ANGELA SATIE NISHIKAKU

**ESTUDO DE PROTEINASES E CITOCINAS
NA RESPOSTA GRANULOMATOSA EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

ANGELA SATIE NISHIKAKU

**ESTUDO DE PROTEINASES E CITOCINAS
NA RESPOSTA GRANULOMATOSA EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Imunologia).**

São Paulo

2008

ANGELA SATIE NISHIKAKU

**ESTUDO DE PROTEINASES E CITOCINAS
NA RESPOSTA GRANULOMATOSA EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Imunologia).**

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Eva Burger

São Paulo

2008

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

reprodução não autorizada pelo autor

Nishikaku, Angela Satie.

Estudo de proteinases e citocinas na resposta granulomatosa em camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* / Angela Satie Nishikaku. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Eva Burger.

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

Versão do título para o inglês: Study on proteinases and cytokines in the granulomatous response of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*.

Descritores: 1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Granuloma 3. Paracoccidioidomicose 4. Citocinas 5. Matriz extracelular 6. Metaloproteinases I. Burger, Eva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB066/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Angela Satie Nishikaku.

Título da Tese: Estudo de proteinases e citocinas na resposta
granulomatosa em camundongos infectados com
Paracoccidioides brasiliensis.

Orientador(a): Eva Burger.

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 para uso de animais em experimentação nº 081/03, sobre o projeto intitulado **“Proteinases com atividade lítica sobre os componentes da matriz extracelular: participação nos mecanismos reguladores da infecção granulomatosa desenvolvida em camundongos resistentes e suscetíveis ao *Paracoccidioides brasiliensis*”**, sob a responsabilidade de **Angela Satie Nishikaku**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **22/09/2003**.

(We certify that the protocol nº 081/03, about **“Proteinases with lytic activity on extracellular matrix components: participation in the regulatory mechanisms of the granulomatous infection developed in resistant and susceptible mice to *Paracoccidioides brasiliensis*”** agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **22/09/2003** meeting.)

São Paulo, 23 de setembro de 2003.

Prof. Dra. Sonia Malheiros L. Sanioto
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA

<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438 e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</p>
---	--

Decl. CEEA.011/2006

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 081/03/CEEA, informo que o título do Projeto foi alterado para "Estudo da Proteinases e citocinas na resposta granulomatosa de camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*", sem modificações da espécie animal utilizada e métodos semelhantes.

São Paulo, 29 de março de 2006.

Prof. Dra. Marília C. L. Seelaender
Coordenadora da CEEA- ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Matsuo e Izuko Nishikaku, pelo carinho e apoio constante para a minha formação. Não há palavras que expressem o meu profundo sentimento de gratidão e admiração.

As minhas irmãs Miyuki e Yumi, aos meus sobrinhos Alexandre, Aline, Miwa e Fernando e também aos meus cunhados Sérgio Morino e Sérgio Sato pelo carinho, compreensão e alegre convívio.

A minha prima Emi Tanaka, pelo constante apoio, companheirismo e bom humor diário. Da mesma forma agradeço à Kaori Tanaka Ishi, Akimitsu Ishi, Chiro Ito e ao saudoso tio Tsuneo Tanaka, pelo constante incentivo, apoio e carinho.

À Profa. Dra. Eva Burger, pela orientação e acima de tudo, por confiar no meu trabalho e acreditar no meu potencial na pesquisa científica. Agradeço imensamente os excelentes conselhos profissionais e pessoais que contribuíram para o meu crescimento e amadurecimento como ser humano. Foi um grande prazer trabalhar neste campo da ciência!!

À Cláudia da Silva Cunha, pelo seu apoio técnico indispensável para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade, companheirismo, alegre convivência e apoio inestimáveis durante todo este período.

Aos alunos do Laboratório de Imunopatologia das Micoses: Renata Scavone, Raphael F. S. Molina, Luciana C. Ribeiro e Janete M. Hatakeyama, pelo apoio na realização dos experimentos e principalmente por compartilharem momentos alegres ou difíceis, com carinho e grande espírito de equipe.

À Célia R. P. Pizzo, pelo apoio técnico para a execução deste trabalho, incentivo, companheirismo e bom humor sempre presentes no laboratório.

Ao Bernardo Paulo Albe, pelo preparo e fornecimento dos materiais histológicos empregados na análise histopatológica e imuno-histoquímica, indispensáveis para a realização do presente trabalho.

Aos Professores Doutores Marcello Fabiano de Franco, Ises de Almeida Abrahamsohn e Anita H. Straus Takahashi, pelas sugestões extremamente enriquecedoras no Exame Geral de Qualificação.

A minha grande amiga Danielle P. Cavalcante, pela orientação e sugestões fundamentais na realização do ensaio zimográfico. Acima de tudo, agradeço pelo constante incentivo e pelos conselhos mesmo que realizados a longa distância.

Ao Dr. Larry W. Fisher (National Institutes of Health, Bethesda, USA) por gentilmente fornecer o anticorpo anti-osteopontina empregado neste trabalho.

Ao mestrando Luciano Gonçalves e à Profa. Dra. Maria Inês Nogueira do Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia, ICB-USP, pela disponibilização dos equipamentos para a captura e análise de imagens e pela orientação na avaliação quantitativa da reação imuno-histoquímica em parte empregada neste estudo.

À Profa. Dra. Sílvia C. Alfieri do Laboratório de Biologia celular e Bioquímica de Protozoários do Departamento de Parasitologia, ICB-USP, pelas sugestões no ensaio zimográfico.

Ao doutorando Ricardo Weinlich, pelas explicações na utilização do programa de análise quantitativa da zimografia.

Ao Prof. Dr. Jarbas A. Bauer, pelas excelentes aulas da disciplina de pós-graduação “Fundamentos em Biologia Tecidual”, do ICB-USP, que para mim foram muito enriquecedoras.

À Profa. Dra. Alexandrina Sartori, pela amizade, os grandes conselhos e pela orientação inicial no campo da ciência.

À Profa. Dra. Vera L. G. Calich, pelo exemplo como docente e pesquisadora na área de Imunologia.

Ao Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto, pela supervisão do estágio no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino realizado no Departamento de Imunologia, ICB-USP. Agradeço à Dra. Eva Burger e à Dra. Maristela M. Camargo, que também fizeram parte do estágio.

Aos docentes do Departamento de Imunologia, ICB-USP, em especial à Profa. Dra. Lourdes Isaac e ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, pela cordialidade constante e pelo exemplo na pesquisa e na docência.

Ao Dr. Sybren de Hoog, pela orientação no estágio realizado em seu laboratório no Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda.

À Marlene de Souza Bernardes, pelo auxílio técnico e principalmente pela amizade, alegria e carinho compartilhados em todos os momentos.

À Celina Arruda e à Tânia A. Costa, pelo apoio constante, carinho e incentivo sinceros.

Aos colegas do Departamento de Imunologia, ICB-USP, em especial, João Paulo M. Carmo, Adriana Pina, Simone Bernardino, Marlene Florido, Meire Hiyane, Aldacilene S. Silva, Daniel Manzoni, Tânia Felizardo, Isabel Vendramini, Priscilla Ramirez, Juliana Kuribayashi, Cíntia

Bombardieri, Mariane Amano, Matheus Ferracini, Renato Baleeiro, Maíra Felonato, Flávio Loures, Eliseu Frank, Soraya I. Oliveira e Áurea de Alvarenga.

À Valéria M. Santos e à Jotelma L. Ribeiro, pela atenção especial às minhas solicitações no Departamento de Imunologia, ICB-USP e pelo carinho com que sempre me receberam.

Ao Amarildo Utiana e à Maria Eni S. Santos, por atenderem às minhas solicitações e por sempre esclarecerem as dúvidas relativas à pós-graduação e à graduação do Departamento de Imunologia, ICB-USP.

À Sílvia M. G. Massironi e à Rosália Regina De Luca, pelos cuidados na manutenção, respectivamente, do Biotério de Experimentação e do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP. Agradeço às equipes dos biotérios, em especial aos funcionários Israel Lima e Dourival Mascarenhas.

À Rosana Prisco, estaticista do ICB-USP, pelo esclarecimento das dúvidas referentes às análises estatísticas empregadas neste trabalho.

Aos senhores Milton V. dos Santos, Otacílio P. dos Santos, Roberto V. dos Santos, Moisés A. Brito e aos demais funcionários do Departamento de Imunologia, ICB-USP.

A Leila C. Guissoni, pela amizade e apoio compartilhados nas aulas de pós-graduação do ICB.

Ao auxílio técnico dos funcionários da Biblioteca do ICB-USP.

Às amigas Ednilse e Edilaine Leme, pelo carinho e pela alegre convivência.

Aos amigos distantes, Rita C. V. Ferreira, Laura R. R. Ribeiro e Ricardo M. Santos, pela força e pelos alegres momentos compartilhados.

Aos amigos Antônio C. Pontes (Júnior), Paulo Roberto, Cristiaini Kano, Kazue Yamamoto, Suzana Assato e Saori Shimabukuro, pela alegria, bom humor e agradável companhia nos raros momentos de lazer e descontração.

À Andréa Nakatani, Eiko Kuramae e Shuwen Deng, pela amizade e pelo carinho com que me receberam, tornando a distância de casa menos árdua.

À FAPESP, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

Ao demais Docentes e Funcionários da Universidade de São Paulo.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

NISHIKAKU, A.S. **Estudo de proteinases e citocinas na resposta granulomatosa em camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis***. 2008. 131 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2008.

Diferenças no padrão das lesões granulomatosas têm sido observadas em camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) e associadas com a presença de várias populações celulares, citocinas e componentes da matriz extracelular. Neste trabalho avaliamos a participação de interferon-gama (IFN- γ), osteopontina (OPN) e de metaloproteinases da matriz (MMPs) no desenvolvimento do granuloma em omento de camundongos infectados pela via intraperitoneal com *P. brasiliensis* e a associação com a gravidade da doença. Através da análise imuno-histoquímica, linfócitos IFN- γ + foram detectados na periferia dos granulomas, com aumento significativo em lesões compactas de camundongos resistentes A/J após 120 dias de infecção (di.) comparado aos 15 di. com o isolado de alta virulência de Pb (Pb18). O número de células+ foi significativamente maior em granulomas compactos de camundongos A/J do que em granulomas frouxos extensos de suscetíveis (B10.A) aos 120 di. Aos 15 di., células OPN+ foram mais numerosas e intensamente marcadas em macrófagos e células gigantes multinucleadas (CGMs) em granulomas frouxos de B10.A do que em A/J; alta carga fúngica e baixos níveis de óxido nítrico (NO) foram observados em B10.A. Aos 120 di., expressão aumentada de OPN foi detectada em granulomas compactos de A/J, associada aos maiores níveis de NO e menor carga fúngica do que em B10.A. A expressão de MMP-9 foi detectada em células mononucleares, CGMs e em células fúngicas no omento de ambas as linhagens de camundongos. A zimografia demonstrou a presença de bandas correspondentes à MMP-9 (pró e ativa) e à MMP-2 ativa em omento de camundongos infectados, mas não em camundongos controles não infectados. Lesões residuais associadas a menor expressão de IFN- γ , OPN e MMP-9, além de altos níveis de NO e controle da disseminação fúngica foram observadas aos 120 di. com o isolado de baixa virulência de Pb (Pb265). O papel do NO na resposta granulomatosa e sua regulação por OPN foi analisada em camundongos C57BL/6 deficientes da sintase de NO induzida (KOiNOS) infectados com Pb18

comparados aos camundongos C57BL/6 iNOS suficientes. Aos 15 di., camundongos KOiNOS desenvolveram principalmente lesões compactas com macrófagos e CGMs OPN+, enquanto os camundongos iNOS suficientes desenvolveram granulomas frouxos e compactos com muitos fungos e expressão de OPN celular por toda a lesão. Aos 120 di., o grupo KOiNOS desenvolveu granulomas compactos com células OPN+, lesões residuais com fraca expressão de OPN, baixa carga fúngica e menor atividade gelatinolítica de MMP-9 comparado ao iNOS suficientes. Este estudo enfatiza a participação de IFN- γ no controle da infecção fúngica e sugere que OPN está associada com maior gravidade na fase inicial da infecção e com certo controle na progressão da infecção, podendo exercer efeitos anti-inflamatórios através da inibição de NO. Sugere-se também que IFN- γ , OPN e NO estejam envolvidos no desenvolvimento e organização do granuloma, dependendo do padrão de resistência das linhagens de camundongos e da virulência dos isolados do fungo. Este trabalho demonstra pela primeira vez a presença de MMPs e sua influência no padrão de organização do granuloma e na disseminação de *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Granuloma. Paracoccidioidomicose. Citocinas. Matriz extracelular. Metaloproteinases.

ABSTRACT

NISHIKAKU, A.S. **Study on proteinases and cytokines in the granulomatous response of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis***. Ph. D. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Differences in the pattern of granulomatous lesions have been observed in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) and associated with the presence of several cell populations, cytokines and extracellular matrix components. In the present work, we studied the participation of gamma-interferon (IFN- γ), osteopontin (OPN), matrix metalloproteinases (MMPs) in the development of omentum granulomas of mice intraperitoneally infected with *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) and their association with severity of the disease. By immunohistochemistry, IFN- γ (+) lymphocytes were detected at the periphery of granulomas, with significant increasing in +cells in compact granulomas of resistant (A/J) mice at 120 days after infection (dai) compared to 15 dai with the highly virulent Pb isolate (Pb18). The number of +cells in compact granulomas of A/J was significantly higher than in loose multifocal granulomas of susceptible (B10.A) at 120 dai. At 15 dai, OPN+ cells were more numerous and intensely immunostained in macrophages and multinucleated giant cells (MGCs) in the loose granulomas of B10.A than in A/J; high fungal load and low NO levels were observed in B10.A. At 120 dai, increased OPN expression was detected in compact granulomas of A/J, associated with higher NO and lower fungal load than in B10.A. MMP-9 expression was detected in mononuclear cells, MGCs and in fungal cells in omentum of both mouse strains. Gelatin zymography showed bands corresponding to MMP-9 (pro and active forms), and to active MMP-2 in omentum of infected mice, but not in non-infected controls. Residual lesions associated to low OPN, IFN- γ and MMP-9 expression, high NO and control of fungal dissemination were observed in both mouse strains at 120 dai with the slightly virulent Pb (Pb265). Role of NO in the granulomatous response and its regulation by OPN was also analyzed in inducible NO synthase deficient mice (KOiNOS) compared to C57BL/6 iNOS sufficient mice (wild-type) infected with Pb18. At 15 dai, KOiNOS showed mainly compact lesions with OPN+ macrophages and MGCs, whereas wild-type mice developed loose and compact granulomas with many Pb and OPN+ cells distributed in all the tissue. At 120 dai, KOiNOS developed compact

granulomas with OPN(+) cells, residual lesions with weak OPN expression, low fungal load and MMP-9 activity compared with wild-type mice. This study emphasizes the participation of IFN- γ in control of fungal infection and suggests that OPN is associated with more severity in an early phase of infection, with a degree of control of progressive infection and may exert anti-inflammatory effects by inhibiting the expression of NO. These data also suggest that IFN- γ , OPN and NO are involved in granuloma development and organization, depending on the resistance pattern of the mouse strains and on the virulence of the fungal isolates. This work demonstrates for the first time the presence of MMPs and suggests their influence in the organization pattern of granulomas and in the *P. brasiliensis* dissemination.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*. Granuloma. Paracoccidioidomycosis. Cytokines. Extracellular matrix. Metalloproteinases.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos e justificativa	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Animais	29
3.2 Cultivo do fungo e obtenção do inóculo para infecção	29
3.3 Inoculação de <i>P. brasiliensis</i>	30
3.4 Coleta de omento para avaliação das lesões granulomatosas.....	30
3.5 Análise histopatológica das lesões granulomatosas	30
3.6 Análise imuno-histoquímica para detecção de citocinas e proteases nas lesões granulomatosas.....	31
3.7 Captura de imagens para as análises histológica e imuno-histoquímica....	32
3.8 Quantificação da reação imuno-histoquímica	32
3.9 Determinação da produção de osteopontina.....	34
3.10 Determinação da produção de óxido nítrico.....	35
3.11 Contagem de unidades formadoras de colônias de <i>P. brasiliensis</i>	35
3.12 Ensaio zimografico para avaliação da atividade gelatinolítica das metaloproteinases da matriz (MMPs) em omento.....	36
3.13 Obtenção do antígeno “cell free” de <i>P. brasiliensis</i>	37
3.14 Ensaio zimográfico para avaliar a atividade gelatinolítica de <i>P. brasiliensis</i>	37
3.15 Semi-quantificação do ensaio zimográfico	38
3.16 Análise estatística	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Infecção de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) com os isolados de alta (Pb18) e baixa (Pb265) virulência de <i>P. brasiliensis</i>	38
4.1.1 Avaliação histopatológica das lesões granulomatosas de omento: análises qualitativas e semi-quantitativas	39
Infecção com Pb18.....	39

Infecção com Pb265.....	40
4.1.2 Avaliação da expressão de IFN-γ nas lesões granulomatosas de omento: análises qualitativas e quantitativas	47
Controles	47
Infecção com Pb18.....	47
Infecção com Pb265.....	48
4.1.3 Avaliação da expressão de OPN nas lesões granulomatosas de omento	54
Controles	54
Infecção com Pb18.....	54
Infecção com Pb265.....	55
4.1.4 Dosagem de OPN em extratos teciduais de omento.....	61
4.1.5 Dosagem de óxido nítrico em extratos teciduais de omento	63
4.1.6 Avaliação do grau de disseminação de <i>P. brasiliensis</i> nos órgãos	65
4.1.7 Avaliação da expressão de MMP-9 nas lesões granulomatosas de omento	68
Controles	68
Infecção com Pb18.....	68
Infecção com Pb265.....	69
4.1.8 Atividade gelatinolítica das metaloproteinases no omento	73
4.2 Infecção de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e camundongos geneticamente deficientes em iNOS (KOiNOS) com o isolado de alta virulência Pb18.....	77
4.2.1 Avaliação histopatológica das lesões granulomatosas de omento: análises qualitativas e semi-quantitativas	78
4.2.2 Avaliação da expressão de OPN nas lesões granulomatosas de omento	83
4.2.3 Dosagem de OPN em extratos teciduais de omento.....	88
4.2.4 Avaliação do grau de disseminação de <i>P. brasiliensis</i> nos órgãos	90
4.2.5 Atividade gelatinolítica das metaloproteinases no omento	92
4.2.6 Atividade gelatinolítica de <i>P. brasiliensis</i>	95
5 DISCUSSÃO	96
6 CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Paracoccidioides brasiliensis (Pb) é o agente etiológico da micose sistêmica humana paracoccidioidomicose (PCM), doença de alta incidência em países da América Latina, incluindo Brasil, Colômbia e Venezuela (RESTREPO, 1985). *P. brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico que desenvolve a forma miceliana à temperatura ambiente ou a forma de levedura à temperatura de 35-37 °C em cultivos *in vitro* e parasitando o hospedeiro (BRUMMER et al., 1993).

O principal mecanismo de infecção do hospedeiro é a inalação de micélios ou conídias de *P. brasiliensis* que se transformam em leveduras nas vias respiratórias, onde podem levar ao desenvolvimento de uma infecção pulmonar assintomática ou ao estabelecimento da doença, com a disseminação do fungo para outros órgãos por via hematogênica ou linfática (FRANCO, 1989).

A PCM caracteriza-se pela manifestação de diferentes formas clínicas, desde formas agudas ou subagudas (tipo juvenil) a crônicas (tipo adulta) (FRANCO, et al., 1987). Nas formas graves e disseminadas (pólo anérgico), os indivíduos apresentam altos títulos de anticorpos específicos e depressão da resposta imune celular, enquanto nas formas benignas e localizadas da doença (pólo hiperérgico), observam-se baixos níveis de anticorpos e imunidade celular preservada, sugerindo que o principal mecanismo de defesa e resistência à infecção por *P. brasiliensis* seja a imunidade mediada por células (BIAGIONI et al., 1984; FRANCO; 1989; MUSATTI et al., 1976).

O modelo experimental de infecção pela via intraperitoneal (ip.) com leveduras de *P. brasiliensis* estabelecido por Calich et al. (1985), permitiu a análise de diferenças no grau de suscetibilidade de várias linhagens isogênicas de camundongos, assim como na virulência dos isolados de Pb, mimetizando a forma crônica da PCM humana. Estudos do grau de disseminação fúngica, da mortalidade e da resposta imune do hospedeiro demonstraram que os padrões de resistência e suscetibilidade no modelo ip. da PCM são similares aos observados no modelo pulmonar de infecção (CALICH et al., 1994; CALICH et al., 1998). Camundongos suscetíveis apresentam ativação precoce de fagócitos e o desenvolvimento de respostas de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) em fases iniciais da infecção, seguido pelo estabelecimento de anergia, com a secreção predominante de

citocinas T helper 2 (Th2), como interleucina (IL) 5 (IL-5), IL-10 e fator transformador do crescimento-beta (TGF- β), baixas respostas de HTT, alta produção de anticorpos, associando a ativação preferencial da resposta Th2 com progressão da doença; por outro lado, camundongos resistentes desenvolvem gradualmente uma potente resposta imune caracterizada por imunidade celular preservada, ativação eficiente de fagócitos e produção de citocinas Th1, como o interferon-gama (IFN- γ), IL-2 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), sugerindo uma associação entre ativação preferencial da resposta Th1 e resistência (CALICH et al., 1998; KASHINO et al., 2000).

No modelo ip. da PCM é frequente o envolvimento do omento/epíplon peripancreático/peri-esplênico, sendo um dos órgãos alvos com marcante recuperação de fungos viáveis, como observado em estudo para determinação da gravidade da doença (SINGER-VERMES et al., 1993). O omento é formado por camadas de tecido mesotelial contendo células adiposas e por tecido conjuntivo frouxo composto por agregados de leucócitos denominado “milky spots” (MS). Os “milky spots” representam um tecido linfomieloide associado ao celoma, que durante estímulo infeccioso, desenvolvem intensa linfocitose, mielomonocitose e plasmocitogênese, atuando como uma importante fonte de macrófagos e um dos principais tecidos imunes da cavidade peritoneal (LENZI et al., 1996; PLATELL et al., 2000).

A PCM tem como um dos principais aspectos o desenvolvimento freqüente da resposta inflamatória crônica granulomatosa, cujo papel parece estar diretamente relacionado à resposta imune celular do hospedeiro frente à presença persistente do patógeno (ARRUDA et al., 1994; BURGER et al., 1996). Tanto em humanos como em camundongos, as formas benignas caracterizam-se pela presença de infecção localizada, contendo granulomas do tipo epitelióide compacto com poucos fungos, enquanto as formas mais graves apresentam processo granulomatoso frouxo com áreas de necrose e intensa disseminação fúngica (FAVA NETTO, 1961; MONTENEGRO e FRANCO, 1994).

Estudos anatomopatológicos e histopatológicos na infecção experimental com *P. brasiliensis* têm evidenciado um marcante desenvolvimento de lesões granulomatosas em MS omentais. A evolução da doença foi estudada desde fases iniciais da infecção até o período de seis meses, notando-se diferenças evidentes

aos 15 e 120 dias de infecção, tempos que representam bem os principais aspectos das fases precoce e tardia da PCM murina experimental (XIDIEH et al., 1999).

A resposta granulomatosa é um tipo de inflamação crônica caracterizada pela presença de diferentes populações celulares, incluindo macrófagos, células epitelióides, células gigantes multinucleadas e linfócitos (WILLIAMS e WILLIAMS, 1983), além de uma complexa mistura de citocinas, fatores de crescimento e várias macromoléculas constituintes da matriz extracelular (MEC) (LENZI et al., 1991).

A expressão de citocinas nas lesões tem sido extensivamente analisada, destacando-se o papel da citocina pró-inflamatória e granulomatogênica TNF- α e do fator de crescimento anti-inflamatório e fibrogênico TGF- β em diferentes infecções granulomatosas (LIMPER et al., 1994; MARSHALL et al., 1996; HERNANDEZ-PANDO et al., 1997).

A expressão *in situ* de IFN- γ nos granulomas tem sido objeto de alguns estudos e correlacionada à resposta imune preferencial Th1 em processos infecciosos de natureza fúngica e bacteriana (KOGA et al., 2002; BERGERON et al., 1997), assim como em infecções helmínticas, cujo padrão de resposta imune predominante é Th2, enfatizando o papel anti-fibrótico de IFN- γ (CZAJA et al., 1989; HENRI et al., 2002).

IFN- γ é uma citocina produzida por linfócito T, células Natural Killers (NK) ativadas, entre outras células, cuja função tem sido descrita como de extrema relevância nos mecanismos de resistência do hospedeiro contra vários patógenos. A ativação das funções efetoras microbicidas de macrófagos por IFN- γ acarreta a indução do complexo enzimático dinucleotídeo nicotinamida-adenina-fosfato oxidase (NADPH oxidase), a regulação positiva de enzimas lisossomais e a estimulação da produção de reativos intermediários de nitrogênio como o óxido nítrico (NO) por macrófagos (SHRODER et al., 2004).

