece CTxB detecta os agrupamentos de GM1. A detecção por imunofluorescência indicou que em AMs em repouso há uma pequena colocalização

de BLT1 e CysLT1 com GM1, entretanto, em resposta a *C. albicans*, os receptores de LTs são redistribuídos para as porções ricas em GM1, evidenciado pelo aumento da colocalização (**Figura 9 A**). Sendo assim, identificamos por microscopia confocal que os receptores para leucotrienos translocam para os *lipid rafts* em resposta a *C. albicans*, funcionando como da parte da sinalização montada nessas plataformas que potencializa a fagocitose do fungo. Para detectar a localização de Dectina-1 e receptor manose foi feito o fracionamento da membrana celular usando um protocolo de fracionamento livre de detergente com o reagente Optiprep (Serezani et al., 2009). Dez frações obtidas foram submetidas a *immunoblotting* e a presença do marcador de *lipid rafts*, Flotilina-1, foi analisada. As frações enriquecidas de Flotilina-1 foram misturadas e denominadas de frações *lipid rafts* (LR) e as demais frações com menor expressão foram também agrupadas e denominadas de frações não *lipid rafts* (NR). Como pode ser observado na **Figura 9 B**, em macrófagos em repouso há localização de Dectina-1 e receptor manose em ambas as porções, LR e NR. No entanto, em resposta a *C. albicans*, Dectina-1 é translocado para LR enquanto que o receptor manose permanece em ambas as porções.

Figura 9 - *C. albicans* induz a translocação de BLT1, CysLT1 e Dectina-1 para *lipid rafts*.

(A) AMs de ratos foram estimulados ou não com *C. albicans* 1:10 por 15 min e *lipid rafts* foram marcados com CTxB-Alexa455/ anti-CTxB (**verde**). Em seguida, as células foram fixadas e marcadas com anti-BLT1, anti-CysLT1, anti-MR e anti-Dectina-1, incubadas com anticorpo secundário conjugado a Alexa 568 (**vermelho**) conforme indicado na própria figura e as amostras foram visualizadas por microscopia confocal. As imagens são de 1 experimento representativas de ao menos 3 experimentos independentes. **(B)** AMs de ratos foram estimulados ou não com *C. albicans* 1:10 por 15 min. O fracionamento da membrana celular foi feito segundo protocolo descrito em *Material e Métodos*. As frações foram coletadas e submetidas *western blot* para marcador de *lipid rafts* (LR) flotilina-1. As frações foram agrupadas de acordo com a presença de flotilina-1 em *lipid rafts* (LR), frações 1-4 e não *lipid rafts* (NR), frações 5-8. Em seguida as frações foram submetidas a *western blot* para BLT1, MR e Dectina-1. Fonte: Morato-Marques (2012).

Sabe-se que via de transdução de sinal de Dectina-1, diferente da via de MR, envolve a ativação de Syk (Netea et al. 2008; Rogers et al. 2005). Assim, como uma abordagem complementar que indicasse a interação de LTB₄ com Dectina-1/MR e LTD₄ com Dectina-1, investigamos se o efeito dos LTs dependem da ativação de SyK. Para isso, AMs foram tratados com dois inibidores diferentes de SyK, tratados com LTs e estimulados com *C. albicans*. Nossos resultados mostram que o aumento de fagocitose induzido por LTB₄ não é dependente de Syk enquanto que o efeito de LTD₄ é completamente abolido na presença dos inibidores de Syk (**Figura 10**). Indiretamente este resultado poderia indicar que na ausência de sinalização via Dectina-1, o reconhecimento via MR é suficiente para LTB₄, mas não LTD₄, induzir aumento de fagocitose de *C. albicans*.

Figura 10 - LTD₄, mas não LTB₄, depende de Syk para potencializar a fagocitose de *C. albicans*.

AMs de rato foram pré-tratados com inibidores de Syk (Piceatannol e BAY 61-3606) por 20 min e as células foram estimuladas com *C. albicans* 1:10 por 1 hora e a fagocitose foi avaliada conforme descrito em *Material e Métodos*. A fagocitose está expressa como porcentagem do controle no qual nenhuma droga foi adicionada e cada barra representa média SEM de 3 experimentos independentes, cada um em quintuplicata. *p < 0.05 comparando tratado com controle não tratado; #p < 0.05 comparando tratado com LTD₄ e tratado com inibidores de Syk.

Fonte: Morato-Marques (2012).

A interação de LTs com PRRs pode ocorrer também através da modulação da expressão de receptores. Para isso a expressão de Dectina-1 e MR foi avaliada em macrófagos peritoneais elicitados por tioglicolato, devido ao maior rendimento celular necessário para este tipo de ensaio, através de citometria de fluxo. Conforme mostrado na **Figura 11** células deficientes em LTs expressam menores níveis basais de Dectina-1 e receptor manose do que as células de animais WT.

Figura 11 - Leucotrienos são necessários para expressão basal de Dectina-1 e MR em macrófagos alveolares.

AMs de animais WT e 5-LO^{-/-} foram marcados com anticorpos para Dectina-1 e receptor de manose (MR) e as células foram submetidas a análise por citometria de fluxo conforme descrito em *Material e Métodos*. MFI – Média da intensidade de fluorescência. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ comparando WT e 5-LO^{-/-}.
Fonte: Morato-Marques (2012).

5.1.3 Identificação das vias de sinalização envolvidas no efeito potencializador dos LTs na fagocitose de *C. albicans*

Em seguida, investigamos as vias de sinalização envolvidas no aumento da fagocitose do fungo. Buscamos investigar as mesmas quinases envolvidas no aumento da fagocitose promovido por LTs via FcγR: PKCα e δ, PI3K e as MAPKs, p38 e ERK1/2. A inibição de PKCδ, mas não PKCα, aboliu o efeito de ambos os LTs na fagocitose de *C. albicans* (**Fig. 12 A**). Como abordagem confirmatória, anticorpos específicos para PKCα e δ foram introduzidos em AMs através de lipossomos. A especificidade e a eficácia desta técnica foi comprovada previamente. Anti-PKCδ, mas não anti-PKCα e IgG não específico, bloqueou a capacidade de ambos os LTs em aumentar a fagocitose (**Fig. 12 B**). Nenhum efeito de anti-PKCδ e a foi detectado na fagocitose basal de *C. albicans* por AMs (dado não mostrado).

Figura 12 - O aumento de fagocitose induzido por LTs é dependente de PKCδ, mas não de PKCα.

(A) AMs de ratos foram pré-tratados com inibidores seletivos de PKC α, (Ro-32-0432, 9 nM) ou PKC δ, (rottlerin, 6 μM) e incubados com LTB4 ou LTD4 (100 nM por 10 min) antes da adição de *C. albicans* na proporção de 30:1. (B) AMs foram tratados 24h com o reagente lipofectina (1% v/v) com ou sem o isotipo controle ou com anticorpos específicos contra PKC α e PKC δ (1/500) seguido da adição de *C. albicans*. Os índices de fagocitose foram calculados e expressos como porcentagem do controle. Os gráficos representam a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. *, p < 0.05 comparado tratados com LTs com não tratados; #, p < 0.05 vs LTB4 ou LTD4 sozinhos.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Para investigar se a ativação de PI3K é importante no efeito de LTs, AMs foram tratados com dois inibidores específicos de PI3K, wortmannin e LY290042. Observamos que ambos os inibidores bloqueiam o efeito dos LTs no aumento da fagocitose de *C. albicans* (**Fig. 13 A**). Outra classe de quinases importantes na fagocitose de *C. albicans* são as MAPKs, p38 e ERK1/2. Investigamos o papel destas quinases no aumento da fagocitose promovido por LTs, utilizando inibidores farmacológicos específicos. A inibição de ERK1/2 e p38 não teve efeito na potencialização da fagocitose induzida por ambos os LTs (**Fig. 13 B**). A inibição de ERK1/2 e p38 não teve efeito na fagocitose basal de *C. albicans* por AMs. Em conjunto, nossos resultados mostram que as duas classes de LTs utilizam vias de sinalização similares para potencializar a fagocitose.

Figura 13 - O aumento de fagocitose induzido por LTs é dependente de PI3K, mas não de MAPK.

AMs de ratos foram pré-tratados com inibidores seletivos de (A) PI3K (wortmannin, 10 nM e LY290042, 10 μ M) (B) ou ERK1/2 (PD98059, 2 μ M) ou p38 (SB20190, 10 μ M) e incubados com LTB4 ou LTD4 (100 nM por 10 min) antes da adição de *C. albicans* na proporção de 30:1. A fagocitose foi avaliada por microscopia ótica e os índices de fagocitose foram calculados e expressos como porcentagem do controle. Os gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. *, $p < 0.05$ comparado tratados com LTs com não tratados; #, $p < 0.05$ vs LTB4 ou LTD4 sozinhos.

Fonte: Morato-Marques (2012).

5.1.4 Ação dos LTs na polimerização de actina

Um dos processos mais relevantes para que ocorra a fagocitose é a polimerização de actina. Foi demonstrado que LTB₄ e LTD₄ são capazes de aumentar a polimerização de actina em leucócitos e células epiteliais (Bailie et al., 1996). No entanto, o papel dos LTs na polimerização de actina que ocorre durante o processo de fagocitose é desconhecido. Comparamos, por microscopia confocal, os níveis de G-actina e F-actina nos AMs de animais 5-LO^{-/-} e WT estimulados com *Candida albicans*. Observamos maiores níveis de G-actina e menores níveis de F-actina nas células deficientes na produção de LTs (**Fig. 14 A i e ii**). Interessantemente, a adição de LTB₄ e LTD₄ reverteu o observado (**Fig. 14 A iii e iv**). Esses resultados foram confirmados em ensaio fluorimétrico no qual os níveis de F-actina podem ser quantificados (**Fig 14 B**).

Figura 14 - LTB₄ e LTD₄ aumentam a polimerização de actina através da fosforilação de PI3K e PKC δ .

(A) AMs de animais 5-LO^{-/-} e WT foram pré-tratados ou não por 5 min com LTB₄ ou LTD₄ (ambos a 100 nM) antes da adição de *C. albicans* 10:1 por 15 min. As células foram incubadas com Alexa435-phalloidin (verde) para detectar F-actina e Alexa555-DNase (vermelho) para detectar G-actina seguido de microscopia confocal. As imagens são de um experimento, representativas de 3 experimentos independentes. (B) AMs de rato foram estimulados com *C. albicans* como descrito em A em as células foram incubadas com Alexa435-phalloidin (verde) e F-actina foi quantificada por ensaio fluorimétrico. RFU, unidades relativas de fluorescência. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão da média de 3-5 experimentos independentes, cada grupo em quintuplicata. *, $p < 0.05$ comparado com AMs não estimulados; #, $p < 0.05$ vs *C. albicans*; &, $p < 0.05$ vs AMs tratados com LTB₄ ou LTD₄. Fonte: Morato-Marques (2012).

Em seguida, mostramos que as mesmas quinases envolvidas na potencialização da fagocitose do fungo pelos LTs, PKC δ e PI3K, também estão envolvidas no aumento dos níveis de F-actina.

Determinamos então, se as mesmas quinases envolvidas no aumento da fagocitose do fungo pelos LTs contribuiriam para aumentar os níveis de F-actina. Observamos que a inibição de PI3K e PKC δ implicam na diminuição dos níveis de F-actina em AMs tratados com LTB₄ e LTD₄ durante a fagocitose de *C. albicans* (Fig. 15). Estes resultados indicam que a potencialização da formação de F-actina em AMs

é um evento chave no aumento da fagocitose de *C. albicans* por LTB₄ e LTD₄ e é dependente de PI3K e PKC δ .

Figura 15 - LTB₄ e LTD₄ aumentam a polimerização de actina através da fosforilação de PI3K e PKC δ .

AMs de rato foram pré-tratados com inibidor de PI3K (wortmannin, 10 μ M), ou de PKC δ (rottlerin, 6 μ M) por 20 min seguido pelo tratamento com LTB₄ e LTD₄ 100 nM por 5 min. Em seguida, *C. albicans* 10:1 foi adicionada e as células foram incubadas com Alexa435-paloidin (verde) e F-actina foi quantificada por ensaio fluorimétrico. RFU, unidades relativas de fluorescência. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão da média de 3-5 experimentos independentes, cada um em quintuplicata. *, $p < 0.05$ comparado com AMs não estimulados; #, $p < 0.05$ vs *C. albicans*; &, $p < 0.05$ vs AMs tratados com LTB₄ ou LTD₄.

Fonte: Morato-Marques (2012).

A regulação da montagem e desmontagem dos microfilamentos de actina é feita por diferentes proteínas, dentre elas Cofilina-1 pertencente a família “*actin-binding proteins*”. Cofilina-1 promove a despolimerização dos filamentos e já foi descrito que inibe a fagocitose via Fc γ R. No entanto a importância desta proteína na fagocitose de *C. albicans* não é conhecida. Assim, postulamos que os LTs poderiam aumentar os níveis de F-actina através da inibição da ativação de Cofilina-1. Verificamos, através de silenciamento de mRNA (dado não mostrado), que Cofilina-1 reduz a fagocitose

de *C. albicans* por AMs (dado não mostrado), identificando um efeito desta “*actin-binding protein*” como limitante na fagocitose de *C. albicans* por AMs. Cofilina-1 é inativada por fosforilação em Ser-3, que resulta na inibição da depolimerização, permitindo a polimerização de actina.

Para examinar o efeito de LTs na fosforilação de Cofilina-1 em AMs estimulados com *C. albicans*, utilizamos microscopia confocal em AMs WT e 5-LO^{-/-} (**Fig. 16 A**) e *immunoblotting* (**Fig. 16 B**). Em AMs WT o tratamento com *C. albicans* aumentou a fosforilação de Cofilina e consequentemente a polimerização de actina. Como mostrado nas **Fig. 16 A i e ii**, em AMs 5-LO^{-/-} não ocorre a fosforilação de Cofilina-1 e polimerização de actina em resposta a *C. albicans* como observado em AMs WT. Deficiência na fosforilação de cofilina foi confirmada por *immunoblotting* (**Fig. 16 B**).

Em seguida, investigamos o papel de LTs específicos na fosforilação de Cofilina-1. Tratamento de AMs 5-lo^{-/-} com LTB₄ e LTD₄ reverteu a fosforilação de Cofilina-1 e a polimerização de actina nos níveis observados em células WT infectadas com *C. albicans* (**Fig 16 A, iii e iv**). Ambas as classes de LTs aumentam a fosforilação de Cofilina-1 em AMs de rato (**Fig. 16 A e B**).

Figura 16 - Leucotrienos aumentam a polimerização de actina através da regulação da fosforilação de Cofilina-1.

(A) AMs de animais 5-LO^{-/-} e WT foram pré-tratados ou não por 5 min com LTB₄ ou LTD₄ (100 nM) antes da adição de *C. albicans* (10:1 por 10 min) e as células foram analisadas por microscopia confocal usando anticorpo fosfo-Cofilina-1 (vermelho) e paloidina-FITC (verde). As imagens são de um experimento, representativas de três experimentos independentes. (B) AMs de animais 5-LO^{-/-} e WT foram infectados ou não com *C. albicans* 10:1 por 10 min e os lisados foram submetidos a *immunoblotting* e as membranas foram incubadas com anticorpo para Cofilina total e Cofilina fosforilada. Os números embaixo das faixas indicam a densidade de fosforilação relativa de Cofilina-1 após estimulação com *C. albicans*, expresso como média ± erro padrão da média de três experimentos independentes.

Fonte: Morato-Marques (2012).

LIMK quinases (LIMKs) catalizam a fosforilação de Cofilina-1 em Ser-3 e sua superexpressão reverte a depolimerização de actina promovida pela Cofilina-1, levando a acumulação de filamentos de actina e agregados. Postulamos que LTs poderiam aumentar a ativação de LIMK1/2. Observamos que *C. albicans* por si, promove o aumento da fosforilação de LIM-1, mas não de LIMK-2 (Fig 17 A e B). Interessantemente, enquanto LTB4 aumenta a fosforilação de LIMK-1 e -2, LTD4 aumenta apenas a fosforilação de LIMK-2. Estes resultados demonstram que LTB4 e LTD4 diminuem a ativação de Cofilina-1, aumentam a polimerização de actina e otimizam a fagocitose de *C. albicans*. LTB4 parece ter efeito mais intenso, o que está correlacionado com a ativação de LIMK1 e -2 enquanto que o efeito de LTD4 está limitado a ativação de LIMK-2.

Figura 17 - LTs regulam a fosforilação de cofilina-1, LIMK-1 e LIMK-2.

(A) AMs de ratos foram pré-tratados ou não por 5 min com LTB4 ou LTD4 (ambos a 100 nM) seguido da adição de *C. albicans* 10:1 por 10 min e os lisados foram submetidos a *immunoblotting*. O resultado mostrado é de um experimento representativo de três experimentos independentes. (B) fosforilação relativa de Cofilina-1, LIMK-1 e LIMK-2 foi determinada por análise da densitometria de membranas de três experimentos independentes e está expressa como média $\pm$ erro padrão da média. A intensidade de fosforilação foi quantificada como a densidade da banda de proteína fosforilada dividido pela densidade da banda de β -actina ou da respectiva proteína total, e essa razão foi expressa como relativa àquela do controle não tratado, que foi considerado 100%. $p < 0.05$ vs AMs infectados com *C. albicans*. Fonte: Morato-Marques (2012).

5.1.5 Modulação por LTs da capacidade fungicida de AMs

Em trabalhos anteriores do grupo (Serezani et al., 2005, 2006) foi mostrado que os LTs aumentam a capacidade de macrófagos eliminarem *K.pneumoniae* opsonizada por IgG e *L.amazonensis*. Fomos então investigar se eles também aumentam a capacidade de matar *C. albicans*. Para isso, os LTs foram adicionados após completada a ingestão do fungo e observamos que a adição exógena de LTB4 e LTD4 aumentou a atividade fungicida basal de AMs 5-LO-/- (**Fig. 18 A**). Além disso, AMs 5-LO-/- exibiram menor capacidade fungicida (detectada pelo aumento de leveduras sobreviventes) em comparação com AMs WT, sugerindo que LTs produzidos endogenamente são necessários para a ótima atividade fungicida de AMs. O crescimento de *C. albicans* não foi diretamente afetado pela adição de LTs (*dado não mostrado*). Esses dados mostram que os LTs estão envolvidos em 2 processos distintos relevantes no controle da infecção fúngica, fagocitose e *killing*.

Espécies reativas de oxigênio (ROIs) geradas por ativação da NADPH oxidase são importantes para o *killing* de microrganismo fagocitados e os LTs são conhecidos por ativar esse mecanismo em macrófagos (Serezani et al., 2005). Avaliamos então o papel dos ROIs no aumento da atividade microbicida promovido pelos LTs. As células foram pré-tratadas com inibidor de NADPH oxidase (DPI) antes da adição de LTs. Vimos que o DPI sozinho, inibiu o *killing* (aumento de leveduras sobreviventes) em 50% comparado com células não tratadas, indicando um importante papel de NADPH oxidase na atividade microbicida basal a *C. albicans*. O LTB4 exógeno, não afetou a capacidade microbicida de AMs tratados com DPI, enquanto que LTD4 reverteu parcialmente o efeito do DPI (**Fig. 18 B**). Esses resultados sugerem que o LTB4 aumenta a atividade fungicida principalmente via ativação de NADPH oxidase enquanto que LTD4 o faz em parte via ativação de NADPH oxidase, em parte por mecanismos microbicidas alternativos. Examinamos também o impacto dos LTs na produção de ROI em AMs WT e 5-LO-/- infectados *C. albicans*, e observamos que os LTs induzem a produção de ROI durante a infecção por *C. albicans* (**Fig. 18 C**).

Figura 18 - LTs aumentam a atividade fungicida de AMs contra *C. albicans*.

(A) AMs de animais 5-LO^{-/-} e WT foram incubados com *C. albicans* viva em proporção de 1:5 por 60 min para permitir a ingestão do fungo. Após esse tempo, as células foram tratadas com LTB₄ ou LTD₄ (ambos 100 nM), e atividade antifúngica foi avaliada 3 horas por comparação com CFU de cada grupo experimental comparado com o controle. (B) AMs de ratos foram pré-tratados com inibidor de NADPH oxidase (DPI, 10 μM) por 20 min antes da adição de *C. albicans* viva (1:5). Trinta minutos depois DPI foi adicionado de volta com ou sem LTB₄ e LTD₄ (ambos a 100 nM). A atividade antifúngica foi determinada como descrito em *Material e Métodos*. (C) AMs foram tratados ou não com LTB₄ (100 nM) ou LTD₄ (100 nM) por 5 min, após esse tempo PBS contendo 10 mM H₂DCF foi adicionado, e as células foram mantidas em cultura por 1 hora. O meio foi substituído com HBSS pré-aquecido, e as células foram estimuladas com *C. albicans* (10:1). A produção de ROI foi medida 90 min através da medição da fluorescência. Os gráficos são a média ± erro padrão da média de 4-8 experimentos independentes. *, p < 0.05 comparado com controle WT; #, p < 0.05 comparando LTB₄/LTD₄ sozinhos ou AMs de WT estimulados com *C. albicans*.

Fonte: Morato-Marques (2012).

5.2 Parte II - LTs na fagocitose via PTX3

Já havia sido descrito que os leucotrienos potencializam a fagocitose de alvos opsonizados com IgG (Mancuso et al., 1998; Mancuso e Peters-Golden, 2000b; Serezani et al., 2009) e neste estudo, observamos que eles também potencializam a fagocitose mediada por PRRs de reconhecimento de fungos, receptor manose e Dectina-1. Sendo que pentraxina 3 (PTX3) exerce papel não redundante no reconhecimento de fungos (Garlanda et al., 2002), produzida localmente no pulmão dentro de poucas horas após o contato com o patógeno (He et al., 2007), resolvemos investigar se os leucotrienos também modulariam a fagocitose de alvos opsonizado com PTX3. Para isto ensaiamos alguns alvos (Zymosan e *K.pneumoniae*) para encontrar aquele com boa capacidade de ligar PTX3. Nossos resultados mostram que rmPTX3 se liga a Zymosan (**Figura 19 A**), confirmando dados já reportados na literatura (Diniz et al., 2004). Entretanto, em nossos ensaios não observamos ligação de rmPTX3 a *Klebsiella pneumoniae* (**Figura 19B**), sendo Zymosan o alvo escolhido para os experimentos subsequentes.

Figura 19 - Ensaio de ligação de rmPTX3 a Zymosan e *K. pneumoniae*.

Proteína PTX3 recombinante murina (rmPTX3) marcada com biotina (100µg/ml) foi incubada ou não com Zymosan (A) e *K. pneumoniae* (B) por 30min a temperatura ambiente. Após lavagem com excesso de PBS e incubação com estreptavidina conjugada com FITC, partículas de Zymosan e células de *K.pneumoniae* foram submetidas à análise por FACS Calibur. Em verde e vermelho estão representados os histogramas de fluorescência das amostras incubadas com rmPTX3-biotina. Em preto estão representados os histogramas das amostras controle realizadas na ausência de rmPTX3.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Avaliamos então se a fagocitose de Zymosan-PTX3 induziria a síntese de LTB₄ por AMs. Para isto camundongos WT e 5LO ^{-/-} foram colocados em contato com Zymosan ou Zymosan-PTX3 por 2 h conforme descrito em Material e Métodos, e após esse tempo o sobrenadante foi coletado e foi feita a quantificação de LTB₄ por EIA. Nossos resultados mostram que Zymosan-PTX3 induz um significativo aumento da produção de LTB₄ por AMs (**Figura 20**).

Figura 20 - A ativação do receptor para PTX3 em AMs induz a síntese de LTB₄.

rmPTX3 (20µg/mL) foi adicionado ou não a AMs juntamente com Zymosan na proporção de 10 partículas por célula durante 2h a 37 °C 5%CO₂. O sobrenadante foi coletado e foi feita a quantificação de LTB₄ por EIA. Resultado é a média de 4 experimentos independentes, barra de erro denota SEM. * p<0.05 da comparação entre AMs estimulados com rmPTX3 versus não estimulados.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Em seguida, buscamos avaliar se os LTs produzidos pelo estímulo com PTX3 modulariam a fagocitose de Zymosan opsonizado ou não com PTX3. Para isto foram utilizados AMs obtidos de animais 5-LO^{-/-} e WT cultivados na presença de Zymosan ou Zymosan-PTX3. Após 2h foi determinado o índice de fagocitose, calculado conforme descrito em *Material e Métodos*. Os resultados obtidos mostram que a fagocitose de Zymosan por AMs de animais 5-LO^{-/-}, é menor que a de AMs

de animais WT. Tanto os KO como os WT fagocitaram mais Zymozan-PTX3 que Zymosan não opsonizado. A fagocitose de Zymosan-PTX3 não foi significativamente diferente quando comparamos animais WT e deficientes em 5-LO (**Figura 21 A**), o que sugere que o aumento da fagocitose de Zymosan induzido por PTX3 não é dependente de LTs. Como contraprova para confirmar o resultado obtido com animais deficientes da enzima responsável pelas síntese de LTs, analisamos o índice fagocítico em animais WT tratados com um inibidor da síntese de LTs, o zileuton. Como observado na **Figura 21 B**, a inibição da síntese de LTs por zileuton não afetou a fagocitose Zymosan-PTX3 embora tenha reduzido a fagocitose de Zymosan não opsonizado. Em conjunto, nossos dados *in vitro* mostram que os LTs estão envolvidos na fagocitose de Zymosan, mas não na fagocitose de Zymosan-PTX3.

Sabe-se que a pentraxina está envolvida com ativação de fatores solúveis, como alguns componentes de sistema complemento (Deban et al., 2008; Inforzato et al., 2006; Ma et al., 2009; Moalli et al., 2010), que estão ausentes neste sistema de estudo *in vitro*. Portanto, resolvemos avaliar a fagocitose de Zymosan-PTX3 *in vivo* por instilação na traquéia de Zymosan ou Zymosan-PTX3. Após 3 horas, o lavado broncoalveolar foi coletado para dosagem da produção de leucotrienos no sobrenadante e para a quantificação da fagocitose nos AMs.

Diferente do observado no ensaio *in vitro*, não conseguimos detectar LTB₄ no lavado broncoalveolar, sendo os valores todos abaixo do nível de detecção do EIA que é 7.8 pg/ml (dados não mostrados). Entretanto, vimos que a instilação intratraqueal tanto de Zymosan como de Zymosan-PTX3 induziu a produção de CysLTs mas apenas nos animais WT (**Figura 22**).

Em seguida quantificamos a fagocitose de Zymosan nos AMs obtidos do lavado broncoalveolar. A fagocitose de Zymosan foi significativamente maior em animais WT do que em animais deficientes em 5-LO, e a opsonização com PTX3 induziu um aumento de fagocitose tanto nos AMs de animais WT quanto em AMs de animais deficientes em LTs (**Figura 23**). Portanto, padrão de fagocitose observado *in vitro* foi mantido *in vivo*. Estes resultados sugerem que o envolvimento dos leucotrienos na potencialização da fagocitose não é um evento universal, e que a sua ação é restrita a alguns receptores da imunidade inata.

Figura 21 - A fagocitose via PTX3 em AMs é independente de LTs.

