UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Ação dos Leucotrienos na Fagocitose Via Receptores Fcγ e Manose
em Macrófagos Alveolares e Mecanismos Moleculares Envolvidos

Marina Reis de Moura Campos

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:
Professora Doutora Sonia Jancar

São Paulo
2008

19.295

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013908

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Campos, Marina Reis de Moura
C198a Ação dos leucotrienos na fagocitose via receptores Fcγ e
 manose em macrófagos alveolares e mecanismos moleculares
 envolvidos / Marina Reis de Moura Campos. -- São Paulo,
 2008.
 98p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Jancar, Sonia

I. Macrófago : Fagocitose : Imunologia : Medicina I. T.
II. Jancar, Sonia, orientador

616.079 CDD

Marina Reis de Moura Campos

**Ação dos Leucotrienos na Fagocitose Via Receptores Fcγ e Manose
em Macrófagos Alveolares e Mecanismos Moleculares Envolvidos**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Professora Doutora Sonia Jancar
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 2008.

09/12/2008

Executar bem um trabalho só é possível quando existe admiração.
Foi assim que esta tese começou, baseado em admirar tanto uma pessoa que
mistura doçura, inteligência e competência.
À você professora Sonia Jancar, por ter acreditado tanto em mim e me orientado
tão bem desde o primeiro dia em que cheguei ao seu Laboratório.

O maior de todos os meus agradecimentos é para o Dr. Carlos Henrique Serezani, que confiou a mim a missão de dar continuidade a este trabalho tão importante. Impossível descrever o quanto este brilhante pesquisador me auxiliou. Se hoje, sinto-me realizada por concluir esta etapa da pesquisa, foi graças ao apoio e à orientação desta pessoa incrível.

Agradeço a Deus por ter iluminado o meu caminho e me dado a segurança necessária para ser firme e persistente nos momentos em que tive dificuldades.

Agradeço ao meu marido Junior, por todo amor, carinho, apoio e compreensão durante toda a realização do meu doutorado.

Agradeço aos meus pais Neto e Cecília por confiarem e acreditarem tanto no meu trabalho. Obrigada por toda força, pelas correções da minha tese e por me amarem tanto.

À minha melhor amiga Laura, com quem sempre pude contar em todos os momentos da minha vida. Obrigada por você existir e ser minha irmã. Agradeço a minha avó Odette por me amar tanto e por aceitar a minha ausência durante a realização deste trabalho.

Aos meus queridos D.Fátima e S.Odevani, pelo carinho e apoio.

Agradeço ao meu grande amigo Eliver, por todo apoio durante todos os meus anos na pesquisa.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório Fábio, Matheus, Camila, Joilson, Reinaldo, Richardt, Denise, Nathalia, Luciano, por tornarem tão agradáveis os meus momentos na USP.

Agradeço à Mariana, por dar continuidade a este trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Patrícia Bozza que me recebeu de forma tão carinhosa em seu Laboratório na Fiocruz, onde tive a oportunidade de aprender importantes técnicas.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 87/2006

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Eventos moleculares envolvidos na fagocitose e atividade microbida de macrófagos alveolares ativado por leucotrienos” (Protocolo CEEA nº118), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Marina Reis de Moura Campos e do orientador(a) Profa. Sonia Jancar, 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) desta Faculdade, em 11/12/2006.

São Paulo, 11 de dezembro de 2006.

*Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA*

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: ceb@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **130** nas fls. **38** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Sonia Jancar, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Eventos moleculares envolvidos na fagocitose e atividade microbida de macrófagos alveolares ativados por leucotrienos**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Marina Reis de Moura Campos, Carlos Henrique Serezani**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **21.11.2006**.

São Paulo, 22 de novembro de 2006.

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da CEEA - ICB/USP

DECLARAÇÃO

=====

DECLARO que, de acordo com os registros existentes no Serviço Acadêmico deste Instituto, o(a) aluno(a) **MARINA REIS DE MOURA CAMPOS**, Nº. Fênix: **4852892**, Nível: **Doutorado**, do **Programa de Análises Clínicas** realizou o **Estágio Supervisionado em Docência** do **Programa de Aperfeiçoamento de Ensino - PAE**, no **1º semestre de 2006**, junto as disciplinas **"BMI.0165 – Imunologia básica"**, ministrada pelo Departamento de Imunologia - Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob a supervisão do(a) Prof(a). Dr(a). Sonia Jancar Negro, com carga horária semanal de **6 horas**.

Secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 06 de dezembro de 2006.

Celso Dias Pereira
Técnico Acadêmico

SIGLAS E ABREVIATURAS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	7
1 – INTRODUÇÃO	8
1.1 – Macrófagos	8
1.2 – Receptores fagocíticos.....	9
1.2.1 – Receptor Fcγ	10
1.2.2 – Receptor manose	12
1.3 – Moléculas de sinalização intracelular envolvidas na fagocitose.....	14
1.3.1 – Proteína tirosina quinase Syk.....	14
1.3.2 – Proteína Quinase C (PKC)	15
1.3.3 – Fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K)	16
1.3.4 – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK)	17
1.4 – Leucotrienos na defesa contra infecções	19
1.5 – Papel dos leucotrienos nas vias de sinalização acionadas durante a fagocitose.	24
2 - OBJETIVOS	26
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 - Animais	27
3.2 - Isolamento de macrófagos alveolares e cultivo	27
3.3 - Fagocitose de Hemácias opsonizadas	27
3.4 - Cultivo da <i>Candida albicans</i>	29
3.5 - Fagocitose de <i>C. albicans</i>	30
3.6 - Dosagem de LTB ₄	32

3.7 - Western Blotting e immunoblotting	33
3.8 - Análise dos dados e estatística.....	34
4 - RESULTADOS	35
4.1 – Fagocitose via receptor Fcγ	35
4.1.1 – Participação de leucotrienos endógenos e vias de sinalização envolvidas.....	35
4.1.2 – Efeito da adição de leucotrienos na fagocitose.	39
4.1.3 - Isoformas da PKC envolvidas na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.....	42
4.1.4 - Envolvimento das MAPK na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.....	46
4.1.5 - Envolvimento da PI3K na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.....	50
4.1.6 – Envolvimento da cPLA ₂ na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.....	54
4.2 – Fagocitose via receptor manose	56
4.2.1 – Produção de LTB ₄ durante fagocitose de <i>C. albicans</i>	56
4.2.2 – Participação de leucotrienos endógenos na fagocitose de <i>C. albicans</i>	58
4.2.3 – Efeito da adição de leucotrienos na fagocitose de <i>C. albicans</i>	60
4.2.4 – Leucotrienos potencializam a fagocitose de <i>C. albicans</i> via receptores manose.....	63
4.2.5 – Perfil de ativação de moléculas sinalizadoras durante a fagocitose de <i>C. albicans</i>	65
4.2.6 – Envolvimento das PKC na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.....	67
4.2.7 – Envolvimento da PI3K na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.....	69

4.2.8 – Envolvimento das MAPK na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.....	71
5 - DISCUSSÃO.....	73
6 - CONCLUSÕES.....	83
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

SIGLAS E ABREVIATURAS

AA - ácido araquidônico
Akt - *agammaglobulinaemia tyrosine kinase*
AM – macrófagos alveolares
BLT 1 e 2 - receptores de leucotrienos 1 e 2
CysLT - receptor dos cisteinil leucotrienos
cPLA₂ - fosfolipase A₂ citoplasmática
C 3 - fração 3 do sistema complemento
DAG - diacilglicerol
DO - densidade óptica
ERK 1/2 - quinase regulada por sinal extracelular
FLAP - proteína ativadora da 5-lipoxigenase
Fc_γR - fração constante – receptor γ
IgG - imunoglobulina G
IL - interleucina
INF - interferon
IP3 - inositol-trifosfato
ITAM - *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
JAK - Janus quinase
JNK - c-Jun quinase
LPS - lipopolissacarídeo
LTA₄ - leucotrieno A₄
LTB₄ - leucotrieno B₄
LTC₄ - leucotrieno C₄
LTD₄ - leucotrieno D₄
MOC - microscópio óptico comum
PBS - *Phosphate buffered saline*
PI3K - Fosfoinositídeo 3-quinase
PKC - proteína quinase C
Rpm - rotações por minuto
sRBC - do inglês *sheep red blood cells*
SDS - dodecil sulfato de sódio
TNF - Fator de necrose tumoral
5-LO - 5-lipoxigenase

RESUMO

Os leucotrienos aumentam a fagocitose e a atividade microbicida contra uma série de patógenos. Em macrófagos alveolares, LTB₄ e LTD₄ aumentam a fagocitose via FcγR de modo dependente de PKC. Entretanto, o papel das isoformas específicas da PKC, das MAPK, e da PI3K neste processo, ainda não é conhecido. Além disso, pouco se sabe sobre a importância dos leucotrienos na fagocitose via outros receptores. Os objetivos deste trabalho são: a) ampliar o conhecimento sobre as vias de sinalização ativadas pelos leucotrienos durante a fagocitose de hemácias opsonizadas por IgG; b) avaliar o efeito dos leucotrienos na fagocitose de *Candida albicans*, por macrófagos alveolares e as vias de sinalização intracelular envolvidas.

Observou-se que os leucotrienos endogenamente produzidos ou adicionados aos macrófagos alveolares, aumentam a fagocitose via FcγR e para isso utilizam distintas vias de sinalização intracelular. A ação do LTB₄ envolveu predominantemente a via ERK1/2 e PKCα e com menor intensidade da PKCδ. A ação do LTD₄ envolveu exclusivamente a via p38 e PKCδ. Ambos leucotrienos utilizaram a PI3K para aumentar a fagocitose via FcγR.