A participação de IFN- γ na imunidade protetora contra fungos tem sido demonstrada em várias patologias, tais como as causadas por *Histoplasma capsulatum* (ALLENDORFER e DEEPE, 1997), *Cryptococcus neoformans* (HOAG et al., 1997) e também por *P. brasiliensis* (CANO et al., 1998; SOUTO et al., 2000). A atividade fungicida de polimorfonucleares neutrófilos contra *Blastomyces dermatitidis* (MORRISON et al., 1987) e *P. brasiliensis* (KURITA et al., 1999), assim como de

macrófagos contra *H. capsulatum* (BRUMMER et al., 1991) e *P. brasiliensis* (BRUMMER et al., 1988; CALVI et al., 2003) é aumentada por IFN- γ , sugerindo importante papel destas células ativadas por citocinas em fase precoce da infecção. A imunidade anti-fúngica induzida por IFN- γ parece estar associada à presença de TNF- α (SOUTO et al., 2000) e IL-12 (HERRING et al., 2002), com funções relevantes na atividade microbicida de fagócitos mononucleares e também na formação do granuloma. Deste modo, a citocina IFN- γ parece exercer um papel crucial nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos, influenciando desde processos inflamatórios agudos até crônicos.

Um dos diversos mecanismos efetores da citocina IFN- γ é a indução da expressão do substrato L-arginina, de cofatores e enzimas necessárias para a produção de NO. As enzimas denominadas sintases de óxido nítrico (NOS) são responsáveis pela conversão do substrato L-arginina em citrulina e NO. Estas enzimas podem ser produzidas constitutivamente (isoformas NOS-1 ou NOS neuronal e NOS-3 ou NOS epitelial) ou podem ser induzidas (NOS-2 ou iNOS) por vários estímulos, tais como contato célula-célula, produtos microbianos e virais, poliaminas, tensão de oxigênio, pH e complexos imunes e citocinas (BOGDAN, 2001).

TGF- β exerce efeitos pró-fibróticos através da indução da expressão de componentes da MEC (APPLETON et al., 1993; ROMAN et al., 1995; SIME et al., 1997), enquanto IFN- γ atua como um fator anti-fibrótico ao regular a atividade das enzimas arginase-1 (ARG-1) e iNOS (WYNN, 2004). As duas enzimas competem pelo substrato comum L-arginina, sendo a ARG-1 responsável pela hidrólise deste aminoácido e conversão em uréia e ornitina, esta última responsável pela síntese de ornitina, que por sua vez é necessária para a produção de prolina, um aminoácido essencial para a síntese do colágeno, o principal componente da MEC observado nos granulomas e principalmente na fibrose tecidual (BOGDAN, 2001; WYNN, 2004).

Diversos modelos de infecção experimental têm demonstrado a importância de óxido nítrico na resposta granulomatosa. A regulação da formação do granuloma e da fibrose induzida por *S. mansoni* e *M. tuberculosis* (HESSE et al., 2001) e *M. avium* (EHLERS et al., 1999; LOUSADA et al., 2006) parece ser regulada pela

ativação diferencial das enzimas ARG-1 e iNOS, sugerindo um papel anti-fibrótico da iNOS.

Nascimento et al. (2002) demonstraram papel dúbio de NO na infecção experimental com *P. brasiliensis*, sugerindo-se um papel protetor na fase inicial da infecção, mas associado a maior gravidade no decurso da infecção. A participação do NO no controle e/ou na disseminação de patógenos tem sido relatada em outras infecções (NATHAN e SHILOH, 2000).

Distintos componentes da MEC (colágenos, glicoproteínas, fibras do sistema elástico e proteoglicanas) são produzidos em vários órgãos e tecidos, apresentando uma diversidade funcional biológica complexa, com propriedades adesivas, estruturais, de sustentação, participando como um reservatório de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas), promovendo assim a regulação das funções de células inflamatórias e imunes, no intuito de manter a integridade tecidual durante processos fisiológicos e patológicos e auxiliando o reparo de danos teciduais e a cicatrização (VADAY et al., 2001). A síntese dos componentes da MEC é regulada por inúmeras citocinas e fatores de crescimento, como a IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , TNF- α e IFN- γ (GRESSNER e BACHEM, 1995; WYNN, 2004).

A participação dos componentes da MEC na formação da resposta granulomatosa e da fibrose, tem sido observada em diversas patologias de natureza infecciosa e parasitária (ABREU-SILVA, 2004; JACOBS et al., 1998; LENZI et al., 2002). Na PCM experimental, a expressão de componentes da MEC (colágeno, laminina, biglican e decorina) e das citocinas granulomatogênicas e fibrogênicas, respectivamente, TNF- α e TGF- β foi observada nas lesões granulomatosas desenvolvidas durante a infecção de camundongos resistentes e suscetíveis infectados por isolados de alta e baixa virulência de Pb, influenciando o padrão de organização estrutural e funcional do tecido inflamado (NISHIKAKU, 2003; XIDIEH et al., 1999).

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína constituinte da MEC, produzida por diferentes populações celulares, incluindo as células do sistema imune, como as células NK, linfócitos T e macrófagos ativados, assim como as células derivadas de macrófagos, tais como os osteoclastos e as células gigantes multinucleadas (O'REGAN e BERMAN, 2000). A OPN apresenta uma gama de atividades, das

quais se destacam o papel na adesão e diferenciação celular, na migração de macrófagos, osteoclastos e linfócitos T, além de atuar como uma citocina com propriedades pró-inflamatórias intimamente associada com o início da resposta imune celular, ativando preferencialmente a resposta imune Th1 (O'REGAN e BERMAN, 2000).

Vários trabalhos têm demonstrado que a OPN constitui um fator importante no desenvolvimento da resposta granulomatosa, sendo observado em doenças de diversas etiologias, tais como sarcoidose, tuberculose e histoplasmose e também em granulomas de corpo estranho (O'REGAN et al., 1999; O'REGAN et al., 2001; O'REGAN e BERMAN, 2000). Seu papel na formação do granuloma está intimamente associado à regulação da migração, diferenciação e ativação de células, como linfócitos e macrófagos, assim como da produção de citocinas Th1 e Th2 (DENHARDT et al., 2001).

A OPN apresenta também efeitos anti-inflamatórios, como a inibição da produção de NO através da regulação negativa da expressão da enzima iNOS (GUO et al., 2001; ROLLO et al., 1996). OPN também contribui para os mecanismos de reparo tecidual, agindo como um fator pró-fibrótico ao estimular a quimiotaxia e potencializar a proliferação de fibroblastos mediada por fatores de crescimento, ao mesmo tempo que regula a secreção de metaloproteinases por estas células (LI et al., 2000; PETROW et al., 2000).

A síntese e a degradação dos componentes da MEC integram os mecanismos de remodelação tecidual induzidos em condições fisiológicas ou patológicas, sob efeito modulador das células e seus diversos produtos, tais como citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, enzimas proteolíticas e seus inibidores (VADAY e LIDER, 2000).

Vários grupos de proteinases têm sido descritas como importantes na degradação da matriz: as serina proteinases, cisteína proteinases e as metaloproteinases da matriz (MMPs). Destas enzimas, as MMPs são as que apresentam uma ampla capacidade para degradar os componentes da matriz extracelular (BARRICK et al., 1999). As MMPs constituem uma família de enzimas zinco/cálcio dependentes e são em sua maioria secretadas no meio extracelular na forma latente (pró-enzima), sendo necessária a ativação exógena para a execução de suas atividades funcionais. Compartilham algumas propriedades estruturais e

funcionais e apresentam de modo geral domínios bem conservados (VISSE e NAGASE, 2003). São produzidas por diferentes populações celulares, incluindo os fibroblastos, células epiteliais, macrófagos, linfócitos e neutrófilos (STAMENKOVIC, 2003; STERNLICHT e WERB, 2001).

As MMPs apresentam diferentes substratos e de acordo com a estrutura e função podem ser classificadas em: collagenase intersticial (MMP-1), gelatinases ou collagenases tipo IV de 72 kDa e 92 kDa (respectivamente, MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3 e MMP-10), collagenase de neutrófilos (MMP-8), matrilisina (MMP-7), metaloelastase (MMP-12) e MMPs de membrana (membrane-type MMPs – MT-MMPs) (STERNLICHT e WERB, 2001).

Em especial, a classe das gelatinases MMP-2 e MMP-9 apresenta vários substratos em comum, dentre eles, alguns componentes da MEC, como a elastina (SENIOR et al., 1991), colágeno tipo IV, gelatina, decorina, laminina e também precursores de citocinas como pró-TNF- α e pró-TGF- β (STERNLICHT e ZERB, 2001). MMP-2 é constitutivamente expressa por células estromais, enquanto MMP-9 é fracamente expressa em tecidos normais, necessitando da indução por citocinas, fatores de crescimento e outros mediadores inflamatórios, como acontece em condições de remodelação tecidual e na invasão tumoral (STAMENKOVIC, 2000). O envolvimento destas enzimas em processo tumorais tem sido observado em diferentes estudos, destacando o seu papel na degradação de componentes da membrana basal, facilitando assim a invasão e disseminação de células tumorais nos tecidos e a angiogênese (DI NEZZA et al., 2002; STAMENKOVIC, 2003).

A ativação das MMPs é requerida tanto em processos fisiológicos, dos quais se destacam a embriogênese, a remodelação óssea e a cicatrização tecidual, como em diversas condições patológicas, tais como nas doenças inflamatórias pulmonares, doenças cardiovasculares, artrite reumatóide, doenças periodontais e no câncer (MANDAL et al., 2003).

A expressão das MMPs é regulada pelo menos em três níveis: durante a transcrição gênica, na ativação da pró-enzima por citocinas e outras enzimas, e também por inibidores endógenos como os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (BARRICK et al., 1999).

A síntese de MMPs e de seus inibidores parece ser regulada por várias citocinas e fatores de crescimento, incluindo IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , fator estimulador

de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e TGF- β (FEINBERG et al., 2000; ZHANG et al., 1998;).

O papel inibitório da citocina IFN- γ na produção de MMPs tem sido demonstrado, indicando o envolvimento de diferentes mecanismos de sinalização intracelular. Macrófagos murinos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) produzem maior quantidade de MMP-2 e MMP-9 do que seus controles, mas a inibição e ativação da síntese ocorrem na presença, respectivamente, de IFN- γ (com LPS) e TGF- β (sem LPS) (XIE et al., 1994). IFN- γ inibe a produção de MMP-9 induzida por TNF- α através de mecanismos envolvendo diferentes fatores de transcrição (ZHOU et al., 2003). IFN- γ também exerce um papel regulador sobre componentes da MEC através da inibição da expressão gênica de colágeno tipo I induzida por TGF- β (GHOSH, 2002). Suprime a síntese de colágeno por fibroblastos através da regulação do balanço de MMPs e TIMPs, ao mesmo tempo que reduz a expressão de citocinas pró-fibróticas por células Th2, CD4⁺ (IL-4 e TGF- β 1) e T reguladoras, CD4⁺CD25⁺ (TGF- β 1) (WYNN, 2004).

Algumas metaloproteinases podem atuar como convertases ou “shedases” liberando citocinas, moléculas de adesão e receptores da superfície celular, produzindo formas inativas, como no caso da citocina IL-1 β , (ITO et al., 1996) ou ativas através da clivagem de precursores como pró-TNF- α (GEARING et al., 1994) e pró-IL-1 β (SCHONBECK et al., 1998).

A participação das MMPs tem sido descrita em diferentes processos infecciosos e parasitários. Na infecção com *M. tuberculosis* foi demonstrada a estimulação da expressão de MMP-9 e a transcrição gênica de MMP-1 e MMP-9 em células do lavado bronco-alveolar (CHANG et al., 1996), assim como a expressão de MMP-9, MMP-1 e TIMP-1 por monócitos humanos, sob regulação diferencial por proteína quinases (FRIEDLAND et al., 2002). Quiding-Jarbrink et al. (2001) estudando a atividade de MMPs na infecção experimental murina por *M. bovis* ou *M. tuberculosis*, demonstraram a produção *in vitro* e *in vivo* de MMP-9 e MMP-2, cuja expressão foi regulada positivamente por IL-18 e TNF- α , mas suprimida por IFN- γ , IL-4 e IL-10.

A expressão de MMP-1 e -2 e TIMP-1 e -2 foi observada na infecção com *S. mansoni* (GOMEZ et al., 1999), enquanto MMP-1, -2, -8 e -9 foram associadas à progressão de infecções virais, tais como hepatite B e C e citomegalovírus (CHUNG

et al., 2004; YAMAMOTO-TABATA et al., 2004). Na sarcoidose pulmonar e cardíaca, González et al. (2002) demonstraram a presença de granulomas contendo células gigantes multinucleadas reativas para MMP-1, -9, -2 e -3.

O envolvimento das MMPs na patofisiologia das infecções fúngicas também tem sido demonstrado por alguns pesquisadores em estudos clínicos e experimentais, com a participação das gelatinases MMP-2 e MMP-9. A secreção de MMP-9 foi observada na aspergilose broncopulmonar alérgica e associada ao influxo de neutrófilos a presença de dano tecidual (GIBSON et al., 2003). Em modelo experimental de meningite e vasculite em coelhos induzida por *Coccidioides immitis*, Williams et al. (2002) detectaram níveis elevados de MMP-9 em fluido cérebro-espinal, destacando o papel desta enzima no rompimento da barreira hematoencefálica, com maior comprometimento do sistema nervoso durante a infecção. Maior expressão gênica de MMP-2 foi detectada em camundongos resistentes (C.B-17) em comparação com camundongos suscetíveis (C57BL/6) infectados com *C. neoformans* e associada à formação de granulomas compactos (MAJKA et al., 2002).

Metaloproteinases e outras enzimas liberadas por células inflamatórias e imunes podem modificar o micro-ambiente no qual estão presentes. Os mecanismos propostos são a geração de formas alteradas ou fragmentos de citocinas, quimiocinas, moléculas de superfície celular e componentes da MEC, influenciando as vias de migração celular e a bioatividade inerente das moléculas secretadas. Poderiam também produzir componentes quimiotáticos importantes para o ajuste fino das funções das células durante as reações inflamatórias, nas imunidades inata e adquirida (VADAY e LIDER, 2000; PARKS et al., 2004).

Citocinas, além das enzimas liberadas pelas células, tais como MMPs, com ação de collagenases, gelatinases e elastases, além de serina proteases poderiam contribuir para as alterações teciduais observadas nos granulomas paracoccidioidomicóticos, muitos dos quais constituídos por necrose e fibrose, indicando intensa destruição de células, principalmente de macrófagos e neutrófilos, além de componentes da MEC e a presença de intensos depósitos de MEC.

A fibrose se desenvolve como um evento terminal na fase tardia da resposta granulomatosa na PCM, sendo freqüentemente observada nos pulmões de pacientes com a doença e também evidenciada em modelos experimentais (LENZI et al., 1994; MONTENEGRO e FRANCO, 1994). Portanto, a compreensão destes

fenômenos durante o desenvolvimento do granuloma poderia conduzir ao estabelecimento de terapias para evitar ou atenuar as seqüelas decorrentes da fibrose, que limitam o funcionamento normal dos órgãos afetados (COCK et al., 2000; TÓBON et al., 2003).

Produtos secretados pelo patógeno também podem contribuir para as alterações estruturais e funcionais do órgão afetado, modulando as respostas geradas pelo hospedeiro durante a infecção. Vários componentes produzidos pelo agente infectante podem primeiramente funcionar como ligantes de certas macromoléculas da MEC, como laminina, fibronectina, proteoglicanas, colágenos do tipo I, II e IV presentes nos tecidos, promovendo a aderência e facilitando a colonização e a disseminação de microorganismos. A interação patógeno-hospedeiro através das moléculas da MEC tem sido observada nas infecções causadas por bactérias (MARQUES et al., 2001), protozoários (GIORDANO et al., 1994) e fungos, tais como *H. capsulatum* (McMAHON et al., 1995), *Candida albicans* (KLOTZ et al., 1990) e *P. brasiliensis* (GESZTESI et al., 1996; VICENTINI et al., 1994).

As moléculas produzidas pelo patógeno podem também funcionar como proteases destruindo barreiras naturais, auxiliando o processo de colonização nos tecidos. Alguns estudos revelaram a presença de uma glicoproteína de 43 kDa (gp43) de *P. brasiliensis*, ligante de laminina, capaz de aumentar a aderência às células do hospedeiro e acarretando em maior gravidade da doença (HANNA et al., 2000; VICENTINI et al., 1994). Esta glicoproteína foi caracterizada também como sendo uma protease, com atividade proteolítica a pH 5 e 6, capaz de solubilizar elastina e hidrolisar caseína a 35 °C (MENDES-GIANNINI et al., 1990); foi classificada como sendo uma serina proteinase (CARMONA et al., 1995), capaz de degradar componentes da MEC, como laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas (PUCCIA et al., 1998).

Desta forma, o estudo da inter-relação deste complexo conjunto de fatores nos mecanismos de resposta induzidos na infecção com *P. brasiliensis* poderá nos esclarecer sobre a importância do granuloma para o controle da disseminação do patógeno na PCM, no contexto da influência do patrimônio genético do hospedeiro, assim como da virulência dos diferentes isolados de *P. brasiliensis*.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

2.1 Objetivo geral

Avaliar a participação de citocinas e enzimas proteolíticas na PCM experimental, empregando-se camundongos isogênicos inoculados por via ip. com os isolados de alta e baixa virulência de *P. brasiliensis*, respectivamente, Pb18 e Pb265, nas fases inicial e tardia da infecção (15 e 120 dias).

2.2 Objetivos específicos e justificativa

Avaliação da resposta granulomatosa desenvolvida em camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) infectados com Pb18 ou Pb265. Neste estudo avaliamos:

- a) a expressão da citocina IFN- γ nas lesões granulomatosas de omento de camundongos infectados, devido a importância desta citocina na resistência ao *P. brasiliensis* e na formação do granuloma;
- b) a expressão de osteopontina (OPN) nos granulomas, assim como os níveis de OPN em homogenato de omento. Esta é uma importante glicoproteína da matriz extracelular e também é considerada uma citocina de extrema relevância para o desenvolvimento da imunidade celular e da resposta inflamatória granulomatosa;
- c) a expressão *in situ* de MMP-9 e a atividade gelatinolítica de MMP-9 e de MMP-2 em extratos teciduais de omento para determinar a participação destas enzimas na inflamação crônica granulomatosa. Os granulomas são estruturas altamente complexas que envolvem diferentes elementos, celulares e extracelulares, os quais sofrem diferentes estímulos e em conjunto, regulam a resposta tecidual frente à infecção pelo fungo. Neste sentido, o estudo das MMPs pode facilitar a compreensão sobre o balanço entre síntese e degradação da MEC nas lesões, correlacionando-

o ao aspecto dos granulomas, fechados ou abertos, e ao controle da disseminação fúngica. A participação das metaloproteinases nos granulomas paracoccidioidomicóticos nunca foi estudada previamente;

- d) a morfologia das lesões, a área ocupada por lesão tecidual e a presença de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, correlacionando-os aos outros parâmetros estudados;
- e) os níveis de óxido nítrico (NO) em extratos de omento. O papel do NO na PCM tem sido analisado em diversos estudos demonstrando propriedades fungicidas e imunossupressoras, porém a sua participação no granuloma tem sido pouco investigada, inclusive a sua relação com os outros elementos da resposta inflamatória. Neste contexto, a OPN, considerada como um componente anti-inflamatório e um fator regulador da síntese de NO, foi analisada em conjunto, estabelecendo-se a relação com gravidade ou controle da infecção;
- f) a carga fúngica nos órgãos para determinar o grau de disseminação de *P. brasiliensis*.

Avaliação da resposta granulomatosa de camundongos geneticamente deficientes da enzima NO sintase induzida (KOiNOS) e de camundongos iNOS suficientes (C57BL/6) inoculados com Pb18. Neste estudo avaliamos:

- a) a expressão de osteopontina (OPN) nos granulomas e os níveis de OPN em omento, estabelecendo-se uma análise associativa entre NO e OPN e o papel deste último como componente anti-inflamatório e regulador da produção de NO;
- b) a atividade gelatinolítica das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) em extratos teciduais de omento para determinar a participação destas enzimas na inflamação crônica granulomatosa e na disseminação do fungos;

- c) a morfologia e a área ocupada por lesão tecidual e a presença de células leveduriformes de *P. brasiliensis* nos granulomas;
- d) a carga fúngica nos órgãos para determinar o grau de disseminação de *P. brasiliensis*.

A produção de proteases de isolados de *P. brasiliensis* com baixa (Pb265) e alta virulência (Pb18), com atividades de gelatinases, no intuito de avaliar o potencial destas enzimas como fatores de virulência e sua contribuição para os eventos lesivos durante a resposta granulomatosa.

Em conjunto, os diferentes parâmetros estudados podem nos fornecer informações sobre a inter-relação da expressão de produtos secretados na MEC e/ou ligados às células com o padrão das lesões granulomatosas, sob a influência do patrimônio genético do hospedeiro e da virulência do fungo, correlacionando-os com maior gravidade ou resolução da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Utilizamos grupos de cinco a dez camundongos isogênicos fêmeas das linhagens B10.A, A/J, C57BL/6 (iNOS suficientes) e C57BL/6 geneticamente deficientes da enzima óxido nítrico sintase induzida (KOiNOS), por experimento, apresentando de seis a oito semanas de idade no período da infecção. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), com ração e água acidificada autoclavadas e à vontade, com períodos de 12 horas de claro e de escuro, a uma temperatura de 21 ± 2 °C, umidade de 60% e mantidos com barreiras físicas em gaiolas microisoladoras.

3.2 Cultivo do fungo e obtenção do inóculo para infecção

Empregamos os isolados de *P. brasiliensis*, Pb18 e Pb265, respectivamente, de alta e baixa virulência em camundongos (KASHINO et al., 1985). Amostras leveduriformes dos isolados Pb18 e Pb265 foram empregadas após 7 dias de cultivo em meio Fava Netto (FAVA NETTO, 1961), período que corresponde à fase exponencial de crescimento (KASHINO et al., 1987). Após coleta dos fungos do meio de cultura, as células leveduriformes foram lavadas em solução salina com tampão fosfato (PBS) estéril através da centrifugação do material a 3000 rpm durante cinco minutos por três vezes. Em seguida, as células leveduriformes decantadas foram ressuspensas em PBS estéril, homogeneizadas e em seguida uma suspensão fina foi coletada para obtenção do inóculo numa concentração de 10×10^6 fungos/mL, ajustada após contagem em câmara hemocitométrica. A viabilidade celular da suspensão fúngica foi avaliada empregando-se o corante vital Janus Green B (BERLINER e RECA, 1966), sendo utilizados apenas os inóculos com viabilidade maior ou igual a 75%.

3.3 Inoculação de *P. brasiliensis*

Grupos de camundongos das linhagens B10.A e A/J foram inoculados pela via i.p. com 0,5 mL de suspensão fúngica dos isolados Pb18 ou Pb265 (5×10^6 leveduras por animal). Grupos de camundongos das linhagens C57BL/6 KOiNOS e C57BL/6 (iNOS suficientes) foram inoculados com o isolado Pb18 nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 15 e 120 dias da infecção, os animais foram exsanguinados pelo plexo retro-orbital e sacrificados por meio de deslocamento cervical para coleta dos órgãos (baço, omento, fígado e pulmão) para a análise histopatológica e imuno-histoquímica, e/ou para obtenção de homogenatos teciduais para as demais análises realizadas neste trabalho.

3.4 Coleta de omento para avaliação das lesões granulomatosas

O omento peripancreático/peri-esplênico foi coletado e fixado em Methacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial). Os materiais fixados, desidratados, embebidos em parafina foram emblocados para posterior obtenção de cortes teciduais de 5 μ m de espessura montados em lâminas previamente cobertas com poli-lisina para a avaliação histológica e imuno-histoquímica.

3.5 Análise histopatológica das lesões granulomatosas

Cortes histológicos de omento de camundongos B10.A, A/J, KOiNOS e C57BL/6 infectados com Pb18 e/ou Pb265 foram utilizados para a análise da área de lesão granulomatosa presente no tecido e também da presença de células fúngicas de Pb (morfologia e a presença de brotamentos) através das seguintes colorações: hematoxilina e eosina (HE), para visualização geral das lesões teciduais e a impregnação pela prata de Grocott (GROCOTT, 1955), para identificação do fungo. A análise semi-quantitativa foi realizada para calcular a área real no campo de observação ocupada por lesão e contendo fungo (totalmente preenchida: 1, metade preenchida: 1/2). Empregou-se para a análise uma ocular com retículo de contagem

e o aumento total de 125x (objetiva de 10x e ocular de 12,5x). Todos os resultados foram expressos como a média das análises semi-quantitativas (10 campos de observação) por μm^2 :

3.6 Análise imuno-histoquímica para detecção de citocinas e proteases nas lesões granulomatosas

A presença *in situ* de IFN- γ , OPN e da enzima MMP-9 em granulomas de omento de camundongos infectados com Pb18 ou Pb265 foi avaliada por método imuno-histoquímico. A reação de estreptavidina-biotina-peroxidase foi empregada seguindo a metodologia preconizada por Soto-Suazo et al. (2002) e conforme descrita em trabalho anterior por Nishikaku (2003).