Pentraxina 3 recombinante murina (rmPTX3, 20µg/mL) foi adicionado ou não a AMs juntamente com Zymosan na proporção de 10 partículas por célula durante 2h a 37 °C 5%CO₂. Em **A** comparação da fagocitose em WT e 5LO^{-/-}. Em **B**, comparação da fagocitose em WT tratados ou não com um inibidor da 5-LO, zileuton (10 µM por 30 min). O índice de fagocitose foi calculado conforme descrito em Material e Métodos. O resultado é a média de 3 experimentos independentes, barra de erro denota SEM. * p<0.05 da comparação entre AMs estimulados com Zymosan-PTX3 versus estimulados com Zymosan. # p<0.05 da comparação entre WT vs 5-LO^{-/-}.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Figura 22 - Zymosan e Zymosan-PTX3 induzem produção de CysLT nas vias aéreas de WT mas não de 5-LO^{-/-}.

Zymosan foi opsonizado ou não com rmPTX3 por 2h a 37 °C e 20 µl da suspensão contendo 25µg Zy foi instilada na traquéia. Após 3 horas, o lavado broncoalveolar foi coletado, centrifugado e feita a quantificação de LTB₄ e CysLT por EIA. O resultado é a média de no mínimo 5 animais por grupo, barra de erro denota SEM. * $p < 0.05$ da comparação entre animais WT que receberam Zy ou Zy-PTX3 com animais que receberam salina.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Figura 23 - Fagocitose *in vivo* de Zymosan opsonizado ou não com rmPTX3 por AMs provenientes de animais deficientes em 5-LO e respectivo tipo selvagem.

Animais 5-LO^{-/-} e WT receberam instilação intratraqueal de salina, Zy, ou Zy opsonizado com PTX3 (50 µg/mL) em volume final de 20 µl (n=7 animais/grupo). Após 3 h, o lavado broncoalveolar foi coletado e as células foram fixadas em lâminas de vidro por citospin e coradas com *Leishman*. O índice de fagocitose foi calculado conforme descrito em *Material e Métodos*. As barras representam a média da porcentagem em relação ao controle (média do grupo WT tratado com Zy), barra de erro denota SEM. * $p < 0.05$ da comparação em relação ao WT tratado com Zy, # $p < 0.05$ da comparação entre 5-LO^{-/-} tratado com Zy e 5-LO^{-/-} tratado com Zy-PTX3.

Fonte: Morato-Marques (2012).

Neste estudo exploramos o papel de leucotrienos na fagocitose e atividade microbicida de fungos, mediado por receptor manose, Dectina-1 e pentraxina 3, por macrófagos alveolares. Em resumo, este trabalho mostrou que: 1) AMs sintetizam LTs quando fagocitam *C. albicans*, Zymosan e Zy-PTX3; 2) LTs potencializam a fagocitose de *C. albicans* e Zymosan, mas não de Zy-PTX3; Este efeito dos LTs depende de: a) do reconhecimento de *C. albicans* via receptor manose (LTB₄) e via Dectina-1 (LTD₄); b) da integridade de microdomínios de membrana chamados de *lipid rafts*; a estimulação de receptores fagocíticos pela *C. albicans* induz a translocação de BLT1, CysLT1 e Dectina-1 para estes microdomínios.; c) de sua ação em mecanismos de polimerização de actina; LTs aumentam os níveis de F-actina por induzirem inativação da Cofilina-1, um regulador negativo da polimerização da actina -atividade de Cofilina-1 é modulada por LIM quinases, e os LTs promovem ativação destas quinases; d) da ativação de PKC δ e PI3K; 3) LTs aumentam a capacidade fungicida a *C. albicans* por mecanismos que envolvem a ativação de NADPH oxidase.

O aumento de infecção disseminada causada por patógenos fúngicos têm crescido consideravelmente nas últimas décadas (Enoch et al., 2006; Kauffman, 2006). Isto decorre principalmente de pacientes nos quais as intervenções cirúrgicas e terapêuticas causaram sobrecarga do sistema imunológico que permitiram ao fungo sobrepor os mecanismos de defesa do hospedeiro. *C. albicans* é uma espécie ubíqua que frequentemente coloniza a pele e as mucosas de indivíduos saudáveis, sem causar doença. No entanto, quando os mecanismos de defesa estão comprometidos (por exemplo em pacientes com câncer que recebem tratamento com quimioterapia, transplantados que recebem imunossupressores ou pacientes com AIDS), *C. albicans* pode se tornar patogênica e causar infecção sistêmica. No pulmão, os macrófagos alveolares participam da eliminação inicial de *C. albicans* e foi demonstrado que são importantes para prevenção da disseminação de *C. albicans* do pulmão de animais imunocomprometidos para outros órgãos (Sawyer, 1990; Sawyer e Harmsen, 1989).

Na resposta imune inata, diversos mediadores são produzidos pelas células do hospedeiro, dentre eles, os eicosanóides. Eicosanóides são uma família de mediadores lipídicos que agem localmente via receptores acoplados a proteínas G

para exercer seus efeitos biológicos. Leucotrienos são bem conhecidos por induzir respostas pró-inflamatórias como o recrutamento de células para o foco inflamatório, aumento da permeabilidade vascular e broncoconstrição (Funk, 2001). Vários estudos mostram que eicosanóides derivados de macrófagos são importantes para iniciar e modular a inflamação durante injúria pulmonar aguda e infecção (Balter et al., 1989; Castro et al., 1993, 1994; Czop e Austen, 1985; Fels e Cohn, 1986; Holtzman, 1991; Sibille e Reynolds, 1990). Já é bem descrito que Zymosan, um componente da parede de *Saccharomyces cerevisiae*, é um potente estimulante para produção de eicosanóides (Czop e Austen, 1985; Daum e Rohrbach, 1992). Também já foi reportado que *C. albicans* desencadeia a liberação de AA de macrófagos via cPLA2 e induz a produção de prostanóides e leucotrienos (Balestrieri et al., 2006; Parti et al., 2010; Suram et al., 2010).

O presente trabalho, além de analisar a importância de LTs na fagocitose de *C. albicans*, se propôs a aprofundar o estudo dos mecanismos pelos quais os leucotrienos exercem este efeito biológico. Primeiramente, comparamos a produção de LTs por AMs estimulados com *C. albicans* viva e morta pelo calor e observamos que os níveis de LTB4 são similares 5 min após estímulo. No entanto, 15 e 30 min após estímulo com o patógeno vivo a produção de LTB4 foi significativamente maior. Determinamos também, em experimentos não mostrados nesta tese, o papel de Dectina-1 e MR na produção de LTs 15 min após estímulo com *C. albicans*. Observamos que um antagonista de Dectina-1, laminarina, bloqueia a produção de LTB4 induzida pelo fungo vivo, enquanto que o antagonista de MR, manana, reduz apenas parcialmente a produção deste eicosanóide. Entretanto, a produção de LTB4 induzida pelo fungo é dependente do reconhecimento via Dectina-1 (dado não mostrado). Estes dados sugerem que LTB4 é produzido rapidamente após a infecção e de maneira dependente de Dectina-1. Nosso trabalho mostra que AMs produzem mais LTB4 que LTD4 quando estimulados tanto com o fungo vivo quanto com o fungo morto. Esse padrão de produção de LTs, produção de LTB4 maior que LTD4, é esperado para células de rato e se assemelha muito com observado em células humanas (Peters-Golden e Henderson, 2007) Uma questão importante neste estudo é se as quantidades de LTs exógenos (adicionados na cultura) se assemelham com a

produção de leucotrienos observada em condições fisiológicas. A dosagem de LTs no sobrenadante de cultura de AMs *in vitro* se assemelha a concentração de LTs, 100nM, que foi padronizada como a dose para ótima fagocitose de *C. albicans* usada nos ensaios subsequentes. Entretanto, a concentração de LTs no pulmão de animais infectados com *C. albicans in vivo* não foi analisada e pode não corresponder àquela usada nas culturas.

Diversos trabalhos mostram o envolvimento de LTs em infecções. A inibição da síntese de LTs ou de sua atividade tem sido associada com diminuição da defesa do hospedeiro a diversos patógenos incluindo bactérias (Bailie et al., 1996; Coffey et al., 2004), vírus (Coffey et al., 1998a, b; Gaudreault e Gosselin, 2008), parasitas (Duarte-Escalante et al., 2003; Serezani et al., 2006) e fungos (Coffey et al., 1998b; Secatto et al., 2012; Sorgi et al., 2009).

Apesar de alguns trabalhos investigarem LTs em resposta a fungos, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos neste efeito dos LTs em potencializar a ingestão de fungos. Em relação aos trabalhos que relacionam LTs e infecções fúngicas temos que: 1) Coffey et al. (1998) mostraram que neutrófilos (PMNs) de pacientes com HIV produzem significativamente menos LTs do que PMNs de indivíduos saudáveis. Os autores mostraram que PMNs provenientes de pacientes com HIV tem menor capacidade fungicida a *Criptococcus neoformans* e essa capacidade é restaurada quando as células são tratadas com GM-CSF, que, dentre outras funções, aumenta a produção de LTs. O interessante é que foi visto que quando estas células estimuladas com GM-CSF foram tratadas com inibidor de LTs a capacidade fungicida foi significativamente diminuída; 2) Medeiros et al. (2004) mostraram que são produzidos altos níveis de LTB₄ e LTC₄ no pulmão durante a infecção pulmonar por *Histoplasma capsulatum*. A inibição farmacológica destes mediadores foi associada com inibição de citocinas do tipo Th1 e favorecimento de citocinas do tipo Th2, que resulta em diminuição dos mecanismos microbicidas, permitindo a persistência do fungo, proliferação e disseminação. O mesmo grupo em 2009 mostrou que a formação de *lipid bodies* (LB) induzida por β -glucanos está inibida em leucócitos provenientes de animais 5-LO^{-/-} e foi sugerido neste trabalho que LB apresentam papel importante na imunidade a fungos. Recentemente, Secatto et al.

(2012), foi demonstrado que deficiência em produzir LTs aumenta a quantidade de CFU no pulmão de camundongos infectados com *H. capsulatum*, diminuição na produção de óxido nítrico e deficiente resposta imune primária. Foi visto que animais 5-LO-/- apresentaram intenso influxo de neutrófilos, mas a habilidade de gerar e recrutar linfócitos T efetores para o pulmão estava diminuída. A maior susceptibilidade destes animais foi correlacionada com a baixa capacidade dos macrófagos fagocitarem o fungo opsonizado com IgG. Estes resultados reforçam que os LTs são necessários para controle de infecções fúngicas por amplificarem tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa durante a histoplasmose; 3) Balestrieri et al. (2006) não notaram diminuição na fagocitose de Zymosan, em macrófagos peritoneais de camundongos deficientes em LTC4 sintase. Okamoto et al. (2010) mostraram que macrófagos derivados de medula óssea provenientes de animais deficientes em BLT1 mostraram menor capacidade fagocítica de Zymosan opsonizado com IgG, mas nenhuma diferença foi notada para Zymosan não opsonizado. Nossos resultados mostram claramente que a fagocitose de Zymosan depende de LTs em macrófagos alveolares e também em macrófagos peritoneais (não mostrado). A discrepância destes trabalhos com Zymosan e dos nossos achados, devem refletir diferenças quanto a procedência do alvo fagocítico (linhagem, proporção células-alvo, linhagem de camundongo, tempo de estímulo, dentre outros) que podem interferir nos PRRs envolvidos e na possibilidade dos animais deficientes em LTC4 sintase super produzirem LTB4.

A fagocitose de *C. albicans* é mediada pela ação conjunta de diferentes receptores que reconhecem componentes da parede celular do fungo (Netea et al., 2008a). A parede celular é essencial para manter a viabilidade das células do fungo e é pelos componentes da parede celular o fungo é reconhecido pelas células do sistema imune. A estrutura da parede celular de *C. albicans* é composta basicamente por: β -(1,3)-glucanos e chitina (poli- β -(1,4)-N-acetilglucosamina), que estão localizados preferencialmente na parte interna da parede celular; e na parte externa por proteínas da parede celular que estão associadas a este esqueleto interno como as mannoproteínas com domínios de repetição internos (Pir-CWP) (Levitz, 2010). Durante a reprodução do fungo por brotamento, a célula mãe fica com uma cicatriz

resultante da separação com a célula filha que expõe componentes internos da parede celular, como chitina e β -glucanos, que induzem rápida e potente resposta imune. Os principais receptores que reconhecem β -glucanos são Dectina-1, CR3, CD36 e SCARF1 e que reconhecem manose são receptor manose (CD206), DC-SIGN e Dectina-2 (Levitz, 2010; Netea et al., 2008a). Dentre os diversos receptores transmembranas que tem sido caracterizados como diretamente associados à ingestão de *C. albicans*, escolhemos estudar Dectina-1 e MR por serem mais relevantes para fagocitose em macrófagos (Netea et al., 2008b). Entretanto, não excluimos a possibilidade de outros receptores que reconhecem *C. albicans* estarem diretamente envolvidos com o efeito dos LTs.

Tendo em vista a relevância do reconhecimento do fungo, quais PRRs estão sujeitos a ação dos LTs é uma questão fundamental abordada neste estudo. Leucotrienos podem cooperar com PRRs de diferentes maneiras: 1) através do sinergismo entre as vias de sinalização ativadas por LTs e as vias de sinalização de PRRs; 2) através da ativação cruzada de receptores de leucotrienos e PRRs com translocação destes receptores para microdomínio de membrana específicos, *lipid rafts*; 3) através da associação física entre BLT1 e CysLT1 com PRRs de fungos; 4) através da modulação da expressão dos PRRs pelos LTs. Neste estudo, exploramos algumas dessas possibilidades.

Primeiramente investigamos sobre qual receptor cada classe de LTs atua para exercer seu efeito potencializador. Mostramos que a ação de LTB₄ atua via reconhecimento do fungo por receptor manose e em menor proporção por Dectina-1 e que o LTD₄ atua basicamente via o reconhecimento por Dectina-1 para amplificar a fagocitose. Esses achados foram feitos usando manana e laminarina que bloqueiam o reconhecimento de manana e β -glucanos, respectivamente, e não com anticorpos específicos para MR e Dectina-1. Sendo assim, devemos considerar que outros receptores que reconhecem manana, como DC-SIGN, podem estar envolvidos no efeito de LTB₄ assim como outros receptores que reconhecem β -glucanos, como CD36, podem estar envolvidos no efeito de LTD₄ e LTB₄.

Outra abordagem que utilizamos na tentativa de entender esta cooperação diferencial foi investigar se o efeito de LTB₄ e LTD₄ depende da ativação de Syk. Isso

porque a via de transdução de sinal de Dectina-1, diferente da via de MR, envolve a ativação de Syk (Netea et al., 2008a). Observamos que o efeito de LTD₄, mas não de LTB₄, é completamente abolido quando Syk está inibida. Este achado é diferente dos resultados reportados para alvos opsonizados com IgG nos quais foi observado que o efeito de LTB₄, mas não de LTD₄, é dependente de Syk. Uma extrapolação deste resultado, poderia indicar que na ausência de sinalização via Dectina-1, o reconhecimento via MR é suficiente para o LTB₄, mas não LTD₄, induzir aumento de fagocitose de *C. albicans*.

Estudos prévios já apontavam a necessidade de estudar a ação de leucotrienos nestes receptores. Serezani et al. (2006) mostraram em experimentos *in vitro* que LTB₄ é o principal LT envolvido no aumento da atividade leishmanicida de macrófagos, pois o antagonismo do seu receptor BLT₁ resulta em aumento do índice de infecção. As formas promastigotas de *Leishmania* podem aderir aos macrófagos via receptor manose-fucose, que reconhece resíduos de manana dos proteoglicanos presentes na forma promastigota (Blackwell, 1985; Wilson e Pearson, 1986). É interessante que neste mesmo estudo os autores já apontaram a possibilidade de LTs modularem a sinalização via receptor de manose (Serezani et al., 2006).

Uma das possíveis explicações para esta cooperação diferencial, LTB₄ via Dectina-1 e MR e LTD₄ via Dectina-1, poderia ser a localização dos receptores BLT₁ e CysLT₁ em microdomínios da membrana plasmática denominados *lipid rafts*. São domínios constituídos por colesterol e esfingolipídios que atuam como plataformas de sinalização que aproximam receptores, proteínas G, quinases, GTPases entre outras moléculas, amplificando e tornando mais rápida diferentes funções celulares (Pike, 2006). Pouco se sabe sobre os *lipid rafts* em macrófagos alveolares ou sobre a localização dos receptores para leucotrienos nesses *lipid rafts*. Strin et al. (2006) reportaram que em neutrófilos humanos, o BLT₁ é constitutivamente localizado nos *lipid rafts* e tal localização é importante para induzir a fosforilação de ERK1/2 e a liberação de cálcio. Serezani et al. (2009) demonstraram que tanto os receptores BLT₁ como CysLT₁ e FcγRI translocam para os *lipid rafts* durante a fagocitose de alvos opsonizados por IgG, e esse microdomínio é necessário para a interação física entre BLT₁ e FcγRI. Foi visto que a ativação de PKC α e δ em macrófagos alveolares

estimulados por LTB₄ ocorre nos *lipid rafts*, enquanto a ativação destas moléculas pelo LTD₄ ocorre fora dos *lipid rafts*. No caso da fagocitose de *C. albicans* essa localização diferencial de receptores poderia explicar, pelo menos em parte, a diferente cooperação entre os receptores.

Nossos resultados mostram que o efeito de ambos os LTs na fagocitose de *C. albicans* é dependente da integridade de *lipid rafts* e que tanto BLT1 quanto CysLT1 parecem migrar para estes microdomínios em AMs estimulados com *C. albicans*. Nosso dado da localização dos receptores foi obtido por microscopia confocal e para confirmar este achado seria necessário outra abordagem metodológica como o fracionamento subcelular da membrana plasmática com o isolamento destes microdomínios e detecção de BLT1 e CysLT1. Apesar de inúmeras tentativas de empregar esta metodologia, a detecção de receptores para LTs em *lipid rafts* não foi possível. Acreditamos que isso se deve ao alto nível de dificuldade desta técnica bem como a baixa qualidade dos anticorpos para detecção destes receptores, já que são receptores acoplados a proteínas G e apresentam inespecificidade considerável. Entretanto, empregando esta metodologia conseguimos mostrar que Dectina-1 migra para porções ricas em *lipid rafts* enquanto que MR permanece em ambas as porções em AMs estimulados com *C. albicans*. Este dado mostrando que Dectina-1 migra para *lipid rafts* está de acordo com os achados de Xu et al. (2009) mostrando que Dectina-1 transloca para *lipid rafts* em células dendríticas estimuladas com Zymosan ou β -glucanos. Neste trabalho os autores mostraram ainda que Syk e PLC2 são recrutadas para os *lipid rafts*, apoiando a hipótese de que estes microdomínios funcionam como plataformas de sinalização para este receptor. Em conjunto, nossos resultados melhor caracterizaram a localização dos receptores BLT1, CysLT1, Dectina-1 e MR nos microdomínios da membrana plasmática, entretanto, o motivo pelo qual ocorre uma cooperação diferencial entre estes receptores ainda não foi esclarecido. Para isso, estão em andamento experimentos de imunoprecipitação na tentativa de verificar se existe interação física entre estes receptores.

Ainda na tentativa de entender como ocorre a cooperação entre estes PRRs e receptores para LTs comparamos a expressão de Dectina-1 e MR em AMs de camundongos 5-LO^{-/-} e WT e constatamos que os LTs estão envolvidos na

modulação da expressão de PRRs uma vez que o nível basal de expressão de receptor manose e Dectina-1 em AMs deficientes em 5-LO é significativamente menor que AMs WT. É importante ressaltar que não é provável que o efeito dos leucotrienos em aumentar a fagocitose esteja relacionado com a síntese *de novo* de PRRs pelo menos nas condições experimentais usadas neste estudo, com 90 min de incubação com *C. albicans*. No entanto, deve ser considerado que há reciclagem de PRRs na membrana de macrófagos, assim, o efeito de leucotrienos na expressão de PRRs requer uma abordagem experimental para não apenas quantificar a expressão dos PRRs em um dado tempo, mas também analisar a razão de expressão de PRRs.

Recentemente, um estudo a parte para avaliar os mecanismos envolvidos na modulação da expressão de Dectina-1 por LTB₄ foi desenvolvido por Serezani et al. (2012) e mostrou que (1) produção basal de LTB₄ é necessária para resposta via Dectina-1 *in vivo* e *in vitro*; (2) a sinalização via LTB₄/BLT1/G α i é necessária para expressão basal de Dectina-1; (3) LTB₄ aumenta a expressão do fator de transcrição PU.1, que controla a expressão de Dectina-1 e (4) GM-CSF é um mediador chave para o aumento da expressão de PU.1 induzido por LTB₄ em macrófagos. Já foi reportado que LTB₄ modula positivamente a expressão de alguns receptores de superfície de leucócitos como CD11b, CD11c em monócitos humanos e receptor de IL-2 β em linfócitos humanos (Flamand et al., 2007), mas no nosso entendimento o trabalho desenvolvido por Serezani et al é o primeiro trabalho que demonstra a capacidade de LTB₄ regular a expressão de PRR. Uma vez que LTB₄ é um componente natural da resposta imune a fungos (Medeiros et al., 2004; Medeiros et al., 2008) e Dectina-1 é um dos principais receptores de reconhecimento de diferentes espécies de fungos tais como *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*, and *Pneumocystis carinii* (Brown, 2006; Dennehy e Brown, 2007; Gow et al., 2007), as implicações destes achados são sugestivas de um papel protetor de LTB₄ no controle de infecções fúngicas. De fato, foi observado em modelo murino de histoplasmose (Medeiros et al., 2004) um papel protetor de LTB₄ endógeno. PU.1 também participa do controle transcricional de vários genes envolvidos na ativação de macrófagos, como TLR4 (Hsu e Lin, 2008), CD14 (Berclaz et al., 2007), receptor manose (Lee et al., 2008; Wang e Lin, 2007), CLEC5a (Li et al., 2007) e Fc γ RIII (Berclaz et al., 2002). Assim, essa

achado que LTB₄ controla a expressão de PU.1 sugere que este mediador lipídico também pode promover a transcrição de outros PRRs e receptores funcionalmente relacionados.

Os receptores para LTs são receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). O mecanismo básico de como os GPCRs regulam a fisiologia celular baseia-se no fato de que a ligação do agonista induz mudanças conformacionais nas regiões transmembrana e intracelular do receptor, permitindo a sua interação com as subunidades de proteínas G heterotriméricas (G α , G β e G γ). As subunidades da proteína G ativada podem então se associar com diferentes moléculas efetoras para modular diversos aspectos da fisiologia celular (Ritter e Hall, 2009). Sabidamente, a subunidade G α i age via inibição da enzima adenilato ciclase e diminuição dos níveis de AMP cíclico, enquanto que a subunidade G α q age via aumento dos níveis intracitoplasmáticos de Ca²⁺ (Ritter e Hall, 2009). Peres et al. (2007) demonstraram que os efeitos dos leucotrienos nas funções efetoras dos AMs a alvos opsonizados com IgG, tais como fagocitose e atividade microbicida são dependentes de diferentes subunidades de proteínas G acopladas ao BLT1 e CysLT1, foi mostrado que o BLT1 está acoplado tanto à proteína Gi como Gq, enquanto que o CysLT1 está acoplado apenas à Gq. Devido às diferenças nos padrões de ligação da proteína G observado para alvos opsonizados com IgG, tivemos interesse em investigar as subunidades envolvidas no efeito dos leucotrienos B₄ e D₄ durante a fagocitose de *C. albicans* e algumas as vias de sinalização intracelular envolvidas. Mostramos que o efeito de BLT1, diferente do efeito de CysLT1, é dependente da subunidade G α i, mesmo padrão observado para alvos opsonizados com IgG (Peres et al., 2007).

Em relação as vias de sinalização utilizadas pelos leucotrienos para aumentar a fagocitose, investigamos, primeiramente, o papel específico da PKC α (clássica) e da PKC δ (nova). Dentre as isoformas de PKC estudadas, focamos na PKC α e δ , pois: (i) são as isoformas mais abundantes em macrófagos alveolares; (ii) ambas isoformas translocam para o copo fagocítico e fagossomo durante a ingestão por alvos opsonizados por IgG ou Zymosan; (iv) são ativadas por ambos leucotrienos (LTB₄ e cisteinil leucotrienos) em diferentes tipos celulares (Marc Peters-Golden et al., 2005). Investigamos também o papel da PI3K por ser uma quinase essencial para

desencadear a fagocitose por meio de diversos receptores (García-García e Rosales 2002; Greenberg e Grinstein, 2002; Lowry et al., 1998) e das MAPK, p38 e ERK1/2.

Observamos que o efeito de ambos os LTs é dependente de PKC δ e PI3K e não de MAPK (p38 e ERK) e PKC α . Esse padrão de vias de sinalização difere daquele observado para alvos opsonizado com IgG no qual foi observado que LTB4 e LTD4 usam um programa diferencial de ativação destas quinases para aumentar a fagocitose. Nesse caso, foi demonstrado que LTB4 age via PKC α e δ e ERK1/2, enquanto que LTD4 age via PKC δ e p38, sendo que ambos dependem de PI3K para exercer seus efeitos (Campos et al., 2009). Especulamos para ambos os casos, alvos opsonizados com IgG e *C. albicans*, que PI3K é ativada antes de PKC δ , baseados em trabalho prévio mostrando que a ativação de NADPH oxidase induzida por PI3K é dependente da ativação de PKC δ (Kilpatrick et al., 2010). Em resumo, apesar da sinalização via G α i ser usada exclusivamente por LTB4/BLT1, o aumento da fagocitose induzido por ambos os LTs é dependente de PKC δ e PI3K, como foi mostrado usando inibidores de quinases e anticorpos bloqueadores.

Para que ocorra fagocitose são necessários diversos processos de ativação celular, dentre eles a polimerização da actina que leva à extensão da membrana plasmática ao redor do alvo a ser capturado. A extensão do pseudópode sobre a partícula forma o fagossomo (Marshall et al., 2001) evento fundamental na fagocitose. Como observamos que LTs atuam via PI3K e PKC δ e que estas mesmas quinases estão relacionadas com fagocitose e polimerização de F-actina (Allen et al., 2005; Smallwood et al., 2005; Waki et al., 2006), exploramos os efeitos de LTs na montagem de F-actina e os possíveis programas de sinalização envolvidos. Ambas as classes de LTs aumentam a montagem de F-actina e diminuem os níveis de G-actina monomérica. Foi mostrado que LTD4 aumenta a polimerização de F-actina em células epiteliais intestinais de maneira dependente de PKC δ e PI3K (Massoumi e Sjölander, 1998). Também foi reportado que LTB4 aumenta a polimerização de actina em neutrófilos (Omann et al., 1987) e células T (Costa et al., 2010). Mostramos que ambas as quinases, PI3K e PKC δ , são necessárias para aumentar a polimerização de actina promovida por LTB4 e LTD4, durante o reconhecimento de *C. albicans*. Também observamos que LTB4 aumentou o total de F-actina ao redor do fungo, que

está co-localizado com Cofilina-1 fosforilada (desativada). A polimerização de actina é regulada por fosforilacao/desfosforilacao de fatores depolimerizadores de actina como Cofilina-1 (Bamburg, 1999). Cofilina-1 é a principal proteína ligadora de actina em leucócitos e tem papel importante em controlar (ou conter) a explosão respiratória e fagocitose nessas células (Adachi et al., 2002). A atividade de Cofilina-1 é diminuída por fosforilação em Ser-3 por LIMKs. As LIMKs podem ser fosforiladas por membros da família Rho GTPases via ativação de ROCK, *RhO kinase*, PAK-1-2 ou -4 mediada por ativação via Cdc42/Rac1 (Bernard, 2007; Lee e Helfman, 2004).