Na fagocitose de *C.albicans*, os macrófagos alveolares produziram LTB₄. Tanto o LTB₄ quanto o LTD₄ endógenos contribuíram para a fagocitose da *C.albicans* que ocorre predominantemente via receptor manose. A fagocitose via receptor manose foi potencializada pela adição tanto do LTB₄ quanto do LTD₄ de modo dependente da ativação da PKCδ e da PI3K. As vias da PKCα, ERK1/2 e p38 não estão envolvidas na potencialização da fagocitose de *C.albicans* por leucotrienos.

O esclarecimento das moléculas sinalizadoras envolvidas na interação de macrófagos alveolares com patógenos poderá contribuir para o desenvolvimento de alvos específicos e

refinados no controle e tratamento de infecções pulmonares. Analisados em conjunto, os resultados mostram que os leucotrienos são importantes moduladores das funções dos macrófagos alveolares, por aumentar a fagocitose tanto através dos receptores para $Fc\gamma$ como do receptor manose. Além disso, os LTB_4 e LTD_4 ativam programas de sinalização distintos para potencializar a fagocitose via receptor $Fc\gamma$, enquanto na fagocitose via receptor manose os LTB_4 e LTD_4 usam as mesmas vias.

ABSTRACT

Leukotrienes enhance phagocytosis and microbicidal activity against several pathogens. In alveolar macrophages, LTB₄ and cysteinyl LT both enhance Fcγ receptor - mediated phagocytosis. While both LTB₄ and LTD₄ enhances phagocytosis dependent on PKC activity, only LTB₄ requires the protein tyrosine kinase syk to do so. However, the role of specific PKC isoforms, MAPKs (p38 and ERK1/2), and PI3K in mediating LT-enhanced FcγR-mediated phagocytosis is unknown. In addition, the importance of LT in the phagocytosis via other receptors is also understudied. In the present work we sought to determine the importance of the above kinases during IgG-opsonized phagocytosis and if both classes of LT enhance the ingestion of *C. albicans*; the receptors and the molecular mechanisms involved. Studies with isoform-selective inhibitors indicated that LTB₄ effects were dependent on both PKCα and PKCδ, while LTD₄ effects were exclusively due to PKCδ activation. Although both exogenous LTB₄ and LTD₄ enhanced p38 and ERK1/2 activation, LTB₄ required only ERK1/2, while LTD₄ required only p38 activation. Activation by both LT was dependent on PI3K activation. It was found that exogenously added LTB₄ and LTD₄ both enhanced PKCδ and PKCα phosphorylation during FcγR engagement. Regarding the studies concerning the importance of LT in the ingestion of *C.albicans*, both endogenous and exogenous LTB₄ and LTD₄ enhanced *C.albicans* phagocytosis. LT effects were dependent exclusively on PKCδ and PI3K. We also demonstrated that the LT effect on *C.albicans* was due to the mannose receptor activation. Taken together, leukotrienes are potente immunomodulators of the phagocyte function, by enhancing phagocytosis both via FcγR and mannose receptor. Moreover, LT receptors activate different signaling programs to enhance FcγR-mediated phagocytosis, while the signaling elicited to enhance *C.albicans* ingestion is similar for both classes of LTs. Thus the nature of the signaling elicited by the phagocytic receptors dictates the signaling induced by LT.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Macrófagos

A eliminação de patógenos é realizada principalmente por fagócitos, células especializadas no reconhecimento, englobamento e destruição de microrganismos. Os macrófagos residentes nos tecidos e os neutrófilos e monócitos que circulam no sangue e penetram nos tecidos, infectados, são as principais células da imunidade inata.

Os macrófagos estão presentes no tecido conjuntivo de vários órgãos, como baço, linfonodos, fígado e em cavidades corporais, como a peritoneal e a pleural. Estão presentes também nas vias aéreas, no cérebro e nos ossos. Originam-se de promonócitos da medula óssea, os quais dão origem aos monócitos do sangue que, ao migrarem para os tecidos, se transformam em macrófagos. Considerada uma das células de ligação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, o macrófago tem a capacidade de fagocitar, processar e apresentar os antígenos aos linfócitos. A ação dessas células inicia-se com a fagocitose, que depende de contato físico entre a membrana do fagócito e a do microrganismo. Assim, essas células fagocíticas ficam dispostas estrategicamente em todos os sítios onde os microrganismos entram em contato com o hospedeiro.

No pulmão existem duas populações de macrófagos, denominados macrófagos intersticiais e macrófagos alveolares. Essas células estão localizadas em diferentes compartimentos anatômicos, como tecido conjuntivo e espaço aéreo, respectivamente. Os macrófagos alveolares residem dentro dos alvéolos e freqüentemente são encontrados na parede do epitélio alveolar. São células expostas diretamente às partículas presentes no ar, poluentes e antígenos. Os macrófagos alveolares são única população de macrófagos cuja função primária é o controle de infecções no pulmão contra microrganismos inalados (revisto por GORDON, 2002).

1.2 – Receptores fagocíticos

A fagocitose, como um mecanismo de defesa imune inata, foi primeiramente demonstrada por Eli Metchnikov no final do século XIX (METCHNIKOFF, 1884; METCHNIKOFF, 1887). A fagocitose desempenha um papel essencial na defesa do hospedeiro através da ingestão e destruição de patógenos, contribuindo para inflamação e ativação de respostas imunes (JONES *et al*, 1999). A ingestão ocorre por diversos receptores, incluindo os que reconhecem peptídeos gerados pela ativação do sistema do complemento ou por anticorpos IgG, além de outras opsoninas e receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (receptores manose, beta glucano, pentraxinas, receptores tipo *toll*, etc..) (OFEK *et al*, 1995; ADEREM, 1999).

A progressiva interação do receptor com o seu respectivo ligante permitem que ocorra a fagocitose, que através de uma maneira tipo zíper internaliza completamente a partícula formando uma estrutura especializada denominada fagossomo. O fagossomo então se funde ao lisossomo tornando-se uma organela microbicida (JONES *et al*, 1999; BERON *et al*, 1995).

Abaixo, detalharemos alguns dos receptores mais importantes envolvidos na fagocitose com anticorpos IgG, que ocorre via receptor Fcγ e na fagocitose que ocorre via um dos receptores que reconhecem padrões, o receptor manose.

1.2.1 – Receptor Fc γ

As partículas opsonizadas com anticorpos são reconhecidas por uma classe de glicoproteínas de membrana, pertencentes à superfamília das imunoglobulinas; os receptores Fc de imunoglobulinas. A interação da partícula opsonizada com anticorpos da classe IgG e o receptor para a porção Fc da IgG propicia o reconhecimento do antígeno por uma série de fagócitos. Tal interação desencadeia cascatas intracelulares, que resultam na ingestão da partícula opsonizada (GESSNER *et al*, 1998; RAGHAVAN, 1996) e liberação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos que podem modular a fagocitose e os mecanismos microbicidas (COX, 2001). Dentre os receptores fagocíticos, os que reconhecem a porção Fc da IgG (Fc γ R) são os mais estudados (RAVETCH, 2001; BROWN, 1992).

Existem três classes de receptores Fc γ : Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII. Cada uma dessas classes consiste em uma isoforma de receptor individual. O Fc γ RI (CD 64) é codificado por três diferentes genes (A, B e C) e está expresso em monócitos, macrófagos e neutrófilos estimulados por interferon. É um receptor de alta afinidade, capaz de se ligar à IgG monomérica. O Fc γ RII (CD 32) é também codificado por três diferentes genes (A, B e C) e é um receptor de baixa afinidade capaz de se ligar apenas à IgG complexada ao antígeno. O receptor Fc γ RIIA está expresso principalmente em células fagocíticas e o Fc γ RIIB é constitutivamente expresso em linfócitos T e B. E finalmente, Fc γ RIII (CD 16) é codificado por dois diferentes genes (A e B) e é também um receptor de baixa afinidade. O Fc γ RIIIA está expresso em macrófagos e monócitos em baixos níveis, enquanto o Fc γ RIIIB está expresso exclusivamente em neutrófilos (RAVETCH, 2001).

Estes receptores estão ancorados à membrana por âncoras de glicofosfatidilinositol (GPI). A maioria das isoformas de Fc γ R, incluindo Fc γ RI (INDIK *et al*, 1994), Fc γ RIIA (TUIJNMAN *et*

al, 1992) e FcγRIIIA (PARK *et al*, 1993) são capazes de mediar a fagocitose. Ao contrário, FcγRIIB regula negativamente a fagocitose (HUNTER *et al*, 1998).

Os FcγRIIA e FcγRIIIA são receptores ativadores caracterizados pela presença da seqüência ITAM, enquanto o FcγRIIB funciona como um receptor inibitório porque contém a seqüência ITIM no seu domínio citoplasmático. A ativação de FcγR contendo seqüência ITAM, além de mediar a fagocitose, leva à produção de citocinas e a expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida, além de estimular a biossíntese de eicosanóides e a produção de radicais de oxigênio (INDIK *et al*, 1994; TUIJNMAN *et al*, 1992; PARK *et al*, 1993; HUNTER *et al*, 1998).