Resumidamente, os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados com banhos sucessivos de xilol, álcool e água destilada. Após lavagem das lâminas com PBS (pH 7.2-7.4), foi realizado o bloqueio de peroxidases endógenas com a adição de solução 3% de H_2O_2 (30%) em PBS sob agitação, por 30 minutos. Em seguida, soros normais de animais da espécie produtora do anticorpo secundário na diluição 1:1 em PBS/ABS (albumina bovina sérica) 10% foram aplicados sobre os cortes para o bloqueio de reações inespecíficas, assim como uma solução tampão TBS (Tris-buffered saline – salina tamponada com Tris) (Pierce Inc., USA) sobre os cortes de tecido para o bloqueio de biotina endógena. As lâminas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: anticorpo específico para a citocina IFN- γ (1:80, anticorpo monoclonal de rato anti-IFN- γ de camundongo, hibridoma XMG 1.2, 2,6 mg/mL); para osteopontina (1:800, antissoro policlonal de coelho anti-osteopontina humano, LF-123, 1 mg/mL) (FISHER et al., 1995) ou para a enzima MMP-9 (1:100, anticorpo policlonal de coelho anti-MMP-9 de camundongo, Chemicon International, CA, USA) “overnight” a 4 °C, diluídos em PBS/Tween 20 0,3%. Posteriormente, estas lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado (Rockland Inc., USA), diluído 1:500 em PBS, por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com estreptavidina-peroxidase (1 mg/mL, Vector Laboratories, USA) na diluição 1:100 em PBS por uma hora a temperatura ambiente e a reação revelada com tetra-hidrocloreto de 3,3’

diaminobenzidina (Sigma Biochemical Co., USA) e adição de peróxido de hidrogênio 30%. As reações foram interrompidas após a visualização de cor marrom nos cortes de tecidos e a seguir, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas em solução Permount e observadas em microscópio óptico com aumentos totais de 40x, 100x, 200x, 250x e 400x.

Lâminas com cortes de tecido (omento) sem o anticorpo primário (substituído pelo diluente), lâminas com cortes de tecido de camundongos não infectados e também com secções teciduais de pâncreas e pulmão foram empregadas para avaliar a especificidade da reação.

3.7 Captura de imagens para as análises histológica e imuno-histoquímica

A avaliação da histopatologia das lesões granulomatosas e das reações imuno-histoquímicas para detecção de IFN- γ e OPN foi realizada a partir da captura de imagens feita em microscópio óptico (Hund Wetzlar, Alemanha) acoplado a uma câmera de vídeo (Kodo Japan) e o emprego do programa Video Capture for Windows.

A expressão de OPN foi também estudada a partir da captura de imagens realizada em microscópio óptico (Nikon Eclipse, E1000, Japan) acoplado a uma câmera digital (DXM 1200C, Japan) e o emprego do software ACT-1(version 2.70, Nikon Corporation, Japan).

A expressão de MMP-9 foi avaliada através da captura de imagens, empregando-se o microscópio óptico Eclipse 80i (Nikon, Japan) acoplado a uma câmera digital (DS-Fi1, Nikon Co., Japan) e programa de captura e análise NIS-Br versão 2.34 (Nikon, Japan).

3.8 Quantificação da reação imuno-histoquímica

Para a quantificação da reação imuno-histoquímica de IFN- γ e OPN foram estabelecidos critérios de análise da marcação positiva, empregando-se uma ocular com retículo de contagem (total de 100 quadrados), com o aumento total de 500x (objetiva de 40x e ocular de 12,5x), resultando na contagem de campos com área

total de 280 μm^2 . Todos os resultados foram expressos como a média das análises quantitativas (10 campos de observação quando possível).

Para a análise da expressão de IFN- γ , realizou-se a contagem do número total de células positivas e o cálculo da porcentagem de células com marcação positiva intensa ou fraca.

Para a análise da reação positiva celular e extracelular de OPN utilizou-se uma escala de 0-4 e valores numéricos como proporção da marcação positiva: 0, positividade ausente; +1= 0,25, positividade maior que 0 e menor ou igual a 25% das células; +2= 0,5, positividade maior que 25 e menor ou igual a 50% das células; +3= 0,75, positividade maior que 50 e menor ou igual a 75%; +4= 1, positividade maior que 75% e menor ou igual que 100%. A intensidade da marcação positiva foi também analisada através do grau de coloração observado e os respectivos valores numéricos considerados: ausente= 0, fraco= 0,25, fraco/moderado= 0,5, moderado= 0,75, forte= 1. Este critério de avaliação foi empregado para a avaliar a expressão de OPN em camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e deficientes.

A quantificação da expressão de OPN foi também realizada através do programa de análise de imagens Image Pro Plus 5.1.2.5.9 (Media Cybernetics). A marcação positiva foi mensurada na forma de densidade óptica integrada (soma da intensidade de positividade multiplicada pela área marcada) em μm , analisando-se até 10 campos no aumento total de 200x (objetiva de 20x e ocular de 10x) por corte de tecido/animal. Todos os resultados foram expressos como a média da densidade óptica integrada $\pm$ erro padrão, por grupo analisado. Este método de avaliação foi empregado no estudo de OPN em camundongos das linhagens B10.A e A/J.

A positividade expressa nas células e/ou na MEC e também a localização da marcação *in situ* de OPN e MMP-9 nas lesões granulomatosas foram consideradas neste estudo.

3.9 Determinação da produção de osteopontina

A concentração de osteopontina (OPN) em homogenatos de omento foi determinada por método imuno-enzimático, empregando-se o kit ELISA DUOSET® (R&D Systems, USA). Primeiramente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo de captura diluído em PBS na concentração de 0,8 µg/mL, “overnight” a temperatura ambiente. Após este período de incubação, as placas foram lavadas com tampão PBS/Tween 20 0,05% por três vezes para a remoção de anticorpo não ligado (a lavagem das placas com este tampão foi repetida após cada etapa de incubação). Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com a adição de 300 µL de PBS/ABS 1%/poço por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram incubadas com 100 µL do padrão (osteopontina recombinante) diluídos em PBS/SFB 10% (soro fetal bovino) e com 100 µL das amostras por duas horas a temperatura ambiente. Em etapa seguinte, 100 µL de anticorpo de detecção biotilado na concentração de 100 ng/mL (diluído em PBS/ABS 1%) foi adicionado em cada poço por um período de incubação de duas horas a temperatura ambiente. As placas foram incubadas com 100 µL/poço de estreptavidina peroxidase por 20 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz e a seguir, incubadas com 100 µL de solução substrato na diluição 1:1 de reagente A (H₂O₂) e reagente B (tetrametilbenzidina) por 20 minutos ao abrigo da luz. As reações foram interrompidas com a adição de 50 µL de H₂SO₄, 2N e imediatamente medidas em leitor de microplacas Multiskan EX, realizando-se as leituras a 450 e a 540 nm. As leituras feitas a 540 nm foram subtraídas das realizadas a 450 nm para corrigir imperfeições ópticas nas placas empregadas. A concentração de OPN nas amostras foi determinada a partir da curva padrão de OPN recombinante nas concentrações de 1000 a 7,8 pg/mL. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como a média da concentração de OPN ± erro padrão (pg/mL).

3.10 Determinação da produção de óxido nítrico

A produção de NO de camundongos B10.A e A/J infectados com Pb18 ou Pb265 foi determinada pela medida da concentração de nitrito em sobrenadante de omento, empregando-se o método de Griess (DING et al., 1990). Resumidamente, 50 μ L dos sobrenadantes de omento foram incubados em placas de 96 poços contendo um volume igual de reagente de Griess (5% de sulfanilamida/0,1% de diidrocloreto de naftileno diamina/5% de H_3PO_4) a temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura da reação foi realizada em comprimento de onda de 540 nm empregando-se o leitor de microplacas Multiskan EX. A concentração de nitrito nas amostras foi determinada a partir da curva padrão de 50 a 0,03 μ M de $NaNO_2$ e todas as análises realizadas em duplicata e os resultados expressos como a média da concentração de nitrito $\pm$ erro padrão em micromoles por grama de tecido.

3.11 Contagem de unidades formadoras de colônias de *P. brasiliensis*

Grupos de camundongos das linhagens B10.A e A/J, assim como das linhagens C57BL/6 KOiNOS e C57BL/6 (iNOS suficientes) infectados com Pb18 ou Pb265 foram sacrificados aos 15 e 120 dias de infecção.

Baço, omento, fígado e pulmão foram coletados e transferidos para frascos estéreis e pesados. Posteriormente, os órgãos recolhidos foram macerados em “potters” contendo 5 mL de PBS estéril, transferidos para tubos de plástico e mantidos em gelo. Os macerados dos órgãos foram centrifugados a 3000 rpm por cinco minutos em centrífuga refrigerada e os sobrenadantes obtidos foram coletados e guardados para posterior utilização. Os “pellets” obtidos a partir da centrifugação foram ressuspensos em 1 mL de PBS e 100 μ L de cada suspensão foi semeada em placas de Petri contendo meio BHI-ágar (brain heart infusion, ágar, 5% de soro normal de cavalo, 4% de fator de crescimento obtido de cultura de Pb192 e 1% de solução antibiótica estreptomicina+penicilina) e posteriormente incubadas em estufa a 35-37 °C (SINGER-VERMES, 1993).

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos viáveis foi realizada num período aproximado de 14 dias de crescimento. Os resultados

foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da contagem de UFC por grama do órgão analisado (log na base 10).

3.12 Ensaio zimográfico para avaliação da atividade gelatinolítica das metaloproteinases da matriz (MMPs) em omento

Os extratos teciduais de omento de camundongos B10.A e A/J inoculados com o isolado Pb18 ou Pb265 e de camundongos C57BL/6 KOiNOS e C57BL/6 (iNOS suficientes) inoculados com Pb18 foram analisados após 15 e 120 dias de infecção através da zimografia. É um método eletroforético simples, sensível e quantificável, que detecta a atividade proteolítica de enzimas, tais como as metaloproteinases, com base nos pesos moleculares, permitindo a visualização tanto das formas latentes como das ativas, desde que as pró-formas são ativadas durante o processo de renaturação após a eletroforese (KLEINER e STETLER-STEVENSON, 1994). Neste estudo empregamos os sobrenadantes dos homogenatos de omento obtidos após maceração em 5 mL de PBS. A concentração protéica das amostras foi determinada através do micrométodo do ácido biscinconínico (BCA) utilizando-se o kit BCA "Protein Assay Reagent" (Pierce Biotechnology, Inc., USA). As amostras foram empregadas na concentração protéica total de 1000 μ g/mL em tampão da amostra (SDS 10%, sucrose 4%, Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,1%).

A atividade gelatinolítica das MMPs foi estudada segundo Kleiner e Stetler-Stevenson (1994). Resumidamente, as amostras teciduais (20 μ L) foram aplicadas em gel de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Eletroforesis) 10% contendo 0,1% de gelatina tipo B (Sigma-Aldrich, USA), utilizando o sistema Mini-PROTEAN[®] II Electrophoresis cell (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Após realização da corrida eletroforética em tampão de corrida (3,75 g/L de Tris-base, 18 g/L de glicina, 1,25 g/L de SDS) a 30 mA a 4 °C, os géis foram incubados a temperatura ambiente com Triton X-100 2,5% por 1 h sob agitação e em seguida incubados com tampão substrato (Tris 50mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, Brij 35P 0,02%, pH 7,5) "overnight" a 37 °C. Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 (0,1% em metanol 45%/ácido acético 10%) e descorados (metanol 45%/ácido

acético 10%). A atividade proteolítica foi visualizada através da observação de regiões não coradas no gel, indicando zonas de degradação da gelatina. O peso molecular das bandas foi estimado a partir do emprego de marcadores de peso molecular pré corados (Fermentas, USA). Também empregamos como controles positivos os recombinantes das enzimas MMP-2 e MMP-9 (R&D Systems, USA).

Para avaliar se a atividade gelatinolítica observada foi devido à presença das metaloproteinases, adicionou-se de 10-20 nM do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ou 5 mM de orto-fenantrolina (Sigma, USA), inibidores das MMPs, ou 1-2 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), o inibidor das serina proteinases nas etapas de incubação com Triton-X e com o tampão do substrato.

3.13 Obtenção do antígeno “cell free” de *P. brasiliensis*

Os isolados de *P. brasiliensis*, Pb18 e Pb265, foram empregados para a obtenção do “cell free antigen” (CFA), exoantígeno de fácil obtenção, conforme metodologia descrita por Camargo et al. (1991). Resumidamente, células leveduriformes do fungo foram cultivadas em meio de cultura Fava Netto a 37 °C e após sete dias de cultivo, a massa celular fúngica foi coletada com alça de platina e transferida para microtubos. Aproximadamente 300 mg da massa celular fúngica contida em cada tubo foi suspensa em 1 mL de PBS, homogeneizadas por 30 segundos em agitador do tipo Vórtex e imediatamente centrifugadas a 10000 rpm em centrífuga por 60 segundos. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em membrana Millipore (0,22 µm), aliquotados e estocados a -20 °C. A concentração protéica dos CFAs de Pb18 e Pb265 foi determinada pelo método BCA (ácido biscinconínico), empregando-se o kit BCA .

3.14 Ensaio zimográfico para avaliar a atividade gelatinolítica de *P. brasiliensis*

A atividade proteolítica de *P. brasiliensis* foi avaliada empregando-se o ensaio zimográfico em gel de poliacrilamida, contendo 0,1% de gelatina tipo B, conforme protocolo descrito na seção 3.12. Os CFAs dos isolados Pb18 e Pb265

foram aplicados no gel em diferentes concentrações protéicas (5, 10, 20 e 25 µg por 20 µL). A atividade gelatinolítica foi visualizada através da observação de regiões não coradas no gel, indicando zonas de lise no peso molecular característico da enzima. Para avaliar se a atividade gelatinolítica foi devido a presença específica das metaloproteinases ou das serino proteinases, empregou-se EDTA, fenantrolina ou PMSF.

3.15 Semi-quantificação do ensaio zimográfico

A análise semi-quantitativa da zimografia para detecção de atividade gelatinolítica de MMP-9 e MMP-2 em omento de camundongos infectados e de proteases de *P. brasiliensis* foi realizada empregando-se o software AlphaEase DigiDoc 1000 versão 3 (Alpha Innotech, USA). Este programa também foi utilizado para determinar os pesos moleculares aproximados das bandas nos géis. Cada gel foi escaneado e a imagem salva em escala de cinza. A partir dessas imagens, as bandas de interesse presentes nos géis foram analisadas e os valores da densidade óptica integrada determinados, descontando-se o “background”. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da porcentagem de atividade gelatinolítica (valores de densidade óptica integrada, DOI) (n=3-6) presente em cada banda em relação à banda mais intensa (considerada como 100%) observada em cada gel.

3.16 Análise estatística

A análise de variância com dois fatores (two way-ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni e a análise de variância com um fator (one-way ANOVA), seguido pelo método de Tukey de comparações múltiplas foram utilizadas para avaliar a diferenças entre os grupos estudados ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software GraphPad Prism versão 4 (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Infecção de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) com os isolados de alta (Pb18) e baixa (Pb265) virulência de *P. brasiliensis*

4.1.1 Avaliação histopatológica das lesões granulomatosas de omento: análises qualitativas e semi-quantitativas

Infecção com Pb18

Neste estudo avaliamos a resposta granulomatosa em omento de camundongos infectados com *P. brasiliensis*. No omento peripancreático/periesplênico de camundongos não infectados observamos a presença de tecido adiposo e pequenos agregados celulares compostos principalmente de linfócitos e macrófagos, além de poucos depósitos de matriz extracelular, nos chamados “milky spots” (**Figuras 1A e 1B**). A inoculação intraperitoneal do fungo acarretou o desenvolvimento de várias lesões granulomatosas nos “milky spots” do omento, com a presença de diferentes populações celulares em vários estágios de diferenciação e aumento na deposição de matriz extracelular.

Após 15 dias de infecção com Pb18, lesões granulomatosas de aspecto frouxo e pouco organizadas foram observadas em camundongos B10.A e A/J (**Figuras 1C e 1E**). Estes granulomas foram compostos por focos centrais contendo macrófagos e células gigantes (**Figuras 1D e 1F**) ao redor de células fúngicas de morfologia preservada (**Figura 1Ci e 1Fi**) e também por agregados linfoplasmocitários localizados na periferia dos granulomas (**Figura 1D e 1F**). Lesões contendo focos de destruição (**Figura 1E**) e apresentando células fúngicas de morfologia alterada (**Figura 1Ei**) foram observadas em camundongos resistentes.

Após 120 dias de infecção, observou-se um aumento no número e tamanho das lesões em omento de camundongos suscetíveis. Estes animais desenvolveram múltiplos focos granulomatosos de aspecto frouxo (**Figura 2A**) contendo várias células gigantes multinucleadas ao redor de células fúngicas de morfologia preservada e com brotamentos (**Figura 2C, 2Ai e 2Ci**). Neste período notou-se também a formação de lesões fibrogênicas com intensos depósitos de MEC (**Figura E**). Na linhagem resistente, várias lesões granulomatosas compactas/organizadas

(**Figura 2B**) principalmente contendo focos de destruição tecidual circunscritos por MEC foram observadas como aos 15 dias, porém maiores em extensão (**Figura 2D**). Estas lesões continham células fúngicas de morfologia preservada e alterada (**Figuras Bi e Di**). Em menor frequência, camundongos resistentes apresentaram lesões caracterizadas como residuais por conterem macrófagos pseudoxantomatosos e células fúngicas destruídas (**Figuras 2F e 2Fi**).

A área de lesão desenvolvida no omento de camundongos infectados, além da área contendo *P. brasiliensis* foram analisadas semi-quantitativamente (média da área $\pm$ erro padrão em μm^2) e constituem a **Figura 3**. No que concerne a área total de lesão, observou-se um aumento na área granulomatosa no decurso da infecção em ambas as linhagens de camundongos infectados com Pb18. A área de lesão com fungos em camundongos B10.A foi significativamente maior aos 120 dias em relação aos 15 dias de infecção e também maior em comparação ao grupo de camundongos A/J na fase tardia da infecção ($p < 0,05$). A área de lesão ocupada por fungos representou 73,31% do total de área do granuloma na linhagem B10.A aos 120 dias de infecção, no qual foram visualizadas muitos fungos viáveis e com múltiplos brotamentos, como descrito anteriormente. Por outro lado, 39,01% da área de lesão foi preenchida por células fúngicas em camundongos A/J, muitas delas com aspecto de degeneração, apesar do aumento da área total do granuloma na fase tardia da infecção.

Infecção com Pb265

Aos 15 dias de infecção, ambas as linhagens de camundongos apresentaram o mesmo padrão de lesões, isto é, granulomas de aspecto frouxo ou com pouca organização, contendo focos de necrose central, semelhante ao observado nos animais resistentes infectados com Pb18 no mesmo período (**Figuras 4A-D**). Aos 120 dias de infecção, apenas lesões residuais com a presença de macrófagos pseudoxantomatosos e células fúngicas destruídas foram observadas nas lesões granulomatosas nos dois grupos estudados (**Figuras 4E e 4F**).

A área de lesão mensurada aos 15 dias de infecção foi maior do que a observada aos 120 dias em ambas as linhagens de camundongos, sendo

significativa em camundongos B10.A ($p < 0,05$) (**Figura 5**). Apesar da maior de lesão detectada na fase precoce da infecção, apenas 10% da área foi ocupada por fungos. Por outro lado, poucas lesões e de aspecto residual foram visualizadas aos 120 dias de infecção, sendo cerca de 36,82% e 76,49% da área de lesão ocupada por fungo, respectivamente, em camundongos B10.A e A/J. Contudo, deve-se ressaltar que na fase tardia da infecção, apenas fungos degenerados foram observados nos “milky spots” do omento.

Figura 1 – Análise histopatológica das lesões granulomatosas em omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 dias de infecção com o isolado Pb18.

Controle não infectado: omento de camundongo não infectado, apresentando o tecido linfomielóide ("milky spot"), composto de pequenos agregados mononucleares, compostos predominantemente de linfócitos e macrófagos e pouca MEC (A, 100x e B, 400x/HE);

B10.A+Pb18+15d: presença de granulomas frouxos e de pouca organização (C, 40x/HE) compostos por focos centrais contendo macrófagos e células gigantes (setas) (D, 250x/HE) ao redor de células fúngicas com brotamentos (estrela) e de morfologia preservada (Ci, 250x/Grocott). Estas lesões apresentaram agregados linfo-plasmocitários (ponta de seta);

A/J+Pb18+15d: presença de lesões com necrose central (E, 40x/HE) contendo células fúngicas de morfologia alterada (E, 250x/Grocott) e de lesões com pouca organização (seta em E) contendo macrófagos e células gigantes (setas), além de agregados de linfócitos e plasmócitos (ponta de seta) (F, 250x/HE) contendo focos de células fúngicas de morfologia preservada (Fi, 250x/Grocott).

Figura 2 – Análise histopatológica das lesões granulomatosas em omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 120 dias de infecção com o isolado Pb18.

B10.A+Pb18+120d: presença de lesão granulomatosa extensa de aspecto frouxo (A, 40x/HE), constituída por várias células gigantes multinucleadas (setas) (C, 250x/HE) circundando muitas células fúngicas de morfologia preservada e com múltiplos brotamentos (Ai, 250x e Ci, 400x/Grocott). Neste período foram observadas também lesões de aspecto fibrótico contendo intenso depósito de matriz extracelular (setas em E, 200x/HE);

A/J+Pb18+120d: formação de granuloma compacto (B, 40x/HE), contendo focos de destruição tecidual circunscritos por matriz extracelular (asterisco) (D, 250x/HE) e apresentando fungos de morfologia alterada (Bi, 250x e Di, 200x/Grocott). Neste período, observou-se a presença de lesões residuais contendo macrófagos pseudoxantomatosos (setas) (F, 400x/HE) e fungos degenerados (Fi, 400x/Grocott) apenas em camundongos resistentes.

Figura 3 – Semi-quantificação da análise histopatológica para avaliar a área de lesão e a área contendo *P. brasiliensis* (Pb18) em omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção.

A análise semi-quantitativa foi realizada a partir do emprego de uma ocular reticulada (100 quadrados, área total de 1120 mm²) para a contagem de quadrados totalmente preenchidos (= 1) e metade preenchidos (= 1/2) por lesão e por fungo contido na lesão em 10 campos de observação (quando possível) no aumento total de 125x (objetiva de 10x e ocular de 12,5x). Todos os resultados foram expressos como a média da área de lesão ± erro padrão (μm²) ou média da área de lesão contendo fungo ± erro padrão (μm²).

Diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (* e #).

* B10.A+Pb18+15 dias vs. B10.A+Pb18+120 dias

B10.A+Pb18+120 dias vs. A/J+Pb18+120 dias

Figura 4 – Análise histopatológica das lesões granulomatosas em omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb265.

B10.A+Pb265+15d: granuloma de aspecto frouxo (A, 40x/HE) contendo macrófagos (seta, B, 200x/HE) ao redor de células fúngicas de morfologia preservada e também alterada (Ai, 200x/Grocott);

A/J+Pb265+15d: granuloma frouxo (C, 40x/HE) contendo células fúngicas (Ci, 200x/Grocott) circunscritas por macrófagos (seta, D, 400x/HE);

B10+Pb265+120d: presença de lesões de aspecto residual (E, 400x/HE) contendo macrófagos pseudoepiteliomatosos (setas) e fungos degenerados (Ei, 400x/Grocott);

A/J+Pb265+120d: lesões residuais com a presença de macrófagos pseudoepiteliomatosos (F, 400x/HE) e células fúngicas destruídas (Fi, 400x/Grocott).

Figura 5 – Semi-quantificação da análise histopatológica para avaliar a área de lesão e a área contendo *P. brasiliensis* (Pb265) em omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção.

A análise semi-quantitativa foi realizada a partir do emprego de uma ocular reticulada (100 quadrados, área total de 1120 mm²) para a contagem de quadrados totalmente preenchidos (= 1) e metade preenchidos (= 1/2) por lesão e por fungo contido na lesão em 10 campos de observação (quando possível) no aumento total de 125x (objetiva de 10x e ocular de 12,5x). Todos os resultados foram expressos como a média da área de lesão ± erro padrão (μm²) ou média da área de lesão contendo fungo ± erro padrão (μm²).

Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (*).

* B10.A+Pb265+15 dias vs. B10.A+Pb265+120 dias

4.1.2 Avaliação da expressão de IFN- γ nas lesões granulomatosas de omento: análises qualitativas e quantitativas

Controles

Lâminas controles sem o emprego do anticorpo primário foram avaliadas quanto à especificidade da reação e nenhuma marcação positiva foi detectada (**Figura 6A**). Quanto a presença de IFN- γ em cortes de omento de animais controles não infectados, apenas fraca positividade foi observada (**Figura 6B**).