Neste estudo, através de duas abordagens distintas (*western blot* e microscopia confocal) observamos que AMs deficientes em 5-LO exibem maior ativação de Cofilina-1 e que LTB4 parece mais eficiente que LTD4 para aumentar a polimerização de F-actina mediada por inativação de Cofilina-1.

O LTB4 amplifica fosforilação de LIMK-1 em LIM-2 enquanto que LTD4 amplifica apenas a fosforilação de LIMK-2. A maior eficiência de LTB4 em relação a LTD4 na fosforilação de Cofilina-1 pode refletir sua ação via ambas isoformas de LIMK. A razão pela qual há uma ativação diferente das LIMK pelas diferentes classes de leucotrienos não foi elucidada. Entretanto, foi mostrado que a sinalização de LTB4 via BLT1 emprega uma diversidade maior de sinais do que a sinalização de LTD4 via CysLT1 para aumentar a fagocitose via FcγR por AMs (Serezani et al., 2009). Em relação a esta questão mostramos que BLT1 é mais eficiente que CysLT1 em aumentar a fagocitose mediada por receptor Fcγ (Lee et al., 2009). Além disso, BLT1 se associa com FcγR1, compondo plataformas de sinalização contendo proteínas G e diferentes quinases, essenciais para um ótimo processo fagocítico (Serezani et al., 2009). A divergência observada entre BLT1 e CysLT1 em ativar as LIMKs pode ser devido a ativação de diferentes efetores *upstream*. LIMK-1 é fosforilada por quiasas ativas por p21 (PAKs) 1-4, enquanto que LIMK-2 é ativada por PKC δ. Entretanto, não foi mostrado se a PKC δ é a quinase envolvida na fosforilação de LIMK-2.

A atividade microbicida para matar *C. albicans* envolve diversos mecanismos oxidativos e não oxidativos (Linden et al., 2010). Mostramos no presente estudo que os leucotrienos não apenas amplificam a fagocitose mas também aumentam a capacidade candidacida de maneira dependente da ativação de NADPH oxidase e

geração de ROI. Em estudo anterior confirmamos o papel da NADPH oxidase no efeito potencializador de LTB₄ na capacidade de AMs em matar *K.pneumoniae*, usando células de animais deficientes de gp91 phox (Serezani et al., 2005). Foi demonstrado que LTB₄ pode promover a ativação de NADPH oxidase por diferentes mecanismos, incluindo a fosforilação e translocação da subunidade p47 phox para a membrana (Serezani et al., 2005), e também através do aumento da expressão da subunidade p47 phox (Mancuso et al., 2010). Foi visto ainda que o efeito do LTB₄ na ativação da NADPH oxidase e subsequente atividade microbicida foi dependente da PKC δ mas não da PKC α (Serezani et al., 2005). Entretanto, as vias de sinalização responsáveis pelos efeitos do LTD₄ na atividade microbicida não foram identificadas. Nossos resultados mostraram que o aumento da capacidade candidacida induzida por LTD₄ é apenas parcialmente dependente da ativação de NADPH oxidase. Possivelmente, LTD₄ induz a secreção de outras moléculas candidacidas diferentes de RÓIS, como óxido nítrico (Vázquez-Torres e Balish 1997) e defensinas (Hoover et al., 2002). Recentemente, Flamand et al. (2007) administraram LTB₄ intravenoso em macacos e encontraram aumento dos níveis plasmáticos de defensinas e aumento da atividade microbicida no plasma *ex vivo*. As vias de sinalização envolvidas no aumento da atividade microbicida a *C. albicans* induzida por LTs também constitui tema interessante para estudo futuro.

Na segunda parte deste estudo, buscamos verificar se LTs modulam a fagocitose de alvos opsonizados com PTX3. A escolha da pentraxina está relacionada com o fato de que ela vem sendo bem reconhecida por apresentar papel não redundante na resposta a fungos (Biagi et al., 2008; Diniz et al., 2004; Garlanda et al., 2002; He et al., 2007) e diferente da IgG, que é produzida em fase mais tardia da resposta imune, a PTX3 é uma opsonina produzida precocemente, em fase inicial da resposta ao patógeno (Bottazzi et al., 2006). Nesta fase também ocorre a ativação da via alternativa do sistema complemento, que gera componentes que funcionam como opsoninas para aumento da fagocitose de diferentes alvos. Foi demonstrado que LTB₄ (via BLT1) e cisteinil leucotrienos (via CysLT1) aumentaram a fagocitose de alvos opsonizados por complemento C3 em neutrófilos (Mancuso et al., 2001),

entretanto LTs não foram capazes de aumentar a fagocitose de alvos opsonizados por C3 em macrófagos (Mancuso e Peters-Golden, 2000b).

Nossos resultados mostram que alvos opsonizados com PTX3 induzem aumento na produção de LTB₄ por AMs estimulados com Zymosan *in vitro*, entretanto LTs endógenos produzidos parecem não ser essenciais para o aumento da fagocitose induzido por PTX3 tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Em 2008 foi demonstrado que as pentraxinas são reconhecidas via receptores do tipo Fcγ (Lu et al., 2008). CRP é reconhecida via FcγRI, SAP é reconhecida via FcγRII e PTX3 é reconhecida por FcγRIII. Serezani et al. (2009) elucidaram que os LTs amplificam a fagocitose e atividade microbida via FcγRI, mas não são capazes de exercer seus efeitos via FcγRIII, podendo ser um dos motivos pelos quais LTs não são importantes na fagocitose via PTX3.

Moalli et al. (2010) reportaram que PTX3 age como opsonina, facilitando o reconhecimento e fagocitose de maneira dependente de complemento e de receptores Fcγ. Particularmente, a atividade de opsonina de PTX3 foi mediada por ativação de CR3 dependente de FcγRII, sendo caracterizada como envolvida na fagocitose de *A.fumigatus* opsonizado por C3. Considerando esta possibilidade, resolvemos testar em um sistema no qual o sistema complemento está presente, se os LTs poderiam exercer algum efeito modulador na fagocitose de Zymosan opsonizado com PTX3 e para isso fizemos o ensaio de fagocitose *in vivo*, no qual Zymosan opsonizado com PTX3 foi injetado na traqueia de camundongos deficientes ou não em LTs, mas o mesmo padrão foi observado.

Estudos prévios detalharam como os sinais provenientes de receptores para leucotrienos aumentam a ingestão e a capacidade microbida de AMs a alvos reconhecidos por FcR (Campos et al., 2009; Mancuso e Peters-Golden 2000a; Peres et al., 2007; Serezani et al., 2005, 2009). O presente estudo estendeu este conceito de LTs atuando na amplificação da fagocitose e atividade microbida para outros receptores - receptor manose e Dectina-1 - e ainda aponta que há seletividade na ação de leucotrienos, uma vez que os LTs não atuaram na amplificação da fagocitose via PTX3, pelo menos nas condições experimentais usadas neste estudo.

Até pouco tempo acreditava-se que a atividade de leucotrienos na resposta imune inata estava restrita a aumentar a permeabilidade vascular e a migração de células para o tecido inflamado. Atualmente, sabe-se que estas moléculas possuem funções importantes na defesa contra infecções, com capacidade de promover não só o aumento da fagocitose como também da atividade microbicida. A importância em desvendar as vias de sinalização envolvidas na fagocitose de *C. albicans* por macrófagos alveolares estimulados ou não com leucotrienos, poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o controle de infecções pulmonares causadas por fungos. Pretendemos com este estudo aumentar o conhecimento do papel de leucotrienos na imunidade contra fungos e possivelmente contribuir para o desenvolvimento de novas formas de intervenção farmacológicas contra patógenos oportunistas.

- AMs sintetizam LTs quando fagocitam *C. albicans*, Zymosan e Zy-PTX3;
- LTs potencializam a fagocitose de *C. albicans* e Zymosan, mas não de Zy-PTX3. Este efeito dos LTs depende de:
 - a) do reconhecimento de *C. albicans* via receptor manose (LTB₄) e via Dectina-1 (LTD₄);
 - b) da integridade de microdomínios de membrana chamados de *lipid rafts*; a estimulação de receptores fagocíticos pela *C. albicans* induz a translocação de BLT1, CysLT1 e Dectina-1 para estes microdomínios;
 - c) de sua ação em mecanismos de polimerização de actina; LTs aumentam os níveis de F-actina por induzirem inativação da Cofilina-1, um regulador negativo da polimerização da actina -atividade de Cofilina-1 é modulada por LIM quinases, e os LTs promovem ativação destas quinases;
 - d) da ativação de PKC δ e PI3K.
- LTs aumentam a capacidade fungicida a *C. albicans* por mecanismos que envolvem a ativação de NADPH oxidase.

Figura 24 - Modelo proposto para ação de leucotrienos na atividade antifúngica.

O reconhecimento de *C. albicans* resulta na geração de LTB4 (A) e LTD4 (B). LTB4 age via subunidade Gai3 acoplada a BLT1 e ambos os LTs dependem de PI3K e PKC δ para aumentar a fagocitose. LTB4 promove a fosforilação LIMK-1 e LIMK-2 enquanto que LTD4 fosforila apenas LIMK-2. Ambos os LTs atuam via fosforilação de Cofilina-1, resultando no aumento de F-actina e polimerização de actina. Não foi determinado se PKC δ e PI3K fosforilam LIMK1/2 (?). Ambos os LTs aumentam a atividade microbicida a *C. albicans* de modo dependente de NADPH oxidase e geração de ROI, sendo que LTD4 age também via outras moléculas microbicidas não identificadas.

Fonte: Morato-Marques (2012).

REFERÊNCIAS¹

- Adachi R, Takeuchi K, Suzuki K. Antisense oligonucleotide to cofilin enhances respiratory burst and phagocytosis in opsonized zymosan-stimulated mouse macrophage J774.1 cells. *J Biol Chem*. 2002;277(47):45566-71.
- Allen LA, Allgood JA, Han X, Wittine LM. Phosphoinositide3-kinase regulates actin polymerization during delayed phagocytosis of *Helicobacter pylori*. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1):220-30.
- Allen LA, Aderem A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med*. 1996;184(2):627-37.
- Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A. Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood*. 1994;84(10):3483-93.
- Aronoff DM, 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*. 2004;173(1):559-65.
- Aspenström P. Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11(1):95-102.
- Babior BM. The leukocyte NADPH oxidase. *Isr Med Assoc J*. 2002;4(11):1023-4.
- Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol*. 1996;157(12):5221-4.
- Balestrieri B, Maekawa A, Xing W, Gelb MH, Katz HR, Arm JP. Group V secretory phospholipase A2 modulates phagosome maturation and regulates the innate immune response against *Candida albicans*. *J Immunol*. 2009;182(8):4891-8.
- Balestrieri B, Hsu VW, Gilbert H, Leslie CC, Han WK, Bonventre JV, Arm JP. Group V secretory phospholipase A2 translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J Biol Chem*. 2006;281(10):6691-8.
- Balter MS, Toews GB, Peters-Golden M. Different patterns of arachidonate metabolism in autologous human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol*. 1989;142(2):602-8.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2011 Jul 15].

Bamburg JR. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:185-230.

Berclaz PY, Carey B, Fillipi MD, Wernke-Dollries K, Geraci N, Cush S, Richardson T, Kitzmiller J, O'connor M, Hermoyian C, Korfhagen T, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates a PU.1-dependent transcriptional program determining the pulmonary response to LPS. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;36(1):114-21.

Berclaz PY, Shibata Y, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF, via PU.1, regulates alveolar macrophage Fcgamma R-mediated phagocytosis and the IL-18/IFN-gamma-mediated molecular connection between innate and adaptive immunity in the lung. *Blood.* 2002;100(12):4193-200.

Berkow RL, Dodson RW. Alterations in tyrosine protein kinase activities upon activation of human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1991;49(6):599-604.

Bernard O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(6):1071-6.

Biagi E, Col M, Migliavacca M, Dell'Oro M, Silvestri D, Montanelli A, Peri G, Mantovani A, Biondi A, Rossi MR. PTX3 as a potential novel tool for the diagnosis and monitoring of pulmonary fungal infections in immuno-compromised pediatric patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30(12):881-5.

Bittencourt VC, Figueiredo RT, da Silva RB, Mourão-Sá DS, Fernandez PL, Sasaki GL, Mulloy B, Bozza MT, Barreto-Bergter E. An alpha-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activation. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22614-23.

Blackwell JM. Receptors and recognition mechanisms of Leishmania species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985;79(5):606-12.

Bottazzi B, Bastone A, Doni A, Garlanda C, Valentino S, Deban L, Maina V, Cotena A, Moalli F, Vago L, Salustri A, Romani L, Mantovani A. The long pentraxin PTX3 as a link among innate immunity, inflammation, and female fertility. *J Leukoc Biol.* 2006;79(5):909-12.

Breton A, Descoteaux A. Protein kinase C-alpha participates in FcgammaR-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(2):472-6.

Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 1992;267(31):22190-7.

Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(1):33-43.

Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003;19(3):311-5.

Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*. 2003;197(9):1119-24.

Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*. 2001;413(6851):36-7.

Camozzi M, Rusnati M, Bugatti A, Bottazzi B, Mantovani A, Bastone A, Inforzato A, Vincenti S, Bracci L, Mastroianni D, Presta M. Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. *J Biol Chem*. 2006;281(32):22605-13.

Campos MR, Serezani CH, Peters-Golden M, Jancar S. Differential kinase requirement for enhancement of Fc gammaR-mediated phagocytosis in alveolar macrophages by leukotriene B4 vs. D4. *Mol Immunol*. 2009;46(6):1204-11.

Canetti C, Hu B, Curtis JL, Peters-Golden M. Syk activation is a leukotriene B4-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. *Blood*. 2003;102(5):1877-83.

Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(1):50-83.

Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*. 1998;282(5394):1717-21.

Castro M, Ralston NV, Morgenthaler TI, Rohrbach MS, Limper AH. *Candida albicans* stimulates arachidonic acid liberation from alveolar macrophages through alpha-mannan and beta-glucan cell wall components. *Infect Immun*. 1994;62(8):3138-45.

Castro M, Morgenthaler TI, Hoffman OA, Standing JE, Rohrbach MS, Limper AH. *Pneumocystis carinii* induces the release of arachidonic acid and its metabolites from alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9(1):73-81.

Chakraborty P, Ghosh D, Basu MK. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *J Parasitol*. 2001;87(5):1023-7.

Chen XS, Sheller JR, Johnson EN, Funk CD. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature*. 1994;372(6502):179-82.

Chimini G, Chavrier P. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol.* 2000;2(10):E191-6.

Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2004;71(3):185-90.

Coffey MJ, Phare SM, George S, Peters-Golden M, Kazanjian PH. Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils. *J Clin Invest.* 1998;102(4):663-70.

Coméra C, André K, Laffitte J, Collet X, Galtier P, Maridonneau-Parini I. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils. *Microbes Infect.* 2007;9(1):47-54.

Costa MF, de Souza-Martins R, de Souza MC, Benjamim CF, Piva B, Diaz BL, Peters-Golden M, Henriques MG, Canetti C, Penido C. Leukotriene B4 mediates gammadelta T lymphocyte migration in response to diverse stimuli. *J Leukoc Biol.* 2010;87(2):323-32.

Cox D, Greenberg S. Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol.* 2001;13(6):339-45.

Cox D, Tseng CC, Bjekic G, Greenberg S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem.* 1999;274(3):1240-7.

Cox D, Chang P, Zhang Q, Reddy PG, Bokoch GM, Greenberg S. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med.* 1997;186(9):1487-94.

Coxon PY, Rane MJ, Powell DW, Klein JB, McLeish KR. Differential mitogen-activated protein kinase stimulation by Fc gamma receptor IIa and Fc gamma receptor IIIb determines the activation phenotype of human neutrophils. *J Immunol.* 2000;164(12):6530-7.

Crowley MT, Costello PS, Fitzer-Attas CJ, Turner M, Meng F, Lowell C, Tybulewicz VL, DeFranco AL. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcgamma receptors on macrophages. *J Exp Med.* 1997;186(7):1027-39.

Cunha C, Di Ianni M, Bozza S, Giovannini G, Zagarella S, Zelante T, D'Angelo C, Pierini A, Pitzurra L, Falzetti F, Carotti A, Perruccio K, Latgé JP, Rodrigues F, Velardi A, Aversa F, Romani L, Carvalho A. Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through

impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity. *Blood*. 2010;116(24):5394-402.

Czop JK, Austen KF. Generation of leukotrienes by human monocytes upon stimulation of their beta-glucan receptor during phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci*. 1985;82(9):2751-5.

Darby C, Geahlen RL, Schreiber AD. Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein. *J Immunol*. 1994;152(11):5429-37.

Daum T, Rohrbach MS. Zymosan induces selective release of arachidonic acid from rabbit alveolar macrophages via stimulation of a beta-glucan receptor. *FEBS Lett*. 1992;309(2):119-22.

Deban L, Jarva H, Lehtinen MJ, Bottazzi B, Bastone A, Doni A, Jokiranta TS, Mantovani A, Meri S. Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J Immunol*. 2008;181(12):8433-40.

Demitsu T, Katayama H, Saito-Taki T, Yaoita H, Nakano M. Phagocytosis and bactericidal action of mouse peritoneal macrophages treated with leukotriene B4. *Int J Immunopharmacol*. 1989;11(7):801-8.

Demitsu T, Katayama H, Saito-Taki T, Yaoita H, Nakano M. Enhanced bactericidal activity of macrophages by exogenous leukotriene B4. *Dermatologica*. 1989;179 Suppl 1:129-30.

Dennehy KM, Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82(2):253-8.

Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, Teixeira MM, Brown GD, Mantovani A, Gordon S, Reis LF, Dias AA. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol*. 2004;75(4):649-56.

Doyle AG, Herbein G, Montaner LJ, Minty AJ, Caput D, Ferrara P, Gordon S. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol*. 1994;24(6):1441-5.

Duarte-Escalante E, Zenteno E, Taylor ML. Interaction of *Histoplasma capsulatum* yeasts with galactosylated surface molecules of murine macrophages. *Arch Med Res*. 2003;34(3):176-83.

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(17):7686-9.

Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 7):809-18.

Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*. 1991;351(6322):155-8.

Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev*. 1997;7(1):67-74.

Fels AO, Cohn ZA. The alveolar macrophage. *J Appl Physiol*. 1986;60(2):353-69.

Flamand L, Tremblay MJ, Borgeat P. Leukotriene B4 triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents. *J Immunol*. 2007;178(12):8036-45.

Flamand N, Mancuso P, Serezani CH, Brock TG. Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(19-20):2657-70.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1871-5.

Galès A, Conduché A, Bernad J, Lefevre L, Olaghier D, Béraud M, Martin-Blondel G, Linas MD, Auwerx J, Coste A, Pipy B. PPARgamma controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000714.

García-García E, Rosales R, Rosales C. Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte-to-macrophage differentiation. *J Leukoc Biol*. 2002;72(1):107-14.

García-García E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 2002;72(6):1092-108.

Garlanda C, Maina V, Cotena A, Moalli F. The soluble pattern recognition receptor pentraxin-3 in innate immunity, inflammation and fertility. *J Reprod Immunol*. 2009;83(1-2):128-33.

Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L, Mantovani A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*. 2002;420(6912):182-6.

Gaudreault E, Gosselin J. Leukotriene B4 induces release of antimicrobial peptides in lungs of virally infected mice. *J Immunol*. 2008;180(9):6211-21.

Gaziano R, Bozza S, Bellocchio S, Perruccio K, Montagnoli C, Pitzurra L, Salvatori G, De Santis R, Carminati P, Mantovani A, Romani L. Anti-*Aspergillus fumigatus* efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(11):4414-21.

Gersuk GM, Underhill DM, Zhu L, Marr KA. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J Immunol*. 2006;176(6):3717-24.

Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem*. 1994;269(12):8878-84.

Goley ED, Welch MD. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(10):713-26.

Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, Bose N, Chan AS, Magee AS, Danielson ME, Weiss A, Vasilakos JP, Underhill DM. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature*. 2011;472(7344):471-5.

Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev*. 2009;230(1):38-50.

Gordon SB, Read RC. Macrophage defences against respiratory tract infections. *Br Med Bull*. 2002;61:45-61.

Gow NA, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, Walker L, Jansen T, Jacobs L, Tsoni V, Brown GD, Odds FC, Van der Meer JW, Brown AJ, Kullberg BJ. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis*. 2007;196(10):1565-71.

Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002;14(1):136-45.

Gross O, Gewies A, Finger K, Schäfer M, Sparwasser T, Peschel C, Förster I, Ruland J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*. 2006;442(7103):651-6.

Harris N, Super M, Rits M, Chang G, Ezekowitz RA. Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription. *Blood*. 1992;80(9):2363-73. PubMed PMID: 1421407.

He X, Han B, Liu M. Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(5):L1039-49.

Henderson RF, Leung HW, Harmsen AG, McClellan RO. Species differences in release of arachidonate metabolites in response to inhaled diluted diesel exhaust. *Toxicol Lett*. 1988;42(3):325-32.

Herre J, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol*. 2004;40(12):869-76.

Hirata K, Maghni K, Borgeat P, Sirois P. Guinea pig alveolar eosinophils and macrophages produce leukotriene B₄ but no peptido-leukotriene. *J Immunol*. 1990;144(5):1880-5.

Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism. Implications of biological chemistry for lung function and disease. *Am Rev Respir Dis*. 1991;143(1):188-203.

Hoover DM, Boulegue C, Yang D, Oppenheim JJ, Tucker K, Lu W, Lubkowski J. The structure of human macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37647-54.

Hoshino M, Izumi T, Shimizu T. Leukotriene D₄ activates mitogen-activated protein kinase through a protein kinase C α -Raf-1-dependent pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells. *J Biol Chem*. 1998;273(9):4878-82.

Hsu RB, Lin FY. Infected aneurysm of the thoracic aorta. *J Vasc Surg*. 2008;47(2):270-6.

Hu B, Punturieri A, Todt J, Sonstein J, Polak T, Curtis JL. Recognition and phagocytosis of apoptotic T cells by resident murine tissue macrophages require multiple signal transduction events. *J Leukoc Biol*. 2002;71(5):881-9.

Hui Y, Funk CD. Cysteinyl leukotriene receptors. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(11):1549-57.

Imamura M, Kawasaki T, Savchenko AS, Ohashi R, Jiang S, Miyamoto K, Ito Y, Iwanari H, Sagara M, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Uchiyama M, Naito M. Lipopolysaccharide induced expression of pentraxin 3 in human neutrophils and monocyte-derived macrophages. *Cell Immunol*. 2007;248(2):86-94.

Inforzato A, Peri G, Doni A, Garlanda C, Mantovani A, Bastone A, Carpentieri A, Amoresano A, Pucci P, Roos A, Daha MR, Vincenti S, Gallo G, Carminati P, De Santis R, Salvatori G. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. *Biochemistry*. 2006;45(38):11540-51.

Introna M, Alles VV, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzai B, Peri G, Breviario F, Salmona M, De Gregorio L, Dragani TA, Srinivasan N, Blundell TL, Hamilton TA, Mantovani A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*. 1996;87(5):1862-72.

Isakov N. ITIMs and ITAMs. The Yin and Yang of antigen and Fc receptor-linked signaling machinery. *Immunol Res*. 1997;16(1):85-100.

Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Frémaux I, Doni A, Moalli F, Garlanda C, Romani L, Gascan H, Bellocchio S, Bozza S, Cassatella MA, Jeannin P, Mantovani A. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med*. 2007;204(4):793-804.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.

Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, Presta M, Maina V, Magistrelli G, Haeuw JF, Hoeffel G, Thieblemont N, Corvaia N, Garlanda C, Delneste Y, Mantovani A. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity*. 2005;22(5):551-60.

Kanakaraj P, Duckworth B, Azzoni L, Kamoun M, Cantley LC, Perussia B. Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon Fc gamma RIIIA-ligand interaction. *J Exp Med*. 1994;179(2):551-8.

Kauffman CA. Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(1):35-40.

Kilpatrick LE, Sun S, Li H, Vary TC, Korchak HM. Regulation of TNF-induced oxygen radical production in human neutrophils: role of delta-PKC. *J Leukoc Biol*. 2010;87(1):153-64.

Krarp E, Vestbo J, Benfield TL, Lundgren JD. Interleukin-8 and leukotriene B4 in bronchoalveolar lavage fluid from HIV-infected patients with bacterial pneumonia. *Respir Med*. 1997;91(5):317-21.

Kruskal BA, Sastry K, Warner AB, Mathieu CE, Ezekowitz RA. Phagocytic chimeric receptors require both transmembrane and cytoplasmic domains from the mannose receptor. *J Exp Med*. 1992;176(6):1673-80.

Kuroki Y, Takahashi M, Nishitani C. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol.* 2007;9(8):1871-9.

Káposzta R, Maródi L, Hollinshead M, Gordon S, da Silva RP. Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*. *J Cell Sci.* 1999;112(Pt 19):3237-48.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de micologia médica. 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Landry Y, Niederhoffer N, Sick E, Gies JP. Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem.* 2006;13(1):51-63.

Larsen EC, DiGennaro JA, Saito N, Mehta S, Loegering DJ, Mazurkiewicz JE, Lennartz MR. Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol.* 2000;165(5):2809-17.

Lee C, Tomkowicz B, Freedman BD, Collman RG. HIV-1 gp120-induced TNF- α production by primary human macrophages is mediated by phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways. *J Leukoc Biol.* 2005;78(4):1016-23.

Lee CG, Da Silva CA, Lee JY, Hartl D, Elias JA. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20(6):684-9.

Lee CH, Lin WC, Chia JH, Su LH, Chien CC, Mao AH, Liu JW. Community-acquired osteomyelitis caused by *Chryseobacterium meningosepticum*: case report and literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;60(1):89-93.

Lee JS, Nauseef WM, Moeenrezakhanlou A, Sly LM, Noubir S, Leidal KG, Schlomann JM, Krystal G, Reiner NE. Monocyte p110 α phosphatidylinositol 3-kinase regulates phagocytosis, the phagocyte oxidase, and cytokine production. *J Leukoc Biol.* 2007;81(6):1548-61.

Lee S, Helfman DM. Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. *J Biol Chem.* 2004;279(3):1885-91.

Lee SP, Serezani CH, Medeiros AI, Ballinger MN, Peters-Golden M. Crosstalk between prostaglandin E2 and leukotriene B4 regulates phagocytosis in alveolar macrophages via combinatorial effects on cyclic AMP. *J Immunol.* 2009;182(1):530-7.

Lee TH, Lee GW, Ziff EB, Vilcek J. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1990;10(5):1982-8.

Levitz SM. Innate recognition of fungal cell walls. PLoS Pathog. 2010 Apr; 6(4):e1000758.

Levitz SM, Specht CA. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. FEMS Yeast Res. 2006;6(4):513-24.

Li XJ, Li PJ, Lin X. Research advances in sequestration mechanisms of hardly biodegradable organic contaminants in soil. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao. 2007;18(7):1624-30.