A fosforilação inicial de ITAM é desencadeada pelas enzimas da família da tirosina quinase Src (KORADE-MIRNICS *et al*, 2000). Pelo menos seis membros da família Src participam da fagocitose: Fgr, Fyn, Hck, Lyn, Yes e Src (KORADE-MIRNICS *et al*, 2000; STRZELECKA *et al*, 1997; MAJEED *et al*, 2001). Logo que são ativadas pelo engajamento do receptor Fcγ com partículas opsonizadas com anticorpos IgG, essas quinases serão redistribuídas para copos fagocíticos ricos em actina (MAJEED *et al*, 2001). Os ITAM fosforilados desencadeiam então a ativação da Syk (TURNER *et al*, 2000; COONEY *et al*, 2001). Abaixo, detalharemos as principais moléculas de sinalização intracelular envolvidas na fagocitose.

Tanto a ingestão de alvos opsonizados, como a liberação de mediadores inflamatórios são conseqüências de eventos intracelulares resultantes do engajamento do receptor Fcγ, tais como fosforilação de resíduos tirosina, rearranjo da actina e ativação de enzimas sinalizadoras, como por exemplo, PI3K, PKC, MAPK (p38 e ERK 1/2), fosfolipase C, fosfolipase D e fosfolipase A₂ (NIMMERJAHN, 2006; GARCIA-GARCIA, 2002).

1.2.2 – Receptor manose

O receptor para manose é uma lectina que liga os resíduos terminais da manose e da fucose de glicoproteínas e glicolípídios. Um exemplo de microrganismo reconhecido pelo receptor manose é a *Candida albicans*, um fungo leveduriforme que possui sua parede revestida, dentre outros componentes, por manana. Entretanto, durante a infecção por *C.albicans*, vários receptores estão envolvidos no reconhecimento deste patógeno, tais como os receptores beta glucano, denominados dectina, para complemento, além dos receptores tipo toll. Neste trabalho, focaremos nossos estudos na fagocitose via receptor manose.

Um dos fatores que determina o reconhecimento do fungo pelo receptor manose ou dectina-1 é a forma com que o fungo se encontra. Quando o fungo está sob a forma de blastoconídio, o reconhecimento ocorre pelo receptor manose, que ativa TLR4, promovendo a liberação de IL-12, gerando um processo pró-inflamatório. Por outro lado, quando o fungo encontra-se sob a forma de hifa, ocorre a exposição de grande quantidade do açúcar beta glucano, favorecendo o reconhecimento e a ativação do receptor dectina-1, que ativa TLR2 e gera uma diminuição da resposta inflamatória (NETEA *et al*, 2006).

Em indivíduos imunocompetentes a *C.albicans* é um fungo que faz parte da microbiota. Entretanto, em casos de debilidade do sistema imunológico, pode infectar a mucosa da boca, olhos, nariz, vagina, e outras regiões do corpo. Em certas situações este fungo invade o tecido pulmonar, podendo resultar na morte do paciente (LACAZ *et al*, 2002). Apesar de terapias apropriadas, a mortalidade causada pela disseminação sistêmica de *C.albicans* em indivíduos imunocomprometidos é de aproximadamente 30% (WENZEL, 1991).

A resistência do hospedeiro contra a infecção pela *C.albicans* é mediada predominantemente por neutrófilos e macrófagos (GREENFIELD, 1992).

Os macrófagos são capazes de fagocitar *C.albicans* opsonizada ou não opsonizada. As principais opsoninas para este fungo são anticorpos presentes no soro, componentes da via clássica e alternativa do complemento (MARODI *et al*, 1991; CASADEVALL, 1995). Sem estar opsonizada, a *C.albicans* é reconhecida e fagocitada principalmente via receptor manose (MARODI *et al*, 1991; LI, 1993). A atividade microbicida de macrófagos em relação à *C.albicans* irá depender da forma com que este fungo foi reconhecido e internalizado. Leveduras opsonizadas irão resultar em uma elevada atividade microbicida com aumento na produção de reativos intermediários do oxigênio por macrófagos, comparado com leveduras não opsonizadas (MARODI *et al*, 1991; MARODI *et al*, 1993).

Macrófagos de ratos e de humanos podem se ligar e internalizar este fungo principalmente via receptor manose (KITZ *et al*, 1992; MARODI *et al*, 1991). Tem sido demonstrado que através do reconhecimento via receptor manose, células dendríticas de ratos são capazes de fagocitar e matar leveduras da *C.albicans* (D'OSTIANI *et al*, 2000).

Patógenos podem evadir ou desativar o processo fagocítico por uma variedade de estratégias que irão permitir a sobrevivência e replicação destes microrganismos no hospedeiro. As estratégias de sobrevivência da *C.albicans* em fagócitos mononucleares são muito exploradas. Sabe-se que a *C.albicans* é mais resistente à atividade microbicida de monócitos, mediada pela mieloperoxidase do que outras espécies de *Candida* menos patogênicas. Além disso, as glicoproteínas presentes na superfície da *C.albicans*, especialmente a glucana, podem exercer um papel protetor para este patógeno (MARQUIS *et al*, 1991). Uma variedade de espécies de *Candida* secreta diferentes proteases, fatores hemolíticos e fosfolipases que também podem contribuir para a sobrevivência do fungo ingerido (LERNER, 1993; IBRAHIM *et al*, 1995; MANNS *et al*, 1994).

1.3 – Moléculas de sinalização intracelular envolvidas na fagocitose

1.3.1 – Proteína tirosina quinase Syk

A syk, uma tirosina quinase expressa em todas as células hematopoiéticas, desempenha um papel essencial nos eventos iniciais da ativação da cascata de sinalização intracelular necessários para diversas respostas imunes celulares, incluindo a fagocitose via receptor Fc γ por macrófagos (CROWLEY *et al*, 1997), células dendríticas (SEDLIK *et al*, 2003) e neutrófilos (RAEDER *et al*, 1999b). Seguido do engajamento ao receptor Fc γ , os dois domínios N-terminais Src se ligam a imunoreceptores baseados em motivos de ativação de tirosina (ITAM) da porção γ dos receptores Fc γ . Após esta interação, syk se torna fosforilada, o que leva à ativação de outras quinases, tais como PI3K e PKC que culminam na polimerização da actina, formação de pseudópodes e consequentemente ingestão dos alvos (GREENBERG, 2002; DAERON, 1997).

Distintas vias de sinalização intracelular são ativadas durante a fagocitose, dependendo do receptor pelo qual o microrganismo foi reconhecido, influenciando respostas funcionais e a sobrevivência do patógeno (UNDERHILL, 2004; LE CABEC *et al*, 2000). Vários estudos tem sido realizados sobre as vias de sinalização ativadas pela ligação de microrganismos com receptores presentes na membrana dos macrófagos. Sabe-se que, enquanto a fagocitose mediada pelo receptor Fc γ ocorre de modo dependente da syk (CROWLEY *et al*, 1997), para a fagocitose via receptor dectina, não é necessária a ativação da syk (UNDERHILL *et al*, 2005).

1.3.2 – Proteína Quinase C (PKC)

A ativação da PKC é decorrente de uma série de fatores, incluindo a geração de segundos mensageiros, tais como o diacilglicerol, ácido araquidônico, cálcio ou outras quinases ativadas logo após a ativação dos receptores. Apesar dessa classe de quinases serem ativadas por uma série de receptores, incluindo os que apresentam cauda de ITAM e os receptores acoplados a proteína G (GPCR), especialmente os acoplados a proteína G_q . Pelo menos 12 isoformas da PKC já foram descritas e podem ser classificadas em três grandes grupos: PKC clássicas (cPKC α , β_1 , β_2 e γ) que são dependentes de cálcio e diacilglicerol; PKC novas (nPKC δ , ϵ , τ e η) que são cálcio independente e diacilglicerol dependente e a PKC atípica ζ , que não necessita de cálcio nem diacilglicerol para ativação (PARKER, 2004).

Foi demonstrado que PKC α e δ foram localizadas em fagossomos de macrófagos durante fagocitose mediada por receptor C3 e Fc γ (BRETON *et al*, 2000; LARSEN *et al*, 2000). Foi demonstrado em macrófagos peritoneais de ratos que a ativação da PKC α é necessária para a formação e maturação do fagossomo (ALLEN, 1995).

Além disso, foi demonstrado que LTD $_4$ ativa PKC δ , mas não PKC α em células de intestino humano (THODETI *et al*, 2001).

PETERS-GOLDEN e colaboradores (2003) reportaram que macrófagos alveolares de ratos apresentam uma maior capacidade de ativação das PKC quando comparados aos macrófagos peritoneais. Dentre as isoformas de PKC, as mais abundantes e facilmente ativadas em macrófagos alveolares são a PKC α e PKC δ (PETERS-GOLDEN *et al*, 1991). Foi demonstrado que PKC α e PKC δ são ativadas por ambos leucotrienos (LTB $_4$ e cisteinil leucotrienos) em diferentes tipos celulares.

1.3.3 – Fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K)

A PI3K é uma quinase lipídica que fosforila o inositol na posição 3 (TOKER, 1997). A PI3K e seus produtos lipídicos $PI(3,4)P_2$ e $PI-3,4,5$ -trifosfato [$PI(3,4,5)P_3$] estão envolvidos na ativação de diversas vias de sinalização intracelular, dentre elas, ativação de diferentes isoformas de PKC (SINGH *et al*, 1993; TOKER *et al*, 1994; YAMAMORI *et al*. 2004), Akt/protein kinase B, FAK e ERK 1/2 (MARSHALL *et al*, 2001; GARCIA-GARCIA *et al*, 2002).