Infecção com Pb18

Aos 15 dias de infecção, marcação positiva para IFN- γ foi observada em células mononucleares com morfologia de linfócitos, presentes na região periférica das lesões de aspecto frouxo em omento de camundongos suscetíveis B10.A (**Figuras 6C e 6D**). As zonas periféricas positivas das lesões apresentaram intenso infiltrado celular, em alguns locais circundados por espaços anteriormente preenchidos por células adiposas (**Figura 6C**). Fraca marcação foi detectada na matriz extracelular e ausente nas células localizadas principalmente nos centros das lesões, como os macrófagos, células gigantes multinucleadas, células epitelióides e leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN). Em camundongos da linhagem resistente (A/J), marcação positiva para IFN- γ foi detectada também na periferia das lesões, as quais apresentaram na maioria dos casos, centros necróticos IFN- γ negativos (**Figuras 6E e 6F**). As células positivas mononucleares (morfologia de célula linfóide) apresentaram intensa marcação na periferia dessas lesões (**Figura 6F**) e também em infiltrados inflamatórios próximos ao tecido adiposo do omento.

Aos 120 dias de infecção, camundongos B10.A apresentaram novamente expressão de IFN- γ em células com morfologia de linfócitos, as quais foram localizadas na região periférica das lesões, circundando focos granulomatosos de aspecto disseminado, apenas diferindo em número de células positivas (maior do que aos 15 dias) (**Figura 7A**). Nesta fase, a reação positiva foi detectada fracamente na MEC em algumas lesões (**Figura 7B**). Na linhagem resistente, a positividade foi também detectada em células linfóides principalmente na periferia das lesões

necróticas, no entanto, com um maior número de células positivas (**Figuras 7C e 7D**). Lesões ocupando áreas menores apresentaram fraca positividade quando associadas a maior deposição de matriz extracelular, ao contrário dos granulomas ativos que continham células positivas em zonas periféricas dos granulomas. Infiltrados celulares ao redor de vasos sanguíneos e próximos ao tecido adiposo apresentaram intensa marcação positiva para IFN- γ .

Infecção com Pb265

Aos 15 dias de infecção com Pb265 observou-se um padrão similar de marcação observado na infecção com Pb18, ou seja, células mononucleares reativas com morfologia de linfócitos e localizadas na periferia das lesões e entre espaços preenchidos anteriormente por tecido adiposo (**Figuras 8A e 8B**).

Aos 120 dias de infecção, poucas células mononucleares de aspecto linfóide foram positivas para IFN- γ em lesões de aspecto residual desenvolvida nos grupos estudados (**Figuras 8C e 8D**).

A análise quantitativa da reação de IHQ para IFN- γ (**Figura 9**) demonstrou que o número de células imunorreativas foi similar em omento de camundongos B10.A e A/J aos 15 dias de infecção com Pb18. Já aos 120 dias de infecção, o número de células IFN- γ positivas praticamente dobrou em camundongos B10.A e em A/J, aumentou quase cinco vezes ($p < 0,05$, B10.A+Pb18+120d vs. A/J+Pb18+120d; A/J+Pb18+15d vs. A/J+Pb18+120d). Em relação à intensidade da marcação, uma maior porcentagem de células foram fracamente positivas em omento de B10.A (68%) e A/J (62%) após 15 dias de infecção, enquanto aos 120 dias de infecção, a porcentagem de células IFN- γ positivas com marcação fraca e intensa foi similar em B10.A (55% fortes e 45% fracas) e igual em A/J (50% fracas e fortes).

Na quantificação da reação imuno-histoquímica para IFN- γ em lesões de camundongos infectados com Pb265 (**Figura 9**), observou-se no período de 15 dias de infecção, uma maior expressão de células positivas em camundongos B10.A do que em A/J resistentes, sendo similar a porcentagem de células com marcação positiva fraca (53%) e forte (47%) no primeiro grupo e maior a porcentagem de

células fracamente coradas no segundo grupo (59%). Aos 120 dias, ao contrário da infecção com Pb18, apenas lesões residuais foram observadas e acompanhadas pela queda no número total de células positivas em ambas as linhagens, sendo a maioria composta por células fracamente coradas, ou seja, 64% e 75%, respectivamente em B10.A e A/J.

Figura 6 – Imunolocalização de IFN- γ em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 dias de infecção com o isolado Pb18.

Controles: reação negativa em corte de omento na ausência do anticorpo primário (A, 250 $\times$); fraca marcação celular (seta) em omento de camundongo não infectado (B, 400 $\times$);

B10.A+Pb18+15d: células mononucleares positivas (setas) na periferia de lesão frouxa com pouca organização (C, 250 $\times$ e D, 400 $\times$);

A/J+Pb18+15d: expressão de IFN- γ em células mononucleares em região periférica (setas) de lesão fechada com necrose central (asterisco) (E, 250 $\times$ e F, 400 $\times$).

Reação de estreptavidina-biotina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Figura 7 – Imunolocalização de IFN- γ em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 120 dias de infecção com o isolado Pb18.

B10.A+Pb18+120d: focos granulomatosos circunscritos por células mononucleares positivas (setas) em lesão frouxa disseminada (A, 400 $\times$); várias células mononucleares IFN- γ positivas (setas) e pouca marcação positiva na MEC (asterisco) em região periférica de lesão frouxa (B, 400 $\times$);

A/J+Pb18+120d: expressão intensa em células mononucleares na periferia de lesão compacta (setas) com centro necrótico (asterisco) (C, 100 $\times$ e D, 400 $\times$).

Reação de estreptavidina-biotina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Figura 8 – Imunolocalização de IFN- γ pela em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 de infecção com o isolado Pb265.

B10.A+Pb265+15d: células mononucleares fortemente marcadas (setas) em pequena lesão com intenso infiltrado inflamatório (A, 400 $\times$);

A/J+Pb265+15d: marcação positiva celular (setas) na periferia do granuloma (B, 400 $\times$);

B10.A+Pb265+120d: poucas células expressando IFN- γ (seta) em lesão residual (C, 400 $\times$);

A/J+Pb265+120d: fraca positividade em células presentes em lesão residual (seta) (D, 400 $\times$).

Reação de estreptavidina-biotina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Figura 9 – Quantificação da análise imuno-histoquímica para avaliar a expressão de IFN- γ em lesões de omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção com Pb18 ou Pb265.

A análise quantitativa foi realizada empregando-se uma ocular com retículo de contagem (total de 100 quadrados), com o aumento total de 500 $\times$ (objetiva de 40 $\times$ e ocular de 12,5 $\times$), resultando na contagem do número total de células positivas e da porcentagem de células com fraca ou forte marcação positiva em campos com área total de 280 mm^2 . Todos os resultados foram expressos como a média do número de células positivas $\pm$ erro padrão por μm^2 . Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (* e **).

* A/J+Pb18+15 dias vs. A/J+Pb18+120 dias

** B10.A+Pb18+120 dias vs. A/J+Pb18+120 dias

4.1.3 Avaliação da expressão de OPN nas lesões granulomatosas de omento

Controles

Na ausência do anticorpo primário anti-OPN não se observou qualquer reação nas secções de omento (**Figura 10A**). Nos grupos controles não infectados, marcações positivas foram observadas em poucas células no omento de ambas as linhagens de camundongos. A positividade foi detectada em células mononucleares presentes nos “milky spots” (**Figura 10B**). O tecido epitelial glandular pancreático foi empregado como controle positivo da reação (**Figura 10C**).

Infecção com Pb18

A análise imuno-histoquímica da expressão de OPN demonstrou um padrão diferente de localização celular e extracelular deste componente em relação à expressão de IFN- γ nas lesões de omento. Aos 15 dias de infecção, marcação positiva para OPN foi localizada principalmente no centro das lesões granulomatosas. Além disso, a distribuição celular detectada foi visivelmente diferente, demonstrando células com morfologia de macrófagos e células gigantes multinucleadas positivas, ambas circundando focos fúngicos. A MEC apresentou de fraca a moderada expressão de OPN (**Figura 10D**). Contudo, na maioria das áreas observadas, a marcação celular apresentou um padrão heterogêneo, com positividade citoplasmática mais intensa em região peri-nuclear em células mononucleares (**Figuras 10E e 10H**) e marcando todo o citoplasma em células gigantes (**Figuras 10E e 10F**). A presença de células gigantes multinucleadas positivas com um maior grau de imunorreatividade foi detectada em lesões de camundongos B10.A (**Figuras 10D-F**) em relação aos camundongos resistentes A/J (**Figuras 10G-I**). Lesões com necrose central observadas em camundongos A/J apresentaram fraca positividade e a deposição de OPN na matriz extracelular (MEC) não foi praticamente observada.

Aos 120 dias de infecção, lesões extensas desenvolvidas em camundongos B10.A apresentaram praticamente o mesmo padrão de marcação positiva para OPN observado aos 15 dias de infecção. Novamente a imunorreatividade celular foi observada preferencialmente em células gigantes multinucleadas envolvendo

células leveduriformes de *P. brasiliensis*, porém com um padrão de marcação citoplasmático mais homogêneo e mais intenso (**Figuras 11A**), além da expressão peri-nuclear em células mononucleares (**Figuras 11A e 11C**). Reação positiva para OPN na MEC foi observada principalmente na zona periférica das lesões (**Figura 11C**), enquanto fraca marcação foi detectada em lesões de padrão fibrótico com intenso depósito de MEC (**Figura 11E**). Em camundongos resistentes A/J, OPN foi observada nas lesões granulomatosas compactas, sendo expressa principalmente na porção peri-nuclear de macrófagos (**Figuras 11B, 11D e 11F**) e também em células gigantes multinucleadas, ambos localizados nos centros dos granulomas e na periferia dos centros necróticos. A expressão de OPN foi também observada nas áreas de destruição tecidual apresentando material extracelular e restos celulares (**Figura 11D**) e na MEC em região periférica de foco necrótico (**Figura 11F**). Lesões concêntricas formando cápsulas com intensa deposição de MEC apresentaram fraca reatividade.

Infecção com Pb265

A expressão de OPN em omento de camundongos B10.A após 15 dias de infecção com Pb265 foi observada também em macrófagos e em células gigantes multinucleadas presentes ao redor das células fúngicas. O padrão de marcação positiva foi similar ao encontrado nas lesões de camundongos infectados com Pb18, com a marcação celular principalmente peri-nuclear (**Figuras 12A e 12B**). Nas lesões necróticas, depósitos de OPN foram observados na periferia dos centros necróticos, marcando aparentemente macrófagos e células gigantes.

De modo geral, fraca positividade foi detectada nos grupos estudados após 120 dias de infecção com o isolado fúngico Pb265, sendo observada em poucas células nos “milky spots” de omentos normal e também nas lesões residuais (**Figuras 12C e 12D**).

A expressão de OPN foi avaliada quantitativamente comparando-se a imunorreatividade nos granulomas de camundongos suscetíveis e resistentes após 15 e 120 dias de infecção com Pb. Camundongos não infectados foram também avaliados e comparados aos grupos experimentais. A **Figura 13** apresenta os

valores da média da densidade óptica integrada (DOI, correlação entre intensidade ou densidade óptica e área da marcação positiva).

De modo geral, uma menor positividade foi detectada em camundongos não infectados em relação aos infectados com Pb18 ($p < 0,05$, B10.A controles+15d vs. B10.A+Pb18+15d; B10.A controles+120d vs. B10.A+Pb18+120d; A/J controles+120d vs. A/J+Pb18+120d) ou aos infectados com Pb265 ($p < 0,05$, B10.A controles+15d vs. B10.A+Pb265+15d). Diferenças entre camundongos não infectados e os inoculados com Pb265 não foram observadas aos 120 dias de infecção.

Comparando-se as linhagens de camundongos infectadas com Pb18, maior positividade para OPN foi detectada em camundongos B10.A do que em A/J aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$). Por outro lado, a expressão de OPN foi significativamente maior nas lesões de camundongos A/J do que nas lesões de B10.A aos 120 dias ($p < 0,05$). Em relação ao tempo de infecção, um aumento significativo foi observado na linhagem A/J ($p < 0,05$), enquanto uma queda na expressão foi detectada em camundongos B10.A ($p < 0,05$) na fase tardia da infecção.

Na infecção com Pb265, maior expressão de OPN foi observada em camundongos B10.A em relação aos camundongos A/J aos 15 dias ($p < 0,05$), enquanto baixa expressão de OPN foi detectada em ambas as linhagens de camundongos aos 120 de infecção, similar ao encontrado em camundongos controles não infectados.

Na análise comparativa da expressão de OPN na infecção pelos diferentes isolados de Pb, observou-se uma expressão significativamente menor em camundongos B10.A inoculados com Pb265 do que nos inoculados com Pb18 após 15 dias de infecção ($p < 0,05$). Ambas as linhagens de camundongos apresentaram menor marcação para OPN aos 120 dias de infecção com Pb265 se comparada à infecção com o isolado Pb18 ($p < 0,05$).

Figura 10 – Imunolocalização de OPN em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 dias de infecção com o isolado Pb18.

Controles: reação negativa na ausência do anticorpo primário (A, 400x); fraca marcação celular (seta) em "milky spot" omental de camundongo não infectado (B, 400x); controle positivo demonstrando marcação positiva em tecido epitelial glandular pancreático (C, 400x);

B10.A+Pb18+15d: granulomas contendo marcação positiva para OPN em células com morfologia de macrófagos (ponta de seta), com fraca positividade na MEC (asterisco) (D, 200x) e intensa positividade em células gigantes multinucleadas (setas) (E, 200x e F, 400x);

A/J+Pb18+15 d: pouca expressão de OPN em células com morfologia de macrófagos (G-H, 200x e I, 400x) e ao redor de foco fúngico (ponta de seta) na periferia de granulomas com necrose central (asterisco).

Reação de estreptavidina-biotina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Figura 11 – Imunolocalização de OPN em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 120 dias de infecção com o isolado Pb18.

B10.A+Pb18+120d: marcação positiva para OPN em células com morfologia de macrófagos (ponta de seta) e principalmente em células gigantes multinucleadas (setas) (A, 400x), assim como na MEC (asterisco) (C, 400x) em granulomas frouxos; pouca expressão de OPN observada nas células (seta) e na MEC (asterisco) na periferia de granuloma fibrótico (E, 200x);

A/J+Pb18+120d: intensa positividade em células com morfologia de macrófagos (setas) próximas e ao redor de células fúngicas em granuloma fechado (B, 400x); expressão de OPN em área de degradação tecidual (asterisco) e também em células (seta) (D, 200x); intensa marcação em região peri-nuclear de células com morfologia de macrófagos (setas) e moderada expressão na MEC (asterisco) em região periférica de foco necrótico (F, 400x);

Reação de estreptavidina-biotina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Figura 12 – Imunolocalização de OPN em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb265.

B10.A+Pb265+15d: expressão de OPN em células com morfologia de macrófagos (setas) e pouca marcação na MEC (asterisco) em granuloma frouxo (A, 400x);

A/J+Pb18+15d: presença de OPN em células com morfologia de macrófagos (seta) (B, 400x);

B10.A+Pb265+120d: fraca expressão em macrófagos pseudoxantomatosos (seta) presentes em lesão residual (C, 400x);

A/J+Pb265+120d: macrófagos pseudoxantomatosos (seta) com fraca marcação para OPN em lesão residual (D, 400x);

Reação de estreptavidina-biotina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Figura 13 – Análise quantitativa da reação imuno-histoquímica para detecção da expressão de osteopontina (OPN) em omento de camundongos suscetíveis B10.A e resistentes A/J após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb18 ou o isolado Pb265.

Grupos controles não infectados foram também estudados. Os resultados expressam a média ± erro padrão da densidade óptica integrada (densidade óptica multiplicada pela área marcada) (n=3). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

* Diferenças significativas entre as linhagens de camundongos (B10.A×A/J)

Diferenças significativas entre os isolados de Pb (Pb18×Pb265)

§ Diferenças significativas entre 15 e 120 dias de infecção

+ Diferenças significativas entre os grupos controles não infectados e infectados

4.1.4 Dosagem de OPN em extratos teciduais de omento

Os níveis de OPN em extratos teciduais de omento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* foram determinados por ELISA. Grupos controles não infectados foram avaliados e comparados aos grupos experimentais.

Como apresentado na **Figura 14**, menores níveis de OPN foram detectados em camundongos não infectados comparados aos infectados com Pb18 ($p < 0,05$, B10.A controle+15d vs. B10.A+Pb18+15d; A/J controle+120d vs. A/J+Pb18+120d) ou aos infectados com Pb265 ($p < 0,05$, B10.A controle+15d vs. B10.A+Pb265+15d; A/J controle+15d vs. A/J+Pb265+15d). Baixos níveis de OPN foram observados em omento de camundongos após 120 dias de infecção com Pb265, similares aos observados nos grupos controles não infectados.

Os níveis de OPN foram significativamente maiores em camundongos B10.A do que em A/J aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$), mas não aos 120 dias de infecção com Pb18. A concentração de OPN diminuiu em camundongos B10.A, enquanto níveis aumentados de OPN foram detectados em camundongos A/J. Entretanto, estes resultados não foram considerados estatisticamente significativos.

Em camundongos infectados com Pb265 (**Figura 14**), os níveis de OPN não diferiram entre as linhagens de camundongos nos períodos de infecção estudados. Menores níveis de OPN foram detectados aos 120 dias de infecção, contudo, foi considerado significativo apenas em camundongos A/J ($p < 0,05$).

Na comparação entre a infecção com os isolados Pb18 e Pb265, maiores concentrações de OPN foram detectadas em camundongos A/J inoculados com Pb265 do que em camundongos inoculados com Pb18 aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$).

Figura 14 – Avaliação dos níveis de osteopontina (OPN) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) em homogenato de omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb 18 ou o isolado Pb 265.

Grupos controles não infectados foram também estudados. Os resultados expressam a média $\pm$ erro padrão da concentração de OPN em pg/mL ($n=5-8$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

* Diferenças significativas entre as linhagens de camundongos (B10.A $\times$ A/J)

Diferenças significativas entre os isolados de Pb (Pb 18 $\times$ Pb 265)

§ Diferenças significativas entre 15 e 120 dias de infecção

+ Diferenças significativas entre os grupos controles não infectados e infectados

4.1.5 Dosagem de óxido nítrico em extratos teciduais de omento

A produção de NO foi avaliada pela medida da concentração de nitrito (NO_2^-) presente no omento de camundongos infectados e controles não infectados. Como mostrado na **Figura 15**, baixas concentrações de nitrito foram detectadas em camundongos não infectados em relação aos grupos infectados com Pb18 ($p < 0,05$, A/J controle+15d vs. A/J+Pb18+15d; A/J controle+120d vs. A/J+Pb18+120d; B10.A controle+120d vs. B10.A+Pb18+120d) ou aos infectados com Pb265 ($p < 0,05$, B10.A controle+120d vs. B10.A+Pb265+120d; A/J controle+15d vs. A/J+Pb265+15d; A/J controle+120d vs. A/J+Pb265+120d).

Os níveis de nitrito em omento de camundongos A/J foram significativamente maiores do que em camundongos B10.A após 15 e 120 dias de infecção com Pb18 ($p < 0,05$). Diferenças entre os períodos de 15 e 120 dias de infecção não foram observadas.

Na infecção com Pb265, as concentrações de nitrito foram significativamente maiores em camundongos A/J do que em B10.A aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$), com um aumento significativo na concentração de nitrito em camundongos B10.A aos 120 dias comparado aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$).

Comparando camundongos infectados com Pb18 e Pb265, níveis significativamente maiores foram detectados em camundongos A/J após 15 dias de infecção com o isolado Pb18 ($p < 0,05$) e em camundongos B10.A após 120 dias de infecção com Pb265 ($p < 0,05$).

Figura 15 – Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) através da determinação da concentração de nitrito em omento de camundongos suscetíveis B10.A e resistentes A/J após 15 e 120 dia de infecção com o isolado Pb18 ou o isolado Pb265.

Grupos controles não infectados foram também estudados. Os resultados expressam a média $\pm$ erro padrão da concentração de nitrito em micromoles por grama de tecido ($n=5-10$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

* Diferenças significativas entre as linhagens de camundongos (B10.A $\times$ A/J)

Diferenças significativas entre os isolados de Pb (Pb18 $\times$ Pb265)

§ Diferenças significativas entre 15 e 120 dias de infecção

+ Diferenças significativas entre os grupos controles não infectados e infectados

4.1.6 Avaliação do grau de disseminação de *P. brasiliensis* nos órgãos

A avaliação da carga fúngica foi realizada através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. brasiliensis* em omento, baço, fígado e pulmão de camundongos infectados com Pb18 ou Pb265. Os resultados são apresentados na **Figura 16**.

Comparando-se as linhagens de camundongos, maior quantidade de fungos viáveis foi recuperada em omento de camundongos B10.A do que A/J aos 15 e 120 dias de infecção com Pb18 ($p < 0,05$) (**Figura 16A**). Camundongos B10.A apresentaram alta carga fúngica que persistiu no decurso da infecção, indicando uma doença ativa. Por outro lado, a diminuição da carga fúngica foi observada em camundongos A/J na fase tardia da infecção.

Na infecção com Pb265, grande número de fungos viáveis foi encontrado em omento de camundongos B10.A e A/J após 15 dias de infecção, mas nenhuma diferença foi detectada entre os grupos. Já aos 120 dias de infecção, não foram observados fungos viáveis em ambos os grupos. A não recuperação de fungos no omento associada ao estudo histopatológico que evidenciou a presença apenas de lesões residuais na fase tardia da infecção, confirmam a resolução da infecção com o isolado Pb265.

Na comparação entre a infecção com os diferentes isolados, maior quantidade de fungos foi recuperada em omento de camundongos após 120 dias de infecção com Pb18 do que com Pb265 ($p < 0,05$).

Grande número de fungos viáveis foi observado em baço, fígado e pulmão de camundongos suscetíveis e resistentes após 15 dias de infecção com Pb18 (Figuras 16B, 16C e 16D). Na fase tardia da infecção, menor carga fúngica foi observada no baço e fígado de camundongos resistentes do que em camundongos suscetíveis, com diminuição significativa da carga fúngica em fígado de camundongos resistentes ($p < 0,05$) (**Figuras 16B, 16C e 16D**).

Alta carga fúngica foi detectada no fígado de ambas as linhagens na fase precoce da infecção com Pb265, mas não houve recuperação de fungos viáveis nos órgãos aos 120 dias de infecção. Comparando-se as infecções com os diferentes isolados, menor carga fúngica foi encontrada na infecção com o isolado Pb265, com diferenças significativas em baço, fígado e pulmão de camundongos suscetíveis e em pulmão de camundongos resistentes aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$),

enquanto maior número de fungos viáveis foi observado em baço e pulmão de ambas as linhagens e em fígado de camundongos B10.A aos 120 dias de infecção com Pb18 ($p < 0,05$).

Figura 16 – Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. brasiliensis* em omento (A), baço (B), fígado (C) e pulmão (D) de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb18 ou o isolado Pb265.

Os resultados expressam a média ± erro padrão de CFU (log₁₀) por grama de tecido (n=5-10). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

* Diferenças significativas entre as linhagens de camundongos

Diferenças significativas entre os isolados de Pb (Pb18×Pb265)

§ Diferenças significativas entre 15 e 120 dias de infecção

4.1.7 Avaliação da expressão de MMP-9 nas lesões granulomatosas de omento

Controles

Reações imuno-histoquímicas em cortes de tecido sem o emprego do anticorpo primário, secundário ou na ausência de estreptavidina-peroxidase foram realizadas para avaliar a especificidade da reação e apenas reações negativas foram observadas (**Figura 17A**). Em cortes de omento de animais controles não infectados, positividade foi observada em células mononucleares presentes em agregados celulares presentes nos “milky spots” (**Figura 17B**). Cortes histológicos de pulmão foram empregados como controles positivos e apresentaram marcação positiva para MMP-9 na porção epitelial dos tecidos (**Figura 17C**).

Infecção com Pb18

Aos 15 dias de infecção, a expressão de MMP-9 em lesões de omento de camundongos B10.A foi observada principalmente em focos inflamatórios contendo células fúngicas de morfologia preservada (**Figura 17D**) ou debris (**Figura 17E**) positivos localizados no centro dos granulomas. Agregados de células mononucleares presentes na periferia das lesões também apresentaram positividade para MMP-9 (**Figura 17F**). Nas lesões de omento de camundongos A/J, a expressão de MMP-9 foi detectada também nos focos de lesões contendo células fúngicas positivas (**Figura 17G**), notavelmente nos centros das lesões contendo necrose, marcando áreas de debris celulares (**Figura 17H**). Células mononucleares positivas foram também visualizadas na periferia das lesões (**Figura 17I**), da mesma forma encontrada em camundongos B10.A.

Aos 120 dias de infecção, observou-se uma marcante expressão da enzima MMP-9 nas lesões de ambas as linhagens de camundongos, principalmente nas áreas de intensa degradação tecidual caracterizada pela presença de inúmeros focos de Pb. Em camundongos B10.A, a expressão da MMP-9 foi novamente localizada em células fúngicas circunscritas por células gigantes multinucleadas também positivas (**Figura 18A**) presentes em lesões granulomatosas frouxas e extensas, com frequência observadas neste período de infecção. Células mononucleares presentes na periferia das lesões apresentaram marcação positiva,

mas apenas em poucas regiões foi detectada a presença de MMP-9 na MEC (**Figura 18C**). Fraca expressão de MMP-9 foi detectada em granulomas fibróticos, com marcação positiva no centro das lesões contendo fungo, mas ausente nas fibras da MEC (**Figura 18F**). Em camundongos A/J a expressão da MMP-9 foi observada em células mononucleares e também em células gigantes (**Figura 18B**) localizadas em granulomas fechados. Nas lesões necróticas, intensa positividade foi detectada em focos centrais contendo destruição tecidual (**Figura 18D**), enquanto a expressão na MEC foi observada em poucas situações na periferia dos granulomas deste grupo (**Figura 18E**). Como na linhagem B10.A, fraca positividade foi observada nas lesões fibróticas (**Figura 18G**).