Linden JR, Maccani MA, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM. High efficiency opsonin-independent phagocytosis of *Candida parapsilosis* by human neutrophils. Med Mycol. 2010;48(2):355-64.

Lowry MB, Duchemin AM, Coggeshall KM, Robinson JM, Anderson CL. Chimeric receptors composed of phosphoinositide 3-kinase domains and Fcγ receptor ligand- binding domains mediate phagocytosis in COS fibroblasts. J Biol Chem. 1998;273(38):24513-20.

Lu J, Marnell LL, Marjon KD, Mold C, Du Clos TW, Sun PD. Structural recognition and functional activation of FcγR by innate pentraxins. Nature. 2008;456(7224):989-92.

Lynch OT, Giembycz MA, Daniels I, Barnes PJ, Lindsay MA. Pleiotropic role of lyn kinase in leukotriene B₄-induced eosinophil activation. Blood. 2000;95(11):3541-7.

Ma YJ, Doni A, Hummelshøj T, Honoré C, Bastone A, Mantovani A, Thielens NM, Garred P. Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition. J Biol Chem. 2009;284(41):28263-75.

Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. J Lipid Res. 2005 May;46(5):1061-7.

Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. Curr Biol. 1998;8(25):1347-56.

Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M. Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2001;69(4):2011-6.

Mancuso P, Peters-Golden M. Modulation of alveolar macrophage phagocytosis by leukotrienes is Fc receptor-mediated and protein kinase C-dependent. Am J Respir Cell Mol Biol. 2000;23(6):727-33.

Mancuso P, Standiford TJ, Marshall T, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 1998;66(11):5140-6.

Marshall JG, Booth JW, Stambolic V, Mak T, Balla T, Schreiber AD, Meyer T, Grinstein S. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol*. 2001;153(7):1369-80.

Martinez-Pomares L, Reid DM, Brown GD, Taylor PR, Stillion RJ, Linehan SA, Zamze S, Gordon S, Wong SY. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol*. 2003;73(5):604-13.

Martínez-Pomares L, Mahoney JA, Káposzta R, Linehan SA, Stahl PD, Gordon S. A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum. *J Biol Chem*. 1998;273(36):23376-80.

Maródi L, Korchak HM, Johnston RB Jr. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 1991;146(8):2783-9.

Massoumi R, Sjölander A. The inflammatory mediator leukotriene D4 triggers a rapid reorganisation of the actin cytoskeleton in human intestinal epithelial cells. *Eur J Cell Biol*. 1998;76(3):185-91.

May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcgammaR or CR3. *Nat Cell Biol*. 2000;2(4):246-8.

Means TK, Mylonakis E, Tampakakis E, Colvin RA, Seung E, Puckett L, Tai MF, Stewart CR, Pukkila-Worley R, Hickman SE, Moore KJ, Calderwood SB, Hacohen N, Luster AD, El Khoury J. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med*. 2009;206(3):637-53.

Medeiros AI, Sá-Nunes A, Turato WM, Secatto A, Frantz FG, Sorgi CA, Serezani CH, Deepe GS Jr, Faccioli LH. Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells. *J Immunol*. 2008;181(12):8544-51.

Medeiros AI, Sá-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun*. 2004;72(3):1637-44.

Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, Romani L, Mantovani A, Garlanda C. Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective

activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood*. 2010;116(24):5170-80.

Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;23(1-2):139-54.

Mugnai S, Ciuffi M, Maurizi M, Bindi D, Franchi-Micheli S, Zilletti L. Influence of interleukin 1alpha on superoxide anion, platelet activating factor release and phospholipase A2 activity of naive and sensitized guinea-pig alveolar macrophages. *Br J Pharmacol*. 1997;122(7):1345-52.

Nauta AJ, de Haij S, Bottazzi B, Mantovani A, Borrias MC, Aten J, Rastaldi MP, Daha MR, van Kooten C, Roos A. Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. *Kidney Int*. 2005;67(2):543-53.

Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(1):67-78.

Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, Hobson RP, Bertram G, Hughes HB, Jansen T, Jacobs L, Buurman ET, Gijzen K, Williams DL, Torensma R, McKinnon A, MacCallum DM, Odds FC, Van der Meer JW, Brown AJ, Kullberg BJ. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*. 2006;116(6):1642-50.

Nick JA, Avdi NJ, Gerwins P, Johnson GL, Worthen GS. Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1996;56(12):4867-75.

O'Riordan DM, Standing JE, Limper AH. Pneumocystis carinii glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infect Immun*. 1995;63(3):779-84.

Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, Yamasaki S, Yokomizo T. Leukotriene B4 augments and restores Fc gammaRs-dependent phagocytosis in macrophages. *J Biol Chem*. 2010;285(52):41113-21.

Okunishi K, Peters-Golden M. Leukotrienes and airway inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(11):1096-102.

Olynych TJ, Jakeman DL, Marshall JS. Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(4):837-43.

Omann GM, Traynor AE, Harris AL, Sklar LA. LTB₄ induced activation signals and responses in neutrophils are short-lived compared to formylpeptide. *J Immunol.* 1987;138(8):2626-32.

Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt2):131-2.

Parti RP, Loper R, Brown GD, Gordon S, Taylor PR, Bonventre JV, Murphy RC, Williams DL, Leslie CC. Cytosolic phospholipase a₂ activation by *Candida albicans* in alveolar macrophages: role of dectin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(4):415-23.

Paruchuri S, Broom O, Dib K, Sjölander A. The pro-inflammatory mediator leukotriene D₄ induces phosphatidylinositol 3-kinase and Rac-dependent migration of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280(14):13538-44.

Paruchuri S, Hallberg B, Juhas M, Larsson C, Sjölander A. Leukotriene D₄ activates MAPK through a Ras-independent but PKCε-dependent pathway in intestinal epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 9):1883-93.

Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4(3):252-7.

Peres CM, Aronoff DM, Serezani CH, Flamand N, Faccioli LH, Peters-Golden M. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *J Immunol.* 2007;179(8):5454-61.

Peters-Golden M, Henderson WR Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med.* 2007;357(18):1841-54.

Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol.* 2005;174(2):589-94.

Peters-Golden M, McNish RW, Hyzy R, Shelly C, Toews GB. Alterations in the pattern of arachidonate metabolism accompany rat macrophage differentiation in the lung. *J Immunol.* 1990;144(1):263-70.

Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res.* 2006;47(7):1597-8.

Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, Blasi E, Agnello D, Ghezzi P, Introna M, Bartfai T, Richards G, Mantovani A. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. *J Neuroimmunol.* 2000;106(1-2):87-94.

Raeder EM, Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Kjeldsen L, Shayman JA, Boxer LA. Sphingosine blocks human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis through inhibition of mitogen-activated protein kinase activation. *Blood.* 1999;93(2):686-93.

Raeder EM, Mansfield PJ, Hinkovska-Galcheva V, Shayman JA, Boxer LA. Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. *J Immunol.* 1999;163(12):6785-93.

Rane MJ, Carrithers SL, Arthur JM, Klein JB, McLeish KR. Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J Immunol.* 1997;159(10):5070-8.

Ritter SL, Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(12):819-30.

Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, Williams DL, Gordon S, Tybulewicz VL, Brown GD, Reis e Sousa C. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity.* 2005;22(4):507-17.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):275-88.

Rose DM, Winston BW, Chan ED, Riches DW, Gerwins P, Johnson GL, Henson PM. Fc gamma receptor cross-linking activates p42, p38, and JNK/SAPK mitogen-activated protein kinases in murine macrophages: role for p42MAPK in Fc gamma receptor-stimulated TNF-alpha synthesis. *J Immunol.* 1997;158(7):3433-8.

Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung SH, Kotaki H, Seki K, Sudo K, Akira S, Adachi Y, Ohno N, Kinjo T, Nakamura K, Kawakami K, Iwakura Y. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol.* 2007;8(1):39-46.

Sampson AP, Pizzichini E, Bisgaard H. Effects of cysteinyl leukotrienes and leukotriene receptor antagonists on markers of inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111(1 Suppl):S49-59.

Sawyer RT. Experimental pulmonary candidiasis. *Mycopathologia.* 1990;109(2):99-109.

Sawyer RT, Harmsen AG. The relative contribution of resident pulmonary alveolar macrophage and inflammatory polymorphonuclear neutrophils in host resistance to pulmonary infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 1989;108(2):95-105.

Scheffzek K, Ahmadian MR. GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(24):3014-38.

Scherle PA, Jones EA, Favata MF, Daulerio AJ, Covington MB, Nurnberg SA, Magolda RL, Trzaskos JM. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and

prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *J Immunol.* 1998;161(10):5681-6.

Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* 1993;150(7):2920-30.

Secatto A, Rodrigues LC, Serezani CH, Ramos SG, Dias-Baruffi M, Faccioli LH, Medeiros AI. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. *PLoS One.* 2012;7(3):e31701.

Sedlik C, Orbach D, Veron P, Schweighoffer E, Colucci F, Gamberale R, Ioan-Facsinay A, Verbeek S, Ricciardi-Castagnoli P, Bonnerot C, Tybulewicz VL, Di Santo J, Amigorena S. A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2003;170(2):846-52.

Segal BH, Han W, Bushey JJ, Joo M, Bhatti Z, Feminella J, Dennis CG, Vethanayagam RR, Yull FE, Capitano M, Wallace PK, Minderman H, Christman JW, Sporn MB, Chan J, Vinh DC, Holland SM, Romani LR, Gaffen SL, Freeman ML, Blackwell TS. NADPH oxidase limits innate immune responses in the lungs in mice. *PLoS One.* 2010;5(3):e9631.

Seeger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9(9):726-35.

Schlesinger LS. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* 1993;150(7):2920-30.

Secatto A, Rodrigues LC, Serezani CH, Ramos SG, Dias-Baruffi M, Faccioli LH, Medeiros AI. 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. *PLoS One.* 2012;7(3):e31701.

Sedlik C, Orbach D, Veron P, Schweighoffer E, Colucci F, Gamberale R, Ioan-Facsinay A, Verbeek S, Ricciardi-Castagnoli P, Bonnerot C, Tybulewicz VL, Di Santo J, Amigorena S. A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2003;170(2):846-52.

Segal BH, Han W, Bushey JJ, Joo M, Bhatti Z, Feminella J, Dennis CG, Vethanayagam RR, Yull FE, Capitano M, Wallace PK, Minderman H, Christman JW, Sporn MB, Chan J, Vinh DC, Holland SM, Romani LR, Gaffen SL, Freeman ML, Blackwell TS. NADPH oxidase limits innate immune responses in the lungs in mice. *PLoS One.* 2010;5(3):e9631.

Seeger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9(9):726-35.

Serezani CH, Aronoff DM, Sitrin RG, Peters-Golden M. FcγRI ligation leads to a complex with BLT1 in lipid rafts that enhances rat lung macrophage antimicrobial functions. *Blood*. 2009;114(15):3316-24.

Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol*. 2006;177(5):3201-8.

Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood*. 2005;106(3):1067-75.

Serezani CH, Kane S, Collins L, Morato-Marques M, Osterholzer JJ, Peters-Golden M. Macrophage Dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis. *J Immunol*. 2012 Jun 13. In press.

Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990;141(2):471-501.

Singh SS, Chauhan A, Brockerhoff H, Chauhan VP. Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;195(1):104-12.

Sitrin RG, Emery SL, Sassanella TM, Blackwood RA, Petty HR. Selective localization of recognition complexes for leukotriene B4 and formyl-Met-Leu-Phe within lipid raft microdomains of human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*. 2006;177(11):8177-84.

Smacchia C, Rebutta P, Drago F, Morelati F, Pappalè M, Sirchia G. A micro colorimetric assay using cryopreserved monocytes to evaluate antibody-mediated red cell-monocyte interaction. *Haematologica*. 1997;82(5):526-31.

Smallwood ND, Hausman BS, Wang X, Liedtke CM. Involvement of NH2 terminus of PKC-δ in binding to F-actin during activation of Calu-3 airway epithelial NKCC1. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;288(4):C906-12.

Soares AC, Souza DG, Pinho V, Vieira AT, Nicoli JR, Cunha FQ, Mantovani A, Reis LF, Dias AA, Teixeira MM. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. *Microbes Infect*. 2006;8(5):1321-9.

Sorgi CA, Secatto A, Fontanari C, Turato WM, Belangér C, de Medeiros AI, Kashima S, Marleau S, Covas DT, Bozza PT, Faccioli LH. *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. *J Immunol.* 2009;182(7):4025-35.

Steele C, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, Gordon S, Shellito JE, Kolis JK. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med.* 2003;198(11):1677-88.

Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potentially enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992;176(1):287-92.

Stephens L, Ellson C, Hawkins P. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(2):203-13.

Sung SS, Nelson RS, Silverstein SC. The role of the mannose/N-acetylglucosamine receptor in the pinocytosis of horseradish peroxidase by mouse peritoneal macrophages. *J Cell Physiol.* 1983;116(1):21-5.

Suram S, Gangelhoff TA, Taylor PR, Rosas M, Brown GD, Bonventre JV, Akira S, Uematsu S, Williams DL, Murphy RC, Leslie CC. Pathways regulating cytosolic phospholipase A₂ activation and eicosanoid production in macrophages by *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 2010;285(40):30676-85.

Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B₄ receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003;69(2-3):123-34.

Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007;8(1):31-8.

Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, Wong SY. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol.* 2002;169(7):3876-82.

Toker A, Cantley LC. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* 1997;387(6634):673-6.

Trotta R, Kanakaraj P, Perussia B. Fc gamma R-dependent mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: a common signal transduction event necessary for expression of TNF-alpha and early activation genes. *J Exp Med.* 1996;184(3):1027-35.

Turner M, Schweighoffer E, Colucci F, Di Santo JP, Tybulewicz VL. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today.* 2000;21(3):148-54.

Ueyama T, Lennartz MR, Noda Y, Kobayashi T, Shirai Y, Rikitake K, Yamasaki T, Hayashi S, Sakai N, Seguchi H, Sawada M, Sumimoto H, Saito N. Superoxide production at phagosomal cup/phagosome through beta I protein kinase C during Fc gamma R-mediated phagocytosis in microglia. *J Immunol.* 2004;173(7):4582-9.

Underhill DM, Rossmagle E, Lowell CA, Simmons RM. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood.* 2005;106(7):2543-50.

Varani S, Elvin JA, Yan C, DeMayo J, DeMayo FJ, Horton HF, Byrne MC, Matzuk MM. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol.* 2002;16(6):1154-67.

Vegesna RV, Mong S, Crooke ST. Leukotriene D4-induced activation of protein kinase C in rat basophilic leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 1988;147(3):387-96.

Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun.* 2005;73(3):1553-60.

Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol.* 2001;38(2-3):189-97.

Vouret-Craviari V, Cenzuales S, Poli G, Mantovani A. Expression of monocyte chemotactic protein-3 in human monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Cytokine.* 1997;9(12):992-8.

Vouret-Craviari V, Matteucci C, Peri G, Poli G, Introna M, Mantovani A. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 1997;65(4):1345-50.

Vázquez-Torres A, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61(2):170-92.

Waki K, Inanami O, Yamamori T, Nagahata H, Kuwabara M. Involvement of protein kinase Cdelta in the activation of NADPH oxidase and the phagocytosis of neutrophils. *Free Radic Res.* 2006;40(4):359-67.

Wan M, Sabirsh A, Wetterholm A, Agerberth B, Haeggström JZ. Leukotriene B4 triggers release of the cathelicidin LL-37 from human neutrophils: novel lipid-peptide interactions in innate immune responses. *FASEB J.* 2007;21(11):2897-905.

Wang TH, Lin TF. Monascus rice products. *Adv Food Nutr Res.* 2007;53:123-59.

Wear MA, Schafer DA, Cooper JA. Actin dynamics: assembly and disassembly of actin networks. *Curr Biol*. 2000;10(24):R891-5.

Weerth SH, Holtzclaw LA, Russell JT. Signaling proteins in raft-like microdomains are essential for Ca^{2+} wave propagation in glial cells. *Cell Calcium*. 2007 Feb;41(2):155-67.

Willment JA, Marshall AS, Reid DM, Williams DL, Wong SY, Gordon S, Brown GD. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1539-47.

Willment JA, Lin HH, Reid DM, Taylor PR, Williams DL, Wong SY, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2003;171(9):4569-73.

Wilson ME, Pearson RD. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol*. 1986;136(12):4681-8.

Wirth JJ, Kierszenbaum F. Stimulatory effects of leukotriene B₄ on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 1985;134(3):1989-93.

Wirth JJ, Kierszenbaum F. Effects of leukotriene C₄ on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;15(1):1-10.

Woo CH, You HJ, Cho SH, Eom YW, Chun JS, Yoo YJ, Kim JH. Leukotriene B₄ stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. *J Biol Chem*. 2002;277(10):8572-8.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995;270(5240):1326-31.

Xu S, Huo J, Gunawan M, Su IH, Lam KP. Activated dectin-1 localizes to lipid raft microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells. *J Biol Chem*. 2009;284(33):22005-11.

Yamamori T, Inanami O, Nagahata H, Kuwabara M. Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47(phox) by controlling cPKC/PKCdelta but not Akt. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(3):720-30.

Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takuwa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature*. 1997;387(6633):620-4.

Zamze S, Martinez-Pomares L, Jones H, Taylor PR, Stillion RJ, Gordon S, Wong SY. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem*. 2002;277(44):41613-23.

Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*. 2005;272(24):6179-217.

Zhang J, Zhu J, Bu X, Cushion M, Kinane TB, Avraham H, Koziel H. Cdc42 and RhoB activation are required for mannose receptor-mediated phagocytosis by human alveolar macrophages. *Mol Biol Cell*. 2005;16(2):824-34.

Zhou HL, Chabot-Fletcher M, Foley JJ, Sarau HM, Tzimas MN, Winkler JD, Torphy TJ. Association between leukotriene B₄-induced phospholipase D activation and degranulation of human neutrophils. *Biochem Pharmacol*. 1993;46(1):139-48.

Leukotrienes Target F-actin/Cofilin-1 to Enhance Alveolar Macrophage Anti-fungal Activity*

Received for publication, February 28, 2011, and in revised form, June 28, 2011 Published, JBC Papers in Press, June 29, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.235309

Mariana Morato-Marques^{‡1}, Marina R. Campos^{‡1}, Steve Kane[§], Ana P. Rangel[‡], Casey Lewis[§], Megan N. Ballinger[§], Sang-Hoon Kim[¶], Marc Peters-Golden[§], Sonia Jancar[‡], and Carlos H. Serezani^{§2}

From the [‡]Department of Immunology, Institute of Biomedical Science IV, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil, the [§]Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Medical School, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, and the [¶]Division of Allergy and Respiratory Medicine, Department of Internal Medicine, Eulji University School of Medicine, Seoul, 139-711, Republic of Korea

Candida albicans is the most common opportunistic fungal pathogen and causes local and systemic disease in immunocompromised patients. Alveolar macrophages (AMs) are pivotal for the clearance of *C. albicans* from the lung. Activated AMs secrete 5-lipoxygenase-derived leukotrienes (LTs), which in turn enhance phagocytosis and microbicidal activity against a diverse array of pathogens. Our aim was to investigate the role of LTB₄ and LTD₄ in AM antimicrobial functions against *C. albicans* and the signaling pathways involved. Pharmacologic and genetic inhibition of LT biosynthesis as well as receptor antagonism reduced phagocytosis of *C. albicans* when compared with untreated or WT controls. Conversely, exogenous LTs of both classes augmented base-line *C. albicans* phagocytosis by AMs. Although LTB₄ enhanced mainly mannose receptor-dependent fungal ingestion, LTD₄ enhanced mainly dectin-1 receptor-mediated phagocytosis. LT enhancement of yeast ingestion was dependent on protein kinase C- δ (PKC δ) and PI3K but not PKC α and MAPK activation. Both LTs reduced activation of cofilin-1, whereas they enhanced total cellular F-actin; however, LTB₄ accomplished this through the activation of LIM kinases (LIMKs) 1 and 2, whereas LTD₄ did so exclusively via LIMK-2. Finally, both exogenous LTB₄ and LTD₄ enhanced AM fungicidal activity in an NADPH oxidase-dependent manner. Our data identify LTB₄ and LTD₄ as key mediators of innate immunity against *C. albicans*, which act by both distinct and conserved signaling mechanisms to enhance multiple antimicrobial functions of AMs.

The importance of *Candida albicans* infection has grown as a result of the increased use of antimicrobial and immunosuppressive agents and of predisposing conditions such as cancer, diabetes, transplantation, HIV infection, and malnutrition (1–5). This pathogenic yeast can cause local infections at portals of entry, such as lung and genitourinary tract as well as

disseminated infections. In the lung, alveolar macrophages (AMs)³ are important defenders against opportunistic fungal infections, preventing the hematogenous dissemination of *C. albicans* in immunocompromised hosts (6). AMs are able to recognize, ingest, and kill *C. albicans* through a range of pathogen recognition receptors (PRRs) including the C-type lectin-like receptor dectin-1 and the mannose receptor (CD206), representing the major macrophage receptors for β -glucan and mannan, respectively, involved in fungal recognition and ingestion (7). Binding of *C. albicans* to AMs causes the release of a myriad of proinflammatory mediators, including cytokines and bioactive lipids such as leukotrienes (LTs) (8, 9).

LTs are products of phospholipase A₂-derived arachidonic acid metabolism by the enzyme 5-lipoxygenase (5-LO) and the 5-LO activating protein (FLAP) and are synthesized by phagocytes in response to inflammatory or infectious stimuli (10). There are two main classes of LTs, namely LTB₄ and the cysteinyl-LTs (cysLTs), which include LTC₄, LTD₄, and LTE₄; these act by ligating the high affinity G protein-coupled receptors BLT1 and cysLT1, respectively (11, 12). LT receptor ligation enhances many aspects of AM activation, including leukocyte accumulation (11), microbial ingestion (13) and killing (14), and generation of proinflammatory mediators (10). We have previously characterized some of the signaling pathways by which LTs enhance AM antimicrobial functions against IgG-opsonized pathogens recognized by the Fc γ receptor (FcR) (15–17). Because of the diversity of signals derived from different phagocytic receptors, the importance of LTs in amplifying phagocytosis could be unique to IgG-coated target ingestion. In addition, during active acute infection, the importance of FcR signaling in the early events of host defense is controversial. Thus, it is of interest to investigate the importance of LTs in mediating AM phagocytosis by non-opsonic receptors.

There is increasing evidence that defects in LT synthesis contribute to impaired innate immunity in a variety of immunosuppressive states, such as malnutrition (18), bone marrow transplantation (19), and HIV infection (20, 21). In view of the importance of LTs in host defense along with the underproduc-

* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grants HL-058897 (to M. P.-G.) and HL-103777–01 (C. H. S.). This work was also supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: Dept. of Internal Medicine, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, 1150 West Medical Center Dr, University of Michigan, Ann Arbor, MI. Tel.: 734-615-5623; Fax: 734-764-4556; E-mail: cserezani@med.umich.edu.

³ The abbreviations used are: AM, alveolar macrophage; 5-LO, 5-lipoxygenase; PRR, pathogen recognition receptor; FLAP, five-lipoxygenase activating protein; BLT1, leukotriene B₄ receptor 1; LT, leukotriene; cysLT1, cysteinyl LT receptor 1; FcR, Fc γ receptor; ROI, reactive oxygen intermediate; CFU, colony forming unit; LIMK, LIM kinase.

tion of LTs observed in immunosuppressive states (22), the present study was undertaken to investigate the role of LTs and the signaling pathways involved in the anti-fungal activity of AMs against the opportunistic pathogen *C. albicans*. Our data show that both endogenous as well as exogenous LTB₄ and LTD₄ enhance phagocytosis of *C. albicans* by promoting F-actin polymerization and assembly and killing via NADPH oxidase activation and reactive oxygen intermediate (ROI) generation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents

RPMI 1640 was purchased from Invitrogen. LTB₄ and LTD₄ were purchased from Biomol. The inhibitors of protein kinase Cα (PKCα) (Ro-32-0432) and PKCδ (rottlerin) were supplied by Calbiochem. PI3K inhibitors (LY290042 and wortmannin), 5-LO inhibitors (AA861 and Zileuton), the cysLT1 receptor antagonist MK571, and the NADPH oxidase inhibitor DPI were supplied by Enzo. CP105696 (BLT1 antagonist) was a generous gift of Pfizer. MK0591 (FLAP inhibitor) was from Merck. Alexa488-phalloidin and Alexa594-deoxyribonuclease I (DNase I) were from Molecular Probes. Laminarin (a soluble glucan prepared from *Laminaria digitata*) and mannan prepared from *Saccharomyces cerevisiae* were both from Sigma. Compounds requiring reconstitution were dissolved in either ethanol or dimethyl sulfoxide (DMSO). Required dilutions of all compounds were prepared immediately before use, and equivalent quantities of vehicle were added to the appropriate controls.

Animals

Female pathogen-free 5-LO^{-/-} (129-Alox5^{tm1Fun}) mice (23), strain-matched wild-type (WT) sv129 mice, and Wistar rats were obtained from Central Laboratory Animal Medicine of University of São Paulo as well as Charles River Laboratories (Portage, MI). All experiments were in accord with ethical principles in animal research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and the National Institutes of Health guidelines for the use of experimental animals, with the approval of the Animal Subject Committee of the Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, and the University of Michigan Committee for the Use and Care of Animals.

Cell Isolation and Culture

Rat or murine AMs were obtained by bronchoalveolar lavage as described (24). In general, rat cells were used for pharmacologic and signaling studies, and murine cells were used for comparisons between 5-LO^{-/-} and WT genotypes. Murine resident peritoneal macrophages were obtained as described (25). Cells were cultured overnight in RPMI containing 10% fetal bovine serum and antibiotics and washed twice the next day with warm medium to remove nonadherent cells.

C. albicans Culture

C. albicans strain CHN1 (a human pulmonary clinical isolate) was grown on Sabouraud dextrose agar plates and maintained at 4 °C. 72 h before the experiment, yeast were grown to

stationary phase at 37 °C in Sabouraud dextrose broth (1% neo-peptone, 2% dextrose (Difco)) with shaking. The cultures were washed in sterile nonpyrogenic PBS, counted with a hemocytometer, and diluted to 2 × 10⁹ colony forming units (CFU)/ml in sterile nonpyrogenic PBS. *C. albicans* was used either live or killed (through heating for 30 min at 56 °C) as indicated throughout the text and figure legends.

Measurement of LTB₄ and CysLTs in the Supernatant of AM Cultures

Levels of LTB₄ and cysLTs in the supernatants of AMs (5 × 10⁵) stimulated with 10:1 live or heat-killed *C. albicans* for different time points were determined using EIA kits (Cayman Chemical Co.) as described (26). In another experimental setting, AMs were pretreated with laminarin or mannan (100 μg/ml each) for 20 min and stimulated with live or heat-killed *C. albicans* (10:1) for 15 min followed by LTB₄ determination.