Durante a fagocitose mediada por receptores $Fc\gamma$, PI3K é essencial na internalização de partículas com pelo menos $2\mu m$ (ARAKI *et al*, 1996) e importante para a extensão de pseudópodes, um evento necessário para fagocitose de partículas (COX *et al*, 1999). Foi observado também o acúmulo de produtos da PI3K nos locais de formação do fagossomo (MARSHALL *et al*, 2001).

A importância da PI3K na fagocitose vem sendo muito estudada através da sua inibição, utilizando para isso um dos seus inibidores específico denominado wortmannin. Em macrófagos, a inibição da PI3K utilizando resultou no bloqueio da fagocitose no estágio inicial da ativação das vias de sinalização necessárias para a ocorrência deste evento (COX *et al*, 1999). Demonstrou-se ainda que a inibição da PI3K diminuiu a fagocitose via $Fc\gamma R$ em polimorfonucleares (KANAKARAJ *et al*, 1994). Macrófagos infectados por *Entamoeba histolytica* e tratados com wortmannin apresentaram uma diminuição significativa na fagocitose e atividade microbida deste protozoário (GHOSH *et al*, 1997).

PI3K é uma quinase essencial para desencadear a fagocitose por meio de diversos receptores (GARCIA-GARCIA *et al*, 2002b). Foi demonstrado em tecido pulmonar humano que uma proteína componente do surfactante pulmonar, possui a capacidade de se ligar a macrófagos e ativar PI3K, aumentando a expressão de receptores para manose na superfície destas células (BEHARKA, *et al*, 2005).

1.3.4 – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK)

Outra via muito importante que vem sendo recentemente estudada é a via das MAPK. Foi demonstrado que esta via é ativada pela ligação dos receptores Fc γ e Fc ϵ (ROSE *et al*, 1997; TROTTA *et al*, 1996). Esta via é constituída por diversas proteínas que possuem atividade de serina/treonina quinases, cada uma delas considerada como uma cascata de quinases, com funções biológicas relacionadas entre si, estando principalmente envolvidas com a proliferação e diferenciação celular (HUNTER & KARIN, 1992). As MAPK mais conhecidas são a ERK 1/2 e a p38.

As MAPK desempenham um importante papel em grande número de mecanismos celulares, tais como crescimento, diferenciação, apoptose e ativação de fatores de transcrição (FANGER *et al*, 1997; SEGER, 1995; XIA *et al*, 1995). Nas funções fagocíticas dos macrófagos, as MAPK estão sendo bastante estudadas, pois existem evidências mostrando que a inibição destas vias pelos patógenos, ocorre como mecanismos de escape do microrganismo. Grande número destes microrganismos tem como alvo esta via, para desativar as funções dos macrófagos e escapar da fagocitose (SCHERLE *et al*, 1998). Espécies virulentas de *Yersinia enterocolytica*, inibem a secreção de TNF- α por macrófagos murinos J774A.1, através da desativação da via das MAPK (RUCKDESCHEL *et al*, 1997).

Além disso, citocinas e fatores de crescimento ativam MAPK. Foi demonstrado que TNF- α , GM-CSF, IL-8 ativam ERK 1/2 e p38 em polimorfonucleares humanos (KNALL *et al*, 1996; KRUMP *et al*, 1997; EL BENNA *et al*, 1996; NICK *et al*, 1997; McLEISH *et al*, 1998).

Fagocitose de *Staphylococcus aureus* opsonizados com IgG ativa ERK 1/2 e p38, ocorrendo em diferentes tempos. O pico da ativação de ERK 1/2 ocorre em 30 minutos enquanto a ativação máxima de p38 ocorre em 5 minutos, retornando a níveis basais em 60 minutos (McLEISH *et al*, 1998). Já com estímulos quimioatraentes, a ativação máxima destas

MAPK ocorre entre 1 e 2 minutos e volta a níveis basais entre 5 e 10 minutos (KNALL *et al*, 1996; KRUMP *et al*, 1997; RANE *et al*, 1997). Utilizando *S.aureus* não opsonizados, foi demonstrado que apenas 10% das bactérias foram fagocitadas e as MAPK praticamente não foram ativadas (McLEISH *et al*, 1998), indicando que muitos receptores incluindo Fcγ, contribuem de forma significativa para a ativação da cascata da ERK 1/2 e p38 durante a fagocitose (McLEISH *et al*, 1998).

Inibidores farmacológicos da ERK 1/2 e p38 diminuíram significativamente o *burst* oxidativo, a aderência e/ou quimiotaxia de polimorfonucleares (NICK *et al*, 1997; RANE *et al*, 1997). Foi demonstrado que a ativação da ERK 1/2 é importante na atividade microbicida de polimorfonucleares humanos infectados por *S.aureus* e *C.albicans* (HILL *et al*, 1999).

As vias de sinalização intracelular que culminam na ativação da ERK 1/2 na fagocitose via Fcγ não estão bem definidos. Estudos apontam que a ativação da ERK1/2 pode ser resultado da ativação das PKC (RAEDER *et al*, 1999; BRETON *et al*, 2000b; GARCIA-GARCIA *et al*, 2002b) ou da PI3K (GARCIA-GARCIA *et al*, 2002b; COXON *et al*, 2000).

1.4 – Leucotrienos na defesa contra infecções

Os leucotrienos são mediadores lipídicos do grupo dos eicosanóides, produzidos principalmente por células de origem mielóide como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos. Estes mediadores são sintetizados através do metabolismo do ácido araquidônico, pela via enzima 5-lipoxigenase (5-LO). São formados a partir de um hidroperóxido (5-HPETE) o qual é transformado em LTA₄ com a formação de um grupamento epóxido (oxigênio ligando os carbonos 5 e 6). O LTA₄ é instável e pode sofrer hidrólise enzimática gerando o LTB₄, ou então receber um resíduo de glutatona gerando o LTC₄. A retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC₄ dá origem ao LTD₄ e com a retirada da glicina do LTD₄ forma-se o LTE₄. Estes três últimos leucotrienos são conhecidos como cisteinil leucotrienos ou leucotrienos peptídicos.

A 5-LO está na forma inativa em leucócitos não estimulados. A ativação das células e conseqüente aumento de cálcio intracelular pode ativar esta enzima (RADMARK, 2005; LUO *et al*, 2006). A 5-LO está presente no citosol células não ativadas e após ativação celular, a enzima transloca-se para a membrana nuclear. A fosfolipase A₂ (PLA₂) hidrolisa os fosfolipídios da membrana nuclear liberando o ácido araquidônico (AA) que se liga a FLAP (do inglês 5-LO *activating protein*), e nesta forma o AA fica acessível à ação da 5-LO. Existem muitas isoformas de PLA₂ com diferentes propriedades e distribuição celular capazes de liberar o AA. O tipo IV PLA₂, também conhecida como PLA₂ citoplasmática (cPLA₂), é a isoforma que desempenha o principal papel na liberação do AA para produção de leucotrienos (BONVENTRE *et al*, 1997).

A síntese de leucotrienos tem, portanto, início na membrana nuclear, podendo ir para o núcleo onde pode atuar como fator de transcrição de genes, permanecerem no citoplasma ou serem transportados para fora da célula (revisto por PETERS-GOLDEN, 2003). A localização sub-celular da 5-LO afeta a síntese do LTB₄, de maneira que quando esta enzima encontra-se

no núcleo, ocorre maior produção do LTB₄ do que quando localizada no citoplasma (BROCK *et al*, 1997; LUO *et al*, 2003).

A produção de leucotrienos pode variar de acordo com o tipo de celular. Por exemplo, monócitos humanos, macrófagos alveolares de ratos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos B produzem principalmente LTB₄; eosinófilos humanos, macrófagos peritoneais e alveolares murinos secretam LTC₄ e mastócitos humanos sintetizam mais LTC₄ que LTB₄ (HIRATA *et al*, 1990; HENDERSON *et al*, 1988). Entretanto, esses padrões de produção de leucotrienos, de acordo com o tipo de célula, não ocorrem necessariamente em todas as espécies animais.

Os leucotrienos são principalmente secretados por leucócitos e atuam de modo autócrino e parácrino (PETERS GOLDEN *et al*, 2005). Os leucotrienos agem em concentrações nanomolares nas células alvo, geralmente de 1 a 100nM, via receptores acoplados à proteína G (TAGER, 2003 a; YOKOMIZO *et al*, 1997).

Existem quatro tipos de receptores celulares para os leucotrienos. Os receptores para os cisteinil leucotrienos conhecidos são o CysLT₁ e CysLT₂ e para o LTB₄ são o BLT₁ e BLT₂. Estes receptores apresentam diferentes afinidades pelos seus ligantes, o BLT₁ é descrito como receptor de alta afinidade e o BLT₂ de baixa afinidade. Nos leucócitos, esses receptores podem estar acoplados a proteína Gq que levam a formação de diacilglicerol e aumento de cálcio intracelular ou a proteína Gi que inibe adenilato ciclase e conseqüentemente a formação de AMP cíclico (TAGER, 2003a). PERES e colaboradores (2007) demonstraram que os efeitos dos leucotrienos nas funções efetoras dos macrófagos alveolares, tais como fagocitose e atividade microbicida são dependentes de diferentes proteínas G acopladas ao BLT₁ e CysLT₁. Foi mostrado que o BLT₁ está acoplado à Gi e Gq, enquanto o CysLT₁ está acoplado apenas à Gq.