Infecção com Pb265

Aos 15 dias de infecção, a expressão de MMP-9 nas lesões granulomatosas de camundongos B10.A e A/J foi similar ao observado na fase precoce da infecção com Pb18. Marcação positiva para MMP-9 foi detectada nos centros dos focos granulomatosos frouxos contendo células fúngicas envoltas por células mononucleares e células gigantes multinucleadas (**Figuras 19A e 19D**) em ambas as linhagens. Áreas de destruição tecidual observadas em camundongos B10.A e A/J apresentaram reação positiva para MMP-9 (**Figuras 19B e 19E**) em lesões necróticas e também células mononucleares positivas para a enzima foram detectadas nas regiões periféricas dos granulomas (**Figuras 19C e 19F**).

Aos 120 dias de infecção, ambas as linhagens apresentaram lesões de aspecto residual contendo macrófagos pseudoxantomatosos positivos para MMP-9 (**Figuras 19G e 19H**).

Figura 17 – Imunolocalização de MMP-9 em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 dias de infecção com o isolado Pb18.

Controles: reação negativa na ausência de anticorpo primário (anti-MMP-9) em corte de omento de animal infectado (A, 400x); células mononucleares positivas (setas) em omento de camundongo não infectado (B, 400x); tecido epitelial pulmonar (seta) empregado como controle positivo da reação (C, 200x);

B10.A+Pb18+15d: focos granulomatosos contendo células fúngicas de morfologia preservada (seta, D, 200x) e debris (seta, E, 200x) positivos para MMP-9 no centro de lesões frouxas; agregados de células mononucleares positivas (setas) na periferia das lesões (F, 400x);

A/J+Pb18+15d: focos granulomatosos positivos para MMP-9 apresentando células fúngicas e células do infiltrado inflamatório (setas, G, 200x); áreas de destruição tecidual com debris celulares positivos (setas, H, 200x); agregados periféricos de células mononucleares positivas (setas) presentes nos granulomas predominantemente frouxos (I, 400x).

Reação de estreptavidina-peroxidase e contracoloração de hematoxilina de Mayer.

Figura 18 – Imunolocalização de MMP-9 em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 120 dias de infecção com o isolado Pb18.

B10.A+Pb18+120d: inúmeros focos de lesão com células fúngicas positivas (setas) circunscritas por células gigantes multinucleadas também positivas (ponta de seta) (Ai, 400x) em granulomas frouxos extensos (A, 200x); expressão da enzima na matriz extracelular (MEC) (setas) próxima às áreas contendo vários focos fúngicos (C, 400x); fraca positividade em foco fúngico central (ponta de seta) em granuloma fibrótico com ausência de marcação na MEC (setas) (F, 200x); **A/J+Pb18+15d:** granuloma fechado contendo células gigantes positivas (setas) (em Bi, 400x) e também células mononucleares (B, 200x); intensa positividade em focos de destruição tecidual (seta) contidos em lesão necrótica (D, 200x) e também na MEC (setas) na periferia do granuloma (E, 400x); lesão fibrótica com marcação positiva em células fúngicas e áreas circunscrevendo estes focos (pontas de seta), mas sem expressão da enzima na MEC (setas) (G, 200x). Reação de estreptavidina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Figura 19 – Imunolocalização de MMP-9 em lesões granulomatosas de omento em camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb265.

B10.A+Pb265+15 d e A/J+Pb265+15d: granulomas contendo células fúngicas marcadas (ponta de seta) envolvidas por células gigantes (seta, Ai, 400x) e células mononucleares positivas (seta e Di, 400x) em lesão frouxa (A e D, 200x); áreas de destruição tecidual positivas (setas e Bi, 400x) no centro de lesões necróticas (B e E, 200x); região periférica do granuloma apresentando células mononucleares positivas (setas) (C e F, 200x).

B10.A+Pb265+120d e A/J+Pb265+120d: ambas as linhagens de camundongos desenvolveram lesões de aspecto residual contendo macrófagos pseudoxantomatosos positivos para MMP-9 (setas) (G e H, 400x).

Reação de estreptavidina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

4.1.8 Atividade gelatinolítica das metaloproteinases no omento

A análise zimográfica para detecção de atividade gelatinolítica foi avaliada em extratos de omento de camundongos das linhagens B10.A e A/J controles não infectados e também em camundongos infectados com Pb18 ou Pb265 na fase precoce (15 dias) e tardia (120 dias) da infecção.

Como mostrado na **Figura 20** e **Figura 21** a zimografia revelou a presença de duas bandas próximas de pesos moleculares aproximados de **106,2** e **95,2** kDa que correspondem respectivamente, à pró-MMP-9 e à forma ativa da MMP-9. Ao mesmo tempo, detectou-se a presença de uma banda de maior migração em relação às bandas descritas anteriormente, com peso molecular aproximado de **64,2** kDa que possivelmente corresponde à enzima MMP-2 na sua forma ativa. A confirmação de que estas bandas possivelmente correspondam às enzimas MMP-9 e MMP-2 se deu através do emprego de proteínas recombinantes comerciais da MMP-9 e da MMP-2 e também pelos ensaios de inibição enzimática.

Aos 15 dias de infecção com o isolado Pb18, a presença da pró-MMP-9 e da MMP-9 (ativa) foi evidenciada em omento de ambas as linhagens de camundongos, sendo a pró-MMP-9 observada em todas as amostras (**Figura 20A**). Atividade gelatinolítica não foi encontrada em camundongos não infectados. Aos 120 dias de infecção, a pró-MMP-9 e a MMP-9 foram novamente observadas nos grupos experimentais, sendo a primeira pró-forma vista em todos os animais (**Figura 20B**). O emprego dos inibidores de MMPs, EDTA (20 mM) e fenantrolina (5 mM) acarretou a inibição da atividade de gelatinases presente nas amostras, enquanto a adição do inibidor das serina proteinases, PMSF (2 mM), não alterou a atividade gelatinolítica (**Figura 20C**).

Quanto à MMP-2, fraca atividade enzimática foi observada em todos os grupos infectados (Figura 20).

Na infecção com o isolado de baixa virulência Pb265, o estudo zimográfico revelou a presença da pró-MMP-9 e da MMP-9 em omento de camundongos B10.A e A/J na fase precoce de infecção (**Figura 21A**), com a detecção da forma latente em todos os animais estudados. Já na fase tardia da infecção, não se observou qualquer atividade gelatinolítica das amostras analisadas (**Figura 21B**).

A análise semi-quantitativa da zimografia detectou algumas diferenças na atividade gelatinolítica das MMPs presentes nas amostras de omento de animais infectados com Pb (**Figura 22**).

Diferenças significativas na atividade gelatinolítica (valores relativos) da pró-MMP-9 foram detectadas entre os camundongos não infectados e os inoculados com Pb18 após 15 e 120 dias de infecção ($p < 0,05$). Quando a atividade proteolítica foi comparada entre as linhagens, verificou-se uma maior atividade da forma ativa da MMP-9 em camundongos A/J do que em B10.A aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$). Maior atividade da pró-MMP-9 foi detectada em B10.A do que em A/J aos 15 dias de infecção, porém sem diferenças significativas, enquanto alta atividade enzimática da pró-MMP-9 foi detectada em ambas as linhagens aos 120 dias de infecção (**Figura 22A**).

Na comparação entre os tempos de infecção com Pb18 (**Figura 22A**), a atividade da pró-MMP-9 não foi significativamente diferente nos grupos estudados. Por outro lado, a atividade gelatinolítica da MMP-9 ativa em A/J foi menor aos 120 dias do que aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$).

Após a infecção com Pb265, a atividade da pró-MMP-9 nos grupos experimentais foi significativamente maior em relação aos grupos controles não infectados ($p < 0,05$), porém não houve diferenças entre as linhagens após a infecção. Diferenças significativas na atividade gelatinolítica de pró-MMP-9 foram detectadas entre os períodos de infecção estudados, sendo observada a presença de pró-MMP-9 apenas na fase precoce da infecção (**Figura 22A**).

Comparando-se a infecção com os diferentes isolados fúngicos, viu-se que a atividade proteolítica foi presente apenas na infecção com Pb18.

Em relação à MMP-2, a atividade gelatinolítica foi detectada em camundongos B10.A e A/J aos 15 e 120 dias de infecção com Pb18 e apenas em camundongos B10.A aos 15 dias de infecção com Pb265, contudo diferenças significativas não foram observadas devido a grande variação observada dentro de cada grupo (**Figura 22B**).

Figura 20 – Estudo zimográfico para detecção da atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) infectados com o isolado de alta virulência Pb18.

(A) Presença de pró-MMP-9, MMP-9 (ativa) e MMP-2 (ativa) em amostras de omento de camundongos após 15 dias de infecção com o isolado Pb18 e ausência em omento de camundongos não infectados;

(B) Presença de pró-MMP-9, MMP-9 (ativa) e MMP-2 (ativa) em amostras de omento de camundongos após 120 dias de infecção com o isolado Pb18 e ausência em omento de camundongos controles não infectados;

(C) Ausência de atividade gelatinolítica em gel incubado com os inibidores de MMPs (EDTA e fenantrolina), confirmando a presença das MMPs; incubação com inibidor de serina proteinases (PMSF) não acarretou em inibição da atividade enzimática.

Figura 21 – Estudo zimográfico para detecção da atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) infectados com o isolado de baixa virulência Pb265.

(A) Presença de pró-MMP-9, MMP-9 (ativa) e MMP-2 (ativa) em amostras de omento de camundongos após 15 dias de infecção com o isolado Pb265 e ausência em omento de camundongos não infectados;

(B) Presença de pró-MMP-9, MMP-9 (ativa) e MMP-2 (ativa) em amostras de omento de camundongos após 120 dias de infecção com o isolado Pb265 e ausência em omento de camundongos controles não infectados.

Figura 22 - Análise semi-quantitativa da zimografia para detecção de atividade gelatinolítica de MMP-9 e MMP-2 em omento de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) após 15 e 120 dias de infecção com Pb18 ou Pb265.

Grupos controles não infectados foram também avaliados. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da porcentagem de atividade gelatinolítica (valores de densidade óptica integrada, DOI) ($n=3-6$) presente em cada banda em relação à banda mais intensa (considerada como 100%) observada em cada gel. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

(A) Atividade gelatinolítica de pró-MMP-9 e MMP-9 (ativa) de camundongos controles não infectados e infectados com Pb18 ou Pb265;

(B) Atividade gelatinolítica de MMP-2 de camundongos controles não infectados e infectados com Pb18 ou Pb265.

* diferenças significativas entre as linhagens de camundongos (B10.A $\times$ A/J)

diferenças significativas entre os isolados de Pb (Pb18 $\times$ Pb265)

§ diferenças significativas entre 15 e 120 dias de infecção

+ diferenças significativas entre os grupos controles não infectados e infectados

4.2. Infecção de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e camundongos geneticamente deficientes na enzima óxido nítrico sintase induzida (KOiNOS) com o isolado de alta virulência Pb18

4.2.1 Avaliação histopatológica das lesões granulomatosas de omento: análises qualitativas e semi-quantitativas

A resposta granulomatosa de camundongos KOiNOS e de C57BL/6 (iNOS suficiente) foi avaliada após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb18.

Aos 15 dias de infecção, camundongos C57BL/6 desenvolveram principalmente granulomas frouxos (**Figura 23A**) com muitas células gigantes multinucleadas e presença de agregados linfo-plasmocitários na periferia das lesões (**Figura 23C**). Observou-se uma grande quantidade de células fúngicas de morfologia preservada e múltiplos brotamentos (**Figura 23E**). Camundongos KOiNOS desenvolveram predominantemente lesões compactas contendo células mononucleares, neutrófilos e células gigantes circundando *P. brasiliensis* (**Figura 23B**); alguns focos apresentaram necrose central circunscrita por fibras da matriz extracelular (**Figura 23D**). Células fúngicas íntegras e de morfologia alterada foram observadas nesse grupo (**Figuras 23F e 23G**).

Aos 120 dias de infecção, observou-se um aumento no tamanho e no número de lesões no omento de camundongos iNOS suficientes, com o desenvolvimento de granulomas frouxos disseminados contendo grande quantidade de células gigantes envolvendo muitas células leveduriformes de morfologia característica espalhadas por toda a lesão (**Figuras 24A e 24C**). Lesões organizadas/fechadas foram também observadas, porém em menor frequência (**Figura 24E**). Por outro lado, camundongos iNOS KO desenvolveram três tipos de lesões: granulomas extensos com necrose central (**Figura 24B**), granulomas fechados e concêntricos com muitos depósitos de MEC ao redor de células fúngicas degeneradas (**Figura 24D**) e lesões residuais com macrófagos pseudoxantomatosos e fungos degenerados (**Figuras 24F e 24Fi**).

Através da análise semi-quantitativa da área total de lesão e da área contendo *P. brasiliensis* (média $\pm$ erro padrão em μm^2) como representada na **Figura 25**, observou-se uma maior área de lesão em camundongos C57BL/6 iNOS suficientes em comparação ao grupo de camundongos KOiNOS após 120 dias de

infecção ($p < 0,05$). Um aumento significativo na área de lesão com fungo foi detectado em camundongos iNOS suficientes 120 dias pós-infecção ($p < 0,05$), além de significativamente maior do que a área ocupada com Pb nas lesões de camundongos iNOS KO e como já descrito anteriormente, apresentaram apenas lesões fechadas e também de aspecto residual nesta fase da infecção.

Figura 23 – Análise histopatológica das lesões granulomatosas em omento de camundongos C57BL/6 (iNOS suficientes) e camundongos geneticamente deficientes de iNOS (KOiNOS) após 15 dias de infecção com o isolado Pb18.

C57BL/6+Pb18+15d: lesão granulomatosa frouxa com intenso infiltrado inflamatório ao redor das células fúngicas (A, 100x e Ai, 200x/HE); formação de focos granulomatosos contendo várias células gigantes multinucleadas (setas) ao redor do fungo e circunscritos por agregados linfoplasmocitários (ponta de seta) (C, 400x/HE); presença de inúmeras células fúngicas com múltiplos brotamentos espalhadas por toda a lesão (E, 250x/Grocott).

KOINOS+Pb18+15d: lesão compacta contendo células mononucleares, neutrófilos e células gigantes (setas) circundando *P. brasiliensis* (B, 100x e Bi, 200x/HE); presença de lesão fechada extensa com necrose central (asterisco) circunscrita por fibras da matriz extracelular (setas) (D, 100x/HE); mesmos campos observados nas figuras B e D demonstrando poucas células fúngicas na lesão fechada (F, 250x/Grocott) e presença de inúmeras células fúngicas com morfologia alterada no centro da lesão necrótica (G, 250x/Grocott).

Figura 24 – Análise histopatológica das lesões granulomatosas em omento de camundongos C57BL/6 (iNOS suficientes) e camundongos geneticamente deficientes de iNOS (KOiNOS) após 120 dias de infecção com o isolado Pb18. C57BL/6+Pb18+120d: extensa área apresentando granuloma disseminado (A, 40x e C, 200x/HE) caracterizado pela presença de várias células gigantes multinucleadas (Ci, 400x/HE) e muitas células fúngicas com brotamentos (Ai, 250x, Grocott); lesão granulomatosa extensa de padrão compacto (E, 250x/HE) contendo células leveduriformes de morfologia característica (Ei, 400x/Grocott). KOINOS+Pb18+120d: formação de granulomas extensos com necrose central (B, 40x/HE); desenvolvimento de lesões compactas e concêntricas com intenso depósito de matriz extracelular (setas) (D, 250x/HE) e circunscrevendo células fúngicas degeneradas (Di, 400x/Grocott) acompanhada da presença de lesões de aspecto residual com macrófagos pseudoxantomatosos (F, 400x/HE) e restos fúngicos (Fi, 400x/Grocott).

Figura 25 – Semi-quantificação da análise histopatológica para avaliar a área de lesão e a área contendo *P. brasiliensis* (Pb18) em omento de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e de camundongos iNOS deficientes (KOiNOS) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado de alta virulência Pb18.

A análise semi-quantitativa foi realizada a partir do emprego de uma ocular reticulada (100 quadrados, área total de 1120 mm²) para a contagem de quadrados totalmente preenchidos (= 1) e metade preenchidos (= 1/2) por lesão e por fungo contido na lesão em 10 campos de observação (quando possível) no aumento total de 125× (objetiva de 10× e ocular de 12,5×). Todos os resultados foram expressos como a média da área de lesão ± erro padrão (µm²) ou média da área de lesão contendo fungo ± erro padrão (µm²).

Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (*, ** e #).

* C57BL/6+Pb18+120 dias vs. KOiNOS+Pb18+120 dias

C57BL/6+Pb18+15 dias vs. C57BL/6+Pb18+120 dias

** C57BL/6+Pb18+120 dias vs. KOiNOS+Pb18+120 dias

4.2.2 Avaliação da expressão de OPN nas lesões granulomatosas de omento

A expressão de OPN diferiu entre os grupos analisados de acordo com o aspecto das lesões desenvolvidas, principalmente associada à distribuição celular, à compartimentalização dos diferentes componentes da MEC, além da quantidade de fungos presentes nos granulomas. No grupo de camundongos iNOS suficientes (C57BL/6), a expressão de OPN foi observada em macrófagos e células gigantes multinucleadas, com intensa positividade distribuída por toda a lesão (**Figuras 26A, 26B e 26C**). Em camundongos KOiNOS, maior expressão para OPN foi visualizada especialmente nas zonas periféricas das lesões granulomatosas com zonas de destruição tecidual (**Figura 26D**) e marcando células gigantes e macrófagos ao redor de pequenos focos fúngicos (**Figura 26E**). Fraca a moderada positividade para OPN foi detectada na MEC em ambos os grupos (**Figuras 26B e 26E**) em relação à marcação celular.

Padrão similar de deposição aos 15 dias foi observado na fase tardia da infecção, com intensa marcação nas células gigantes e macrófagos circunscrevendo focos fúngicos, além de depósitos na MEC nos granulomas frouxos de camundongos iNOS suficientes (**Figuras 27A e 27B**). No grupo KOiNOS, a expressão de OPN foi observada em região peri-nuclear das células mononucleares localizadas na periferia das lesões necróticas (**Figura 27C**), enquanto células gigantes e MEC positivas para OPN foram observadas em lesões fechadas (**Figura 27D**). As lesões residuais encontradas nesse grupo apresentaram apenas fraca positividade (**Figura 27E**).

A análise semi-quantitativa da expressão de OPN indicou um menor grau de marcação celular (**Figura 28A**) em camundongos KOiNOS comparado à positividade encontrada em camundongos C57BL/6 aos 120 dias de infecção com Pb18 ($p < 0,05$) e ao mesmo tempo, menor intensidade dessa marcação celular (**Figura 28B**) ($p < 0,05$). O grau e a intensidade da marcação celular observados nas lesões de camundongos KOiNOS aos 120 dias foi significativamente menor do que aos 15 dias e infecção ($p < 0,05$). A expressão de OPN na MEC foi menor do que a observada nas células e não apresentou diferenças significativas entre os grupos nos diferentes períodos estudados (**Figuras 29A e 29B**).

Figura 26 – Imunolocalização de OPN em lesões granulomatosas de omento em camundongos C57BL/6 (iNOS suficientes) e camundongos geneticamente deficientes em iNOS (KOiNOS) após 15 dias de infecção com o isolado Pb18. C57BL/6+Pb18+15d: intensa positividade distribuída por toda a lesão granulomatosa frouxa (A, 250x); lesões com expressão positiva em região peri-nuclear de macrófagos (ponta de seta) (B, 400x) e forte marcação em células gigantes multinucleadas (setas) (B e C, 400x), mas leve marcação na matriz extracelular (asterisco) (B, 400x). KOINOS+Pb18+15d: forte expressão em área de degradação tecidual contendo células gigantes e fúngicas (pontilhados), as quais se encontram envoltas por macrófagos (marcação peri-nuclear, ponta de seta) e células gigantes positivas (setas) (D, 250x); células gigantes positivas (setas) e fraca marcação positiva na matriz extracelular (asterisco) (E, 400x). Reação de estreptavidina-peroxidase e contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Figura 27 – Imunolocalização de OPN em lesões granulomatosas de omento em camundongos C57BL/6 (iNOS suficientes) e camundongos geneticamente deficientes em iNOS (KOiNOS) após 120 dias de infecção com o isolado Pb18. C57BL/6+Pb18+120d: intensa expressão de OPN em células gigantes multinucleadas (setas) e em região peri-nuclear de células com morfologia de macrófagos (A e B, 400x); marcação na matriz extracelular (asterisco) (B, 400x). KOINOS+Pb18+120d: marcação peri-nuclear em células mononucleares (ponta de seta) e fraca positividade na matriz extracelular presentes na periferia das lesões necróticas (C, 400x); detecção de célula gigante (seta) e matriz extracelular positivas para OPN em lesões compactas (D, 400x); fraca marcação para OPN em lesão residual (E, 400x).

Figura 28 – Semi-quantificação da análise imuno-histoquímica para avaliar a expressão de OPN em lesões de omento de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e de camundongos iNOS deficientes (KOiNOS) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado de alta virulência Pb18.

A análise semi-quantitativa foi realizada empregando-se uma ocular com retículo de contagem (total de 100 quadrados, área total de $280 \mu\text{m}^2$), com o aumento total de 500x (objetiva de 40x e ocular de 12,5x).

A) Análise da reação positiva celular empregando-se valores numéricos como proporção da marcação positiva: 0, positividade ausente; 0,25, positividade maior que 0 e menor ou igual a 25%; 0,5, positividade maior que 25 e menor ou igual a 50%; 0,75, positividade maior que 50 e menor ou igual a 75%; 1, positividade maior que 75% e menor ou igual que 100%;

B) Intensidade da marcação positiva celular, estabelecendo-se o seguinte critério do grau de coloração observado e os respectivos valores numéricos: ausente= 0, fraco= 0,25, fraco/moderado=0,5, moderado=0,75, forte= 1.

Todos os resultados foram expressos como a média da expressão de células OPN positivas $\pm$ erro padrão por μm^2 . Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (* e **).

A e B) * KOiNOS+Pb18+15 dias vs. KOiNOS+Pb18+120 dias

** C57BL/6+Pb18+120 dias vs. KOiNOS+Pb18+120 dias

Figura 29 – Semi-quantificação da análise imuno-histoquímica para avaliar a expressão de OPN em lesões de omento de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e de camundongos iNOS deficientes (KO iNOS) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado de alta virulência Pb18.

A análise semi-quantitativa foi realizada empregando-se uma ocular com retículo de contagem (total de 100 quadrados, área total de $280 \mu\text{m}^2$), com o aumento total de $500\times$ (objetiva de $40\times$ e ocular de $12,5\times$).

A) Análise da reação positiva na MEC empregando-se valores numéricos como proporção da marcação positiva: 0, positividade ausente; 0,25, positividade maior que 0 e menor ou igual a 25%; 0,5, positividade maior que 25 e menor ou igual a 50%; 0,75, positividade maior que 50 e menor ou igual a 75%; 1, positividade maior que 75% e menor ou igual que 100%;

B) Intensidade da marcação positiva na MEC, estabelecendo-se o seguinte critério do grau de coloração observado e os respectivos valores numéricos: ausente= 0, fraco= 0,25, fraco/moderado= 0,5, moderado= 0,75, forte= 1.

Todos os resultados foram expressos como a média da expressão de OPN na MEC $\pm$ erro padrão por μm^2 . Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

A e B) * KOiNOS+Pb18+15 dias vs. KOiNOS+Pb18+120 dias

** C57BL/6+Pb18+120 dias vs. KOiNOS+Pb18+120 dias

4.2.3 Dosagem de OPN extratos teciduais de omento

Os níveis de OPN em extratos teciduais de omento de camundongos infectados com *P. brasiliensis* foram determinados por ELISA. Grupos controles não infectados foram avaliados e comparados aos grupos experimentais.

Como apresentado na **Figura 30**, os níveis de OPN de camundongos infectados com Pb18 foram significativamente maiores do que os observados em camundongos controles na fase precoce da infecção ($p < 0,05$). Na fase tardia da infecção, os níveis de OPN encontrados nestes grupos experimentais foram baixos e não diferiram dos controles não infectados.

Os níveis de OPN foram significativamente maiores em camundongos KOiNOS em relação ao seu grupo controle aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$). A concentração de OPN diminuiu significativamente em camundongos iNOS suficientes e KOiNOS aos 120 dias de infecção ($p < 0,05$).

Figura 30 – Avaliação dos níveis de osteopontina (OPN) pelo ensaio imuno-enzimático (ELISA) em homogenato de omento de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e iNOS deficientes (KOiNOS) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb18.