Phagocytosis Assays

Light Microscopic Assay—2 × 10⁵ WT and 5-LO^{-/-} AMs were plated in 4-well chamber slides (Nunc). In another set of experiments, rat AMs were plated on 8-well glass coverslips in 24-well cell culture-treated dishes (BD Biosciences) and were pretreated or not with inhibitors of PKCδ (6 μM rottlerin), PKCα (9 nM Ro-32-0432), PI3K (10 μM LY 290042 and 10 nM wortmannin), or ERK1/2 (by 2 μM PD98059) and p38 (by 10 μM SB20190) for 20 min before the addition of LTB₄ or LTD₄ (both at 10 or 100 nM as indicated in the legends). In another set of experiments, AMs were pretreated for 20 min with a 5-LO inhibitor (AA-861, 10 μM), a BLT1 antagonist (CP105,696, 10 μM), or a cysLT1 antagonist (MK571, 10 μM) (24) followed by the addition of 30:1 live *C. albicans*:AM for 90 min. The inhibitor doses used were based on previously published observations (24, 27–30). After 10 min of incubation with or without LTs, AMs were challenged with a multiplicity of infection of 30:1 live *C. albicans* for 90 min at 37 °C. Wells were then washed three times with warmed PBS to remove noningested yeast. *C. albicans* phagocytosis was assessed as described previously (31). Results were expressed as the phagocytic index, which was derived by multiplying the percent of macrophages containing at least one ingested target by the mean number of phagocytosed targets per positive macrophage.

Fluorometric Assay—The ability of AMs to phagocytose *C. albicans* was also assessed using a previously published protocol for determining the ingestion of fluorescent, heat-killed FITC-labeled *C. albicans* (^{FITC}*C. albicans*) (32). Briefly, heat-killed *C. albicans* were labeled with FITC (33). 4 × 10⁵ murine or rat AMs were seeded in replicates of 5– in 96-well tissue culture plates with opaque sides and optically clear bottoms (Costar, Corning Life Sciences). On the following day AMs were challenged with heat-killed *C. albicans* using a multiplicity of infection of 10:1 for 90 min to allow phagocytosis to occur. In another set of experiments, AMs were incubated with laminarin and/or mannan (100 μg/ml each) or anti-dectin receptor (clone 2A11; 1 μg/ml) or anti-mannose receptor (clone 15–2; 10 μg/ml) for 30 min before the addition of LTs or *C. albicans*. Trypan blue (250 μg/ml; Molecular Probes) was added for 10 min to quench the fluorescence of extracellular yeast, and fluo-

Leukotrienes Enhance Macrophage Anti-fungal Activity

rescence was determined using a Spectramax Gemini EM fluorometer at settings of 485 excitation/535 emission (Molecular Devices). The phagocytic index was calculated as previously described in relative fluorescence units (32).

RNA Isolation and Semiquantitative Real Time RT-PCR

RNA from cultured cells was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and real time RT-PCR was performed as described (34). Cofilin-1 mRNA was normalized to β -actin, and the respective untreated control was set to 100%.

RNA Interference

RNA interference experiments were performed according to a protocol provided by Dharmacon. AMs were transfected using DharmaFECT 1 reagent with 30 nM concentrations of nonspecific control or specific ON-TARGET SMARTpool cofilin-1. After 48 h of transfection, AMs were harvested for mRNA or fluorometric phagocytosis assay.

Confocal Microscopy

A total of 2×10^5 AMs were plated in 4-well chamber slides (Nunc), incubated with or without 10:1 heat-killed *C. albicans* for 15 min, and then washed with PBS. Slides were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS for 3 min. Cells were then blocked with 2% BSA in PBS and incubated with phospho-cofilin-1 (Ser-3, 1:200) in blocking buffer for 1 h at room temperature. Next, slides were washed in PBS and incubated with secondary antibody (1:200) in blocking buffer for 1 h. Cells were also stained with FITC-phalloidin (1 μ M) or DNase I-Alexa594 (1 μ M) to stain F- or G-actin, respectively, according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). Cells stained with isotype-matched control antibody were used to control for the background from each fluorophore (not shown). Slides were mounted in Prolong Gold mounting media with 4,6 diamidino-2-phenylindole (Molecular Probes), and cells were imaged on a Zeiss LSM 510 confocal microscope with an inverted Axiovert 100 M microscope stand using a C-apochromat40/1.2 W corr. The 488-nm line from an argon laser and the 543- and 633-nm lines from 2 He/Ne lasers were used for excitation. The images were analyzed using LS 2.5 image analysis software (Zeiss). Photographs were obtained only of AMs containing bound or 1–2 internalized heat-killed *C. albicans*. Confocal images were taken with identical settings to allow comparison of staining. Single confocal sections of the cells were captured in multitrack. Each set of frames from a given treatment condition depicts a representative AM selected from 20 analyzed cells.

Fluorometric Assay for Quantification of Actin Polymerization

4×10^5 rat AMs were seeded in replicates of 5 in 96-well tissue culture plates with opaque sides and optically clear bottoms (Costar, Corning Life Sciences). On the following day AMs were infected with heat-killed *C. albicans* using a multiplicity of infection of 10:1 for 30 min. Cells were fixed with 3% paraformaldehyde for 20 min followed by cell blocking with 2% BSA in PBS for 1 h at room temperature. AMs were stained with

FITC-phalloidin (1 μ M) to stain F-actin, according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes). Cells were washed three times in PBS, and fluorescence was determined using a Spectramax Gemini EM fluorometer at settings of 485 excitation/535 emission (Molecular Devices).

Western Blotting

2×10^5 AMs were plated in 6-well tissue culture dishes and were either stimulated or not with 100 nM LTB₄ or 100 nM LTD₄ for 5 min followed by the addition of 10:1 heat-killed *C. albicans* for 15 min. AMs were lysed in buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 25 μ M KCl, 5 mM MgCl₂, and 0.2% Nonidet P-40) supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics). For immunoblot analysis, protein samples (30 μ g) were mixed with loading buffer (50 mM Tris HCl (pH 6.8), 2% SDS, 100 mM DTT, 10% glycerol, and 0.1% bromophenol blue), boiled, applied to 10% SDS-polyacrylamide gels, and subjected to electrophoresis. Immunoblot analysis was performed as previously described (35) using primary antibodies against total and phospho-cofilin-1 (Ser-3) (1:1000, Cell Signaling), phospho-LIMK1 (Thr-508), total and phospho-LIMK-2 (Thr-505) (1:1000, from Abcam), and β -actin (1:10,000, Sigma). Densitometric analysis was as described (36); the intensity of phosphorylation was quantitated as the density of the phosphorylated protein band divided by that of the actin or the respective total protein band, and this ratio was then expressed relative to that of the untreated control, which was set at 100%. In all instances, density values of bands were corrected by subtraction of the background values.

Fungicidal Activity Assay

The ability of AMs to kill *C. albicans* was evaluated using an assay of CFU as described (37, 38). Briefly, WT and 5-LO^{-/-} mouse AMs or rat AMs (1×10^6) were plated in 12-well tissue culture dishes. The next day live *C. albicans* yeast cells were added to the macrophages at a multiplicity of infection of 5:1 (*C. albicans*:AMs) for 1 h to allow phagocytosis to occur. Then cells were treated with compounds of interest for 20 min or as indicated in the figure legends and were incubated at 37 °C for 3 h. Subsequently, all wells were extensively washed to remove extracellular fungi, and the cells were collected and centrifuged at $4500 \times g$ for 5 min. The pellet was resuspended with 1 ml of sterile water to lyse the cells. The contents were vortexed vigorously and then were serially diluted and plated on Sabouraud dextrose agar plates. Inspection of the initial lysate revealed only single colonies, 98% of which were still in the yeast phase. After incubation at 37 °C for 24 h, CFU were counted, and the percentage of *C. albicans* cells that were killed was calculated by comparison to the CFU obtained from the original inoculum, which also was quantified by serial dilution and plating. Results were expressed as percent survival of ingested yeast, where the survival of ingested yeast = $100\% \times \text{before inoculum CFU} / \text{CFU 3 h after AM incubation}$.

Measurement of ROI

AMs were added to 96-well plates at a concentration of 4×10^5 cells/well and cultured overnight in RPMI 1640 containing 10% FCS. The next day, medium was replaced with PBS con-

FIGURE 1. Endogenously produced LTs are required for optimal phagocytosis of *C. albicans*. A, LTB₄ and cysLT levels were measured in the supernatant from rat AMs infected with 10:1 live or heat-killed *C. albicans* after 5, 15, and 30 min as described under "Experimental Procedures." Data are the mean $\pm$ S.E. from three separate experiments. *, $p < 0.05$ compared with unstimulated AMs; #, $p < 0.05$ compared with live *C. albicans*. B, AMs were pretreated with or without the 5-LO inhibitor AA 861 (10 μ M) or the FLAP inhibitor MK886 (10 μ M) for 10 min and challenged with live *C. albicans* for 90 min, and the phagocytosis was determined microscopically as described. C, AMs from 5-LO^{-/-} and WT mice were challenged with heat-killed ^{FITC}*C. albicans* for 1 h, and phagocytosis was measured by fluorometry. D, peritoneal macrophages (PM) from 5-LO^{-/-} and WT mice were challenged with heat-killed ^{FITC}*C. albicans* for 1 h, and phagocytosis was measured by fluorometry. E, AMs were pretreated or not for 10 min with the BLT1 antagonist CP 105,696 (10 μ M) or the cysLT1 antagonist MK 571 (10 μ M) before the addition of live *C. albicans* for 90 min, and phagocytosis was measured microscopically. In C and D, fluorometric assay was performed, and phagocytic indices were calculated and expressed as a percentage of the control. Data are the mean $\pm$ S.E. from 3–5 separate experiments. *, $p < 0.05$ comparing treated to untreated groups or 5-LO^{-/-} to WT AMs.

taining 10 μ M H₂DCF (a cell-permeable oxidant sensitive fluorophore), and the cells were cultured for 1 h. The medium was then replaced with warmed HBSS, and the cells were stimulated with heat-killed *C. albicans* using a multiplicity of infection of 10:1. ROI production was assessed after 90 min by measuring fluorescence using a Spectramax Gemini XS fluorometer (Molecular Devices) with excitation/emission setting at 493/522 nm. To assess the effect of LTs on ROI production by AMs, LTB₄ (100 nM) and LTD₄ (100 nM) and heat-killed *C. albicans* (10:1) were added to this solution before the addition to the AMs.

Statistical Analysis

Graphs represent the mean $\pm$ S.E. from three-six independent experiments. The means from different treatments were compared by analysis of variance. When significant differences were identified, individual comparisons were subsequently analyzed with the Bonferroni *t* test for unpaired values. When two groups were compared, we performed paired Student's *t* tests. Statistical significance was set at a *p* value ≤ 0.05 .

RESULTS

Phagocytosis of *C. albicans* by AMs Requires the Generation of Both Classes of LTs—First, we compared the ability of live and heat-killed *C. albicans* to induce LTB₄ and cysLT synthesis in rat AMs at time points relevant to the process of yeast ingestion. Both live and heat-killed *C. albicans* induced similar levels of LTB₄ (~100 pg/ml, which corresponds to ~0.5 nM) after 5 min of fungal challenge. However, only live *C. albicans* further enhanced LTB₄ synthesis at the later time point tested (Fig. 1A). The synthesis of cysLTs was also induced by both live and heat-killed *C. albicans* but at levels lower than LTB₄ at all time points studied; this was expected, based on the known capacity for rat AMs to synthesize greater quantities of LTB₄ than cysLTs in response to a variety of stimuli (22, 39). Together, our data indicate that LT biosynthesis is a component of the normal macrophage response to this microbe. Next, we asked if LTs produced during *C. albicans* ingestion have a functional role in AM antimicrobial function. The phagocytic capacity over 90 min of AMs pretreated or not with the 5-LO inhibitor AA861 (10 μ M) or the FLAP inhibitor MK0591 (1 μ M) was determined

microscopically. LT inhibition by both the 5-LO and FLAP inhibitors reduced phagocytosis of live *C. albicans* by ~60% when compared with untreated cells (Fig. 1B). To confirm the effects of pharmacologic inhibition of LT synthesis on yeast ingestion determined microscopically, we utilized 5-LO^{-/-} AMs (which cannot synthesize LTs) and control WT AMs in a fluorometric assay of heat-killed ^{FITC}*C. albicans* phagocytosis. We observed a 60% decrease in yeast ingestion in 5-LO^{-/-} cells when compared with WT AMs (Fig. 1C). We also saw a similar reduction in phagocytosis by LT-deficient peritoneal macrophages, suggesting that LTs are necessary for optimal phagocytosis in diverse macrophage populations (Fig. 1D). Thus, LT generation is required for optimal ingestion of both live and heat-killed *C. albicans*. The importance of individual LT classes in *C. albicans* ingestion was evaluated using BLT1 and cysLT1 antagonists. Pretreatment with BLT1 antagonist (CP105,696, 10 μ M) or cysLT1 antagonist (MK571, 10 μ M) resulted in a 45 and 60% reduction, respectively, in live *C. albicans* ingestion (Fig. 1E). These data suggest that LTs readily produced during *C. albicans* ingestion are required for optimal yeast phagocytosis.

Having established the importance of endogenously produced LTB₄ and cysLTs for the optimal phagocytic capacity of AMs, we next investigated if the addition of LTs to AMs also amplified base-line yeast ingestion. Phagocytosis of live fungus was enhanced by both LTB₄ (Fig. 2A) and LTD₄ (Fig. 2B) in a dose-dependent fashion. A dose of 100 nM concentrations of each LT caused maximal ingestion of *C. albicans*, and thus, we chose this dose for subsequent experiments. Exogenous LTB₄ and LTD₄ each fully restored the deficient phagocytic capability of 5-LO^{-/-} AMs, confirming the importance of LTs for macrophage phagocytosis (Fig. 2C). Interestingly, a combination of LTB₄ plus LTD₄, each used at a submaximal dose of 10 nM, amplified heat-killed ^{FITC}*C. albicans* ingestion to a greater extent than did either LTB₄ or LTD₄ alone (Fig. 2C). The same pattern was also observed when testing the effects of exogenous LTs on fungal ingestion employing live *C. albicans* (Fig. 2D). Consistent with the greater level of LT synthesis in response to live *versus* heat-killed fungus, the dependence of phagocytosis on LTs as reflected by the magnitude of the phagocytic defect in 5-LO^{-/-} AMs was likewise greater with live than with heat-killed *C. albicans* (Fig. 2, C and D). Together, these findings show that both classes of LTs are required for optimal *C. albicans* ingestion in AMs.

Identification of the Signaling Pathways Involved in LT Enhancement of Yeast Ingestion—Next, we sought to determine the role of dectin-1 and mannose receptor in yeast phagocytosis and the extent to which ingestion through each was influenced by both classes of LTs. Mannose receptor antagonism by both mannan and anti-mannose receptor antibody inhibited ^{FITC}*C. albicans* phagocytosis by ~40%, and dectin-1 receptor blockade by both laminarin and anti-dectin-1 antibody inhibited fungal ingestion by ~60%. The combination of both mannan and laminarin treatment impaired yeast ingestion by ~80% (Fig. 3A). Although LTB₄ enhancement of yeast phagocytosis was abolished when AMs were pretreated with mannan and partially inhibited by laminarin, LTD₄ effects were shown to depend primarily on dectin-1 recognition. Conversely, inhibi-

FIGURE 2. Exogenous LTB₄ and LTD₄ both enhance *C. albicans*-mediated phagocytosis. Rat AMs were pretreated for 10 min without or with LTB₄ (A) or LTD₄ (B) in the indicated doses before the addition of live *C. albicans* for 90 min, and phagocytosis was measured microscopically. C, AMs from WT and 5-LO^{-/-} mice were pretreated or not with 10 nM of LTB₄ and/or LTD₄ for 10 min before the addition of heat-killed ^{FITC}*C. albicans* for 90 min, and phagocytosis was determined fluorometrically. D, AMs from WT and 5-LO^{-/-} mice were pretreated or not with 10 nM of LTB₄ and/or LTD₄ for 10 min before the addition of live *C. albicans*, and phagocytosis was measured microscopically. Data are the mean $\pm$ S.E. from three separate experiments. *, $p < 0.05$ comparing treated to untreated WT groups or 5-LO^{-/-} to WT AMs; #, $p < 0.05$ comparing untreated 5-LO^{-/-} AMs to LT-activated cells; &, $p < 0.05$ comparing LTB₄ or LTD₄ alone.

tion of both mannose and dectin-1 receptors completely inhibited the stimulatory effect of both classes of LTs (Fig. 3B). We also investigated which PRR is responsible for LTB₄ production during *C. albicans* infection. We pretreated AMs with mannan and laminarin to block mannose receptor and dectin-1, respectively, followed by the addition of either live or heat-killed *C. albicans* for 15 min. Although LTB₄ production induced by live yeast was mainly dependent on dectin-1 and partially dependent on mannose receptor, that induced by heat-killed *C. albicans* was completely dependent on dectin-1 activation (Fig. 3, C and D).

Previously, we showed that BLT1 but not cysLT1 uses G α_i protein to enhance AM antimicrobial functions (17). However, the specific G proteins by which LTs enhance PRR-mediated phagocytosis of unopsonized pathogens is unknown. Here, we sought to investigate the role of G α_i in mediating LTB₄/LTD₄ effects on *C. albicans* ingestion. G α_i inhibition by pertussis toxin pretreatment, as described previously (17), abolished the effect of LTB₄, but not LTD₄, on *C. albicans* phagocytosis (Fig. 4A). These data show that G α_i mediates BLT1 effects on AM phagocytosis via PRRs.

FIGURE 3. Role of dectin-1 and mannose receptor in LT-enhanced *C. albicans* ingestion. A, rat AMs were pretreated with mannose or laminarin (both at 100 μ g/ml) or anti-dectin-1 (clone 2A11, AbD Serotec) and anti-mannose receptor (clone 15-1, Biolegend) (both at 10 μ g/ml) for 30 min before the addition of 10:1 heat-killed *FITC*-*C. albicans* for 90 min, and phagocytosis was determined fluorometrically. Data are the mean $\pm$ S.E. from three separate experiments. *, $p < 0.05$ compared with untreated control. B, rat AMs were pretreated with mannose or laminarin as in A followed by LTB₄ or LTD₄ for 10 min before the addition of 10:1 heat-killed *FITC*-*C. albicans*. Phagocytosis was measured by fluorometry after 90 min. Data are the mean $\pm$ S.E. from three separate experiments. *, $p < 0.05$ compared with untreated AMs; #, $p < 0.05$ versus LTB₄ or LTD₄ alone. Rat AMs were pretreated with laminarin or mannose as in A followed by 10:1 live (C) or heat-killed (D) *C. albicans* for 15 min, and LTB₄ was determined by ELISA. Data are the mean $\pm$ S.E. from three separate experiments. *, $p < 0.05$ compared with untreated AMs; #, $p < 0.05$ versus *C. albicans* alone.

Next, we investigated the downstream signaling pathways involved in the enhancement of yeast phagocytosis. We focused on the requirement of specific kinases previously shown to be important for LT enhancement of FcR-mediated phagocytosis, including PKC α and δ , PI3K, and the MAPKs p38 and ERK1/2 (16). Inhibition of PKC δ , but not PKC α , abolished both LTB₄ and LTD₄ enhancement of *C. albicans* phagocytosis (Fig. 4B). As a confirmatory approach, we utilized intracellular delivery of a specific mouse monoclonal anti-PKC α or δ IgG into rat AMs using a liposomal reagent (16). We have previously confirmed the specificity and efficacy of this technique (16, 40, 41). Anti-PKC δ , but neither anti-PKC α nor nonspecific mouse IgG (not shown), blocked the ability of both LTs to augment phagocytosis (Fig. 4C). We did not observe any effect of the anti-PKC α or δ Abs on basal phagocytosis (data not shown).

PI3K is pivotal for the engulfment of a variety of phagocytic targets (42). To investigate if PI3K activation is important for

LT-enhanced phagocytosis, AMs were treated with two specific PI3K inhibitors, wortmannin (10 nM) and LY290042 (10 μ M). We found that the potentiating effects of both LTB₄ and LTD₄ on yeast phagocytosis were abolished by both inhibitors (Fig. 4D).

Another class of kinases known to participate in *C. albicans* phagocytosis is the MAPKs, namely, p38 and ERK1/2 (43, 44). We investigated their role in LT amplification of *C. albicans* phagocytosis using well established pharmacologic inhibitors. The pharmacologic inhibition of ERK1/2 (by 2 μ M PD98059) and p38 (by 10 μ M SB20190) had no effect on LTB₄ or LTD₄ potentiation of phagocytosis (Fig. 4E). Moreover, neither ERK1/2 nor p38 influenced basal *C. albicans* phagocytosis (not shown). Collectively, our data demonstrate that both classes of LTs utilize similar kinase programs to enhance yeast phagocytosis.

LTs Enhance F-actin Assembly during C. albicans Phagocytosis—Actin polymerization is required for particle ingestion by phagocytes (45, 46). Both LTB₄ and LTD₄ are capable of

FIGURE 4. Inhibition of PI3K and PKC δ but not of PKC α or MAPKs abolishes LT enhancement of *C. albicans* phagocytosis. A, rat AMs were pretreated with or without pertussis toxin (PTX) for 18 h followed by 10 min of treatment with vehicle or LTB₄ and/or LTD₄ at a final concentration of 100 nM. Heat-killed *C. albicans* was added, phagocytosis was measured by fluorimetry after 90 min, and phagocytic indices were calculated and expressed as a percentage of the control. Rat AMs were pretreated with selective inhibitors of PKC α (9 nM Ro-32-0432) or PKC δ (6 μ M rottlerin) (B), PI3K (10 nM wortmannin and 10 μ M LY290042) (D), or ERK1/2 (2 μ M PD98059) or p38 (SB20190 10 μ M) (E) and then incubated with LTB₄ and LTD₄ (100 nM for 10 min) before the addition of live *C. albicans* at a ratio of 30:1. In C, cells were treated overnight with Lipofectin reagent (1% v/v) with or without isotype controls or specific Abs against PKC α and PKC δ (1/500 dilution) as previously described (16) followed by the addition of live *C. albicans*. In panels B–E, phagocytosis was determined microscopically, and phagocytic indices were calculated and expressed as a percentage of the control. Data are the mean $\pm$ S.E. from three-five separate experiments. *, $p < 0.05$ comparing LT-treated with untreated; #, $p < 0.05$ versus LTB₄ or LTD₄ alone.

enhancing actin polymerization in leukocytes and epithelial cells (47). However, the role of LTs in assembly of polymerized F-actin during phagocytosis is unknown, and we interrogated this using WT and 5-LO^{-/-} AMs. By using confocal microscopy we observed that 5-LO^{-/-} AMs exhibited higher levels of G-actin and lower levels of F-actin when compared with WT cells (Fig. 5A, *i* and *ii*). Interestingly, both exogenously provided LTB₄ and LTD₄ increased F-actin and reduced G-actin levels during yeast phagocytosis in 5-LO^{-/-} AMs (Fig. 5A, *iii* and *iv*). We also determined fluorometrically the importance of LTs on F-actin levels present during live *C. albicans* ingestion in rat AMs treated with or without LTs; *C. albicans* enhanced F-actin levels in rat AMs, and both LTB₄ and LTD₄ potentiated yeast-induced F-actin polymerization. Moreover, the combination of both LTs elicited an additive effect (Fig. 5B). We next determined if kinases involved in potentiation of fungal ingestion by LTB₄ and LTD₄ also contribute to potentiation of F-actin levels. Indeed, both PI3K and PKC δ inhibition decreased F-actin levels in AMs challenged with both LTB₄ and LTD₄ during live *C. albicans* ingestion (Fig. 5C). These results indicate that potentiation of F-actin assembly in AMs is key to the enhance-

ment of *C. albicans* phagocytosis by both LTB₄ and LTD₄ and is dependent on both PI3K and PKC δ .

Actin-binding proteins, including cofilin-1, regulate assembly and disassembly of actin filaments (48). Cofilin-1 causes depolymerization at the minus end of filaments, thereby preventing their reassembly (48), and inhibits FcR-mediated phagocytosis (49). However, the importance of this protein in *C. albicans* phagocytosis is unknown. Thus, we tested the possibility that LTs potentiate F-actin levels by inhibiting the activation of cofilin-1. Cofilin-1 mRNA was silenced with siRNA (Fig. 6A), and yeast ingestion was increased in AMs 2-fold when compared with control siRNA (Fig. 6B), identifying an effect for this actin-binding protein in limiting AM phagocytosis of *C. albicans*. Cofilin-1 is inactivated by phosphorylation on Ser-3, which results in inhibition of F-actin disassembly, thus allowing actin polymerization. To examine the effect of LTs on cofilin-1 phosphorylation in phagocytosing AMs, we utilized both confocal microscopy in WT and 5-LO^{-/-} AMs (Fig. 6C) and immunoblotting (Fig. 6D). In control WT AMs, *C. albicans* challenge increased cofilin-1 phosphorylation and, therefore, actin polymerization. As shown in Fig. 6C, *i* and *ii*, 5-LO^{-/-}

FIGURE 5. LTB₄ and LTD₄ enhance actin polymerization through PI3K and PKC δ phosphorylation. A, AMs from WT and 5-LO^{-/-} mice were pretreated or not for 5 min with 100 nM LTB₄ or 100 nM LTD₄ before the addition of heat-killed *C. albicans* 10:1 for 15 min. Cells were then incubated with Alexa435-Phalloidin (green) to detect F-actin and Alexa555-DNase (red) to detect G-actin followed by confocal microscopy. Images are from one experiment representative of three independent experiments. B, rat AMs were stimulated and challenged with heat-killed *C. albicans* as described in A, and cells were incubated with Alexa435-phalloidin (green), after which F-actin was determined by fluorometry. RFU, relative fluorescence units. C, rat AMs were pretreated with the PI3K inhibitor wortmannin (10 nM) or the PKC δ inhibitor rottlerin (6 μ M) for 20 min followed by 100 nM LTB₄ or LTD₄ for 5 min. Heat-killed *C. albicans* 10:1 was added, and actin polymerization was determined as in B. Each bar represents the mean S.E. from 3–5 individual experiments, each performed in quintuplicate. *, $p < 0.05$ compared with unstimulated AMs; #, $p < 0.05$ versus *C. albicans*; &, $p < 0.05$ versus LTB₄ and LTD₄-treated AMs.

AMs displayed decreased cofilin-1 phosphorylation and concomitantly less actin polymerization upon exposure to *C. albicans* than did WT cells. That 5-LO^{-/-} AMs were unable to phosphorylate cofilin-1 upon *C. albicans* challenge was confirmed by immunoblot (Fig. 6D). Next, we sought to investigate the role of specific LTs on cofilin-1 phosphorylation. Treatment of 5-LO^{-/-} AMs with LTD₄ and LTB₄ restored both cofilin-1 phosphorylation and actin polymerization to levels observed in WT cells infected with *C. albicans* alone (Fig. 6C, iii and iv). Both classes of LTs also enhanced cofilin-1 phosphorylation in rat AMs, and again LTB₄ was more effective than LTD₄ in doing so (Fig. 6, E and F). LIM kinases (LIMKs) catalyze the phosphorylation of cofilin-1 on serine 3, and their overexpression reverses cofilin-induced actin depolymerization, leading to accumulation of actin filaments and aggregates (50). Thus, we asked if LTs enhanced activation of LIMK-1 and/or -2. *C. albicans* challenge itself increased phosphorylation of LIMK-1 but not LIMK-2 (Fig. 6, E and F). Interestingly, although LTB₄ increased activation of both LIMK-1 and -2, LTD₄ enhanced only the phosphorylation of LIMK-2. These results demonstrate that both LTB₄ and LTD₄ decreased the activation of cofilin-1, the cellular brake on actin polymerization, thereby enhancing F-actin assembly and optimizing *C. albicans* ingestion. However, LTB₄ exerted stronger effects that correlated with an ability to act via both LIMK-1 and -2, as opposed to the effects of LTD₄, which were limited to activation of LIMK-2.