O LTB₄ aumenta a adesão de células ao endotélio vascular (GIMBRONE *et al*, 1984), atrai (FORD-HUTCHINSON *et al*, 1980) e ativa neutrófilos, monócitos e linfócitos (CLAEISSON, 1984; CUNNINGHAM *et al*, 1980), dando início a uma cascata de eventos pró-inflamatórios possivelmente por ativação do receptor BLT₁ dos leucócitos, o que por induzir a polimerização da actina participa dos eventos requeridos para a migração de leucócitos (FORD-HUTCHINSON *et al*, 1980; KIM *et al*, 2006; MATSUKAWA *et al*, 1999). O LTB₄ também contribui para o recrutamento de células T efectoras e para o tráfego de células dendríticas após estimulação com antígenos e pode desempenhar um papel essencial no direcionamento da resposta imune adaptativa (TAGER *et al*, 2003b; DOEPPING *et al*, 2007).

Os leucotrienos estão envolvidos com o início da defesa do hospedeiro frente à infecções, participando diretamente da resposta imune inata. Organismos opsonizados com IgG ativam cPLA₂, liberando AA e subsequente síntese de leucotrienos (CLAEISSON *et al*, 1985; MANCUSO *et al*, 1998).

O papel deste mediador na defesa do hospedeiro foi demonstrado primeiramente em macrófagos peritoneais onde LTB₄ e LTC₄ aumentaram a fagocitose e a eliminação de *Trypanosoma cruzi* (WIRTH, 1985 a; WIRTH, 1985 b). Mais tarde, demonstrou-se que LTB₄ e LTC₄ são capazes de potencializar a fagocitose de *K.pneumoniae* opsonizadas, em macrófagos alveolares (MANCUSO *et al*. 1998) e neutrófilos (BAILIE *et al*. 1996).

Além da ação dos leucotrienos no aumento da fagocitose, foi observado que a administração do LTB₄ e LTC₄ aos macrófagos aumentou a atividade microbicida contra diferentes microrganismos tais como *T.cruzi* (WIRTH, 1985 a; WIRTH, 1985 b; TALVANI *et al*, 2002), *Toxoplasma gondii* (YONG *et al*, 1994), *Leishmania amazonensis* (SEREZANI *et al*, 2006), *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (apenas o LTB₄) (DEMITSU *et al*, 1989 b).

MEDEIROS e colaboradores (2004) demonstraram que a eliminação do fungo *Histoplasma capsulatum* foi prejudicada em ratos tratados com MK 886, um inibidor de síntese de leucotrienos. Além disso, a ausência de leucotrienos resultou na diminuição da fagocitose de leveduras de *H.capsulatum* opsonizadas com IgG em macrófagos alveolares.

A administração exógena do LTB₄, o produto mais abundante da 5-LO nos neutrófilos, aumentou a atividade microbida dos neutrófilos contra *Mycobacterium bovis* (COFFEY *et al*, 2004) e *Schistosoma mansoni* (MOQBEL *et al*, 1983).

Em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) existem evidências de que os leucotrienos contribuem para o aumento da suscetibilidade às infecções pulmonares. Macrófagos alveolares e polimorfonucleares obtidos destes indivíduos apresentaram redução na atividade microbida para *Cryptococcus neoformans* e a adição de LTB₄ reverteu esta deficiência (COFFEY *et al*, 1998). Além disso, verificou-se que a deficiência na produção de leucotrienos estava associada com a redução da expressão da FLAP (COFFEY *et al*, 1998; KRARUP *et al*, 1997).

A associação da deficiência de leucotrieno com o aumento da susceptibilidade à doenças infecciosas tem sido descrito em numerosos modelos murinos de infecções pulmonares. Com relação a importância destes mediadores gerados endogenamente, BAILE e colaboradores (1996), demonstraram que animais deficientes de 5-LO apresentaram uma taxa de mortalidade 40% maior que os animais selvagens em infecção por *K.pneumoniae*. O aumento da suscetibilidade destes animais deficientes parece estar associado à diminuição da fagocitose e da atividade microbida. Em modelos murinos de infecções peritoneais, inibidores farmacológicos de síntese de leucotrienos, *in vivo*, prejudicaram a eliminação de *Escherichia coli* (MALAVIYA, 2000).

Foi demonstrado que a injeção intravenosa do LTB₄ reduziu a carga viral e aumentou a sobrevivência de ratos com citomegalovírus, enquanto ratos deficientes de 5-LO ou tratados com antagonista de receptor para LTB₄ apresentaram aumento da carga viral quando comparados com os ratos selvagens ou não tratados, indicando que o LTB₄ aumenta atividade anti-viral *in vivo* (GOSSELIN *et al*, 2005).

SERHAN e colaboradores (1982b) demonstraram que o LTB₄ aumenta a secreção de grânulos em neutrófilos. Além disso, este leucotrieno foi capaz de aumentar a produção de óxido nítrico sintase (SEREZANI *et al*, 2006; TALVANI *et al*, 2002) e de α -defensinas por neutrófilos (FLAMAND *et al*, 2004), além de aumentar a produção de reativos intermediários do oxigênio por ativar o complexo NADPH oxidase (SEREZANI *et al*, 2005; DEWALD, 1985; LARFARS *et al*, 1999). Foi demonstrado também que os cisteinil leucotrienos e o LTB₄ administrados aos macrófagos e neutrófilos aumentaram a geração de óxido nítrico por estas células (LARFARS *et al*, 1999, HUBBARD *et al*, 1995; TALVANI *et al*, 2002; SEREZANI *et al*, 2006).

1.5 – Papel dos leucotrienos nas vias de sinalização acionadas durante a fagocitose

As vias de sinalização ativadas por receptores $Fc\gamma$ e por receptores para leucotrienos em macrófagos alveolares convergem e amplificam os sinais individuais, resultando tanto no aumento da fagocitose como da atividade microbida induzidas pela ingestão de alvos opsonizados por IgG (PETERS GOLDEN *et al*, 2005).

Após ligar-se ao receptor BLT_1 , o LTB_4 ativa várias cascatas de transdução de sinais que levam a mobilização dos estoques de cálcio (SERHAN *et al*, 1982), ativação de PKC e MAPK (O'FLAHERTY *et al*, 1990a; O'FLAHERTY *et al*, 1990b). Destes efeitos resultam diversas respostas dos macrófagos, incluindo aumento da fagocitose via receptor $Fc\gamma R$ (MANCUSO *et al*, 2000). Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais os leucotrienos aumentam a fagocitose são pouco conhecidos. Sabe-se que a adição tanto do LTB_4 quanto do LTD_4 aos macrófagos fagocitando alvos opsonizados com IgG, aumenta a fagocitose via ativação da PKC, mas apenas o LTB_4 potencializa a fagocitose por aumentar a fosforilação da tirosina quinase syk, um evento que acontece logo após a ligação do receptor $Fc\gamma$ (CANETTI *et al*, 2003).

SEREZANI e colaboradores (2005) relataram que a adição de LTB_4 aumentou a atividade microbida em macrófagos alveolares infectados por *K.pneumoniae* de modo dependente da PKC δ e subsequente ativação da NADPH oxidase.

Recentemente, PERES e colaboradores (2007) mostraram que o efeito do BLT_1 na atividade microbida de macrófagos alveolares foi dependente da ativação da proteína Gi e Gq, enquanto o efeito do $CysLT_1$ foi exclusivamente desencadeado pela ativação de Gq.

Um melhor conhecimento das vias de sinalização envolvidas na interação de macrófagos alveolares com patógenos é relevante, pois pode propiciar o desenvolvimento de alvos específicos e refinados no controle e tratamento de infecções pulmonares.

2 - OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Ampliar o conhecimento das vias de sinalização acionadas pelos leucotrienos, responsáveis pela potencialização da fagocitose via receptor Fcγ por macrófagos alveolares.
- b) Avaliar o envolvimento dos leucotrienos na fagocitose via receptor manose (*C.albicans*) por macrófagos alveolares e as vias de sinalização envolvidas nos efeitos observados.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, de 8 a 12 semanas de vida, livres de patógenos, obtidos do Biotério Central (ICB I) da Universidade de São Paulo (USP-SP). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com controle de temperatura (23 +/- 2°C) e tiveram livre acesso à água e alimento.

3.2 - Isolamento de macrófagos alveolares e cultivo

Os macrófagos alveolares residentes foram obtidos por lavagem do pulmão de ratos. A suspensão de células em PBS, resultante do lavado, foi centrifugada a 1500 rpm por 12 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspensão em meio RPMI (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA - USA) e o número de células foi determinado em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas de acordo com cada ensaio por 1 hora a 37°C em 5% de CO₂. As células não aderentes foram removidas e as que ficaram aderidas foram cultivadas em meio RPMI acrescido de soro fetal bovino a 2% (HyClone, Logan, UT-USA).

3.3 - Fagocitose de Hemácias opsonizadas

- Opsonização de hemácias de carneiro

Hemácias de carneiro (sRBC) – doação do Sancet Laboratório Médico – Mogi das Cruzes – SP, foram lavadas duas vezes com PBS gelado, centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos. Após contagem em câmara de Neubauer, em torno de 10⁹ de hemácias foram opsonizadas com concentração subaglutinante de IgG anti-sRBC produzido em coelho (Cappel Organon

Teknika, Durham) por 30 minutos a 37°C; mantidas 15 minutos no gelo e armazenadas a 4°C por até duas semanas.