Grupos controles não infectados foram também estudados. Os resultados expressam a média $\pm$ erro padrão da concentração de OPN em pg/mL ($n=5-8$). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

* Diferenças significativas entre os camundongos iNOS suficientes e os KOiNOS

§ Diferenças significativas entre 15 e 120 dias de infecção

+ Diferenças significativas entre os grupos controles não infectados e infectados

4.2.4 Avaliação do grau de disseminação de *P. brasiliensis* nos órgãos

Os resultados da avaliação da carga fúngica (UFC) estão apresentados na **Figura 31**. Em relação ao número de fungos viáveis no omento, uma intensa carga fúngica foi detectada após 15 dias de infecção de camundongos iNOS suficientes e iNOS deficientes. Por outro lado, maior número de UFC foi recuperado em camundongos iNOS suficientes do que em camundongos KOiNOS após 120 dias de infecção ($p < 0,05$). Diferenças no grau de disseminação fúngica não foram observadas em camundongos iNOS suficientes em relação ao tempo de infecção. Diminuição da carga fúngica foi observada em camundongos KOiNOS aos 120 dias de infecção ($p < 0,05$, 15d vs. 120d).

Em relação à contagem de UFC no baço, fígado e pulmão (**Figuras 31B, 31C e 31D**), grande número de fungos viáveis foi observada em baço e fígado aos 15 dias de infecção, sendo significativamente menor no fígado de camundongos KOiNOS do que de camundongos C57BL/6, nesse mesmo período ($p < 0,05$). Considerando as diferenças no tempo de infecção, camundongos KOiNOS apresentaram menor carga fúngica no baço, fígado e pulmão aos 120 dias de infecção em relação aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$). Diminuição significativa do número de fungos viáveis foi observada apenas em pulmão de camundongos iNOS suficientes ($p < 0,05$).

Figura 31 – Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *P. brasiliensis* em omento (A), baço (B), fígado (C) e pulmão (D) de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e iNOS deficientes (KOiNOS) após 15 e 120 dias de infecção com o isolado Pb18.

Os resultados expressam a média $\pm$ erro padrão de CFU (log₁₀) por grama de tecido (n=5-10). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

* Diferenças significativas entre as linhagens de camundongos

§ Diferenças significativas entre 15 e 120 dias de infecção

4.2.5 Atividade gelatinolítica das metaloproteinases no omento

A análise zimográfica da atividade gelatinolítica foi também avaliada em extratos de omento de camundongos iNOS suficientes (C57BL/6) e iNOS deficientes (iNOS KO) controles não infectados e também em camundongos infectados com Pb18 na fase precoce (15 dias) e tardia (120 dias) da infecção.

A atividade gelatinolítica não foi observada em amostras de camundongos não infectados (**Figura 32**). Nas amostras de camundongos infectados, a zimografia revelou a presença de duas bandas de peso molecular aproximado de 106,2 e 95,2 kDa que provavelmente correspondem à pró-MMP-9 e à MMP-9 ativa e também a presença de uma banda de menor peso molecular de 64,2 kDa que corresponde a faixa de peso molecular da enzima MMP-2 ativa.

Aos 15 dias de infecção, a pró-MMP-9 e a MMP-9 (ativa) foram observadas em omento de camundongos iNOS suficientes e iNOS deficientes, com a a pró-MMP-9 presente em todas as amostras (**Figura 32A**). Aos 120 dias de infecção, a fraca atividade gelatinolítica da pró-MMP-9 e ausência da forma ativa foram observadas em camundongos KOiNOS (**Figura 32B**). Quanto à MMP-2, fraca atividade proteolítica foi detectada em ambos os grupos nos períodos estudados, visivelmente menor que a atividade da enzima MMP-9.

A análise semi-quantitativa da zimografia detectou algumas diferenças na atividade gelatinolítica das MMPs presentes nas amostras de omento de animais infectados com Pb (**Figura 33**). Não se observou a atividade enzimática em omento de camundongos não infectados.

Maior atividade gelatinolítica da pró-MMP-9 foi detectada em camundongos infectados do que nos controles não infectados, exceto no grupo KOiNOS na fase tardia da infecção ($p < 0,05$) (**Figura 33A**). Quando a atividade proteolítica foi comparada entre os camundongos iNOS suficientes e iNOS deficientes, observou-se a presença da forma ativa da MMP-9 em camundongos C57BL/6 iNOS suficientes do que nos KOiNOS aos 120 dias de infecção ($p < 0,05$). Menor atividade gelatinolítica da pró-MMP-9 foi detectada em camundongos KOiNOS aos 120 dias em relação aos 15 dias de infecção ($p < 0,05$).

Em relação à MMP-2, baixa atividade foi observada nos grupos experimentais e nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos analisados (**Figura 33B**).

Figura 32 – Estudo zimográfico para detecção da atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em omento de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes e de camundongos iNOS deficientes (KOiNOS) infectados com o isolado de alta virulência Pb18.

(A) Presença de pró-MMP-9, MMP-9 (ativa) e MMP-2 (ativa) em amostras de omento de camundongos após 15 dias de infecção com o isolado Pb18 e ausência em omento de camundongos não infectados;

(B) Presença de pró-MMP-9, MMP-9 (ativa) e MMP-2 (ativa) em amostras de omento de camundongos após 120 dias de infecção com o isolado Pb18 e ausência em omento de camundongos controles não infectados.

Figura 33 - Análise semi-quantitativa da zimografia para detecção de atividade gelatinolítica de MMP-9 e MMP-2 em omento de camundongos da linhagem C57BL/6 (iNOS suficientes) e de camundongos iNOS deficientes (KOiNOS) após 15 e 120 dias de infecção com Pb18.

Grupos controles não infectados foram também avaliados. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da porcentagem de atividade gelatinolítica (valores de densidade óptica integrada, DOI) ($n=3-6$) presente em cada banda em relação à banda mais intensa (considerada como 100%) observada em cada gel. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

(A) Atividade gelatinolítica de pró-MMP-9 e MMP-9 (ativa) de camundongos controles não infectados e infectados com Pb18;

(B) Atividade gelatinolítica de MMP-2 de camundongos controles não infectados e infectados com Pb18.

* diferenças significativas entre camundongos iNOS suficientes e iNOS deficientes

§ diferenças significativas entre 15 e 120 dias de infecção

+ diferenças significativas entre os grupos controles não infectados e infectados

4.3 Atividade gelatinolítica de *P. brasiliensis*

A atividade gelatinolítica de *P. brasiliensis* foi avaliada empregando-se o ensaio zimográfico em gel de poliacrilamida, contendo 0,1% de gelatina. Neste estudo utilizamos o antígeno “cell free” dos isolados Pb18 (CFA 18) e Pb265 (CFA 265), porém não se observou qualquer atividade gelatinolítica independentemente do isolado ser de alta ou baixa virulência (**Figura 34**).

Figura 34 – Estudo zimográfico para detecção da atividade gelatinolítica de *P. brasiliensis*. Exoantígenos dos isolados Pb18 e Pb265 (CFA18 e CFA265) foram empregados na concentração de 20 μ g (20 μ L). Representativo de dois experimentos.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a resposta granulomatosa desenvolvida nos “milky spots” de omento de camundongos infectados com *P. brasiliensis*, observando a participação da citocina IFN- γ e da glicoproteína osteopontina, assim como de enzimas proteolíticas da MEC. Estudos experimentais empregando o modelo de infecção intraperitoneal têm demonstrado a disseminação fúngica para vários órgãos, incluindo o omento peri-pancreático/peri-esplênico (SINGER-VERMES et al., 1993), com a formação de granulomas desde fases agudas até crônicas da infecção (BURGER et al., 1996; XIDIEH et al., 1999).

Neste trabalho observamos os mesmos padrões de resposta granulomatosa vistos por XIDIEH et al. (1999). No curso da infecção com o isolado de alta virulência de *P. brasiliensis* (Pb18), verificamos o desenvolvimento predominante de lesões frouxas extensas em camundongos suscetíveis, com o aumento da área total de lesão e da presença de fungos de morfologia preservada. Além disso, observamos intenso grau de disseminação fúngica em omento e também nos outros órgãos, confirmando a progressão da doença nos camundongos suscetíveis da linhagem B10.A. Por outro lado, observamos a presença de granulomas fechados, caracterizados pela formação de necrose central e fibrose e a presença de poucas lesões residuais com macrófagos pseudoxantomatosos e fungos degenerados, indicando assim a tendência para o processo de resolução. Estes achados foram complementados pela semi-quantificação da análise histopatológica e também pela avaliação do grau de disseminação nos órgãos que demonstraram apesar do aumento da área total de lesão, uma diminuição da área de lesão contendo fungo e menor carga fúngica nos órgãos na fase tardia da infecção de camundongos resistentes.

Já na infecção com o isolado de baixa virulência (Pb265), ambas as linhagens de camundongos desenvolveram inicialmente lesões granulomatosas frouxas e compactas com áreas de necrose central, tendendo ao processo resolutivo, como observado pela presença de lesões residuais contendo fungos destruídos, a diminuição da área total de lesão e a ausência de fungos viáveis aos 120 dias de infecção. Isto confirma o caráter progressivo da resposta tecidual

durante a infecção com Pb18 e regressivo com Pb265, mesmo em camundongos suscetíveis, indicando um importante papel da virulência dos isolados fúngicos.

Estudos clínicos e experimentais da PCM têm descrito a importância da imunidade celular, com especial atenção à secreção de citocinas do padrão Th1 ou Th2 e regulação da atividade microbicida por fagócitos ativados, principalmente macrófagos, via produção de TNF- α e metabólitos intermediários reativos de nitrogênio (NO) e oxigênio (H_2O_2 , O_2^-) (CALICH et al., 1998; KASHINO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002). No entanto, ainda não é claro como estes vários fatores interagem com os diferentes componentes celulares e extracelulares e como contribuem para a formação da resposta inflamatória granulomatosa.

A citocina IFN- γ apresenta uma gama de atividades biológicas, incluindo propriedades antivirais, efeitos pró-apoptóticos, anti-proliferativos, participação no desenvolvimento das respostas imunes do tipo Th1 e ativação das funções microbicidas de macrófagos, como revisto por SHRODER et al. (2004). Seu papel na defesa contra diversos patógenos, particularmente na imunidade anti-fúngica, tem sido largamente observado. A imunidade protetora contra o *P. brasiliensis* parece estar associada à produção de IFN- γ , como observado em estudos clínicos e experimentais, associando o padrão de resistência do hospedeiro à resposta imune preferencial Th1 (CANO et al., 1998; KASHINO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002). A formação do granuloma na infecção com *P. brasiliensis* foi associada à presença de IFN- γ e TNF- α , indicando importante papel destas citocinas no controle da infecção fúngica (SOUTO et al., 2000)

No presente trabalho, a avaliação imuno-histoquímica permitiu detectar a expressão *in situ* de IFN- γ nas lesões granulomatosas de camundongos suscetíveis e resistentes infectados com isolados de alta e baixa virulência de *P. brasiliensis*. Células mononucleares com morfologia de linfócitos foram as únicas células positivas, as quais se encontraram distribuídas na periferia dos granulomas circundando agregados centrais de macrófagos, células epitelióides e células gigantes ao redor de células fúngicas. Este padrão de distribuição celular parece indicar que a principal fonte de produção desta citocina neste modelo de infecção são os linfócitos T, pois granulomas paracoccidioidomicóticos apresentam de modo geral um manto periférico de células T ao redor de agregados de macrófagos

(BRITO e FRANCO, 1994), confirmando a localização predominante destas células nas lesões granulomatosas.

A expressão de IFN- γ nas lesões de animais infectados com o isolado Pb18, não foi associada ao padrão genético de resistência do hospedeiro, pelo menos em fase precoce da infecção, visto que camundongos suscetíveis apresentaram maior positividade em relação aos resistentes. Com a evolução da infecção, ocorreu uma inversão da produção, ou seja, camundongos resistentes passaram a ter um número consideravelmente maior de células expressando IFN- γ , sugerindo uma intensa atividade das células T e sugerindo possivelmente a ativação de mecanismos protetores no controle da disseminação de células fúngicas, como a ativação eficiente da capacidade fungicida de fagócitos. A expressão de IFN- γ em camundongos suscetíveis observada até a fase tardia da infecção não foi associada com a atividade microbida, visto que inúmeros focos fúngicos foram observados em lesões disseminadas, indicando uma ineficiência no controle da doença.

A distribuição celular de IFN- γ não diferiu nos grupos infectados com o isolado de baixa virulência Pb265, pois o mesmo padrão de expressão foi observado, isto é, em linfócitos localizados na periferia das lesões. A análise quantitativa demonstrou que em fase precoce da infecção, a indução de expressão de células IFN- γ (+) também é observada em camundongos suscetíveis e resistentes, mas ao contrário da infecção com o isolado de alta virulência, a infecção com Pb265 está associada à presença de lesões residuais com um menor número de células expressando a citocina, sugerindo uma fase de inativação da resposta imune e resolução da doença.

A presença de TNF- α e IFN- γ tem sido observada em processos necróticos (EHLERS et al., 1999; FLYNN et al., 1995; KANEKO et al., 1999; SUGAWARA et al., 1998), enquanto TGF- β tem sido associado à formação de fibrose em granulomas (APPLETON et al., 1993). Em estudos anteriores, a expressão de TNF- α (NISHIKAKU, 2003) e de TGF- β (NISHIKAKU et al., 2003) foi avaliada nos granulomas, observando-se a presença destes elementos predominantemente em macrófagos e células gigantes multinucleadas, assim como difusas na MEC. Áreas de fibrose apresentaram depósitos de TGF- β , enquanto a expressão de TNF- α foi detectada em regiões de necrose central. A presença de fibrose foi observada nas lesões de omento em camundongos suscetíveis e resistentes ao Pb, principalmente

em fases avançadas da doença. A necrose tecidual foi também observada nas lesões, algumas vezes no centro de áreas fibróticas, apenas em camundongos resistentes infectados com Pb18 e em ambas as linhagens na infecção com Pb265, havendo resolução da infecção. No presente estudo, IFN- γ apresentou intensa marcação em células mononucleares, possivelmente linfócitos T, localizados na periferia de lesões necróticas de camundongos resistentes.

Em conjunto, estes dados sugerem a participação ativa de citocinas como TNF- α , TGF- β e IFN- γ e das populações celulares (macrófagos, células gigantes e linfócitos) nas alterações teciduais observadas durante o desenvolvimento da resposta granulomatosa e também nos mecanismos efetores imunes contra a infecção com *P. brasiliensis*.

A participação de macrófagos como componentes fundamentais na imunidade protetora foi demonstrada no modelo ip. de infecção com *P. brasiliensis* (KASHINO et al., 1995). As células gigantes multinucleadas são células características da resposta granulomatosa e mantêm importantes funções realizadas por macrófagos ativados, pois além da capacidade fagocítica, são produtores de citocinas como TNF- α , IL-1 and TGF- β (HERNANDEZ-PANDO et al., 2000). O presente estudo enfatiza a contribuição de macrófagos e de células gigantes multinucleadas na resposta granulomatosa induzida por Pb e descreve o envolvimento da glicoproteína OPN como marcador destas células nas lesões. A OPN é produzida por diferentes populações celulares, expressa e secretada em diferentes tecidos e fluidos corpóreos (O'REGAN e BERMAN, 2000). Em nosso trabalho, a expressão de OPN foi observada particularmente em células mononucleares com morfologia de macrófagos e em células gigantes multinucleadas no centro dos granulomas de camundongos infectados com Pb. Alterações marcantes na morfologia dos "milky spots" de omento têm sido descrita após infecção com *P. brasiliensis*, onde uma intensa resposta granulomatosa é desenvolvida em comparação aos outros órgãos da cavidade peritoneal (XIDIEH et al., 1999). Portanto, o estudo do granuloma infeccioso, particularmente no tecido omental, torna-se uma importante ferramenta de estudo que auxilia a compreensão da sequência de eventos que predizem a evolução desta doença fúngica.

O padrão de organização de macrófagos e células gigantes principalmente localizadas nas zonas centrais das lesões granulomatosas paracoccidioidomicóticas, confirma prévios estudos histopatológicos (MONTENEGRO e FRANCO, 1994; XIDIEH et al., 1999). Empregando-se a análise imuno-histoquímica, demonstrou-se uma marcante expressão de OPN em região peri-nuclear de células com morfologia típica de macrófagos, sugerindo a secreção de proteínas neo-sintetizadas, como observado por Suzuki et al., (2002). Por outro lado, um padrão mais homogêneo de marcação foi encontrado no citoplasma de células gigantes, o que poderia indicar a síntese ativa de OPN nessas células. Outros autores também demonstraram a expressão de OPN em macrófagos em diferentes condições patológicas (NAU et al., 1997; ZHU et al., 2004).

De fato, a presença de OPN tem sido observada em macrófagos ativados, mas não em monócitos e macrófagos residentes, sugerindo que a sua síntese depende do estado de maturação celular (KRAUSE et al., 1996) e que a OPN controla a diferenciação de macrófagos em células gigantes e osteoclastos (MERRY et al., 1993; NAU et al., 1997). Influxo aumentado, adesão e migração facilitada de macrófagos aos sítios inflamatórios foram induzidas por OPN em modelo experimental de inflamação cutânea (GIACHELLI et al., 1998). Em nossos resultados, a presença de macrófagos e células gigantes nas lesões granulomatosas ocorre em condições nas quais notável expressão celular foi detectada em omento de camundongos infectados com Pb. A presença de células gigantes evidenciada através da expressão de OPN, pode indicar uma importante correlação desta glicoproteína com o processo de diferenciação e fusão de macrófagos necessários para conter a intensa disseminação fúngica observada nas lesões de camundongos suscetíveis. Portanto, OPN poderia ser um dos responsáveis pela localização *in situ* destas células, através de sua atividade quimiotática.

Os níveis de OPN em homogenatos de omento foram estudados, observando-se alta produção desta glicoproteína, ao mesmo tempo em que intensa expressão, principalmente em células gigantes, foi detectada em lesões de organização frouxa de camundongos suscetíveis após 15 dias de infecção com o isolado de alta virulência Pb18. De outra forma, o desenvolvimento de granulomas compactos em camundongos resistentes foi associada com aumento nas células OPN-positivas, principalmente células com morfologia de macrófagos presentes ao redor dos focos fúngicos e também envolvendo zonas centrais de necrose. O

aumento na expressão *in situ* nos granulomas e na concentração de OPN em homogenato tecidual foi observado em camundongos resistentes após 120 dias de infecção, sugerindo um processo de diferenciação celular mais tardio, provavelmente de macrófagos nos sítios de inflamação crônica. Maior produção de OPN detectada em camundongos suscetíveis B10.A do que em camundongos resistentes A/J após 15 dias de infecção com Pb, como observado pela análise imuno-histoquímica e por ELISA, corroboram com estudos prévios nos quais respostas mais ativas e precoces foram encontradas em camundongos suscetíveis durante a fase inicial da infecção (CALICH et al., 1998; FAZIOLI et al., 1994).

A presença de OPN foi detectada em camundongos resistentes e suscetíveis após 15 dias de infecção com o isolado de baixa virulência Pb265, porém diminuiu aos 120 dias de infecção, período em que somente lesões residuais são observadas, desta forma, indicando a baixa atividade inflamatória devido ao processo de resolução da doença.

No presente estudo, fraca expressão de OPN foi detectada na matriz extracelular na fase precoce da infecção com Pb, aumentando na fase tardia, principalmente localizando-se em áreas de degradação tecidual e em granulomas concêntricos e organizados de camundongos resistentes. Em contraste, não se observou a presença de OPN na MEC em omento de camundongos no tempo de 120 dias de infecção com Pb265, já que nesse período somente lesões residuais foram detectadas. A expressão de outros componentes da MEC, como colágenos, proteínas da membrana basal e proteoglicanas nos granulomas de omento têm sido estudada no modelo ip. de infecção com *P. brasiliensis* (BURGER et al., 1996; LENZI et al., 1994; NISHIKAKU et al., 2003). A imunolocalização de OPN observada no presente estudo, com marcante expressão celular e em menor grau na MEC, enfatiza a participação de OPN na organização do granuloma, contribuindo para o padrão de resposta tecidual induzida por *P. brasiliensis*.

Ao lado das funções inflamatórias, OPN também apresenta efeitos anti-inflamatórios, tais com a regulação da produção excessiva de óxido nítrico através da inibição da expressão da enzima iNOS (GUO et al., 2001; SCOTT et al., 1998). A síntese de NO por macrófagos e induzida por iNOS tem sido demonstrada como um importante mecanismo microbicida contra vários patógenos (NATHAN et al., 2000). Em modelos experimentais da PCM, NO parece ter papel ambivalente: protetor,

controlando a disseminação fúngica e supressor, inibindo a resposta imune celular (BOCCA et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2002).

Em nosso estudo, a produção de NO foi detectada em todos os grupos experimentais, sendo maior e sustentada em camundongos resistentes do que em camundongos suscetíveis infectados com Pb18 ou Pb265, assim, sugerindo um papel protetor. Uma associação inversa foi observada ao comparar-se a produção de OPN e NO: altos níveis de OPN, mas baixa produção de NO foram detectadas em camundongos suscetíveis infectados com Pb18, enquanto baixos níveis de OPN e altos níveis de NO foram observados em camundongos resistentes. No estágio tardio da infecção com Pb265, alta produção de NO, mas baixas concentrações de OPN foram observadas nos grupos experimentais. Os resultados da determinação de NO sugerem que OPN possivelmente tenha propriedades anti-inflamatórias, inibindo a expressão de NO, como descrito por outros autores (GUO et al., 2001; SCOTT et al., 1998). Portanto, OPN pode estar associada à suscetibilidade aumentada em fase inicial da infecção com *P. brasiliensis*.

Em relação ao grau de disseminação de *P. brasiliensis*, um maior número de fungos viáveis foi recuperado em omento de camundongos suscetíveis B10.A do que em camundongos resistentes A/J infectados com Pb18, confirmando a maior suscetibilidade da linhagem B10.A à infecção. Por outro lado, um grande número de colônias fúngicas foi detectado em ambas as linhagens de camundongos aos 15 dias de infecção com Pb265, mas não foram recuperadas aos 120 dias de infecção, fase caracterizada pelo processo de resolução, desta forma confirmando o baixo grau de patogenicidade do isolado Pb265.

Análise comparativa entre a contagem de UFC de *P. brasiliensis* e a produção de OPN demonstrou uma tendência de associação positiva, onde altos níveis de OPN e alta carga fúngica foram observados em camundongos suscetíveis na fase precoce da infecção com Pb18, enquanto baixos níveis de OPN e baixa contagem de UFC foram detectados no omento de camundongos infectados com Pb265, independentemente da linhagem, após 120 dias de infecção. Já na análise associativa entre NO e grau de disseminação fúngica, observou-se uma relação inversa, portanto reforçando o papel de NO no controle da infecção.

Alguns autores têm descrito a participação de OPN na ativação preferencial da imunidade celular, aumentando a expressão de citocinas como IL-12 e inibindo IL-10, deste modo, direcionando as respostas imunes a um perfil Th1, importante

para a resistência à infecção por patógenos intracelulares (ASHKAR et al., 2000; NAU et al., 2000). Li et al. (2003) demonstraram que IFN- γ estimula a expressão de OPN, que por sua vez aumenta a síntese de IFN- γ , sugerindo-se um mecanismo de regulação positiva para o desenvolvimento da resposta Th1.

Em nosso trabalho, o aumento na expressão de OPN principalmente por macrófagos foi acompanhado também pelo aumento na expressão de IFN- γ por linfócitos T nos granulomas, sugerindo que ambos os componentes podem ser parte integrante dos mecanismos de controle da infecção com *P. brasiliensis* em camundongos resistentes. Por outro lado, apesar do aumento na expressão celular de OPN e IFN- γ na fase tardia da infecção de camundongos suscetíveis com Pb18, não houve associação com o controle da doença. Menor grau de expressão foi detectado em camundongos infectados com Pb265 em comparação com os infectados com Pb18 e além disso, a reatividade para OPN diminui com o tempo, como observado para IFN- γ , provavelmente devido à resolução da infecção.

Poucos trabalhos têm relatado a participação de OPN nas infecções fúngicas. A expressão *in situ* de OPN foi demonstrada em granuloma pulmonar induzido por *H. capsulatum* (CARLSON et al., 1997), assim como a produção de IL-12 por monócitos mediada por OPN foi observada em estudo com *Penicillium marneffei* (KOGUCHI et al., 2002) e também investigada na infecção com *C. albicans* (SATO et al., 2005).

O presente estudo é o primeiro a relatar a participação de OPN na infecção com *P. brasiliensis*, demonstrando a presença e sua relevância na suscetibilidade e ao mesmo tempo no processo de maturação e migração celular. Nós identificamos a expressão de OPN em células mononucleares com morfologia de macrófagos e em células gigantes multinucleadas, além da localização na MEC em menor grau, desde a fase precoce da infecção com Pb18, com aumento significativo em granulomas compactos de camundongos resistentes na fase tardia da infecção.