LTs Enhance AM Candidacidal Activity—We previously reported that exogenous LTB₄ and LTD₄ enhanced intracellular killing of IgG-coated *Klebsiella pneumoniae* as well as *Leishmania amazonensis* (14, 25). We, therefore, hypothesized that

LTs, in addition to enhancing *C. albicans* phagocytosis, also enhanced AM fungicidal activity. Because ingestion is a prerequisite for intracellular killing and because LTs enhance yeast ingestion, an assay that distinguishes effects on killing from those on phagocytosis was necessary. We accomplished this by adding LTB₄ or LTD₄ themselves after the ingestion of *C. albicans* was completed. With such a protocol, exogenous addition of both LTB₄ and LTD₄ enhanced basal fungicidal activity of LT-deficient AMs (Fig. 7A). Moreover, 5-LO^{-/-} AMs exhibited reduced fungicidal activity (i.e. increased the survival of ingested yeast) than did WT AMs, suggesting that endogenously produced LTs are necessary for the optimal killing of *C. albicans* by AMs. *C. albicans* growth was not directly affected by the addition of LTs to macrophage-free cultures (data not shown). These data show that LTs are key mediators that promote two distinct and important steps in the control of yeast infection; that is, ingestion as well as killing.

LT Enhancement of Candidacidal Activity Involves NADPH Oxidase Activation—ROIs generated by NADPH oxidase activation are important in killing ingested yeast (51, 52), and LTs are known to activate this oxidase in AMs and other cell types (14, 26). Thus, we evaluated the role of NADPH oxidase-derived ROIs in LT enhancement of *C. albicans* killing. Cells were pretreated with the NADPH oxidase inhibitor DPI (53) followed by the addition of both classes of LTs and then *C. albicans*. DPI alone inhibited killing (i.e. increased survival of ingested *C. albicans*) by ~50% compared with untreated cells (Fig. 7B), indicating an important role for NADPH oxidase in the basal control of *C. albicans*, as previously reported (51). Exogenous LTB₄ failed to overcome the killing defect in DPI-treated cells, whereas exogenous LTD₄ did so significantly but

FIGURE 6. LTs enhance actin polymerization through regulation of cofilin-1 and LIMK-1 and -2 phosphorylation. A, cofilin-1 (CFL-1) mRNA expression by real time RT-PCR was measured in rat AMs incubated with cofilin-1 siRNA or control siRNA for 48 h. B, rat AMs were incubated with cofilin-1 siRNA or control siRNA for 48 h, and heat-killed *C. albicans* phagocytosis assay was performed fluorometrically. Data represent the mean $\pm$ S.E. from three individual experiments, each performed in quintuplicate. *, $p < 0.05$ versus control siRNA. RFU, relative fluorescence units. C, AMs from WT and 5-LO^{-/-} mice pretreated or not for 5 min with 100 nM LTB₄ or 100 nM LTD₄ before the addition of heat-killed *C. albicans* (10:1 for 10 min) were analyzed by confocal microscopy using phospho-cofilin-1 specific antibody (red) and phalloidin-FITC. Images are from one representative experiment of three independent experiments. D, AMs from WT and 5-LO^{-/-} mice were infected or not with heat-killed *C. albicans* 10:1 for 10 min, and the lysates were subject to immunoblotting and probed for total and phosphorylated cofilin-1. Numbers under the lanes indicate relative density of phosphorylated cofilin-1 upon *C. albicans* challenge, expressed as the mean $\pm$ S.E. from three independent experiments. E, rat AMs were pretreated or not for 5 min with 100 nM LTB₄ or 100 nM LTD₄ followed by heat-killed *C. albicans* (10:1) for 10 min, and the lysates were subject to immunoblotting. Blots are from one experiment representative of three independent experiments. F, relative phosphorylation of cofilin-1, LIMK-1, and LIMK-2 was determined by densitometric analysis of immunoblots from three independent experiments as depicted in panel E and is expressed as the mean $\pm$ S.E. In D and E, the intensity of phosphorylation was quantitated as the density of the phosphorylated protein band divided by that of the actin or the respective total protein band, and this ratio was then expressed relative to that of the untreated control, which was set at 100%. *, $p < 0.05$ versus *C. albicans*-infected AMs.

incompletely. These results suggest that LTB₄ augments candidacidal activity largely via activation of NADPH oxidase, whereas LTD₄ accomplishes this partially via oxidase activation and partially via alternative microbicidal mechanisms. The impact of endogenously produced LTs on cellular ROI production in response to live *C. albicans* infection was examined in WT and LT-deficient AMs. As shown in Fig. 7C, *C. albicans* infection induced ROI production by WT AMs; this was inhibited in 5-LO^{-/-} AMs, suggesting that endogenous LTs are involved in NADPH oxidase activation and release of ROIs during *C. albicans* infection. Accordingly, exogenous LTB₄ and LTD₄ further enhanced *C. albicans*-induced ROI secretion in 5-LO^{-/-} cells (data not shown). As expected, DPI abolished ROI production in infected AMs (data not shown). Our results show that both classes of LTs enhance yeast killing in a manner-dependent to varying degrees on the activation of NADPH oxidase complex and ROI release.

DISCUSSION

C. albicans is an opportunistic fungal pathogen that causes both local and disseminated infection (3, 54, 55). This pathogen can cause respiratory disease, especially in the setting of immunosuppressive therapy, bone marrow, organ transplants, and HIV infection. It is increasingly apparent that a variety of clinical circumstances are associated with an acquired defect in LT synthesis that itself confers increased susceptibility to infection; examples include HIV infection, bone marrow transplant, vitamin D₃ deficiency, and cigarette smoking (10). Here we have explored the role of LTs in phagocytosis and killing of *C. albicans* by AMs, the resident innate immune defender of the alveolar surface. Overall, our results show that 1) AMs quickly synthesize and release both LTB₄ and cysLTs in response to *C. albicans*, 2) both classes of LTs are required for optimal phagocytosis and killing of the fungi, 3) LTB₄ enhances mannose and dectin-1 receptor phagocytosis, whereas LTD₄ is

FIGURE 7. LTs enhance AM fungicidal activity against *C. albicans*. A, AMs from 5-LO^{-/-} and WT mice were incubated with live *C. albicans* at a ratio of 1:5 for 60 min to allow ingestion of the fungi. Cells were then treated with LTB₄ (100 nM) or LTD₄ (100 nM). The antifungal activity of AMs was measured after 3 h by comparing the CFU of each experimental group compared with control. B, rat AMs were pretreated with the NADPH oxidase inhibitor DPI (10 μ M) for 20 min before the addition of live *C. albicans* (1:5). Thirty minutes later DPI was added back with or without LTB₄ (100 nM) or LTD₄ (100 nM). Fungicidal activity was determined as described under "Experimental Procedures." C, AMs were treated with or without LTB₄ (100 nM) or LTD₄ (100 nM) for 5 min, after which PBS containing 10 μ M H₂DCF was added, and the cells were cultured for 1 h. The medium was then replaced with warmed HBSS, and the cells were stimulated with heat-killed *C. albicans* (10:1). ROI production was assessed after 90 min by measuring fluorescence. Data are the mean $\pm$ S.E. from 4–8 separate experiments. *, $p < 0.05$ compared with WT control; #, $p < 0.05$ when compared with LTB₄/LTD₄ alone or *C. albicans* stimulated WT AMs.

required for optimal dectin-1-mediated phagocytosis, 4) LT enhancement of phagocytosis involves the activation of PKC δ and PI3K, with subsequent activation of LIMKs, decreased cofilin-1 activation, and ultimately, F-actin assembly, and 5) LT enhancement of *C. albicans* killing involves NADPH oxidase activation and ROI generation.

Inhibition of LT synthesis or activity has likewise been reported to impair host defense against a myriad of pathogens, including bacteria (56, 57), viruses (58–60), fungi (20, 61), and parasites (25, 62). That endogenous generation of both classes of LTs is important in the macrophage phagocytic and microbicidal response during *C. albicans* infection was revealed through both pharmacologic and genetic means. *C. albicans* can be recognized by a variety of PRRs including dectin-1 and the mannose receptor, each of which can activate specific signaling pathways required for yeast ingestion (7). Here we show that LTB₄ production is required for optimal mannose receptor phagocytosis and partially necessary for dectin-1-mediated ingestion. In contrast, LTD₄ is essential for optimal dectin-1 phagocytosis. Such findings correlate with the differential role of dectin-1 and mannose receptor in generating LTB₄ during *C. albicans* ingestion. Although live and heat-killed yeast utilize dectin-1 to enhance LTB₄ production, mannose receptor participates only in live *C. albicans*-induced LT synthesis. The greater importance of dectin-1 recognition in mediating heat-killed *C. albicans*-induced LTB₄ production could reflect the exposure of β -glucan in the yeast exposed to high temperatures (63). In addition, our data are in agreement with previous reports showing that dectin-1 is the main receptor involved in both arachidonic acid release and LT secretion in macrophages (9, 64, 65). Little is known about the importance of arachidonic acid metabolites including LTs in enhancing fungal ingestion. Balestrieri *et al.* (67) identified no defect in phagocytosis of the yeast cell wall product zymosan in LTC₄ synthase-deficient peritoneal macrophages. In addition, Okamoto *et al.* (68) have shown that BLT1^{-/-} bone marrow-derived macrophages exhibit lower phagocytic capability of IgG-opsonized zymosan but not of non-opsonized zymosan. Although our work focused

on AMs, we did observe a similar dependence on 5-LO products for phagocytosis by peritoneal macrophages. The discrepancy between these other reports and our own may, therefore, reflect differences in the PRRs recognizing *C. albicans* versus zymosan or strain of *C. albicans* and the possibility that LTC₄ synthase-deficient cells might overproduce LTB₄. Although Balestrieri *et al.* (38) showed that secretory PLA₂ activation was required for optimal *C. albicans* ingestion and killing, they did not address the role of specific arachidonic acid metabolites. In contrast, our work provides mechanistic insight into the anti-fungal actions of specific LTs.

Although G α_i signaling was utilized exclusively by LTB₄/BLT1, enhanced phagocytosis induced by both LTD₄ and LTB₄ depended on PKC δ and PI3K, as revealed by both kinase inhibitors and intracellular antibody blockade. We speculate that PI3K is upstream of PKC δ , based on previous work showing that PI3K-induced NADPH oxidase activation is dependent on PKC δ activation (69). Because both PI3K and PKC δ have been previously implicated in phagocytosis as well as in F-actin polymerization (70–72), we explored the effects of LTs on F-actin assembly and the possible signaling programs involved. Both classes of LTs enhanced F-actin assembly and decreased monomeric G-actin levels. Interestingly, LTD₄ has been reported to enhance F-actin polymerization in intestinal epithelial cells in a PKC δ - and PI3K-dependent manner (73). It also has been shown that LTB₄ enhances actin polymerization in neutrophils (74) and T cells (75). We show that both classes of kinases were required for enhanced F-actin polymerization during *C. albicans* challenge by LTB₄ and LTD₄. We also observed that LTB₄ enhanced the amount of F-actin surrounding the yeast, which co-localized with phosphorylated (deactivated) cofilin-1. Actin polymerization is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of actin depolymerizing factors such as cofilin-1 (48). Cofilin-1 is a major actin-binding protein in leukocytes and plays an important role in restraining the respiratory burst and phagocytosis (49, 76), and its activity is decreased by phosphorylation at serine-3 by LIMKs. LIMKs can be phosphorylated by Rho-family GTPases via the activation of

Rho kinase (ROCK) or via Cdc42/Rac-mediated activation of PAK1, -2, or -4 (50, 77). Here, by employing two different approaches (Western blotting and confocal microscopy) we observed that 5-LO-deficient AMs exhibited increased cofilin-1 activation and that LTB₄ seems to be more effective than LTD₄ in decreasing cofilin-1-mediated F-actin depolymerization. Conversely, LTB₄ amplifies LIMK-1 and LIMK-2 phosphorylation, whereas LTD₄ only enhances LIMK-2 activity. The greater effect of LTB₄ than LTD₄ on cofilin-1 phosphorylation may reflect its action via both LIMK isoforms. The underlying reason for differences in actions between the two LTs remains unknown. However, LTB₄/BLT1 activates and employs a greater variety of signaling pathways than does LTD₄/cysLT1 to enhance AM FcR-mediated phagocytosis (78). Cross-talk between LT signaling and *C. albicans* signaling could conceivably involve specific cross-activation of dectin-1 and/or mannose receptors by LTD₄ and LTB₄, respectively, or translocation of those receptors to specific membrane microdomains such as lipid rafts, and association among BLT1 and/or cysLT1 and the fungal PRR(s). In this regard we have shown that BLT1 is more potent than cysLT1 in enhancing FcR-mediated phagocytosis (79). Furthermore, BLT1 associates with FcRI, forming a signaling platform composed of G proteins and kinases, and this platform is required for optimal phagocytosis (78). The observed divergence between BLT1 and cysLT1 in activating LIMKs could be due to activation of different upstream effectors. LIMK-1 is phosphorylated by p21 activated kinases (PAKs) 1–4, whereas LIMK-2 is phosphorylated by PKCδ. However, whether PKCδ is the kinase involved in LTB₄ or LTD₄-induced LIMK-2 phosphorylation remains to be determined.

Not only did LTs amplify phagocytosis, but they also increased AM candidacidal activity in a manner dependent on NADPH oxidase activation and ROI generation. We have previously confirmed the role of NADPH oxidase in LTB₄-mediated killing of *K. pneumoniae* as suggested by pharmacologic studies with AMs derived from gp91phox^{-/-} mice (14). In addition, LTB₄ can promote NADPH oxidase activation by various mechanisms, including enhancement of phosphorylation and membrane translocation of the NADPH oxidase subunit p47phox (14) and also by enhancing the expression of the gp91phox subunit (80). Interestingly, LTD₄-induced *C. albicans* killing was only partially dependent on NADPH oxidase activation. Thus, LTD₄ might induce the secretion of candidacidal molecules other than ROIs, such as nitric oxide (81) and defensins (82). Recently, Flamand *et al.* (66) administered LTB₄ intravenously to monkeys and found increased α-defensin plasma levels and enhanced *ex vivo* antimicrobial activities of plasma.

Previous studies have detailed how signals emanating from G protein-coupled LT receptors enhance AM ingestion and killing of targets recognized by the opsonic FcR (16, 78). The present work extends this concept of LT-mediated phagocytic signal amplification to ingestion via distinct PRRs recognizing *C. albicans*. We have recently reported that LTB₄/BLT1/Gα_i signaling also controls NFκB activation downstream of PRRs (36). Together, these studies highlight the emerging importance of cross-talk between LT receptors and PRR signaling.

Acknowledgment—We are grateful to Silvana Aparecida da Silva for technical assistance.

REFERENCES

1. Dictar, M. O., Maiolo, E., Alexander, B., Jacob, N., and Verón, M. T. (2000) *Med. Mycol.* **38**, 251–258
2. Kyriazis, A. P., and Kyriazis, A. A. (1993) *Diagn. Cytopathol.* **9**, 487–491
3. Yao, Z., and Liao, W. (2006) *Curr. Opin. Pulm. Med.* **12**, 222–227
4. Evans, S. E. (2010) *Proc. Am. Thorac. Soc.* **7**, 197–203
5. Jakab, G. J., Warr, G. A., and Astry, C. L. (1981) *Infect. Immun.* **34**, 610–622
6. Sawyer, R. T. (1990) *Mycopathologia* **109**, 99–109
7. Netea, M. G., and Maródi, L. (2010) *Trends Immunol.* **31**, 346–353
8. Castro, M., Ralston, N. V., Morgenthaler, T. I., Rohrbach, M. S., and Limper, A. H. (1994) *Infect. Immun.* **62**, 3138–3145
9. Parti, R. P., Loper, R., Brown, G. D., Gordon, S., Taylor, P. R., Bonventre, J. V., Murphy, R. C., Williams, D. L., and Leslie, C. C. (2010) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42**, 415–423
10. Peters-Golden, M., and Henderson, W. R., Jr. (2007) *N. Engl. J. Med.* **357**, 1841–1854
11. Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y., and Shimizu, T. (1997) *Nature* **387**, 620–624
12. Lynch, K. R., O'Neill, G. P., Liu, Q., Im, D. S., Sawyer, N., Metters, K. M., Coulombe, N., Abramovitz, M., Figueroa, D. J., Zeng, Z., Connolly, B. M., Bai, C., Austin, C. P., Chateaufort, A., Stocco, R., Greig, G. M., Kargman, S., Hooks, S. B., Hosfield, E., Williams, D. L., Jr., Ford-Hutchinson, A. W., Caskey, C. T., and Evans, J. F. (1999) *Nature* **399**, 789–793
13. Mancuso, P., Standiford, T. J., Marshall, T., and Peters-Golden, M. (1998) *Infect. Immun.* **66**, 5140–5146
14. Serezani, C. H., Aronoff, D. M., Jancar, S., Mancuso, P., and Peters-Golden, M. (2005) *Blood* **106**, 1067–1075
15. Canetti, C., Aronoff, D. M., Choe, M., Flamand, N., Wettlaufer, S., Toews, G. B., Chen, G. H., and Peters-Golden, M. (2006) *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1234–1241
16. Campos, M. R., Serezani, C. H., Peters-Golden, M., and Jancar, S. (2009) *Mol. Immunol.* **46**, 1204–1211
17. Peres, C. M., Aronoff, D. M., Serezani, C. H., Flamand, N., Faccioli, L. H., and Peters-Golden, M. (2007) *J. Immunol.* **179**, 5454–5461
18. Skerrett, S. J., Henderson, W. R., and Martin, T. R. (1990) *J. Immunol.* **144**, 1052–1061
19. Stenke, L., Laurén, L., Reizenstein, P., and Lindgren, J. A. (1987) *Exp. Hematol.* **15**, 203–207
20. Coffey, M. J., Phare, S. M., George, S., Peters-Golden, M., and Kazanjian, P. H. (1998) *J. Clin. Invest.* **102**, 663–670
21. Thorsen, S., Busch-Sørensen, M., and Søndergaard, J. (1989) *AIDS* **3**, 651–653
22. Peters-Golden, M., Canetti, C., Mancuso, P., and Coffey, M. J. (2005) *J. Immunol.* **174**, 589–594
23. Chen, X. S., Sheller, J. R., Johnson, E. N., and Funk, C. D. (1994) *Nature* **372**, 179–182
24. Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J. M., Mazerbourg, S., Pisselet, C., and Monniaux, D. (2002) *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**, 139–154
25. Serezani, C. H., Perrela, J. H., Russo, M., Peters-Golden, M., and Jancar, S. (2006) *J. Immunol.* **177**, 3201–3208
26. Serezani, C. H., Aronoff, D. M., Jancar, S., and Peters-Golden, M. (2005) *J. Leukoc. Biol.* **78**, 976–984
27. Lee, C., Tomkowicz, B., Freedman, B. D., and Collman, R. G. (2005) *J. Leukoc. Biol.* **78**, 1016–1023
28. Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., and Saltiel, A. R. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 7686–7689
29. Hu, B., Punturieri, A., Todt, J., Sonstein, J., Polak, T., and Curtis, J. L. (2002) *J. Leukoc. Biol.* **71**, 881–889
30. Mugnai, S., Ciuffi, M., Maurizi, M., Bindi, D., Franchi-Micheli, S., and Zilletti, L. (1997) *Br. J. Pharmacol.* **122**, 1345–1352
31. Smacchia, C., Rebulla, P., Drago, F., Morelatti, F., Pappalettera, M., and

- Sirchia, G. (1997) *Haematologica* **82**, 526–531
32. Aronoff, D. M., Canetti, C., and Peters-Golden, M. (2004) *J. Immunol.* **173**, 559–565
33. Káposzta, R., Maródi, L., Hollinshead, M., Gordon, S., and da Silva, R. P. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 3237–3248
34. Serezani, C. H., Chung, J., Ballinger, M. N., Moore, B. B., Aronoff, D. M., and Peters-Golden, M. (2007) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 562–570
35. Canetti, C., Hu, B., Curtis, J. L., and Peters-Golden, M. (2003) *Blood* **102**, 1877–1883
36. LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Ruland, J., and Reis e Sousa, C. (2007) *Nat. Immunol.* **8**, 630–638
37. Galès, A., Conduché, A., Bernad, J., Lefevre, L., Olganier, D., Béraud, M., Martin-Blondel, G., Linas, M. D., Auwerx, J., Coste, A., and Pipy, B. (2010) *PLoS Pathog* **6**, e1000714
38. Balestrieri, B., Maekawa, A., Xing, W., Gelb, M. H., Katz, H. R., and Arm, J. P. (2009) *J. Immunol.* **182**, 4891–4898
39. Balter, M. S., Toews, G. B., and Peters-Golden, M. (1989) *J. Immunol.* **142**, 602–608
40. Canetti, C., Serezani, C. H., Atrasz, R. G., White, E. S., Aronoff, D. M., and Peters-Golden, M. (2007) *J. Immunol.* **179**, 8350–8356
41. Chung, J., Serezani, C. H., Huang, S. K., Stern, J. N., Keskin, D. B., Jagirdar, R., Brock, T. G., Aronoff, D. M., and Peters-Golden, M. (2008) *J. Immunol.* **181**, 5501–5509
42. Gillooly, D. J., Simonsen, A., and Stenmark, H. (2001) *J. Cell Biol.* **155**, 15–17
43. Giraldo, E., Martin-Cordero, L., Hinchado, M. D., Garcia, J. J., and Ortega, E. (2010) *Mol. Cell. Biochem.* **333**, 115–120
44. Ibatá-Ombetta, S., Jouault, T., Trinel, P. A., and Poulain, D. (2001) *J. Leukoc. Biol.* **70**, 149–154
45. Allen, L. A., and Aderem, A. (1996) *Curr. Opin Immunol.* **8**, 36–40
46. Schindler, B., and Segal, E. (2008) *Med. Mycol.* **46**, 251–258
47. Deleted in proof
48. Bamberg, J. R. (1999) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 185–230
49. Adachi, R., Takeuchi, K., and Suzuki, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 45566–45571
50. Bernard, O. (2007) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1071–1076
51. Takao, S., Smith, E. H., Wang, D., Chan, C. K., Bulkley, G. B., and Klein, A. S. (1996) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **271**, C1278–C1284
52. Donini, M., Zenaro, E., Tamassia, N., and Dusi, S. (2007) *Eur. J. Immunol.* **37**, 1194–1203
53. Morré, D. J. (2002) *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 207–212
54. Ho, N. K. (1984) *Aust. Paediatr. J.* **20**, 127–130
55. Virgili, A., Zampino, M. R., and Mantovani, L. (2002) *Am. J. Clin. Dermatol.* **3**, 19–35
56. Coffey, M. J., Phare, S. M., and Peters-Golden, M. (2004) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **71**, 185–190
57. Bailie, M. B., Standiford, T. J., Laichalk, L. L., Coffey, M. J., Strieter, R., and Peters-Golden, M. (1996) *J. Immunol.* **157**, 5221–5224
58. Coffey, M. J., Phare, S. M., Cinti, S., Peters-Golden, M., and Kazanjian, P. H. (1999) *Blood* **94**, 3897–3905
59. Coffey, M. J., Phare, S. M., Kazanjian, P. H., and Peters-Golden, M. (1996) *J. Immunol.* **157**, 393–399
60. Gaudreault, E., and Gosselin, J. (2007) *Viral Immunol.* **20**, 407–420
61. Medeiros, A. I., Sá-Nunes, A., Soares, E. G., Peres, C. M., Silva, C. L., and Faccioli, L. H. (2004) *Infect. Immun.* **72**, 1637–1644
62. Duarte-Escalante, E., Zenteno, E., and Taylor, M. L. (2003) *Arch. Med. Res.* **34**, 176–183
63. Linden, J. R., Maccani, M. A., Laforce-Nesbitt, S. S., and Bliss, J. M. (2010) *Med. Mycol.* **48**, 355–364
64. Suram, S., Gangelhoff, T. A., Taylor, P. R., Rosas, M., Brown, G. D., Bonventre, J. V., Akira, S., Uematsu, S., Williams, D. L., Murphy, R. C., and Leslie, C. C. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 30676–30685
65. Hise, A. G., Tomalka, J., Ganesan, S., Patel, K., Hall, B. A., Brown, G. D., and Fitzgerald, K. A. (2009) *Cell Host Microbe* **5**, 487–497
66. Flamand, L., Tremblay, M. J., and Borgeat, P. (2007) *J. Immunol.* **178**, 8036–8045
67. Balestrieri, B., Hsu, V. W., Gilbert, H., Leslie, C. C., Han, W. K., Bonventre, J. V., and Arm, J. P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 6691–6698
68. Okamoto, F., Saeki, K., Sumimoto, H., Yamasaki, S., and Yokomizo, T. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 41113–41121
69. Kilpatrick, L. E., Sun, S., Li, H., Vary, T. C., and Korchak, H. M. (2010) *J. Leukoc. Biol.* **87**, 153–164
70. Waki, K., Inanami, O., Yamamori, T., Nagahata, H., and Kuwabara, M. (2006) *Free Radic Res.* **40**, 359–367
71. Smallwood, N. D., Hausman, B. S., Wang, X., and Liedtke, C. M. (2005) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **288**, C906–C912
72. Allen, L. A., Allgood, J. A., Han, X., and Wittine, L. M. (2005) *J. Leukoc. Biol.* **78**, 220–230
73. Massoumi, R., and Sjölander, A. (1998) *Eur. J. Cell Biol.* **76**, 185–191
74. Omann, G. M., Traynor, A. E., Harris, A. L., and Sklar, L. A. (1987) *J. Immunol.* **138**, 2626–2632
75. Costa, M. F., de Souza-Martins, R., de Souza, M. C., Benjamim, C. F., Piva, B., Diaz, B. L., Peters-Golden, M., Henriques, M. G., Canetti, C., and Penido, C. (2010) *J. Leukoc. Biol.* **87**, 323–332
76. Bierne, H., Gouin, E., Roux, P., Caroni, P., Yin, H. L., and Cossart, P. (2001) *J. Cell Biol.* **155**, 101–112
77. Lee, S., and Helfman, D. M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 1885–1891
78. Serezani, C. H., Aronoff, D. M., Sitrin, R. G., and Peters-Golden, M. (2009) *Blood* **114**, 3316–3324
79. Lee, S. P., Serezani, C. H., Medeiros, A. I., Ballinger, M. N., and Peters-Golden, M. (2009) *J. Immunol.* **182**, 530–537
80. Mancuso, P., Lewis, C., Serezani, C. H., Goel, D., and Peters-Golden, M. (2010) *Infect. Immun.* **78**, 2264–2271
81. Vázquez-Torres, A., and Balish, E. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 170–192
82. Hoover, D. M., Boulegue, C., Yang, D., Oppenheim, J. J., Tucker, K., Lu, W., and Lubkowski, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37647–37654

ANEXO B- Artigo de periódico - *Macrophage Dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis* – publicado na revista *Journal of Immunology*

Macrophage Dectin-1 Expression Is Controlled by Leukotriene B₄ via a GM-CSF/PU.1 Axis

This information is current as of June 13, 2012.