- Determinação do índice fagocítico

Os macrófagos alveolares (10^5 /poço) foram plaqueados e cultivados em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro a 37°C em 5% de CO₂ até o dia seguinte. Os macrófagos alveolares foram então lavados com PBS pré-aquecido, seguido da adição ou não de inibidores de moléculas sinalizadoras como descrito abaixo, por 20 minutos, seguido da adição de LTB₄ ou LTD₄ (ambos 100nM) por 10 minutos. Após a incubação, o sobrenadante foi desprezado e as hemácias opsonizadas ou não opsonizadas (controle de internalização) foram adicionadas a uma proporção de 30:1 e incubadas com os macrófagos alveolares por 90 minutos a 37°C em 5% de CO₂ em PBS. Esta concentração foi estabelecida após a padronização da proporção de hemácias por macrófagos alveolares. Os inibidores adicionados aos macrófagos alveolares estão listados abaixo.

Para avaliar o envolvimento dos leucotrienos endógenos na fagocitose de alvos opsonizados, antagonistas de receptores ou inibidores de síntese de leucotrienos foram adicionados aos macrófagos alveolares 20 minutos antes da adição das hemácias opsonizadas como descrito acima. Os inibidores adicionados aos macrófagos alveolares estão listados abaixo.

As lamínulas foram então lavadas três vezes com PBS pré-aquecido para remoção de hemácias não fagocitadas e coradas com corante de Giemsa (Newprov, Brasil). As lamínulas foram mantidas por 5 segundos em cada um dos corantes e lavadas em água corrente. Em seguida, as lamínulas foram deixadas para secar à temperatura ambiente e fixadas com Entellan (Merck, Alemanha). Posteriormente, foram analisadas em microscópio óptico comum

(1000x). O índice de fagocitose foi calculado multiplicando-se a quantidade de macrófagos contendo hemácias, pelo número médio de hemácias internalizadas por estas células (ODA *et al*, 1983). Em seguida esses valores foram transformados em porcentagem.

$$\text{IF} = \text{n}^\circ \text{ AM que fagocitaram} \times \text{partículas internalizadas}$$

3.4 - Cultivo da *Candida albicans*

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

O cultivo em lâmina com ágar-batata foi mantido a temperatura ambiente e após 48 horas observou-se microscopicamente a presença de clamidoconídios, esféricos, com parede celular espessa nas extremidades das pseudo-hifas. O estágio inicial da formação da hifa pelo blastoconídio é denominado tubo germinativo. O clamidoconídio e o tubo germinativo são estruturas formadas apenas pela espécie *C.albicans*, auxiliando de maneira significativa na identificação deste fungo (LACAZ *et al*, 2002).

As amostras de levedura obtidas no cultivo foram também identificadas por provas de assimilação e fermentação dos carboidratos, tais como: Zimograma (fermentação de açúcares) – *C.albicans* fermentou glicose, maltose, sacarose e galactose com produção de gás e

Auxanograma (assimilação de açúcares) – *C.albicans* sobreviveu nos meios contendo glicose, maltose e sacarose.

3.5 - Fagocitose de *C.albicans*

Os macrófagos alveolares (10^5 /poço) foram plaqueados e cultivados em lamínulas, da mesma forma como descrito para o ensaio de fagocitose de hemácias opsonizadas. A adição de LTB₄ ou LTD₄ foi realizada em diferentes concentrações para padronização da dose capaz de aumentar a fagocitose deste fungo. As concentrações de leucotrienos utilizadas foram: 1nM, 10nM, 100nM e 1 μ M. Após estímulo, os macrófagos alveolares foram incubados por 10 minutos a 37°C em 5% de CO₂. A suspensão de *C.albicans* foi preparada em 15mL de PBS, adicionada em uma proporção de 30 leveduras para cada macrófago e mantidas a 37°C em 5% de CO₂ por 1 hora (essa proporção *C.albicans*:macrófago alveolar foi considerada ótima em experimentos preliminares - dados não mostrados). Em seguida, a placa foi lavada com PBS por 3 vezes. As lamínulas foram coradas com corante de Leishman. As lamínulas foram mantidas por 2 minutos no corante Leishman e por 2 minutos em água tamponada e Leishman (proporção 1:1 - água tamponada:Leishman). Em seguida, foram lavadas em água corrente, deixadas para secar à temperatura ambiente e fixadas com Entellan (Merck, Alemanha). Posteriormente, as lamínulas foram analisadas em microscópio óptico comum (1000x). O índice de fagocitose foi calculado multiplicando-se a quantidade de macrófagos contendo leveduras, pelo número médio de *C.albicans* internalizadas por essas células. Os valores também foram transformados em porcentagem como descrito no item 3.3.3.

Para verificar a importância do receptor manose na fagocitose de *C.albicans*, cerca de 2×10^5 macrófagos alveolares foram plaqueados e incubados com 10 μ g/mL de citocalasina D (controle da internalização do fungo), manana, anti-receptor de manose por 1 hora. A seguir,

foram adicionados 100nM de LTB₄ ou LTD₄ por 5 minutos e 1:1 *C.albicans* foram adicionadas por 90 min. A seguir foi adicionado o mesmo volume de Azul de tripan (1 mg/mL) para quelar a fluorescência das *C.albicans* não ingeridas.

Para avaliar o envolvimento dos leucotrienos endógenos na fagocitose de *C.albicans*, antagonistas de receptores ou inibidores de síntese de leucotrienos foram adicionados aos macrófagos alveolares 20 minutos antes da adição das leveduras como descrito acima. Os inibidores adicionados aos macrófagos alveolares estão listados abaixo.

Para avaliar as vias de sinalização envolvidas na fagocitose via receptor manose em macrófagos alveolares estimulados por leucotrienos, estas células foram cultivadas como descrito anteriormente. Vinte minutos antes da adição dos leucotrienos, foram adicionados ou não inibidores específicos das vias de sinalização intracelular, como descrito abaixo. Os LTB₄ e LTD₄ foram então adicionados na concentração de 100nM – melhor concentração previamente determinada, capaz de aumentar a fagocitose, e as células incubadas por 10 minutos a 37°C em 5% de CO₂. A suspensão de *C.albicans* foi preparada como descrito anteriormente e adicionada às células na proporção de 30 leveduras de *C.albicans* para cada macrófago, mantidas a 37°C em 5% de CO₂ por 1 hora. Em seguida, a placa foi lavada 3 vezes com PBS. As lamínulas foram coradas com corante de Leishman e o índice fagocítico determinado como descrito anteriormente. Os inibidores adicionados aos macrófagos alveolares estão listados abaixo. Os inibidores adicionados aos macrófagos alveolares estão listados abaixo.

- Inibidores de quinases:

As doses dos inibidores foram determinadas baseadas em experimentos preliminares ou de trabalhos anteriores do Laboratório.

AACOCF3 (10 μ M): inibidor da cPLA₂.

Pirrolidina (100nM): inibidor da cPLA₂.

SB20190 (10 μ M): inibidor da p38MAPK.

PD98059 (2 μ M): inibidor da ERK 1/2.

LY290042 (10 μ M): inibidor da PI3K.

WORTMANNIN (10nM): inibidor da PI3K.

Ro-32-0432 (9nM): inibidor da PKC α .

Rottlerin (6 μ M): inibidor da PKC δ .

Inibidores da síntese ou ação dos Leucotrienos:

AA 861 (10 μ M) inibidor da 5-LO.

CP 105,696 (10 μ M) antagonista do BLT₁.

MK 571 (10 μ M) antagonista do CysLT₁.

MK886 (1 μ M) inibidor da FLAP.

3.6 - Dosagem de LTB₄

Os macrófagos alveolares (2 x 10⁵/poço) foram cultivados como descrito no item 3.2. As leveduras de *C.albicans* foram adicionadas na proporção de 1:1 (*C.albicans*:macrófagos alveolares) por diferentes períodos de tempo. A seguir, os sobrenadantes foram colhidos e a dosagem do LTB₄ foi determinada como descrito pelo fabricante (Cayman Chem, Ann Arbor, MI).

3.7 - Western Blotting e immunoblotting

Cerca de 3×10^5 macrófagos alveolares foram cultivados em placas de 6 poços. No dia seguinte, as células foram estimuladas com 100nM de LTB₄ e LTD₄ por 10 minutos para avaliar a fosforilação das quinases estudadas. Em seguida, as células foram colhidas por raspagem e sonicadas em tampão de lise gelado, contendo 150mM de Tris-HCl (pH 8.0), 100mM de NaCl, 1mM de *sodium orthovanadate*, 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 50mM de fluoreto de sódio e 1µg/mL de leucopeptina. A concentração de proteínas foi determinada utilizando o kit *Coomassie dye-binding assay* (Pierce Chemical Co. Rockford, IL - EUA). As amostras contendo aproximadamente 20µg de proteínas foram separadas por gel de poliacrilamida (SDS-*polyacrylamide gel electrophoresis* – PAGE 10%) e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Após a transferência, foram sondadas com anticorpos primários contra a proteína de interesse ou com anticorpos fosfo-específicos. As membranas foram então marcadas com anticorpo secundário apropriado, conjugado a peroxidase e as bandas foram visualizadas utilizando ECL (*enhanced chimiluminescence* - ECL; Amersham, Arlington Heights, IL - USA).