A OPN pode estar associada com maior suscetibilidade no início da infecção com *P. brasiliensis*, visto que altas concentrações e maior expressão de OPN em granulomas frouxos pouco organizados foram correlacionados aos baixos níveis de NO, em contraste a alta carga fúngica recuperada em omento de camundongos suscetíveis aos 15 dias de infecção com Pb18 ou Pb265. Sugerimos também um

possível papel de OPN na regulação da produção de NO durante a infecção. Por outro lado, a OPN poderia estar associada também com o controle da doença progressiva na fase tardia da infecção, cujo aumento nos níveis e na expressão *in situ* de OPN foi acompanhado pela produção sustentada de NO e diminuição da carga fúngica no omento de camundongos resistentes infectados com Pb18. A presença de lesões residuais contendo macrófagos pseudoxantomatosos indica a fase resolutiva da doença e foi associada no presente trabalho, à baixa expressão de OPN, altas concentrações de NO e controle da disseminação fúngica durante a infecção com o isolado de baixa virulência Pb265.

Portanto, os resultados em relação à OPN indicam que esta glicoproteína pode estar relacionada com maior gravidade na fase precoce da infecção de camundongos suscetíveis com *P. brasiliensis* e tendência a um grau de controle da infecção progressiva. Estes dados também sugerem que OPN esteja envolvida na formação do granuloma, contribuindo para o seu desenvolvimento e organização estrutural. E finalmente, OPN pode apresentar diferentes funções na inflamação crônica granulomatosa, dependendo do padrão de resistência do hospedeiro e também da virulência dos isolados de *P. brasiliensis*.

No presente trabalho, a atividade gelatinolítica foi analisada em extratos de omento de camundongos suscetíveis e resistentes infectados com Pb através do ensaio zimográfico, metodologia que permite a detecção das formas latentes e ativas das metaloproteinases (KLEINER e STETLER-STEVENSON, 1994). Bandas correspondentes à MMP-9, nas formas latente e ativa, assim como a forma ativa da MMP-2 foram detectadas nos grupos de animais infectados, mas não em controles não infectados. Assim pudemos demonstrar que a infecção por *P. brasiliensis* induz a expressão de metaloproteinases com atividade de gelatinases, ou seja, a MMP-9 e a MMP-2.

As atividades de colagenases e gelatinases atribuídas à MMP-2 e à MMP-9, são de particular interesse, devido à sua participação na degradação de vários componentes da MEC, como o colágeno tipo IV e a laminina, componentes da membrana basal dos tecidos, importantes no controle do influxo celular, incluindo células inflamatórias e imunes, além de facilitar o processo de invasão e disseminação de patógenos e células tumorais nos tecidos. Uma importante contribuição destas enzimas na regulação do comportamento celular na inflamação

aguda e crônica tem sido descrita na literatura, associando-as à ativação e à migração de macrófagos, linfócitos e PMNs, assim como à ativação ou inibição de citocinas (BARRICK et al., 1999; OPDENAKKER et al., 2001; PARKS et al., 2004).

A MMP-9 foi observada na fase inicial da infecção com o isolado Pb18 e Pb265, mas com a predominância da forma latente da enzima em camundongos suscetíveis B10.A e resistentes A/J e a presença da forma ativa apenas em alguns animais. A pró-MMP-9 foi a forma mais observada aos 120 dias de infecção com Pb18, mas ausente na infecção com P265. Em contraste a presença marcante e constante da MMP-9, fraca atividade proteolítica de MMP-2 foi detectada nas amostras, com escassa ou nenhuma atividade em camundongos resistentes e pouca atividade enzimática nos suscetíveis infectados, independentemente da virulência do fungo, indicando uma maior contribuição da MMP-9 na resposta inflamatória crônica induzida pelo fungo.

Além da marcante atividade gelatinolítica de MMP-9 observada em nosso estudo, investigamos a expressão *in situ* desta enzima nos granulomas de camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Os resultados demonstraram a expressão de MMP-9 em diferentes populações celulares, incluindo células gigantes multinucleadas e também células mononucleares com morfologia de macrófagos, presentes nos centros das lesões, assim como em células mononucleares com morfologia de linfócitos localizados na periferia dos granulomas. De fato, macrófagos, linfócitos e células gigantes são capazes de produzir a MMP-9, sob diferentes estímulos e em variados processos inflamatórios e imunes (GOETZL et al., 1996; OPDENAKKER et al., 2001). A expressão de MMP-9 em macrófagos (FAYYAZI et al., 2000; HSU et al., 2005) e células gigantes multinucleadas (GONZÁLEZ et al., 2002; RODRÍGUEZ-PLA et al., 2005) nos granulomas têm sido descrita na literatura, sugerindo uma importante participação destas células como principais fontes produtoras destas proteases.

A estimulação de macrófagos por citocinas e produtos derivados de patógenos pode acarretar a ativação de suas funções efetoras e sua diferenciação em dois padrões distintos de células: o primeiro com aumentada capacidade fagocítica, microbicida, produtora de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de enzimas proteolíticas da matriz extracelular; o segundo tipo, associado ao remodelamento tecidual e à resolução da inflamação, sendo capaz de promover a

síntese de mediadores anti-inflamatórios, induzir a proliferação celular, assim como a produção de componentes da matriz extracelular (DUFFIELD, 2003).

A presença de pouca MMP-9 ativa na fase tardia da infecção com Pb18 sugere o predomínio da síntese sobre a degradação da matriz, aumentando a deposição de componentes da MEC no tecido inflamado. Fraca expressão de MMP-9 foi observada em lesões fibróticas, sendo ausente nas áreas com intensa deposição de MEC. Já a presença de lesões com degradação tecidual, incluindo as áreas de necrose observadas em camundongos resistentes, poderia indicar a participação ativa de enzimas proteolíticas, em especial da MMP-9. É possível que a menor ativação da MMP-9 se deva à regulação por parte dos inibidores endógenos das metaloproteinases e/ou por outros mecanismos que envolvam os mediadores pró-fibróticos como TGF- β e IL-13 (WYNN, 2004).

Como visto nos resultados histopatológicos, grande quantidade de matriz foi observada aos 120 dias de infecção com Pb18, delimitando focos fúngicos nas lesões granulomatosas de omento de animais infectados, com padrão frouxo em camundongos suscetíveis e padrão compacto/concêntrico em camundongos resistentes. A expressão de componentes da MEC (colágenos tipo I, III e IV, laminina, decorina e biglican) foi estudada através da análise imuno-histoquímica em lesões granulomatosas de omento em camundongos B10.A e A/J inoculados por via ip. com Pb18 ou Pb265 em diferentes tempos de infecção (NISHIKAKU, 2003). Neste trabalho, observou-se padrões de lesões similares aos descritos por Xidieh (1999), com variados graus de deposição dos diferentes componentes da MEC estudados. Na infecção com Pb18, colágenos tipo I e III, decorina e em menor grau, laminina, foram encontrados principalmente circundando macrófagos e células gigantes contendo células fúngicas em ambas as linhagens de camundongos, assim como delimitando áreas de necrose presentes apenas em camundongos A/J e marcando intensamente as lesões fibróticas formadas em fases mais tardias da infecção. A expressão de colágeno tipo IV foi detectada na membrana basal dos vasos neoformados na lesões e também disperso na MEC, enquanto biglican foi observado principalmente em células gigantes e macrófagos nos granulomas.

Em camundongos infectados com Pb265, marcação positiva evidente para os diferentes componentes da MEC foi encontrada em fase precoce da infecção, com padrões de deposição semelhantes aos observados na inoculação de

camundongos com Pb18, contudo, menor expressão destes componentes foi observada em estágio avançado.

Vale ressaltar que na análise imuno-histoquímica a expressão de MMP-9 foi observada também em células leveduriformes de *P. brasiliensis* de morfologia preservada e degenerada presentes nas lesões granulomatosas. Estes resultados sugerem que o fungo possa estar produzindo enzimas similares à MMP-9 ou alternativamente, possa apresentar receptores que reconheçam esta enzima secretada pelo hospedeiro.

A produção de NO dependente da ação enzimática de iNOS (NOS-2) e da estimulação pelas citocinas IFN- γ e TNF- α representa um dos principais mecanismos microbicidas de macrófagos contra patógenos (BOGDAN, 2001). Outras funções do NO incluem o seu papel na resposta granulomatosa infecciosa através da regulação da fibrose e da secreção de citocinas do tipo Th1 e Th2 (HESSE et al., 2001).

Alguns estudos da PCM experimental têm sugerido um papel protetor de NO, enquanto outros têm demonstrado que a produção persistente está associada à suscetibilidade (BOCCA et al., 1998; GONZALEZ et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2002). Estes pesquisadores demonstraram que o NO é importante para o controle da disseminação fúngica, porém acarreta em supressão da imunidade celular e inibição da produção de TNF- α no curso da infecção. Por outro lado, Bernardino (2005) observou uma menor disseminação fúngica e maior produção de TNF- α em camundongos KO iNOS em comparação com o controle (C57BL/6) após duas semanas de infecção com Pb18, mas um aumento na carga fúngica em camundongos KO iNOS após 10 semanas de infecção.

Quanto à resposta granulomatosa, o tratamento com o inibidor da síntese de NO, acarretou em aumento das lesões hepáticas e diminuição da produção de TNF- α em camundongos suscetíveis (B10.A) (NASCIMENTO et al., 2002) e na formação de granulomas fechados e produção aumentada de TNF- α nos pulmões de camundongos C57BL/6 tratados (BOCCA et al., 1998), assim como em animais KO iNOS (BERNARDINO, 2005) infectados com Pb18. Estes resultados sugerem que a supressão de NO conduz a produção de TNF- α que por sua vez apresenta um importante papel na formação de granulomas organizados. Em estudos clínicos da

PCM, a expressão de iNOS em macrófagos e células gigantes foi observada em lesões orais (BATISTA et al., 2005), assim como em lesões de pacientes com as formas juvenil e adulta da doença (NEWORAL et al., 2003)

A produção de NO mediada pela enzima iNOS é controlada por OPN, ao mesmo tempo em que a expressão desta glicoproteína é induzida por NO, demonstrando assim a existência de um mecanismo de retro-alimentação para controlar a síntese excessiva de NO (GUO et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2000).

Devido a inter-relação existente entre NO e OPN e a importância destes dois componentes na resposta inflamatória tecidual, decidimos investigar também o efeito da ausência de iNOS na expressão de OPN em granulomas de camundongos infectados com *P. brasiliensis*. Em nosso estudo, camundongos deficientes de iNOS (KOiNOS) e seu controle C57BL/6 inoculados ip. com o isolado Pb18 foram analisados após 15 e 120 dias de infecção. Diminuição no grau de células OPN (+) e na área total das lesões ocupadas por fungos foi observada nas lesões de camundongos KOiNOS aos 120 dias de infecção. Menor carga fúngica foi observada nos órgãos deste grupo em comparação ao observado nos camundongos controles na fase tardia da infecção. Provavelmente a diminuição da expressão de OPN detectada em macrófagos e células gigantes multinucleadas, assim como da presença de fungos viáveis, esteja associada à presença de lesões de padrão encapsulado/fechado, com a formação de necrose e a existência de lesões de aspecto residual em camundongos deficientes da iNOS. Os níveis de OPN em homogenato de omento foram também analisados por ELISA, detectando alta produção aos 15 dias de infecção, mas a diminuição da secreção aos 120 dias de infecção.

A princípio, estes resultados parecem associar a presença de NO com maior grau de suscetibilidade, pois observou-se um padrão de resistência no curso da infecção de camundongos deficientes, apresentando algumas similaridades com a resposta granulomatosa observada em camundongos A/J, como a menor quantidade de fungos viáveis nos órgãos, a presença lesões compactas e necróticas, além de lesões residuais, conferindo o aspecto regressivo na infecção. Por outro lado, camundongos iNOS suficientes apresentaram um grande número de focos de lesões ativas, contendo células OPN positivas e muitos fungos preservados até a fase tardia da infecção. Menor carga fúngica e presença de granulomas fechados foram também observados após 15 dias da infecção pulmonar de

camundongos KOiNOS com o mesmo isolado fúngico, por Bernardino (2005). Esta linhagem foi classificada como intermediária em estudos da sobrevivência após infecção ip. com o isolado Pb18 (CALICH et al., 1985) e posteriormente como suscetível em estudos dos níveis de amilase plasmática, cujo aumento foi correlacionado à maior gravidade da doença (XIDIEH et al., 1994). No presente trabalho, os resultados obtidos em camundongos C57BL/6 infectados associaram a manutenção da expressão de OPN com a presença de granulomas ativos, muito deles disseminados e também com a presença de NO.

Aumentada expressão de OPN foi observada em granulomas de camundongos B10.A desde a fase inicial de infecção, acompanhada pela alta expressão de células IFN- γ positivas, assim como marcante expressão de OPN foi encontrada nas lesões de camundongos C57BL/6 iNOS suficientes. Estes resultados sugerem que camundongos com maior suscetibilidade à infecção são capazes de produzir e secretar rapidamente produtos considerados importantes para o desenvolvimento da resposta inflamatória granulomatosa, porém são ineficientes para controlar a doença, possivelmente devido à presença de outros componentes reguladores que favorecem o aumento da disseminação fúngica e a progressão da doença. Outros mecanismos podem estar presentes na regulação da produção de OPN, pois neste presente trabalho, a expressão de OPN foi observada mesmo na ausência de iNOS.

Quanto à produção de MMPs em camundongos geneticamente deficientes em iNOS infectados com Pb18, a presença desta classe de enzimas foi semelhante a observada nos grupos experimentais descritos anteriormente neste trabalho; houve a detecção de pró MMP-9 e MMP-9 ativa, além da MMP-2 ativa, tanto em camundongos KOiNOS como em seus controles infectados. Mais uma vez, observamos a presença da forma latente da MMP-9 em omento de camundongos após 15 e 120 dias de infecção, com a diminuição da pró-MMP-9 e a ausência da forma ativa em camundongos KOiNOS na fase tardia da infecção, indicando menor ativação proteolítica na ausência de iNOS e o predomínio da síntese de componentes da MEC. Estes dados corroboram a análise histopatológica realizada neste estudo, visto que intensa deposição de MEC foi observada nos granulomas de padrão compacto de camundongos KOiNOS. Além disso, a predominância de lesões

fechadas foi acompanhada pela presença de lesões residuais e pelo menor grau de disseminação fúngica nos órgãos.

Nossos resultados estão de acordo com os descritos na literatura, demonstrando que a enzima iNOS medeia as propriedades anti-fibróticas de NO durante o desenvolvimento da resposta granulomatosa (HESSE et al., 2000; HOGABOAM et al., 1998; LOUSADA et al., 2006). A inibição da fibrose e por conseguinte da deposição de MEC pela enzima iNOS, parece estar associada à modulação na expressão e atividade de MMP-9 e MMP-2 (CHEN et al., 2005; MARCET-PALACIOS et al., 2003) e também no perfil de produção de citocinas e quimiocinas fibrogênicas (HOGABOAM et al., 1998).

Com base nestes resultados, pode-se concluir que nos granulomas induzidos por *P. brasiliensis*, o óxido nítrico apresenta papel importante na modulação da resposta inflamatória crônica, favorecendo o processo de degradação tecidual. Dessa forma, é possível que o NO esteja influenciando diretamente o padrão estrutural e funcional dos granulomas, alterando o processo de migração das células da resposta imune e ao mesmo tempo, a disseminação do patógeno nos sítios de inflamação crônica. Por fim, NO parece ter papel deletério em fases tardias da infecção ip. com o isolado virulento Pb18, sendo associado à presença de granulomas frouxos e maior grau de disseminação do fungo, confirmando os resultados da literatura.

O processo de invasão tecidual de *P. brasiliensis* durante a infecção tem sido atribuído em parte à secreção de proteinases pelo fungo com atividade de gelatinase (VAZ et al., 1994), collagenase (BEDOYA-ESCOBAR et al., 1993) e também capazes de degradar componentes da membrana basal (PUCCIA et al., 1998). No presente trabalho, estudamos um eventual papel das proteases como fator de virulência do fungo para facilitar a disseminação nos tecidos durante a infecção. No entanto, foi demonstrada aqui a ausência de atividade gelatinolítica do fungo em cultura, sugerindo que o *P. brasiliensis* não produz metaloproteinases ou as produz apenas quando presente nos tecidos do hospedeiro.

Nossos resultados confirmam a existência de proteases capazes de degradar a MEC, os quais podem contribuir para a organização do padrão das lesões granulomatosas. Deste modo, considerando-se a resposta granulomatosa

induzida na infecção com *P. brasiliensis* como um sistema complexo e dinâmico, na qual uma gama de populações celulares, componentes da MEC, citocinas e outros produtos são produzidos pelo hospedeiro e influenciados pela interação com o patógeno, é esperado que as MMPs e outras enzimas proteolíticas da MEC possam contribuir em menor ou maior grau na progressão ou na resolução da PCM através da regulação do balanço entre degradação e síntese da matriz. Neste sentido, a ação das MMPs pode ser a de facilitar a disseminação do patógeno ao mesmo tempo que permite o acesso de células inflamatórias para o sítio inflamatório.

A expressão de componentes da matriz extracelular associada à presença de citocinas e fatores de crescimento nas lesões paracoccidioidomicóticas, sugere a existência de uma intensa rede de interações célula-célula, célula-matriz e matriz-matriz, com parte integrante dos mecanismos de regulação da resposta imune desenvolvida em camundongos com diferentes graus de suscetibilidade ao *P. brasiliensis* e de modo similar estar presente na doença humana.

Finalmente, a caracterização geral dos granulomas usando o presente modelo de infecção (ip.), através da análise do padrão de distribuição celular e da MEC, assim como da interação patógeno-hospedeiro, contribui para a avaliação da influência dos fatores relacionados ao hospedeiro (patrimônio genético) e ao patógeno (virulência).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- a) a expressão aumentada de IFN- γ nas células em lesões granulomatosas contendo necrose e fibrose em camundongos da linhagem A/J na fase tardia da infecção com Pb18, confirma a importância desta citocina na resistência à infecção com *P. brasiliensis*;
- b) a expressão de osteopontina (OPN) em macrófagos e a constante expressão de OPN em células gigantes multinucleadas localizadas nas lesões granulomatosas disseminadas de camundongos suscetíveis B10.A infectados com Pb18, indica uma importante contribuição desta glicoproteína na maturação funcional e na migração destas células, sugerindo o seu envolvimento na formação e organização estrutural dos granulomas;
- c) a OPN está associada a maior gravidade na fase inicial da infecção de camundongos suscetíveis, mas a um certo grau de controle da progressão da infecção em camundongos resistentes na fase tardia da infecção, exercendo efeitos anti-inflamatórios através da regulação da produção de óxido nítrico;
- d) a evidente expressão de OPN e IFN- γ observada tanto em camundongos suscetíveis e resistentes em lesões granulomatosas ativas durante a fase inicial, em contraste com a fraca expressão na fase tardia da infecção com o isolado de baixa virulência Pb265, reforça a hipótese de que a resolução da infecção leva à inibição dos componentes de caráter granulomatogênico;
- e) o caráter regressivo da resposta no curso da infecção de camundongos A/J inoculados com o isolado de alta virulência Pb18 e em camundongos

infectados com o isolado de baixa virulência Pb265, foi associado à formação de lesões granulomatosas compactas/fechadas, muitas das quais acompanhadas de necrose e fibrose, além da presença de lesões residuais contendo macrófagos pseudoxantomatosos e fungos degenerados. Além disso, houve uma correlação direta com a diminuição da área de lesão com o fungo e do grau de disseminação fúngica nos órgãos;

- f) o desenvolvimento de granulomas compactos e de lesões residuais na fase tardia de camundongos KOiNOS foi relacionado à diminuição da expressão de OPN e da área lesionada contendo fungo, assim como do menor grau de disseminação de *P. brasiliensis* nos órgãos, sugerindo que o NO apresenta papel importante na modulação da resposta granulomatosa, ao inibir a produção de componentes da MEC e está diretamente associado à progressão da doença;
- g) no contexto da interação NO-OPN, a expressão de OPN foi observada nas lesões granulomatosas ativas mesmo na ausência da enzima iNOS durante a fase precoce da infecção, sugerindo que a síntese desta glicoproteína esteja sob regulação de outros fatores;
- h) a infecção com *P. brasiliensis* induz a produção e a expressão de metaloproteinases da matriz (MMP), em particular da MMP-9, por diferentes células do hospedeiro, possivelmente contribuindo para a migração de células importantes na formação de granulomas compactos ou frouxos e/ou para a disseminação do fungo nos tecidos.

Estes resultados em conjunto confirmam mais uma vez a participação de componentes da MEC, de enzimas proteolíticas da matriz e de citocinas no desenvolvimento da resposta granulomatosa induzida por *P. brasiliensis*, assim como a influência do patrimônio genético do hospedeiro e da virulência dos diferentes isolados fúngicos.

REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; MORTARA, R. A.; TEDESCO, R. C.; CARDOSO, F.O.; CARVALHO, L.O.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Extracellular matrix alterations in experimental murine *Leishmania (L.) amazonensis* infection. **Parasitology**, v.128, p. 385-390, 2004.

ALLEENDOERFER, R.; DEEPE JR., G. S. Intrapulmonary responses to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2564-2569, 1997.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; COLVILLE-NASH, P. R.; WILLOUGHBY, D. A. Temporal and spatial immunolocalization of cytokines in murine chronic granulomatous tissue – implications for their role in tissue development and repair processes. **Lab. Invest.**, v. 69, p. 405-414, 1993.

ARRUDA, M. S .P.; COELHO, K. I. R.; MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis of hamster inoculated in the cheek pouch. **Mycopathologia**, v. 128, p. 67-73, 1994.

ASHKAR, S.; WEBER, G. F.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; SANCHIRICO, M. E.; JANSSON, M.; ZAWAIDEH, S.; RITTLING, S. R.; DENHARDT, D.; GLIMCHER, M. J.; CANTOR, H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type 1 (cell-mediated) immunity. **Science**, v. 287, p. 860-864, 2000.

BARRICK, B.; CAMPBELL, E. J.; OWEN, C. A. Leucocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. **Wound Rep. Reg.**, v. 7, p. 410-422, 1999.

BATISTA, A. C.; SOARES, C. T.; LARA, V. S. Failure of nitric oxide production by macrophages and decrease in CD4⁺ T cells in oral paracoccidioidomycosis: possible mechanisms that permit local fungal multiplication. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 47, p. 267-273, 2005.

BEDOYA-ESCOBAR, V. I.; NARANJO-MESA, M. S.; RESTREPO-MORENO, A. Detection of proteolytic enzymes released by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 299-304, 1993.

1

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BERGERON, A.; BONAY, M.; KAMBOUCHNER, M.; LECOSSIER, D.; RIQUEST, M.; SOLER, P.; HANCE, A.; TAZI, A. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas. **J. Immunol.**, v. 159, p. 3034-3043, 1997.²

BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouradia**, v. 5, p. 26-29, 1966.

BERNARDINO, S. **Paracoccidioidomicose pulmonar em camundongos geneticamente deficientes da enzima óxido nítrico sintase-induzida (iNOS)**. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BIAGIONI, L.; SOUZA, M. J.; CHAMMA, L. G.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; MOTA, N. G. S.; FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, p. 617-621, 1984.

BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3056-3063, 1998.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 907-916, 2001.

BRITO, T.; FRANCO, M. F. Viewpoint granulomatous inflammation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 36, p. 185-192, 1994.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J. Immunol.**, v. 140, p. 2786-2789, 1988.

BRUMMER, E.; KURITA, N.; YOSHIDA, S.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Killing of *Histoplasma capsulatum* by gamma-interferon-activated human monocyte-derived macrophages: evidence for a superoxide anion-dependent mechanism. **J. Med. Microbiol.**, v. 35, p. 29-34, 1991.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.

BURGER, E.; MIYAJI, M.; SANO, A.; CALICH, V. L. G.; NISHIMURA, K.; LENZI, H. L. Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 235-242, 1996.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 585-599, 1985.

CALICH, V. L. G. SINGER-VERMES, L. M.; RUSSO, M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Fla. USA: CRC Press, 1994, p.151-173.

CALICH, V. L. G.; VAZ, C. A. C., BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v. 149, p. 273-528, 1998.

CALVI, S. A.; SOARES, A. M.; PERAÇOLI, M. T.; FRANCO, M.; RUIZ, R. L. JR.; MARCONDES-MACHADO, J.; FECCHIO, D.; MATTOS, M. C.; MENDES, R. P. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 373-379, 2003.

CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSO, L. R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* un serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 31-38, 1991.

CANO, L.E.; KASHINO, S.S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C.F.; SINGER-VERMES, L., VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 800-806, 1998.

CARLSON, I.; TOGNAZZI, K.; MANSEAU, E. J., DVORAK, H. F., BROWN, L. F. Osteopontin is strongly expressed by histiocytes in granulomas of diverse etiology. **Lab. Invest.**, v. 77, p.103-108, 1997.

CARMONA, A. K.; OLIVEIRA M. C. F.; JULIANO L.; RODRIGUES E.; PUCCIA R.; TRAVASSOS L. R. Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biochem. J.**, v. 309, p. 209-214, 1995.

CHANG, J. C.; WYSOCKI, A.; TCHOU-WONG, K. M.; MOSKOWITZ, N.; ZHANG, Y.; ROM, W. N. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on

macrophages and the release of matrix metalloproteinases. **Thorax** **51**, v. 3, p. 306-311, 1996.