C. Henrique Serezani, Steve Kane, Latima Collins, Mariana Morato-Marques, John J. Osterholzer and Marc Peters-Golden

J Immunol published online 13 June 2012
<http://www.jimmunol.org/content/early/2012/06/13/jimmunol.1200257>

-
- Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2012/06/13/jimmunol.1200257.DC1.html>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

Macrophage Dectin-1 Expression Is Controlled by Leukotriene B₄ via a GM-CSF/PU.1 Axis

C. Henrique Serezani,* Steve Kane,* Latima Collins,* Mariana Morato-Marques,[†] John J. Osterholzer,*[‡] and Marc Peters-Golden*

Pattern recognition receptors for fungi include dectin-1 and mannose receptor, and these mediate phagocytosis, as well as production of cytokines, reactive oxygen species, and the lipid mediator leukotriene B₄ (LTB₄). The influence of G protein-coupled receptor ligands such as LTB₄ on fungal pattern recognition receptor expression is unknown. In this study, we investigated the role of LTB₄ signaling in dectin-1 expression and responsiveness in macrophages. Genetic and pharmacologic approaches showed that LTB₄ production and signaling through its high-affinity G protein-coupled receptor leukotriene B₄ receptor 1 (BLT1) direct dectin-1–dependent binding, ingestion, and cytokine production both in vitro and in vivo. Impaired responses to fungal glucans correlated with lower dectin-1 expression in macrophages from leukotriene (LT)- and BLT1-deficient mice than their wild-type counterparts. LTB₄ increased the expression of the transcription factor responsible for dectin-1 expression, PU.1, and PU.1 small interfering RNA abolished LTB₄-enhanced dectin-1 expression. GM-CSF controls PU.1 expression, and this cytokine was decreased in LT-deficient macrophages. Addition of GM-CSF to LT-deficient cells restored expression of dectin-1 and PU.1, as well as dectin-1 responsiveness. In addition, LTB₄ effects on dectin-1, PU.1, and cytokine production were blunted in GM-CSF^{−/−} macrophages. Our results identify LTB₄–BLT1 signaling as an unrecognized controller of dectin-1 transcription via GM-CSF and PU.1 that is required for fungi-protective host responses. *The Journal of Immunology*, 2012, 189: 000–000.

Protective innate immune responses require host recognition of microbes through the engagement of pattern recognition receptors (PRRs), including TLRs and C-type lectins (1). PRRs recognize highly conserved microbial motifs known as pathogen-associated molecular patterns, which include carbohydrates, peptidoglycans, and LPSs (2). Dectin-1, a C-type lectin, is the major receptor on macrophages for β-1,3-glucan, a polymer of glucose present in the fungal cell wall that stimulates phagocytosis and production of inflammatory cytokines (1). This receptor is predominantly expressed on cells of the monocyte/macrophage lineage, neutrophils, dendritic cells, and a minor subpopulation of splenic T cells (1), and its expression can be enhanced by the cytokines IL-4 (3), IL-13 (4), IL-23, and GM-CSF (3), and decreased by corticosteroids and LPS (3). It is not presently known whether dectin-1 expression can be regulated by signals emanating from G protein-coupled receptors (GPCRs).

Dectin-1 is now recognized to be the main nonopsonic receptor involved in fungal binding and uptake (5). Signal transduction after dectin-1 ligation depends on its cytoplasmic ITAM, the phosphorylation of which by Src kinase leads to the recruitment of spleen tyrosine kinase (Syk) in phagocytes (6). Dectin-1 engagement also activates phospholipase A₂ with subsequent production of eicosanoid lipid mediators including cyclooxygenase-derived prostanoids and 5-lipoxygenase (5-LO)–derived leukotrienes (LTs) such as lipid mediator leukotriene B₄ (LTB₄) (7, 8). The latter, acting via its high-affinity GPCR leukotriene B₄ receptor 1 (BLT1), is best known as a leukocyte chemoattractant (9). It has been implicated in a variety of inflammatory disease states, such as atherosclerosis and ischemia-reperfusion injury (9). Importantly, LTB₄ is also produced at sites of infection and participates in innate immune responses in vivo and in vitro (8). For example, we and others have previously shown that LTB₄ enhances ingestion of IgG-opsonized targets (10), as well as unopsonized microbes including *Leishmania amazonensis* (11), *Streptococcus pneumoniae* (12), *Candida albicans* (8), and *Histoplasma capsulatum* (13). LTB₄ can promote fungal ingestion in macrophages via both mannose and dectin-1 receptors (8). The role of specific 5-LO metabolites and receptors in modulating dectin-1–mediated responses is unknown. In this study, we demonstrate that LTB₄ synthesis and signaling via BLT1 are necessary for optimal dectin-1 expression and responsiveness in macrophages in vivo and in vitro. This form of regulation involves LTB₄–BLT1 control of GM-CSF production and subsequent expression of the dectin-1 transcription factor PU.1.

Materials and Methods

Reagents

RPMI 1640, LTB₄ and LTD₄, 5-LO inhibitors (AA861 and zileuton), and the dectin-1 antagonist laminarin prepared from *Laminaria digitata* were from Enzo Life Sciences. The mannose receptor antagonist mannan prepared from *Saccharomyces cerevisiae*, actinomycin D, polymyxin B sulfate, and pertussis toxin (PTX) were purchased from Sigma. The selective

*Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Michigan Health System, Ann Arbor, MI 48109; [†]Department of Immunology, Institute of Biomedical Science IV, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; and [‡]Pulmonary Section, Medical Service, Ann Arbor Veterans Affairs Health System, Department of Veterans Affairs Health System, Ann Arbor, MI 48105

Received for publication January 20, 2012. Accepted for publication May 14, 2012.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and National Institutes of Health Grants HL-058897 (to M.P.-G.) and HL-103777-01 (to C.H.S.).

Address correspondence and reprint requests to Dr. C. Henrique Serezani at the current address: Department of Microbiology and Immunology, 950 Walnut Street, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46022, or Dr. Marc Peters-Golden, Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, 6301 MSRB III, 1150 West Medical Center Drive, Ann Arbor, MI 48109-5642. E-mail addresses: hserezan@iupui.edu (C.H.S.) and petersm@umich.edu (M.P.-G.)

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: AM, alveolar macrophage; BAL, bronchoalveolar lavage; BLT1, leukotriene B₄ receptor 1; 5-LO, 5-lipoxygenase; LT, leukotriene; LTB₄, leukotriene B₄; PKC, protein kinase C; PRR, pattern recognition receptor; PTX, pertussis toxin; siRNA, small interfering RNA; Syk, spleen tyrosine kinase; WT, wild-type.

dectin-1 agonist curdlan from *Alcaligenes faecalis* and zymosan depleted of TLR agonists (by treatment with chloroform/methanol) (14) were from Invivogen. U75302 (BLT1 antagonist) was from Cayman Chemicals. C5a and CXCL1 were from R&D. Compounds requiring reconstitution were dissolved in either ethanol or DMSO. Required dilutions of all compounds were prepared immediately before use, and equivalent quantities of vehicle were added to the appropriate controls.

Animals

Eight-week-old female 5-LO^{-/-} mice (15) were bred in-house, and strain-matched wild-type (WT) sv/129 mice were purchased from The Jackson Laboratory. GM-CSF^{-/-} mice (16) were originally a gift from J. Whitsett (Children's Hospital, Cincinnati, OH) and were bred in-house. BLT1^{-/-} mice (17) and strain-matched WT C57BL/6 mice were obtained from The Jackson Laboratory.

Ethics statement

Mice were treated according to National Institutes of Health guidelines for the use of experimental animals, with the approval of the University of Michigan Committee for the Use and Care of Animals. All surgery was performed under sodium pentobarbital anesthesia, and all efforts were made by the attending veterinarian to minimize suffering.

Cell isolation and culture

Elicited peritoneal macrophages were harvested from the peritoneal cavities of mice by lavage with PBS 4 d after the injection of 2 ml of 3% thioglycollate, as described previously (18). Resident murine alveolar macrophages (AMs) were obtained by bronchoalveolar lavage (BAL) as described previously (18). Cells were cultured overnight in RPMI 1640 containing 10% FBS and antibiotics, and washed twice the next day with warm medium to remove nonadherent cells.

C. albicans culture

C. albicans strain CHN1 (a human pulmonary clinical isolate) was grown on Sabouraud dextrose agar plates and maintained at 4°C. Seventy-two hours before the experiment, yeast were grown to stationary phase at 37°C in Sabouraud dextrose broth (Difco; 1% neopeptone, 2% dextrose) with shaking. The cultures were washed in sterile nonpyrogenic PBS, counted with a hemocytometer, and diluted to 2×10^9 CFU/ml in sterile nonpyrogenic PBS. *C. albicans* was killed through heating for 30 min at 56°C and FITC labeled as described previously (8).

In vitro binding assay

In vitro *C. albicans* binding assays were performed as previously described (19). In brief, overnight cultures of macrophages were cooled to 4°C and washed three times with prechilled serum-containing medium. FITC-*C. albicans* was added to the macrophages at a ratio of 10 particles/cell for 1 h on ice, and cells were washed three times to remove unbound FITC-yeast and then lysed with 3% Triton X-100. FITC-*C. albicans* in lysates was quantified using a Spectramax Gemini EM fluorometer (Molecular Devices) at settings of 485 excitation/535 emission.

In vivo injection with curdlan

Curdlan (100 µg/kg) was reconstituted in PBS with 1% BSA and administered to the lungs of mice via oropharyngeal injection as described previously (20). BAL was performed by three successive instillations of 1 ml PBS, followed by gentle suction. BAL fluid from WT and 5-LO^{-/-} mice was harvested after 24 h, and levels of LTB₄, cytokines, and chemokines were measured by ELISA or by Ab-based cytokine array. The pelleted cells were subjected to cytospin, and cell counts and differentials for evaluation of neutrophil recruitment were determined by light microscopy.

Semiquantitative cytokine array

WT and 5-LO^{-/-} mice underwent intrapulmonary challenge with curdlan as described earlier and the BAL fluid was harvested 24 h later. Protein content was quantified by Bradford assay, and 50 µg protein was used for qualitative measurement of cytokine expression using the Mouse Cytokine Ab Array, Panel A (ARY006), as recommended by the manufacturer (R&D Systems, Wiesbaden, Germany).

Measurement of LTB₄

Levels of LTB₄ in the BAL fluid obtained from WT mice 24 h after intrapulmonary challenge with curdlan were determined using enzyme immunoassay kits (Cayman Chemical) as described previously (8).

Measurement of cytokine and chemokine levels

Levels of IL-12p40, IL-17A, GM-CSF, M-CSF, KC, IL-1β, and TNF-α were determined by ELISA (R&D Duoset; R&D Systems) by the University of Michigan Cancer Center Cellular Immunology Core.

Flow cytometry

For flow cytometric analysis, cells were resuspended in PBS containing 2 mM EDTA and 0.5% FCS. Fc receptor-mediated and nonspecific Ab binding was blocked by addition of excess CD16/CD32 (BD Biosciences Pharmingen). For staining, macrophages were incubated with anti-dectin-1 conjugated to FITC (1:200; BD Biosciences Pharmingen) at 4°C in the dark for 15 min. Samples were stabilized with 1% paraformaldehyde and analyzed on the same day. A FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) was used for flow cytometric characterization of cell populations, and data were analyzed with WinMDi and FlowJo Version 7.6.4 software (Tree Star).

In vivo phagocytosis assay

WT and 5-LO^{-/-} mice were subjected to intrapulmonary administration of 1 µg/ml zymosan as described earlier for curdlan, and 24 h later, cells were harvested by BAL and subjected to cytospin and stained with Diff-Quick. The number of intracellular zymosan particles was determined microscopically. The phagocytic index was generated by counting the number of macrophages containing intracellular zymosan multiplied by the number of intracellular zymosan particles.

RNA isolation and semiquantitative real-time RT-PCR

RNA from cultured cells was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and real-time RT-PCR was performed as previously described (18). Dectin-1 (*Clec7A*), dectin-2 (*Clec7F*), GM-CSF (*Gmcsf*), or PU.1 (*Sp1*) mRNAs were normalized to β-actin or GAPDH, and the respective WT control was set at 100%. WT and 5-LO^{-/-} macrophages were treated with or without 2.5 µg/ml actinomycin D (Sigma-Aldrich), and the amount of mRNA was determined after harvesting at different time points, to determine the decay of *Clec7A* mRNA. *Clec7A* mRNA was normalized to β-actin, and the respective WT control was set to 100%. Percentages were plotted against time, and decay curves were calculated.

Western blotting

A total of 2×10^6 macrophages were plated in 6-well tissue culture dishes and were incubated in the presence or absence of 100 nM LTB₄ for 24 h and then lysed in buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, and 0.2% Nonidet P-40) supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics). For immunoblot analysis, protein samples (30 µg) were mixed with loading buffer (50 mM Tris HCl [pH 6.8], 2% SDS, 100 mM DTT, 10% glycerol, and 0.1% bromophenol blue), boiled, applied to 10% SDS-polyacrylamide gels, and subjected to electrophoresis. Immunoblot analysis was performed as previously described (21), using primary Abs against dectin-1 (1:1,000; Biovision), Dectin-2 (1:500; Abcam), PU.1 and Sp.1 (both at 1:1,000; Abcam), and GAPDH (1:10,000; Sigma). Densitometric analysis was as described previously (22); the intensity of the protein band was divided by that of the GAPDH, and this ratio was then expressed relative to that of the untreated control, which was set at 100%. In all instances, density values of bands were corrected by subtraction of the background values.

RNA interference

RNA interference was performed according to a protocol provided by Dharmacon and as we have previously reported (18). WT and 5-LO^{-/-} macrophages were transfected using DharmaFECT 1 reagent with 30 nM nonspecific control or specific ON-TARGET SMARTpool *Pu.1* small interfering RNAs (siRNAs). After 48 h of transfection, macrophages were incubated with or without 100 nM LTB₄ for 24 h, and the cells were harvested for mRNA or protein analysis.

Statistics

All experiments were performed at least three times unless otherwise specified, and data are presented as the mean ± SE of the values from all experiments. Within each experiment, triplicate values were used for each condition. Comparisons among three or more experimental groups were performed with ANOVA followed by the Bonferroni analysis. Differences were considered significant if $p \leq 0.05$.

Results

LTB₄ regulates macrophage expression of dectin-1

LTB₄ can enhance PRR-mediated responses by regulating expression of MyD88 (18) and can also enhance expression of certain macrophage receptors, such as CD11b and CD11c (23). However, it is not known whether LTB₄ can influence the expression of PRRs, including dectin-1. This possibility was first examined in elicited peritoneal macrophages from WT and 5-LO^{-/-} mice, because this cell population is known to express high levels of dectin-1 (3). LT-deficient macrophages exhibited reduced baseline expression of dectin-1 mRNA, as determined by real-time RT-PCR (Fig. 1A), and protein, as determined by both FACS (Fig. 1B) and immunoblotting (Fig. 1C). Reduced dectin-1 mRNA was confirmed in WT cells treated for 24 h with a 5-LO inhibitor (Fig. 1D). Twenty-four-hour treatment with 100 ng/ml LTB₄ fully rescued dectin-1 mRNA (Fig. 1A) and protein (Fig. 1B, 1C) expression in 5-LO^{-/-} macrophages back to the levels observed in WT cells. By contrast with its effects on dectin-1, neither endogenously produced nor exogenously added LTB₄ modulated expression of dectin-2 mRNA or protein (Fig. 1E and inset). Reduced expression of dectin-1 was also observed in AMs

(Fig. 1F) and bone marrow-derived macrophages (not shown) from LT-deficient mice, and again, levels were significantly increased with 24 h treatment with LTB₄. We next determined whether the decreased dectin-1 expression correlated with lower macrophage binding of *C. albicans*. AMs from 5-LO^{-/-} mice bound substantially less *C. albicans* than did WT macrophages, but LTB₄ treatment for 24 h restored yeast binding to levels exhibited by WT cells (Fig. 1G). The importance of dectin-1 in mediating yeast binding was confirmed by showing that treatment of WT cells with the dectin-1 receptor antagonist laminarin, but not the mannose receptor antagonist mannan, decreased *C. albicans* binding to levels approximating that observed in 5-LO^{-/-} cells (Fig. 1H). The specific role of BLT1 in controlling dectin-1 expression was confirmed by demonstrating reduced baseline dectin-1 mRNA in elicited macrophages from BLT1^{-/-} mice (Fig. 1I) and from WT mice treated overnight with a BLT1 antagonist. However, because of lack of BLT1, LTB₄ was unable to restore deficient dectin-1 expression (Fig. 1I), in contrast with 5-LO^{-/-} cells. Together, these results show that LTB₄ enhances basal expression of dectin-1 mRNA and protein in various macrophage populations.

FIGURE 1. LTB₄ is necessary for basal dectin-1 expression in macrophages. **(A)** WT and 5-LO^{-/-} macrophages were treated ± 100 nM LTB₄ for 24 h, and dectin-1 mRNA was determined by real-time RT-PCR. **(B)** WT- and 5-LO^{-/-}-elicited peritoneal macrophages were probed with anti-dectin-1 Ab, and the cells were subjected to FACS analysis as described in *Materials and Methods*. Mean fluorescence intensity (MFI) is expressed as the mean ± SEM from three individual experiments. **(C)** Elicited macrophages were incubated ± LTB₄ for 24 h, and the expression of dectin-1 and GAPDH was determined by immunoblot analysis. Numbers under lanes indicate the relative density of dectin-1, determined from densitometric analysis and expressed as the mean ± SEM from three individual experiments, with the values of the WT control group set as 100%. **(D)** WT macrophages were pretreated with the 5-LO inhibitor AA-861 (10 μM) or the BLT1 antagonist U7532 (1 μM) for 24 h, and dectin-1 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR. **(E)** WT and 5-LO^{-/-} macrophages were incubated ± LTB₄ for 24 h, and the expression of dectin-2 was determined by real-time RT-PCR. **(Inset)** Dectin-2 protein abundance in WT and 5-LO^{-/-} macrophages determined by immunoblotting. **(F)** AMs were incubated ± LTB₄ for 24 h, and the expression of dectin-1 and GAPDH was determined by immunoblot analysis. Data are expressed and analyzed as in (C). **(G)** AMs from WT and 5-LO^{-/-} mice were incubated ± 100 nM LTB₄ for 24 h, and the binding capacity for 10:1 heat-killed ⁵ FITC *C. albicans* was determined as described in *Materials and Methods*. **(H)** AMs from WT mice were pretreated with mannan or laminarin (both at 100 μg/ml) for 30 min before the addition of 10:1 heat-killed ⁵ FITC *C. albicans*, and yeast binding capacity was determined as described in (G). **(I)** WT- and BLT1^{-/-}-elicited peritoneal macrophages were incubated ± LTB₄ for 24 h, and dectin-1 mRNA was determined by real-time RT-PCR. In all circumstances, data represent the mean ± SEM from three individual experiments, each performed in triplicate. **p* < 0.05 versus WT control or untreated control; #*p* < 0.001 versus untreated 5-LO^{-/-} macrophages by ANOVA.

LTB₄ regulates macrophage responses via dectin-1 in vitro and in vivo

Because LTB₄ and BLT1 signaling control dectin-1 expression, we reasoned that LTB₄ would also control host responses to dectin-1 engagement. This was tested both in vitro and in vivo. In the in vitro experiments, we used the dectin-1-selective agonist curdlan or zymosan, which is able to ligate dectin-1 but whose TLR ligands were removed by treatment with chloroform/methanol (14). Initially, we performed dose-response experiments in which elicited peritoneal macrophages from WT and 5-LO^{-/-} mice were stimulated with concentrations of curdlan or treated zymosan. TNF-α production increased in dose-dependent fashion and peaked at a dose of 100 μg/ml for both agonists. In all circumstances, 5-LO^{-/-} cells exhibited lower responsiveness to both agonists than WT macrophages (Supplemental Fig. 1A, 1B). To determine whether LTB₄ is the 5-LO product involved in dectin-1 responsiveness, 5-LO^{-/-} cells were pretreated in the presence or absence of LTB₄ for 24 h and stimulated with curdlan for another 24 h. Curdlan stimulation induced IL-12p40, TNF-α, and GM-CSF in WT macrophages, as expected, but the response to curdlan in 5-LO^{-/-} cells was significantly reduced (Fig. 2A–C). Pharmacologic inhibition of 5-LO by 24-h pretreatment with AA-861 likewise resulted in attenuation of curdlan-induced cytokine generation in WT macrophages (Fig. 2D–F). The specific role of endogenous LTB₄ in regulating responses to curdlan was evidenced by the facts that overnight LTB₄ pretreatment restored the ability of curdlan to induce IL-12p40, GM-CSF, and TNF-α levels in 5-LO^{-/-} macrophages (Fig. 2A–C), and that overnight pretreatment with the selective BLT1 antagonist U7532 prevented curdlan-induced cytokine generation to the same extent as did pharmacologic inhibition of 5-LO (Fig. 2D–F). Because curdlan preparations could be contaminated with endotoxins, we pretreated WT macrophages with the LPS inhibitor polymyxin B sulfate (10 μg/ml) before curdlan stimulation. Polymyxin B did not alter curdlan-induced TNF-α production (data not shown), which excludes a possible role for contaminating endotoxin in our curdlan preparations. Also, the primary role of dectin-1 in mediating curdlan effects was demonstrated by showing that the dectin-

1-selective antagonist laminarin, which blocks dectin-1, but not complement receptor 3 and mannose receptor (19, 24), impaired curdlan-induced TNF-α secretion by ~70% (Supplemental Fig. 2).

The dectin-1-dependent production of proinflammatory mediators in the lung in vivo was determined by oropharyngeal injection of curdlan in WT and 5-LO^{-/-} mice. Twenty-four hours after curdlan injection, high levels of LTB₄ were measured in BAL fluid of WT mice (Fig. 3A), verifying that generation of this lipid mediator is a component of the host response to dectin-1 ligation. Next, we determined the pattern of cytokine/chemokine secretion in the BAL fluid of WT and 5-LO^{-/-} mice using an Ab-based array. 5-LO^{-/-} mice were globally less responsive to curdlan than were WT mice (Fig. 3B). This finding was confirmed by ELISA determination of individual mediators in BAL fluid. Levels of TNF-α, KC, and M-CSF were decreased by at least 70% in fluid from 5-LO^{-/-} mice, whereas levels of IL-12p40, IL-1β, IL-17A, and IL-23 were decreased by ~30–50% (Fig. 3C–I). The recruitment of neutrophils to the lung of 5-LO^{-/-} mice in response to curdlan challenge was also lower than in WT animals (Fig. 3J). After intrapulmonary challenge with zymosan, LT-deficient mice also manifested significantly lower in vivo ingestion of the yeast particles by macrophages (Fig. 3K), but not by neutrophils (data not shown). These findings indicate that LTB₄ produced in response to dectin-1 engagement amplifies macrophage phagocytosis, cytokine secretion, and neutrophil recruitment.

LTB₄ enhances dectin-1 expression by a transcriptional mechanism involving PU.1

Because LTB₄ can modulate the mRNA turnover rate of SOCS-1 in macrophages (18), we considered the possibility that it may increase dectin-1 mRNA expression by enhancing message stability. This was examined by comparing its decay in WT and 5-LO^{-/-} macrophages. At various time points after addition of actinomycin D to block the formation of new transcripts, cells were processed for real-time RT-PCR analysis. No difference in mRNA stability was observed between 5-LO^{-/-} and WT macrophages (Fig. 4A), which suggests instead that reduced dectin-1 mRNA in 5-LO^{-/-} cells reflects a transcriptional defect.

FIGURE 2. LTB₄ is necessary for dectin-1 responses in macrophages. (A–C) WT and 5-LO^{-/-} macrophages were pretreated ± LTB₄ for 24 h, then incubated with the dectin-1 selective agonist curdlan (100 μg/ml) for another 24 h before determination of IL-12 p40 (A), TNF-α (B), and GM-CSF (C) levels by ELISA. (D–F) WT macrophages were incubated with the 5-LO inhibitor AA-861 (10 μM) or the BLT1 antagonist U7532 (1 μM) for 24 h, followed by curdlan stimulation for 24 h, and IL-12 p40 (D), TNF-α (E), and GM-CSF (F) levels were determined by ELISA. Data represent the mean ± SEM from three individual experiments, each performed in triplicate. **p* < 0.05 versus WT control or untreated control; #*p* < 0.01 versus untreated 5-LO^{-/-} macrophages or untreated WT and stimulated with curdlan by ANOVA.

FIGURE 3. LT biosynthesis is required for optimal pulmonary antifungal responses. (A) WT mice were oropharyngeally administered 100 μ g/ml curdian, and 24 h later, BAL fluid was harvested and LTB₄ was measured by enzyme immunoassay. (B) BAL fluid was harvested from WT and 5-LO^{-/-} mice 24 h after intrapulmonary administration of curdian and subjected to cytokine/chemokine Ab array as described in *Materials and Methods*. Adjacent dots represent cytokine/chemokine expression from two independent experiments. Equal protein loading is demonstrated by loading controls, as indicated by the oval labels. Identities of mediators highlighted by the rectangles are as labeled in the bottom panel. Experiment representative of two independent experiments. (C–I) BAL fluid from WT and 5-LO^{-/-} mice challenged with curdian as in (B) was harvested, and levels of TNF- α (C), KC (D), M-CSF (E), IL-12p40 (F), IL-1 β (G), IL-17A (H), and IL-23 (I) were determined by ELISA. (J) BAL fluid from curdian-challenged WT and 5-LO^{-/-} mice was subjected to cytospin, stained with Diff-Quick, and the neutrophil counts were determined microscopically; values are expressed as a percentage of the neutrophil count found in WT mice, which was 60 ± 4 /mouse when at least 200 cells were counted. (K) WT and 5-LO^{-/-} mice were challenged with zymosan (10 μ g/ml) via the oropharyngeal route, and 24 h later, BAL cells were subjected to cytospin and the number of intracellular zymosan particles determined microscopically from cells stained with Diff-Quick; phagocytic index was determined as described in *Materials and Methods*. Data represent the means $\pm$ SEM from at least three independent experiments with six mice per genotype. * p < 0.05 versus WT control; # p < 0.01 versus untreated 5-LO^{-/-} macrophages by ANOVA.

Transcription factors for dectin-1 include PU.1 (25), Sp1 (25), and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (4). We examined the effects of LT deficiency and exogenous LTB₄ on levels of these transcription factors. Elicited peritoneal (Fig. 4B) and resident alveolar (Fig. 4C) macrophages from 5-LO^{-/-} mice both exhibited less PU.1 than did cells from WT mice. Overnight treatment of 5-LO^{-/-} cells with LTB₄ largely restored PU.1 protein expression to WT levels in both populations of macrophages (Fig. 4B, 4C) and drove PU.1 mRNA in elicited peritoneal macrophages to levels that far exceeded WT (Fig. 4D). By contrast, neither Sp1 protein (Fig. 4B) nor mRNA (data not shown) levels were reduced compared with WT cells. Likewise, no re-

duction in peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression was observed in 5-LO^{-/-} macrophages (data not shown). To investigate the importance of PU.1 for BLT1-mediated dectin-1 expression, we used siRNA to knock down this transcription factor in elicited WT macrophages. We achieved $\sim 75\%$ knockdown of PU.1 mRNA (Fig. 4E) and $\sim 55\%$ knockdown of protein (Fig. 4G), when compared with control siRNA. PU.1 silencing decreased dectin-1 mRNA (Fig. 4F) and protein (Fig. 4G) expression by $\sim 55\%$. In addition, PU.1 siRNA abolished LTB₄ enhancement of dectin-1 expression (Fig. 4F, 4G). These data show that LTB₄ enhancement of dectin-1 involves upregulated expression of its transcription factor, PU.1.