3.8 - Análise dos dados e estatística

Os dados foram representados como a média $\pm$ SEM e analisados com o programa de estatística *Prism 4.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA – USA). As comparações entre dois grupos experimentais foram realizadas com o teste *t-Student*. Comparações entre ≥ 3 grupos experimentais foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) seguido da análise por Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0.05$. Todos os experimentos foram realizados em dias diferentes, por pelo menos 3 vezes.

4 - RESULTADOS

4.1 – Fagocitose via receptor Fc γ

4.1.1 – Participação de leucotrienos endógenos e vias de sinalização envolvidas.

Para confirmar o papel dos leucotrienos endógenos na fagocitose via receptor Fc γ e avaliar que vias de sinalização estão envolvidas, foram utilizados inibidores da 5-LO (AA 861), para impedir a formação dos leucotrienos; antagonista do receptor BLT $_1$ (CP 105,696) para impedir a ação do LTB $_4$ e um antagonista do CysLT $_1$ (MK 571) para impedir a ação de LTD $_4$.

A inibição da síntese dos leucotrienos com AA 861, diminuiu significativamente a fagocitose de hemácias opsonizadas (em torno de 70%). Da mesma forma, os antagonistas de BLT $_1$ e de CysLT $_1$ também diminuíram significativamente a fagocitose (em torno de 40% e 30% respectivamente) (Figura 1). Isto mostra que durante a fagocitose via Fc γ R, os leucotrienos produzidos pelos macrófagos alveolares contribuem para a fagocitose. A inibição da síntese de leucotrienos pelo composto AA 861, resultou em uma inibição mais efetiva da fagocitose que os antagonistas de LTB $_4$ e LTD $_4$ utilizados sozinhos, demonstrando o sinergismo destes dois leucotrienos.

Em seguida, estudamos as vias de sinalização ativadas na ingestão dos alvos opsonizados com IgG. Quando a biossíntese de leucotrienos foi abolida por AA-861, a fosforilação da PKC α e δ , ERK1/2 e Akt foi inibida, sugerindo que leucotrienos produzidos endogenamente desempenham um papel importante na ativação dessas vias de sinalização durante o engajamento do receptor Fc γ . O antagonista seletivo do receptor BLT $_1$ (CP 105,696) inibiu a fosforilação da PKC α , ERK1/2 e Akt, mas não afetou a ativação da PKC δ , enquanto o antagonista específico do CysLT $_1$ (MK 571) foi capaz de abolir a fosforilação da PKC δ , p38 e Akt (Figura 2).

Em conjunto, esses dados confirmam que o estímulo dos macrófagos alveolares via $\text{Fc}\gamma\text{R}$ leva a geração de LTB_4 e cisteinil leucotrienos. Durante o processo, foram ativadas várias quinases sendo que a ativação da $\text{PKC}\alpha$, ERK1/2 e Akt foram dependentes do LTB_4 e a $\text{PKC}\delta$, p38 e Akt dependentes dos cisteinil leucotrienos.

Figura 1: Importância dos leucotrienos endógenos na fagocitose via Fc γ R. Macrófagos alveolares foram incubados com antagonista de BLT₁ (CP 105,696), antagonista de CysLT₁ (MK 571) e inibidor de síntese de leucotrienos (AA 861). Após 20 minutos, hemácias opsonizadas foram adicionadas às células em uma proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos). O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos “Materiais e Métodos”. Os resultados representam a média $\pm$ SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo, de um total de cinco. * $p < 0,05$ versus controle.

Figura 2: Participação dos leucotrienos endógenos na ativação das vias de sinalização intracelular durante a fagocitose via FcγR. Macrófagos alveolares foram tratados com inibidores de síntese de leucotrienos e antagonistas de seus receptores como descrito em cada ensaio e em seguida estimulados por hemácias opsonizadas em uma proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos). As células foram colhidas por raspagem e sonicadas em tampão de lise gelado. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram então sondadas com anticorpo primário e secundário apropriados. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

4.1.2 – Efeito da adição de leucotrienos na fagocitose.

Para padronizar a melhor dose de leucotrieno capaz de aumentar a fagocitose de hemácias opsonizadas via Fc γ R foram realizados ensaios de dose resposta. O LTB₄ (Figura 3 A e 4) e o LTD₄ (Figura 3 B e 4) foram adicionados aos macrófagos alveolares nas concentrações de 1nM, 10nM, 100nM e 1 μ M. Foi observado um aumento significativo da fagocitose nas concentrações de 10 e 100nM para ambos os leucotrienos, confirmando os achados já descritos na literatura (MANCUSO *et al*, 1998; MANCUSO *et al*, 2001). Como o pico da resposta foi observado com 100nM de LTB₄ e LTD₄, causando um aumento de aproximadamente 450% na fagocitose. Essa dose foi utilizada nos experimentos subseqüentes.

Figura 3: Dose-Resposta ao LTB₄ (A) e LTD₄ (B) na fagocitose via FcγR. Macrófagos alveolares foram estimulados por LTB₄ (A) e LTD₄ (B) nas concentrações de 1nM, 10nM, 100nM e 1µM por 10 minutos e em seguida incubados com hemácias opsonizadas com IgG na proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos). O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos “Materiais e Métodos”. Os resultados representam a média ± SEM de valores em triplicata de um experimento representativo, de um total de três. * p<0,05 tratado versus controle.

Índice de Fagocitose (% sobre o controle)

100%	460%	397%
------	------	------

Figura 4: Ilustração do aumento da fagocitose de hemácias opsonizadas por macrófagos alveolares estimulados por leucotrienos. Macrófagos alveolares tratados com LTB₄ e LTD₄ ambos na concentração de 100nM por 10 minutos e posteriormente incubados com hemácias de carneiro opsonizadas numa proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos) aumento de 1000x. O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos".

4.1.3 - Isoformas da PKC envolvidas na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.

Sabe-se que o tratamento de macrófagos alveolares com inibidores da atividade da PKC bloqueia a capacidade tanto do LTB₄ como do LTD₄ em amplificar a fagocitose (MANCUSO *et al*, 2000). Entretanto, não está esclarecido qual a isoforma de PKC é responsável por este fenômeno. Inicialmente, foi avaliada a importância das PKC α e δ , pois sabe-se que tanto os leucotrienos como a ativação de receptores Fc γ são capazes de ativar essas enzimas, que são as mais abundantes em macrófagos alveolares (MONICK *et al*, 1998, PETERS-GOLDEN *et al*, 1991).

Para isso, os macrófagos alveolares foram pré-tratados com inibidores específicos para PKC α (Ro-32-0432, 9nM) e PKC δ (Rottlerin, 6 μ M) antes da adição dos leucotrienos. A inibição da PKC α aboliu e a da PKC δ inibiu parcialmente o aumento da fagocitose induzido pelo LTB₄ (aproximadamente 350% e 150% de inibição, respectivamente). Por outro lado, o tratamento com inibidor da PKC δ inibiu a potencialização da fagocitose pelo LTD₄ (em torno de 350% de inibição), mas não pelo LTB₄ (Figura 5 A e B). Esses resultados mostram que o efeito potencializador da fagocitose via Fc γ R induzido pelo LTB₄ é mediado por PKC α > PKC δ , enquanto o efeito do LTD₄ é devido apenas a PKC δ .

Em seguida, avaliamos se a adição de leucotrienos afeta os sinais gerados pelos receptores Fc γ . Nossos resultados mostram que o pré-tratamento dos macrófagos alveolares tanto com LTB₄ como LTD₄ aumentam a fosforilação tanto da PKC α como PKC δ durante o período necessário para ingestão dos alvos opsonizados (Figura 6).

Apesar das duas PKC terem sido ativadas por ambos leucotrienos em 90 minutos, resultados preliminares da cinética de ativação das vias acionadas por leucotrienos sobre as

acionadas pela fagocitose via $\text{Fc}\gamma\text{R}$ mostram diferentes tempos de ativação para essas vias. Observou-se que o LTB_4 amplificou a ativação da $\text{PKC}\alpha$ 15 minutos após o estímulo com alvos opsonizados por IgG. Do mesmo modo, os efeitos do LTD_4 na $\text{PKC}\delta$ ocorreram nos períodos iniciais, importantes na ingestão das partículas (5 minutos) (dados não mostrados).

Além disso, o fato das diferentes classes de leucotrienos ativarem distintas PKC sugere que outras moléculas podem ser ativadas e/ou auxiliam no aumento da fagocitose induzidos por LTB_4 ou LTD_4 “downstream”.

Em relação aos efeitos dessas PKC na modulação da fagocitose basal, nossos resultados mostraram que tanto a inibição farmacológica, como o tratamento dos macrófagos alveolares com os anticorpos bloqueadores, não alteraram a fagocitose via $\text{Fc}\gamma\text{R}$ (dados não mostrados).

Figura 5: Importância da PKC α e δ na fagocitose via Fc γ R por macrófagos alveolares estimulados com leucotrienos. Macrófagos alveolares foram tratados com inibidor da PKC α (Ro-32-0432, 9nM) ou inibidor da PKC δ (Rottlerin, 6 μ M) e com LTB₄ (100nM) (A) e LTD₄ (100nM) (B) e posteriormente incubados com hemácias de carneiro opsonizadas numa proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos). O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos". Os resultados representam a média $\pm$ SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo, de um total de cinco. * $p < 0,05$ versus controle e # $p < 0,05$ versus LTB₄ e LTD₄.