CHEN, Y.; HOZAWA, S.; SAWAMURA, S.; SATO, S.; FUKUYAMA, N.; TSUJI, C.; MINE, T.; OKADA, Y.; TANINO, R.; OGUSHI, Y.; NAKAZAWA, H. Deficiency of inducible nitric oxide synthase exacerbates hepatic fibrosis in mice fed high-fat diet. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 326, p. 45-51, 2005.

CHUNG, T. W.; KIM, J. R.; SUH, J. I.; LEE, Y. C.; CHANG, Y. C.; CHUNG, T. H.; KIM, C. H. Correlation between plasma levels of matrix metalloproteinases (MMP)-9 /MMP-2 ratio and alpha-fetoproteins in chronic hepatitis carrying hepatitis B virus. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 19, p. 565-571, 2004.

COCK, A. M., CANO, L. E., VÉLEZ, D., ARISTIZÁBAL, B. H., TRUJILLO, J., RESTREPO, A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 42, p. 59-66, 2000.

CZAJA, M. J.; WEINER, F. R.; TAKAHASHI, S.; GIAMBRONE, M.A.; VAN DER MEIDE, P. H.; SCHELLEKENS, H.; BIEMPICA, L.; ZERN, M. A. Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. **Hepatology**, v. 10, p. 795-800, 1989.

DENHARDT, D. T.; GIACHELLI, C. M.; RITTLING, S. R. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 41, p. 723-749, 2001.

DI NEZZA, L. A.; MISAJON, A.; ZHANG, J.; JOBLING, T.; QUINN, M. A.; OSTÖR, A. G.; NIE, G.; LOPATA, A.; SALAMONSEN, L. A. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion. **Cancer**, v. 94, p. 1466-1475, 2002.

DING, A.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β 1, β 2, and β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . **J. Immunol.**, v. 145, p. 940-944, 1990.

DUFFIELD, J. S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 104, p. 27-38, 2003.

EHLERS, S.; BENINI, J.; KUTSCH, S.; ENDRES, R.; RIETSCHER, E. T.; PFEFFER, K. Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3571-3579, 1999.

FAVA NETTO, C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 21, p. 99-194, 1961.

FAYYAZI, A.; SCHWEYER, S.; EICHMEYER, B.; HERMS, J.; HEMMERLEIN, B.; RADZUN, H. J.; BERGER, H. Expression of IFN γ , coexpression of TNF α and matrix metalloproteinases and apoptosis of T lymphocytes and macrophages in granuloma annulare. **Arch Dermatol Res.**, v. 292, p. 384-390, 2000.

FAZIOLI, R. A.; KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G. Delayed-type hypersensitivity response in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 126, p. 137-146, 1994.

FEINBERG, M. W.; JAIN, M. K.; WERNER, F.; SIBINGA, N. E. S.; WIESEL, P.; WANG, H.; TOPPER, J. N.; PERRELLA, M. A.; LEE, M-E. Transforming growth factor- β 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. **J. Biol. Chemist.**, v. 275, p. 25766-25773, 2000.

FISHER, L. W.; STUBBS, J. T. I.; YOUNG, M. F. Antisera and cDNA probes to human and certain animal model bone matrix noncollagenous proteins. **Acta Orthop. Scand.**, v. 66, p. 61-65, 1995.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C. J.; SCHREIBER R.; MAK T. W.; BLOOM B. R. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, v. 2, p. 561-572, 1995.

FRANCO, L.; NAJVAR, L.; GOMEZ, B. L.; RESTREPO, S.; GRAYBILL, J. R.; RESTREPO, A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p.424-430, 1998.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p.129-132, 1987.

FRANCO, M.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Baillières Clin. Trop. Med. Comm. Dis.**, v. 4, p. 185-220, 1989.

FRIEDLAND, J. S.; SHAW, T. C.; PRICE, N. M.; DAYER, J. M. Differential regulation of MMP-1/9 and TIMP-1 secretion in human monocytic cells in response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Matrix Biol.**, v. 21, p. 103-110, 2002.

GEARING, A. J. H.; BECKETT, P.; CHRISTODOULOS, M.; CHURCHILL, M.; CLEMENTS, J.; DAVIDSON, A. H.; DRUMMOND, A. H.; GALLOWAY, W. A.; GILBERT, R.; GORDON, J. L.; LEBER, T. M.; MANGAN, M.; MILLER, K.; NAYEE, P.; OWEN, K.; PATEL, S.; THOMAS, W.; WELLS, G.; WOOD, L. M.; WOOLLEY, K. Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. **Nature**, v. 370, p. 555-561, 1994.

GESZTESI, J.L.; GESZTESI, J.; PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R.; VICENTINI, A. P.; MORAES, D. E. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. **Hybridoma**, v. 15, p. 415-422, 1996.

GHOSH, A. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p. 301-314, 2002.

GIACHELLI, C. M.; LOMBARDI, D.; JOHNSON, R. J.; MURRY, C. E.; ALMEIDA, M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. **Am. J. Pathol.**, v. 152, p. 353-358, 1998.

GIBSON, P. G.; WARK, P. A.; SIMPSON, J. L.; MELDRUM, C.; MELDRUM, S.; SALTOS, N.; BOYLE, M. Induced sputum IL-8 gene expression, neutrophil influx and MMP-9 allergic bronchopulmonary aspergillosis. **Eur. Respir. J.**, v. 21, p. 582-588, 2003.

GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S. S.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. An acidic component of the heterologous Tc-85 protein family from the surface *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 65, p. 85-94, 1994.

GOETZL, E. J.; BANDA, M.J.; LEPPERT, D. Matrix metalloproteinases in immunity. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1-4, 1996.

GOMEZ, D. E.; DE LORENZO, M. S.; ALONSO, D. F.; ANDRADE, Z. A. Expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, and MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in schistosomal portal fibrosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 9-13, 1999.

GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2546-2552, 2000.

GONZÁLEZ, A. A.; SEGURA, A. M.; HORIBA, K.; QIAN, S.; YU, Z. X.; STETLER-STEVENSON, W.; WILLERSON, J. T.; MCALLISTER, H. A. JR.; FERRANS, V. J. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lesions of cardiac and pulmonary sarcoidosis: an immunohistochemical study. **Hum. Pathol.**, v. 33, p. 1158-1164, 2002.

GRESSNER, A. M.; BACHEM, M. G. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis--a homage to the role of activated fat-storing cells. **Digestion**, v. 56, p. 335-346, 1995.

GROCOTT, R. G. A stain for fungi in tissue sections and smears, using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 25, p. 975-979, 1955.

GUO, H.; CAI, C. Q.; SCHROEDER, R. A.; KUO, P. C. Osteopontin is a negative feedback regulator of nitric oxide synthesis in murine macrophages. **J. Immunol.**, v. 166 p. 1079-1086, 2001.

HANNA, S. A.; DA SILVA, J. L.; GIANNINI, M. J. S. M. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 877-884, 2000.

HENRI, S.; CHEVILLARD, C.; MERGANI, A.; PARIS, P.; GAUDART, J.; CAMILLA, C.; DESSEIN, H.; MONTERO, F.; ELWALI, N. E.; SAEED, O. K.; MAGZOUN, M.; DESSEIN, A. J. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. **J. Immunol.**, v. 169, p. 929-936, 2002.

HERNANDEZ-PANDO, R.; OROSCO, H.; ARRIAGA, K.; SAMPIERI, A.; LARRIVASAHD, J.; MADRID-MARINA, V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 α and transforming growth factor- β , during the course of experimental pulmonary tuberculosis. **Immunology**, v. 90, p. 607-617, 1997.

HERNANDEZ-PANDO, R.; BORNSTEIN, Q. L.; AGUILAR LEON, D.; OROZCO, E. H.; MADRIGAL, V. K.; MARTINEZ CORDERO, E. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. **Immunology**, v. 100, p. 52-358, 2000.

HERRING, A. C.; LEE, J.; McDONALD, R. A.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumour necrosis factor alpha for protective Th1-cell mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2959-2964, 2002.

HESSE, M.; CHEEVER, A. W.; JANKOVIC, D.; WYNN, T. A. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. **Am. J. Pathol.**, v. 157, p. 945-955, 2000.

HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A. C.; SCHITO, M.; FUENTES, J. M.; CHEEVER, A. W.; PEARCE, E. J.; WYNN, T. A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines *in vivo*: granulomatous pathology is shaped by pattern of L-arginine metabolism. **J. Immunol.**, v. 167, p. 6533-6544, 2001.

HOAG, K. A.; LIPSCOMB, M. F.; IZZO, A. A.; STREET, N. E. IL-12 and IFN- γ are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant CB-17 mice. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 17, p. 733-739, 1997

HOGABOAM, C. M.; GALLINAT, C. S.; BONE-LARSON, C.; CHENSUE, S. W.; LUKACS, N. W.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Collagen deposition in a non-fibrotic lung granuloma model after nitric oxide inhibition. **Am J Pathol.**, v. 153, p. 1861-1872, 1998.

HSU, L. S.; LEE, H. H.; CHEN, K.M.; CHOU, H. L.; LAI, S. C. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the granulomatous fibrosis of rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 99, p. 61-70.

ITO, A.; MUKAIYAMA, A.; ITOH, Y.; NAGASE, H.; THOGERSEN, I. B.; ENGHILD, J. J.; SASAGURI, Y.; MORI, Y. Degradation of interleukin- β 1 by matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 14657-14660, 1996.

JACOBS, W.; KUMAR-SINGH, S.; BOGERS, J.; VAN de VIJVER, K.; DEELDER, A.; VAN MARCK, E. Transforming growth factor- β , basement membrane components and heparan sulphate proteoglycans in experimental hepatic schistosomiasis mansoni. **Cell Tissue Res.**, v. 292, p. 101-106, 1998.

KANEKO, H.; YAMADA, H.; MIZUNO, S.; UDAGAWA, T.; KAZUMI, Y.; SEKIKAWA, K.; SUGAWARA, I. Role of tumor necrosis factor-alpha in *Mycobacterium*-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. **Lab. Invest.**, v. 79, p. 379-386, 1999.

KASHINO, S. S., CALICH, V. L. G., BURGER, E., SINGER-VERMES, L. M. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, p. 173-178, 1985.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; ABRAHAMSOHN, P. A.; BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of the *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v. 99, p. 119-128, 1987.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 130, p. 131-140, 1995.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. **J. Interf. Cyt. Res.**, v. 20, p. 89-97, 2000.

KLEINER, D. E.; STETLER-STEVENSON, W. G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal. Biochem.**, v. 218, p. 325-329, 1994.

KLOTZ, S.A. Adherence of *Candida albicans* to component of the subendothelial extracellular matrix. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 68, p. 249-254, 1990.

KOGA, T.; DUAN, H.; FURUE, M. Immunohistochemical detection of interferon- γ -producing cells in granuloma formation of sporotrichosis. **Med. Mycol.**, v. 40, v. 111-114, 2002.

KOGUCHI, Y.; KAWAKAMI, K.; KON, S.; SEGAWA, T.; MAEDA, M.; UEDE, T.; SAITO, A. *Penicillium marneffei* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 1042-1048, 2002.

KRAUSE, S. W.; REHLI, M.; KREUTZ, M.; SCHWARZFISCHER, L.; PAULAUSKIS, J. D.; ANDREESSEN, R. Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. **J. Leukoc. Biol.**, 60, p. 540-545, 1996.

KURITA, N.; BISWAS, S. K.; OARADA, M.; SANO, A.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Fungistatic and fungicidal activity of murine polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 19-24, 1999.

LENZI, H.L.; LENZI, J.A.; KERR, I.B.; ANTUNES, S.L.; MOTA, E.M.; OLIVEIRA, D.N. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 77-90, 1991.

LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; MIYAJI, M.; SANO, A.; NISHIMURA, K.; BURGER, E. Fibrosis patterns of lesions developed by athymic and euthymic mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2301-2308, 1994.

LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D. N.; PELAJO-MACHADO, M.; BOROJEVIC, R.; LENZI, J. A. Coelom-associated lymphomyeloid tissue (milky spots): site of lymphoid and myeloid cell generation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 19-24, 1996.

LENZI, J. A.; MOTA, E. M.; PELAJO-MACHADO, M.; VALE, B. S.; ANDRADE, Z. A.; LENZI, H. L. Intestinal fibrovascular nodules caused by *Schistosoma mansoni* infection in *Calomys callosus* Rengger, 1830 (Rodentia: Cricetidae): a model of concomitant fibrosis and angiogenesis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 117-127, 2002.

LI, G. C. Y.; KELPKE, S. S.; OPARIL, S.; THOMPSON, J. A. Estrogen attenuates integrin-beta(3)-dependent adventitial fibroblast migration after inhibition of osteopontin production in vascular smooth muscle cells. **Circulation**, v. 101, p. 2949-2955, 2000.

LI, X.; O'REGAN, A. W.; BERMAN, J. S. IFN-gamma induction of osteopontin expression in human monocytoid cells. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 23, p. 259-265, 2003.

LIMPER, A. H.; COLBY, T. V.; SANDERS, M. S.; ASAKURA, S.; ROCHE, P. C.; DEREMEE, R. A. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- β_1 in the nonnecrotizing granulomas of pulmonary sarcoidosis. **Am. J. Resp. Crit. Care Med.**, v. 149, p. 197-204, 1994.

LOUSADA, S.; FLÓRIDO, M.; APPELBERG, R. Regulation of granuloma fibrosis by nitric oxide during *Mycobacterium avium* experimental infection. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 87, p. 307-315, 2006.

MAJKA, S. M.; KASIMOS, J.; IZZO, L.; IZZO, A. A. *Cryptococcus neoformans* pulmonary granuloma formation is associated with matrix metalloproteinase-2 expression. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 323-328, 2002.

MANDAL, M.; MANDAL, A.; DAS, S.; CHAKRABORTI, T.; CHAKRABORTI, S. Clinical implications of matrix metalloproteinases. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 252, p. 305-329, 2003.

MARCET-PALACIOS, M.; GRAHAM, K.; CASS, C.; BEFUS, A. D.; MAYERS, I.; RADOMSKI, M. W. Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 307, p. 429-436, 2003.

MARQUES, M. A. M.; MAHAPATRA, S.; SARNO, E. N.; SANTOS, S.; SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J.; PESSOLANI M. C. V. Further biochemical characterization of *Mycobacterium leprae* laminin-binding proteins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 463-470, 2001.

MARSHALL, B. G.; WANGOO, A.; COOK, H. T.; SHAW, R. J. Increased inflammatory cytokines and new collagen formation in cutaneous tuberculosis and sarcoidosis. **Thorax**, v. 51, p. 1253-61, 1996.

McMAHON, J. P.; WHEAT, J.; SOBEL M. E.; PASULA R.; DOWNING J. F.; MARTIN II W. J. Murine laminin binds to *Histoplasma capsulatum*: a possible mechanism of dissemination. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 1010-1017, 1995.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MORAES, R.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 32, p. 384-385, 1990.

MERRY, K.; DODDS, R.; LITTLEWOOD A.; GOWEN, M. Expression of osteopontin mRNA by osteoclasts and osteoblasts in modelling adult human bone. **J. Cell. Sci.**, v. 104, p. 1013-1020, 1993.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Fla., USA: CRC Press, 1994. p. 131-150.

MORAES, S. M. D.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E. Susceptible mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection produce higher levels of TGF- β than resistant animals. In: INTERNATIONAL MEETING ON CYTOKINES, 1996, Angra dos Reis, RJ, Brazil. **Abstracts...** Angra dos Reis, 1996. p. 44, res. 01.56.

MORRISON, C. J.; BRUMMER, E.; ISENBERG, R. A.; STEVENS, D. A. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity by recombinant gamma interferon. **J. Leuk. Biol.**, v. 41, p. 434-440, 1987.

MUSATTI, C. C.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; MENDES, E.; MENDES, N. F. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. **Cell. Immunol.**, v. 24, p. 365-378, 1976.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L. G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 97, p. 8841-8848, 2000.

NAU, G. J.; GUILLFOILE, P.; CHUPP, G. L.; BERMAN, J. S.; KIM, S. J.; KORNFIELD, H.; YOUNG, R. A. 1997. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 6414-6421, 1997.

NAU, G. J.; CHUPP, G. L.; EMILE, J. F.; JOUANGUY, E.; BERMAN, J. S.; CASANOVA, J. L.; YOUNG, R. A. Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection. **Am. J. Pathol.**, v. 157, p. 37-42, 2000.

NEWORAL, E. P. M.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R. L.; NORONHA, I. L.; BLOTTA, M. H. S. L. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymphnodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 21, p. 234-241, 2003.

NISHIKAKU, A. S. **Avaliação dos componentes da matriz extracelular e de citocinas nas lesões de camundongos resistentes e suscetíveis à paracoccidioidomicose.** 166 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NISHIKAKU, A. S.; BURGER, E. Immunohistochemical demonstration of transforming growth factor-beta and decorin in paracoccidioid granulomas. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 1073-1078, 2003.

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAORDANOU, P. M. O.; BLOTTA, M. H. S. L. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparative with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 139-144, 2002.

OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E.; DUBOIS, B.; NELISSEN, I.; VAN COILLIE, E.; MASURE, S.; PROOST, P.; VAN DAMME, J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. **J. Leukoc. Biol.**, v. 69, p. 851-859, 2001.

O'REGAN, A.; BERMAN, J. S. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 81, p. 373-390, 2000.

O'REGAN, A. W.; CHUPP, G. L.; LOWRY, J. A.; GOETSCHKES, M.; MULLIGAN, N.; BERMAN, J. S. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. **J. Immunol.**, v. 162, p. 1024-1031, 1999.

O'REGAN, A. W.; HAYDEN, J. M.; BODY, S.; LIAW, L.; MULLIGAN, N.; GOETSCHKES, M.; BERMAN, J. S. Abnormal pulmonary granuloma formation in osteopontin-deficient mice. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 164, p. 2243-2247, 2001.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 617-629, 2004.

PETROW, P. K.; HUMMEL, K. M.; SCHEDEL, J.; FRANZ, J. K.; KLEIN, C. L.; MULLER-LADNER, U.; KRIEGSMANN, J.; CHANG, P. L.; PRINCE, C. W.; GAY, R. E.; GAY, S. Expression of osteopontin messenger RNA and protein in rheumatoid arthritis: effects of osteopontin on the release of collagenase 1 from articular chondrocytes and synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.**, v. 43, p. 1597-1605, 2000.

PLATELL, C.; COOPER, D.; PAPADIMITRIOU, J. M.; HALL, J. C. The omentum. **World J. Gastroenterol.**, v. 6, p. 169-176, 2000.

PUCCIA, R.; CARMONA, A. K.; GESZTESI, J.-L.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 345-348, 1998.

QUIDING-JÄRBRINK, M.; SMITH, D. A.; BANCROFT, G. J. Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 5661-5670, 2001.

RESTREPO, A. The ecology of *P. brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RODRÍGUEZ-PLA, A.; BOSCH-Gil, J. A.; ROSSELLÓ-URGELL, J.; HUGUET-REDECILLA, P.; STONE, J. H.; VILARDELL-TARRES, M. Metalloproteinase-2 and -9 in giant cell arteritis: involvement in vascular remodeling. **Circulation.**, v. 112, p. 264-269, 2005.

ROLLO, E. E.; LASKIN, D. L.; DENHARDT, D. T. Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 60, p. 397-404, 1996.

ROMAN, J.; JEON, Y. J.; GAL, A.; PEREZ, R. L. Distribution of extracellular matrices, matrix receptors, and transforming growth factor-beta 1 in human and experimental lung granulomatous inflammation. **Am J Med Sci.**, v. 309, p. 124-33, 1995.

SATO, I.; YAMAMOTO, N.; YAMAZAKI, H.; HASHIMOTO, S.; HINO, M.; SAKAI, F.; FUJIE, A. Prevention of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin does not influence susceptibility to *Candida albicans* infection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 3053-3055, 2005.

SCHONBECK, U.; MACH, F.; LIBBY, P. Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: a novel caspase1-independent pathway of IL-1 β processing. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3340-3346, 1998.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.** v. 75, p. 163-189, 2004.

SCOTT, J.A.; WEIR, M.L.; WILSON, S.M.; XUAN, J.W.; CHAMBERS, A.F.; McCORMACK, D. G. Osteopontin inhibits inducible nitric oxide synthase activity in rat vascular tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. 2258-2265, 1998.

SENIOR, R. M.; GRIFFIN, G.; FLISZAR, C. J.; SHAPIRO, S. D.; GOLDBERG, G. I.; WELGUS, H.G. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 7870-7875, 1991

SHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, p. 163-89, 2004.

SIME, P. J.; XING, Z.; GRAHAM, F. L.; CSAKY, K. G.; GAULDIE, J. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. **J Clin Invest.**, v. 100, p. 768-76, 1997.

SINGER-VERMES, L. M.; CALDEIRA, C. B.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 94, p. 75-79, 1993.

SOTO-SUAZO, M.; SAN MARTIN, S.; FERRO, E. S.; ZORN, T. M. T. Differential expression of glycosaminoglycans and proteoglycans in the migratory pathway of the primordial germ cells of the mouse. **Histochem. Cell Biol.**, v. 118, p. 69-78, 2002.

SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p. 1811-1820, 2000.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 10, p. 415-433, 2000.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **J. Pathol.**, v. 200, p. 448-464, 2003.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, p. 463-561, 2001.

SUGAWARA, I.; YAMADA, H.; OHTOMO, K.; AOKI, T.; DOI, N.; KAZUMI, Y.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y. Granulomas in IFN-gamma gene-disrupted mice are inducible by avirulent *Mycobacterium*, but not by virulent *Mycobacterium*. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 871-877, 1998.

SUZUKI, K.; ZHU, B.; RITTLING, S. R.; DENHARDT, D. T.; GOLDBERG, H. A.; MCCULLOCH, C. A. G.; SODEK, J. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. **J. Bone Miner. Res.**, v. 17, p. 1486-1497, 2002.

TAKAHASHI, F.; TAKAHASHI, K.; MAEDA, K.; TOMINAGA, S.; FUKUCHI, Y. Osteopontin is induced by nitric oxide in RAW 264.7 cells. **IUBMB Life.**, v. 49, p. 217-221, 2000.

TOBÓN, A. M.; AGUDELO, C. A.; OSÓRIO, M. L.; ALVAREZ, D. L.; ARANGO, M.; CANO, L. E.; RESTREPO, A. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, p. 898-904, 2003.

VADAY, G. G.; LIDER, O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, p. 149-159, 2000.

VADAY, G. G.; FRANITZA, S.; SCHOR, H.; HECHT, I.; BRILL, A.; CAHALON, L.; HERSHKOVIZ, R.; LIDER, O. Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokine mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. **J. Leukoc. Biol.**, **69**, p. 885-892, 2001.

VAZ, C. A. C.; MACKENZIE, D. W. R.; HEARN, V.; CAMARGO, Z. P.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Gelatinase activity of exoantigens from virulent and non-virulent isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 65-69, 1994.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J.-L.; FRANCO, M. F.; DE SOUZA, W.; DE MORAES, J. Z.; TRAVASSOS, L. R.; LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1465-1469, 1994.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, v. 92, p. 827-839, 2003.

WILLIAMS, G. T.; WILLIAMS, W. J. Granulomatous inflammation – a review. **J. Clin. Pathol.**, v. 36, p. 723-733, 1983.

WILLIAMS, P. L.; LEIB, S. L.; KAMBERI, P.; LEPPERT, D.; SOBEL, R. A.; BIFRARE, Y. D.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Levels of matrix metalloproteinases-9 within cerebrospinal fluid in a rabbit model of coccidioidal meningitis and vasculitis. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1692-1695, 2002.

WYNN, T. A. Fibrotic disease and the Th1/Th2 paradigm. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 1-12, 2004.

XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E. Plasma amylase levels as a marker of disease severity in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 37-45, 1994.

XIDIEH, C. F. **Aspectos imunológicos e histopatológicos de camundongos resistentes, suscetíveis e híbridos da geração F1 no curso da infecção intraperitoneal por amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* com diferentes graus de virulência.** 104 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

XIDIEH, C. F.; LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 188, p. 41-49, 1999.

XIE, B.; DONG, Z.; FIDLER, I. Regulatory mechanisms for the expression of type IV collagenases/gelatinases in murine macrophages. **J. Immunol.**, v. 152, p. 3637-3644, 1994.

YAMAMOTO-TABATA, T.; McDONAGH, S.; CHANG, H. T.; FISHER, S.; PEREIRA, L. Human cytomegalovirus-interleukin-10 downregulates metalloproteinases activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness *in vitro*. **J. Virol.**, v. 78, p. 2831-2840, 2004.

ZHANG, Y.; McC.; FUJII, K.; WAHL, L. M. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF- α , granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 β through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3071-3076, 1998.

ZHOU, M.; ZHANG, Y.; ARDANS, J. A.; WAHL, L. M. Interferon- γ differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor-necrosis factor- α and caspase 8. **J. Biol. Chem.**, v. 46, p. 45406-45413, 2003.

ZHU, B.; SUZUKI, K.; GOLDBERG, H. A.; RITTLING, S.R.; DENHARDT, D.T.; MCCULLOCH, C.A.; SODEK, J. Osteopontin modulates CD44-dependent chemotaxis of peritoneal macrophages through G-protein-coupled receptors: evidence of a role for an intracellular form of osteopontin. **J. Cell. Physiol.**, v. 198, p. 155-167, 2004.