FIGURE 4. PU.1 mediates LTB₄-enhanced dectin-1 expression in macrophages. **(A)** Dectin-1 mRNA decay in WT and 5-LO^{-/-} macrophages harvested after treatment with actinomycin D (2.5 μg/ml). Data are from three experiments in triplicate; values are relative to untreated macrophages from both genotypes. **(B)** WT- and 5-LO^{-/-}-elicited peritoneal macrophages or **(C)** resident AMs were treated ± LTB₄ for 24 h, and the expression of PU.1, Sp1, and GAPDH was determined by immunoblotting. Numbers under lanes indicate relative density of PU.1 from three independent experiments. **(D)** PU.1 mRNA expression was determined by real-time RT-PCR in WT- and 5-LO^{-/-}-elicited macrophages incubated ± LTB₄ for 24 h. **(E)** WT macrophages were treated for 48 h in the presence of scrambled siRNA (siControl) or PU.1 siRNA, and the expression of PU.1 mRNA was determined by real-time RT-PCR and expressed relative to values in siControl cells. **(F)** Dectin-1 mRNA and **(G)** protein expression in WT macrophages treated with PU.1 and control siRNA, as determined by real-time RT-PCR and immunoblotting, respectively; mRNA levels are expressed relative to those in siControl-treated WT cells. Immunoblot is representative of three independent experiments. Numbers under lanes indicate relative density of dectin-1 or PU.1 from three independent experiments. Data represent the mean ± SEM from three individual experiments, each performed in triplicate. **p* < 0.05 versus WT or WT siControl; #*p* < 0.05 versus 5-LO^{-/-} control or LTB₄-stimulated siControl macrophages by ANOVA.

BLT1/Gαi plays a nonredundant role in enhancing dectin-1 and PU.1 expression

Although BLT1 can couple to both Gαi and Gαq in macrophages (26), numerous activation responses in macrophages preferentially involve Gαi signaling (18). To determine the importance of Gαi in LTB₄/BLT1 control of dectin-1 expression, we tested the ability of pretreatment with the Gαi inhibitor PTX to interfere with basal and LTB₄-enhanced dectin-1 mRNA. PTX treatment for 24 h decreased basal dectin-1 expression and also prevented the enhancement in dectin-1 expression elicited by LTB₄ (Fig. 5A), suggesting that constitutive Gαi signaling is required for dectin-1 expression and that LTB₄/BLT1 signaling requires Gαi. Because other Gαi-coupled receptors besides BLT1 are expressed and promote activation responses in macrophages, we tested whether other selected ligands could also enhance dectin-1 expression. Neither C5a nor CXCL1 was capable of increasing dectin-1 mRNA expression (Fig. 5B), suggesting a nonredundant role for BLT1/Gαi signaling in controlling the expression of this PRR. The importance of Gαi signaling in controlling PU.1 expression was also studied. PTX treatment of elicited macrophages revealed that Gαi signaling is necessary for baseline PU.1 expression and for LTB₄/BLT1 enhancement of PU.1 expression (Fig. 5C), as it was for dectin-1 expression (Fig. 5A).

GM-CSF is a critical mediator of LTB₄-enhanced PU.1 and dectin-1 expression

GM-CSF upregulates PU.1 (27) and dectin-1 (3) expression in macrophages. However, it is unknown whether endogenously produced GM-CSF is also required for dectin-1 expression. It is also unknown whether GM-CSF participates in the LTB₄ amplification of dectin-1 and PU.1. To evaluate this possibility, we initially determined the levels of GM-CSF in 5-LO^{-/-} and WT-elicited peritoneal macrophage cultures. Expression of both mRNA (Fig. 6A) and protein (Fig. 6B) was decreased in LT-deficient cells when compared with WT macrophages. Overnight treatment of 5-LO^{-/-} cells with LTB₄ restored GM-CSF mRNA and protein levels beyond the WT range (Fig. 6A, 6B). To determine whether the lower GM-CSF expression in 5-LO^{-/-} cells was responsible for their decreased PU.1 and dectin-1 expression, we pretreated LT-deficient cells with GM-CSF for 24 h and determined dectin-1 and PU.1 mRNA expression. GM-CSF treatment (10 ng/ml) significantly augmented baseline expression of both dectin-1 (Fig. 6C) and PU.1 (Fig. 6D) in WT cells and also overcame their deficient expression in 5-LO^{-/-} macrophages. As expected, the restored dectin-1 expression achieved by GM-CSF treatment also rescued responsiveness to curdlan in LT-deficient cells, as shown by the production of IL-12p40 (Fig. 6E) and TNF-α (Fig. 6F).

FIGURE 5. G α i signaling is required for LTB₄/BLT1-induced dectin-1 and PU.1 expression in macrophages. **(A)** WT-elicited macrophages were pretreated with PTX (600 ng/ml) for 24 h and incubated with or without LTB₄ for another 24 h, after which RNA was isolated for dectin-1 mRNA determination by real-time RT-PCR. **(B)** WT macrophages were treated for 24 h with LTB₄ (100 nM), C5a (50 ng/ml), or CXCL1 (20 ng/ml), and dectin-1 mRNA was determined by real-time RT-PCR. **(C)** WT macrophages were pretreated with PTX for 24 h and incubated with or without LTB₄ for another 24 h, after which RNA was isolated for PU.1 mRNA determination by real-time RT-PCR. Data represent the mean $\pm$ SEM from three individual experiments, each performed in triplicate, and are expressed relative to untreated macrophages. * p < 0.05 versus WT control or untreated control; # p < 0.001 versus macrophages incubated with LTB₄ only by ANOVA.

To determine whether endogenous GM-CSF is required for PU.1 and dectin-1 expression, we measured the expression of these mRNAs in elicited macrophages from GM-CSF-deficient and WT mice by real-time RT-PCR. As expected (28), PU.1 (Fig. 6G)

expression was lower in GM-CSF^{-/-} than WT macrophages. Accordingly, dectin-1 (Fig. 6H) expression was also markedly lower in GM-CSF^{-/-} than WT cells. Importantly, overnight treatment with LTB₄ was unable to enhance either PU.1 (Fig. 6G) or dectin-1 (Fig. 6H) expression in GM-CSF-deficient macrophages, as it was in WT cells. As predicted on the basis of decreased dectin-1 expression, GM-CSF^{-/-} macrophages exhibited lower cytokine generation in response to curdlan than did WT macrophages (Fig. 6I, 6J). Moreover, overnight LTB₄ treatment was unable to potentiate curdlan-induced cytokine production in GM-CSF-deficient cells as it was in WT cells (Fig. 6I, 6J). These results indicate that LTB₄/BLT1 regulation of dectin-1 expression and responsiveness in macrophages depends on an autocrine loop involving GM-CSF potentiation of PU.1 (Fig. 7).

Discussion

We provide evidence in this article that the GPCR BLT1 is a central determinant of dectin-1 expression and of host responses to fungi recognized by this PRR, and perhaps others that recognize the β -glucan moiety. Our findings also reveal a previously unrecognized interplay between the cytokine GM-CSF and LTB₄ that mediates this effect. More specifically, we have shown that: 1) homeostatic LTB₄ production is required for dectin-1 responsiveness in vivo and in vitro; 2) LTB₄/BLT1/G α i signaling is necessary for basal dectin-1 expression; 3) LTB₄ enhances the expression of the transcription factor PU.1, which, in turn, controls dectin-1 expression; and 4) GM-CSF is a key mediator of LTB₄-induced PU.1 and dectin-1 expression in macrophages. A

FIGURE 6. GM-CSF mediates the enhancement by LTB₄ of PU.1 and dectin-1 in macrophages. **(A)** GM-CSF mRNA expression was determined by real-time RT-PCR in WT and 5-LO^{-/-} macrophages incubated $\pm$ LTB₄ for 24 h. **(B)** GM-CSF protein was determined by ELISA in WT and 5-LO^{-/-} macrophages incubated $\pm$ LTB₄ for 24 h. **(C and D)** WT and 5-LO^{-/-} macrophages were treated with GM-CSF (10 ng/ml) for 24 h, and the expression of dectin-1 (C) or PU.1 (D) mRNA was determined. **(E and F)** WT and 5-LO^{-/-} macrophages were pretreated with GM-CSF for 24 h and then stimulated with curdlan (100 μ g/ml) for another 24 h, after which the supernatant levels of IL-12p40 (E) or TNF- α (F) were determined by ELISA. **(G and H)** WT and GM-CSF^{-/-} macrophages were treated $\pm$ LTB₄ for 24 h, and the expression of dectin-1 (G) and PU.1 (H) mRNA was determined by real-time RT-PCR. **(I and J)** WT and GM-CSF^{-/-} macrophages were pretreated $\pm$ LTB₄ for 24 h followed by curdlan for another 24 h, and the supernatant was harvested to determine levels of TNF- α (I) and IL-12p40 (J) by ELISA. Data represent the mean $\pm$ SEM from three individual experiments, each performed in triplicate. * p < 0.05 versus WT control; # p < 0.05 versus 5-LO^{-/-} alone or LTB₄-stimulated macrophages; & p < 0.05 versus 5-LO^{-/-} macrophages incubated with curdlan only by ANOVA.

FIGURE 7. Proposed model of LTB₄/BLT1 regulation of GM-CSF and PU.1 expression and enhancement of dectin-1 expression and responsiveness. Basal or dectin-1-activated LTB₄/BLT1 signaling elicits Gαi activation that results in enhanced expression of GM-CSF. This cytokine potentiates expression of PU.1, which carries out transcription of dectin-1, augmenting dectin-1 protein expression and responsiveness, as evidenced by binding, phagocytosis, cytokine secretion, and neutrophil recruitment in response to challenge with *C. albicans*, zymosan, or the fungal glucan curdlan. LTB₄ generation in response to dectin-1 ligation represents an autocrine self-amplifying loop.

scheme illustrating the relevant events is depicted in Fig. 7. Because LTB₄ production is a component of the host response to fungal infections (8) and because dectin-1 is a major recognition receptor for numerous fungi, including species of *Candida*, *Aspergillus*, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*, and *Pneumocystis carinii* (29), our findings suggest a potentially broad role for LTB₄ in antifungal defense. Indeed, a protective role for endogenous LTB₄ has been described in a murine model of pulmonary histoplasmosis (30). Moreover, dectin-1 may also participate in recognition of other microbes, including mycobacteria (31), and it is interesting to note that potential roles for LTB₄ have been identified in defense against mycobacterial infections in both humans (32) and mouse models (33).

We used both genetic and pharmacologic approaches to interrupt either LTB₄ synthesis or signaling via its GPCR, BLT1. Together, these establish that basal elaboration of LTB₄ and ligation of BLT1 was necessary for optimal dectin-1-dependent responses, including in vitro macrophage binding of *C. albicans* and cytokine production in response to curdlan, as well as in vivo phagocytosis, cytokine generation, and neutrophil recruitment. Indeed, the concentration of LTB₄ elaborated constitutively by elicited peritoneal macrophages (100 pg/ml, equivalent to 0.5 nM) (18) substantially exceeds that necessary to amplify macrophage antimicrobial functions via BLT1 (0.01 nM) (26).

In addition to modulating the expression of dectin-1, LTB₄ could also potentiate the signals derived from this and other fungal PRRs. Dectin-1 signaling is mediated mainly by Syk, which is responsible for optimal TNF-α secretion, and Raf/MAPK, which is responsible for IL-12 production (6). The fact that TNF-α production in the lungs of 5-LO^{-/-} mice was more impaired relative to WT mice than was IL-12p40 production suggests that LTB₄ may exert an additional potentiating effect directed at activation of Syk. Such a potentiating effect by LTB₄/BLT1 on Syk activation has been previously noted in the context of macrophage phagocytosis via the Fcγ receptor (21), which, like dectin-1, also signals via an ITAM-Syk mechanism (6). In any case, our findings demonstrate that LTB₄ is essential for fungal engagement of

dectin-1 to elicit Th1- and Th17-type responses that participate in antifungal immunity (34). These effects on dectin-1 are not the only mechanism by which LTB₄ can potentiate PRR pathways. We have recently reported that by enhancing expression of the adaptor protein MyD88, BLT1 signaling increases MyD88-dependent NF-κB activation that is an integral component of the host responses to various TLR and cytokine receptors (18). This effect on MyD88 expression would be expected to have broad implications for enhancing innate immunity, and it is possible that other PRRs or their downstream partners might also be targets for modulation by LTB₄. Although LTB₄ has also been reported to enhance the expression of certain leukocyte cell surface receptors, including CD11b and CD11c in human monocytes and IL-2Rβ in human lymphocytes (23), we are not aware of any previous reports indicating its capacity to specifically regulate expression of a PRR. Among the transcription factors that control dectin-1 expression, only PU.1 expression was downregulated in 5-LO^{-/-} macrophages, and LTB₄ was capable of enhancing its expression. PU.1 is an *ets*-family transcription factor that regulates myeloid lineage development (35). PU.1 gene disruption abolishes macrophage and B lymphocyte production, and delays neutrophil and T lymphocyte production (36). PU.1 also participates in the transcriptional control of various genes involved in macrophage activation, such as TLR4 (37), CD14 (38), mannose receptor (39), CLEC5A (40), and FcRI-III (41). Our finding that LTB₄ controls PU.1 expression represents a means by which this lipid mediator might similarly promote the transcription of other PRRs and functionally related receptors. This will be the subject of future studies.

Gαi signaling and GM-CSF production elicited by LTB₄/BLT1 were critical for its ability to enhance PU.1 expression and subsequent dectin-1 expression. Because a variety of Gαi-coupled receptors are present in macrophages, one could speculate that other Gαi-coupled ligands should exert similar effects as LTB₄ on dectin-1 and PU.1 expression. Surprisingly, neither C5a nor CXCL1 enhanced dectin-1 expression, which supports the findings from BLT1^{-/-} cells, in which expression of other Gαi-coupled receptors are intact, that LTB₄/BLT1/Gαi signaling controls dectin-1 transcription in a nonredundant manner. The reasons for this nonredundant role are unknown but could reflect unique signaling programs or efficiency of BLT1, or specific spatially defined molecular interactions with dectin-1.

In addition to its ability to induce PU.1 expression, LTB₄ could also potentiate its transcriptional activation. For instance, PU.1 activation is known to be controlled by protein kinase C (PKC)-δ-mediated phosphorylation (42), and LTB₄ activates PKC-δ in macrophages to enhance phagocytosis (43). The possible role of PKC-δ in this axis remains to be clarified.

The regulation of dectin-1 expression is not extensively studied, but it is known that GM-CSF (3) is among the cytokines that can enhance its expression. GM-CSF exhibits a wide range of effects in macrophages, promoting maturation (44), differentiation (44), cytokine secretion (45), and phagocytosis of opsonized (41) and nonopsonized targets (46). Generation of the GM-CSF-deficient mouse was instrumental in elucidating the role of this cytokine in host defense (44). These mice exhibit reduced pulmonary clearance of various microbial pathogens, including group B *Streptococcus* (47), *Pneumocystis carinii* (48), *Mycobacterium tuberculosis* (49), *Leishmania major* (50), and *Cryptococcus neoformans* (51). Because both GM-CSF and LTB₄ play pivotal roles in host defense, it is possible that cross talk between these two molecules contributes to their capacities to enhance macrophage function. Indeed, GM-CSF protein and mRNA levels were lower in 5-LO^{-/-} macrophages than in WT cells, and LTB₄

challenge enhanced GM-CSF production. The molecular mechanisms by which LTB₄/BLT1 controls GM-CSF mRNA expression await future investigation. However, that lower GM-CSF production is indeed responsible for lower dectin-1 and PU.1 expression was evidenced by the fact that addition of this cytokine to LT-deficient cells restored dectin-1 and PU.1 production, as well as curdlan responsiveness. Although we have previously reported that GM-CSF enhances macrophage LT generation (52), its ability to enhance dectin-1 expression in 5-LO^{-/-} macrophages indicates that this effect is independent of LTB₄ synthesis.

Our findings reveal a novel form of regulation in which BLT1, a GPCR ligated at sites of infection, modulates transcription of the important fungal PRR dectin-1 via a GM-CSF/PU.1 cascade. Cross talk between BLT1 signaling and PRRs would be anticipated to participate in shaping nascent innate immune responses to infections. However, this network is likely disabled in states of immunosuppression characterized by deficient LTB₄ synthesis, such as malnutrition (9), infection with HIV (9), cigarette smoking (9), and bone marrow transplantation (9). These data provide important insights and new opportunities to modulate innate immune and inflammatory responses to pathogens.

Acknowledgments

We thank members of the Peters-Golden laboratory and Ana Paula Moreira for thoughtful input.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Reid, D. M., N. A. Gow, and G. D. Brown. 2009. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr. Opin. Immunol.* 21: 30–37.
- Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30: 16–34.
- Willment, J. A., H. H. Lin, D. M. Reid, P. R. Taylor, D. L. Williams, S. Y. Wong, S. Gordon, and G. D. Brown. 2003. Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 171: 4569–4573.
- Galès, A., A. Conduché, J. Bernad, L. Lefevre, D. Ollagnier, M. Béraud, G. Martin-Blondel, M. D. Linas, J. Auwerx, A. Coste, and B. Pipy. 2010. PPARγ controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 6: e1000714.
- Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall, and S. Gordon. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.* 197: 1119–1124.
- Rogers, N. C., E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. L. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown, and C. Reis e Sousa. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22: 507–517.
- Balestrieri, B., V. W. Hsu, H. Gilbert, C. C. Leslie, W. K. Han, J. V. Bonventre, and J. P. Arm. 2006. Group V secretory phospholipase A2 translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 281: 6691–6698.
- Morato-Marques, M., M. R. Campos, S. Kane, A. P. Rangel, C. Lewis, M. N. Ballinger, S. H. Kim, M. Peters-Golden, S. Jancar, and C. H. Serezani. 2011. Leukotrienes target F-actin/cofilin-1 to enhance alveolar macrophage antifungal activity. *J. Biol. Chem.* 286: 28902–28913.
- Peters-Golden, M., and W. R. Henderson, Jr. 2007. Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.* 357: 1841–1854.
- Canetti, C., D. M. Aronoff, M. Choe, N. Flamand, S. Wettlaufer, G. B. Toews, G. H. Chen, and M. Peters-Golden. 2006. Differential regulation by leukotrienes and calcium of Fc gamma receptor-induced phagocytosis and Syk activation in dendritic cells versus macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 79: 1234–1241.
- Serezani, C. H., J. H. Perrella, M. Russo, M. Peters-Golden, and S. Jancar. 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J. Immunol.* 177: 3201–3208.
- Mancuso, P., C. Lewis, C. H. Serezani, D. Goel, and M. Peters-Golden. 2010. Intrapulmonary administration of leukotriene B₄ enhances pulmonary host defense against pneumococcal pneumonia. *Infect. Immun.* 78: 2264–2271.
- Nicotele, R., A. Secatto, P. A. Pereira, E. G. Soares, and L. H. Faccioli. 2009. Leukotriene B₄-loaded microspheres as a new approach to enhance antimicrobial responses in Histoplasma capsulatum-infected mice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34: 365–369.
- Ikeda, Y., Y. Adachi, T. Ishii, N. Miura, H. Tamura, and N. Ohno. 2008. Dissociation of Toll-like receptor 2-mediated innate immune response to Zymosan by organic solvent-treatment without loss of Dectin-1 reactivity. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 13–18.
- Chen, X. S., J. R. Sheller, E. N. Johnson, and C. D. Funk. 1994. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature* 372: 179–182.
- Wilkins, H. J., M. M. Crane, K. Copeland, and W. V. Williams. 2005. Hyper-eosinophilic syndrome: an update. *Am. J. Hematol.* 80: 148–157.
- Tager, A. M., S. K. Bromley, B. D. Medoff, S. A. Islam, S. D. Bercury, E. B. Friedrich, A. D. Carafone, R. E. Gerszten, and A. D. Luster. 2003. Leukotriene B₄ receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat. Immunol.* 4: 982–990.
- Serezani, C. H., C. Lewis, S. Jancar, and M. Peters-Golden. 2011. Leukotriene B₄ amplifies NF-κB activation in mouse macrophages by reducing SOCS1 inhibition of MyD88 expression. *J. Clin. Invest.* 121: 671–682.
- Brown, G. D., P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. Wong, and S. Gordon. 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 196: 407–412.
- Rand, T. G., M. Sun, A. Gilyan, J. Downey, and J. D. Miller. 2010. Dectin-1 and inflammation-associated gene transcription and expression in mouse lungs by a toxic (1,3)-beta-D glucan. *Arch. Toxicol.* 84: 205–220.
- Canetti, C., B. Hu, J. L. Curtis, and M. Peters-Golden. 2003. Syk activation is a leukotriene B₄-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. *Blood* 102: 1877–1883.
- LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8: 630–638.
- Flamand, N., P. Mancuso, C. H. Serezani, and T. G. Brock. 2007. Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2657–2670.
- Brown, G. D., and S. Gordon. 2001. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413: 36–37.
- Zhang, C., S. H. Wang, C. P. Liao, S. Shao, M. E. Lasbury, P. J. Durant, and C. H. Lee. 2010. Downregulation of PU.1 leads to decreased expression of Dectin-1 in alveolar macrophages during *Pneumocystis pneumonia*. *Infect. Immun.* 78: 1058–1065.
- Peres, C. M., D. M. Aronoff, C. H. Serezani, N. Flamand, L. H. Faccioli, and M. Peters-Golden. 2007. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *J. Immunol.* 179: 5454–5461.
- Bonfield, T. L., B. Raychaudhuri, A. Malur, S. Abraham, B. C. Trapnell, M. S. Kavuru, and M. J. Thomassen. 2003. PU.1 regulation of human alveolar macrophage differentiation requires granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 285: L1132–L1136.
- Shibata, Y., P. Y. Berclaz, Z. C. Chronos, M. Yoshida, J. A. Whitsett, and B. C. Trapnell. 2001. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 15: 557–567.
- Brown, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 33–43.
- Medeiros, A. I., A. Sá-Nunes, E. G. Soares, C. M. Peres, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2004. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect. Immun.* 72: 1637–1644.
- Schorey, J. S., and C. Lawrence. 2008. The pattern recognition receptor Dectin-1: from fungi to mycobacteria. *Curr. Drug Targets* 9: 123–129.
- Keefe, D. M., M. M. Schubert, L. S. Elting, S. T. Sonis, J. B. Epstein, J. E. Raber-Durlacher, C. A. Migliorati, D. B. McGuire, R. D. Hutchins, and D. E. Peterson; Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. 2007. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer* 109: 820–831.
- Peres, C. M., L. de Paula, A. I. Medeiros, C. A. Sorgi, E. G. Soares, D. Carlos, M. Peters-Golden, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2007. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 9: 483–489.
- Netea, M. G., and L. Maródi. 2010. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol.* 31: 346–353.
- Oikawa, T., T. Yamada, F. Kihara-Negishi, H. Yamamoto, N. Kondoh, Y. Hitomi, and Y. Hashimoto. 1999. The role of Ets family transcription factor PU.1 in hematopoietic cell differentiation, proliferation and apoptosis. *Cell Death Differ.* 6: 599–608.
- Scott, E. W., M. C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265: 1573–1577.
- Rehli, M., A. Poltorak, L. Schwarzfischer, S. W. Krause, R. Andreesen, and B. Beutler. 2000. PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human Toll-like receptor 4 gene. *J. Biol. Chem.* 275: 9773–9781.
- Berclaz, P. Y., B. Carey, M. D. Fillipi, K. Werne-Dollries, N. Geraci, S. Cush, T. Richardson, J. Kitzmiller, M. O'Connor, C. Hermoyan, et al. 2007. GM-CSF regulates a PU.1-dependent transcriptional program determining the pulmonary response to LPS. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 36: 114–121.
- Eichbaum, Q., D. Heney, D. Ravet, M. Chung, M. Davidson, J. Epstein, and R. A. Ezekowitz. 1997. Murine macrophage mannose receptor promoter is regulated by the transcription factors PU.1 and SP1. *Blood* 90: 4135–4143.

40. Batliner, J., M. M. Mancarelli, M. Jenal, V. A. Reddy, M. F. Fey, B. E. Torbett, and M. P. Tschan. 2011. CLEC5A (MDL-1) is a novel PU.1 transcriptional target during myeloid differentiation. *Mol. Immunol.* 48: 714–719.
41. Berclaz, P. Y., Y. Shibata, J. A. Whitsett, and B. C. Trapnell. 2002. GM-CSF, via PU.1, regulates alveolar macrophage FcγR-mediated phagocytosis and the IL-18/IFN-γ-mediated molecular connection between innate and adaptive immunity in the lung. *Blood* 100: 4193–4200.
42. Hamdorf, M., A. Berger, S. Schüle, J. Reinhardt, and E. Flory. 2011. PKCδ-induced PU.1 phosphorylation promotes hematopoietic stem cell differentiation to dendritic cells. *Stem Cells* 29: 297–306.
43. Campos, M. R., C. H. Serezani, M. Peters-Golden, and S. Jancar. 2009. Differential kinase requirement for enhancement of Fc γR-mediated phagocytosis in alveolar macrophages by leukotriene B₄ vs. D₄. *Mol. Immunol.* 46: 1204–1211.
44. Trapnell, B. C., and J. A. Whitsett. 2002. Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu. Rev. Physiol.* 64: 775–802.
45. Page, A. V., and W. C. Liles. 2008. Granulocyte colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and other immunomodulatory therapies for the treatment of infectious diseases in solid organ transplant recipients. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13: 575–580.
46. Richardson, M. D., C. E. Brownlie, and G. S. Shankland. 1992. Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by GM-CSF-activated human neutrophils. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 433–441.
47. LeVine, A. M., J. A. Reed, K. E. Kurak, E. Cianciolo, and J. A. Whitsett. 1999. GM-CSF-deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection. *J. Clin. Invest.* 103: 563–569.
48. Paine, R., III, A. M. Preston, S. Wilcoxon, H. Jin, B. B. Siu, S. B. Morris, J. A. Reed, G. Ross, J. A. Whitsett, and J. M. Beck. 2000. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the innate immune response to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J. Immunol.* 164: 2602–2609.
49. Gonzalez-Juarrero, M., J. M. Hattle, A. Izzo, A. P. Junqueira-Kipnis, T. S. Shim, B. C. Trapnell, A. M. Cooper, and I. M. Orme. 2005. Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Leukoc. Biol.* 77: 914–922.
50. Solbach, W., J. Greil, and M. Rölinghoff. 1987. Anti-infectious responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice injected with recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 138: 759–762.
51. Chen, G. H., M. A. Olszewski, R. A. McDonald, J. C. Wells, R. Paine, III, G. B. Huffnagle, and G. B. Toews. 2007. Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in host defense against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection during murine allergic bronchopulmonary mycosis. *Am. J. Pathol.* 170: 1028–1040.
52. Brock, T. G., R. W. McNish, M. J. Coffey, T. C. Ojo, S. M. Phare, and M. Peters-Golden. 1996. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on eicosanoid production by mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 156: 2522–2527.