Figura 6: Ativação da PKC α e PKC δ . Macrófagos alveolares foram estimulados por LTB₄ e LTD₄ (ambos 100nM) e incubados com hemácias opsonizadas com IgG na proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos) por 90 minutos. As células foram colhidas por raspagem e sonicadas em tampão de lise gelado. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram então marcadas com anticorpo primário e secundário apropriados. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

4.1.4 - Envolvimento das MAPK na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.

Após verificar as subclasses de PKC envolvidas no aumento da fagocitose mediado por LTB₄ e LTD₄, decidiu-se observar quais MAPK estariam participando deste processo, pois tem sido demonstrado que esta via é ativada pela ligação dos receptores Fcγ e Fcε (ROSE *et al*, 1997; TROTTA *et al*, 1996).

A primeira abordagem foi estudar a participação da ERK 1/2 no aumento da fagocitose via FcγR em macrófagos alveolares estimulados pelos leucotrienos. Os resultados mostram que a inibição da ERK 1/2 impediu os efeitos do LTB₄, mas não do LTD₄ no aumento da fagocitose (Figura 7 A). Por outro lado, o aumento da fagocitose desencadeado pelo LTD₄, mas não pelo LTB₄ foi dependente da p38, pois a inibição desta via pelo SB20190 levou a diminuição significativa da fagocitose (Figura 7 B).

A seguir realizamos experimentos de *Western blotting*, utilizando anticorpos que reconhecem resíduos fosforilados da ERK 1/2 e p38. Nossos resultados mostram que a adição tanto de LTB₄ como LTD₄ aumentou a ativação da ERK 1/2 e p38 após 90 minutos (Figura 8). Entretanto, na fagocitose via FcγR, o LTB₄ agiu via ERK 1/2, enquanto o LTD₄ via p38.

Para avaliar o período de tempo em que ERK 1/2 e p38 são ativadas respectivamente por LTB₄ e LTD₄ durante a ingestão de hemácias opsonizadas, realizou-se um estudo de cinética de ativação. Observou-se que a ERK 1/2 foi fosforilada 5 minutos após a adição do LTB₄ e FcγR. Por outro lado, a p38 foi fosforilada entre 2,5 e 5 minutos após a adição de LTD₄ aos macrófagos alveolares fagocitando hemácias opsonizadas (dados não mostrados). Esses resultados sugerem que essas moléculas são ativadas durante a formação do copo fagocítico e conseqüente ingestão.

Em relação aos efeitos dessas MAPK na modulação da fagocitose basal, nossos resultados mostram que tanto a inibição farmacológica, como os tratamentos dos macrófagos alveolares com os anticorpos bloqueadores não alteraram a fagocitose via $\text{Fc}\gamma\text{R}$ (dados não mostrados).

Figura 7: MAPK na fagocitose via FcγR por macrófagos alveolares estimulados com leucotrienos. Macrófagos alveolares foram tratados com inibidor da ERK 1/2 (PD98059, 2µM) ou com inibidor da p38 (SB20190, 10µM) e com LTB₄ (100nM) (**A**) e LTD₄ (100nM) (**B**) e posteriormente incubados com hemácias de carneiro opsonizadas numa proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos). O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos". Os resultados representam a média ± SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo, de um total de cinco. * p<0,05 versus controle e # p<0,05 versus LTB₄ e LTD₄.

Figura 8: Ativação da ERK 1/2 e p38. Macrófagos alveolares foram estimulados por LTB₄ e LTD₄ (ambos 100nM) e incubados com hemácias opsonizadas com IgG na proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos) por 90 minutos. As células foram colhidas por raspagem e sonicadas em tampão de lise gelado. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram então marcadas com anticorpo primário e secundário apropriados. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

4.1.5 - Envolvimento da PI3K na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.

Sabe-se que na fagocitose mediada pelo receptor $Fc\gamma$, a PI3K é essencial para internalização de partículas de mais de 2 μm (ARAKI *et al*, 1996) e importante para a extensão de pseudópodes, um evento necessário para fagocitose de partículas (COX *et al*, 1999). Além disso, foi demonstrado que a PI3K ativa a PKC δ em células d-HL 60 e ativa o componente da NADPH oxidase, p47phox (YAMAMORI *et al*, 2004).

Desta forma, decidimos avaliar se a PI3K está envolvida no aumento da fagocitose de macrófagos alveolares estimulados por leucotrienos. Verificou-se que após a inibição da PI3K (LY290042 e Wortmannin), tanto o LTB $_4$ (Figura 9 A) quanto o LTD $_4$ (Figura 9 B) tiveram seus efeitos praticamente abolidos, confirmando a importância desta molécula sinalizadora na potencialização da fagocitose pelos leucotrienos. Além disso, vale ressaltar que a inibição da PI3K inibiu a ingestão de alvos opsonizados por IgG em macrófagos alveolares não estimulados. Desde modo, como ambos os leucotrienos não foram capazes de aumentar a fagocitose na ausência da PI3K, nossos resultados sugerem que PI3K é essencial nos efeitos dos leucotrienos. Além disso, nossos resultados sugerem que as vias de sinalização induzidas por LTB $_4$ e LTD $_4$ convergem e tem a PI3K como elemento central.

Apesar da PI3K ter sido ativada por leucotrienos em 90 minutos, confirmando a existência de sinergismo entre os receptores para leucotrienos e o receptor $Fc\gamma$ (Figura 10), decidiu-se também avaliar a cinética de ativação da PI3K durante estimulação por leucotrienos de macrófagos alveolares fagocitando hemácias opsonizadas. Dados preliminares mostraram que esta via é ativada por LTB $_4$ em 2,5 minutos e por LTD $_4$ em 15 minutos após adição de leucotrienos e hemácias opsonizadas (dados não mostrados). Os ensaios foram realizados utilizando anticorpos anti-Akt, já que esta molécula é alvo da PI3K e caracteriza sua

fosforilação. De modo geral, nossos resultados indicam que a PI3K é uma das primeiras vias ativadas em macrófagos alveolares principalmente quando da estimulação simultânea dos receptores Fcγ e BLT₁.

Figura 9: PI3K no aumento da fagocitose via Fc γ R por macrófagos alveolares estimulados com leucotrienos. Macrófagos alveolares foram tratados com inibidores da PI3K (LY290042, 10 μ M e Wortmannin, 10nM) e com LTB₄ (100nM) (A) e LTD₄ (100nM) (B) e posteriormente incubados com hemácias de carneiro opsonizadas numa proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos). O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos". Os resultados representam a média $\pm$ SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo de um total de cinco. * $p < 0,05$ versus controle e # $p < 0,05$ versus LTB₄ e LTD₄.

Figura 10: Ativação da PI3K. Macrófagos alveolares foram estimulados por LTB₄ e LTD₄ (ambos 100nM) e incubados com hemácias opsonizadas por IgG na proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos) por 90 minutos. As células foram colhidas por raspagem e sonicadas em tampão de lise gelado. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram então marcadas com anticorpo primário e secundário apropriados. Experimento representativo de 3 experimentos independentes.

4.1.6 – Envolvimento da cPLA₂ na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.

Os efeitos dos leucotrienos na fagocitose poderiam ser devido ao aumento da atividade da cPLA₂ e conseqüentemente liberação de AA. Além disso, foi demonstrado que o AA é um importante segundo mensageiro envolvido na fagocitose via FcγR em monócitos humanos (KARIMI, 1995; LENNARTZ, 1991). Por isso, resolveu-se avaliar o papel da cPLA₂ utilizando o inibidor AACOCF₃.

Foi observado que esta molécula não possui papel significativo na fagocitose via FcγR, já que a sua inibição não alterou o aumento na fagocitose mediado pelos leucotrienos (Figura 11 A e B). Foi utilizado ainda, um outro inibidor da cPLA₂, mais seletivo e mais potente que o AACOCF₃, a pirrolidina na concentração de 100nM, que também não alterou a influência dos leucotrienos na fagocitose.

Figura 11: Importância da cPLA₂ na fagocitose via FcγR por macrófagos alveolares estimulados com leucotrienos. Macrófagos alveolares foram tratados com inibidor da cPLA₂ (AACOCF3, 10µM e Pirrolidina, 100nM) e com LTB₄ (100nM) (A) e LTD₄ (100nM) (B) e posteriormente incubados com hemácias de carneiro opsonizadas numa proporção de 30:1 (hemácias:macrófagos). O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos". Os resultados representam a média ± SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo de um total de cinco. * p<0,05 versus controle.

4.2 – Fagocitose via receptor manose

4.2.1 – Produção de LTB₄ durante fagocitose de *C.albicans*.

Uma vez demonstrado que os leucotrienos amplificam a sinalização dos macrófagos alveolares que levam ao aumento na fagocitose via FcγR, avaliamos se os leucotrienos também estariam envolvidos na ingestão de patógenos via outros receptores fagocíticos que reconhecem padrões moleculares de patógenos. Um dos receptores envolvidos no reconhecimento desses padrões é o receptor para manose. Para isso, infectamos os macrófagos alveolares com o fungo *C.albicans*, que é reconhecido por uma série de receptores, incluindo o receptor manose e determinamos se a infecção por este fungo induz a liberação de LTB₄ (o principal produto da 5-LO produzido por macrófagos alveolares de ratos).

Os macrófagos alveolares foram incubados com *C.albicans* por diferentes períodos de tempo (30, 60, 90 e 120 minutos). Os resultados mostram que houve um aumento significativo na produção do LTB₄ por macrófagos alveolares estimulados pela *C.albicans*. Esse aumento ocorreu gradativamente de acordo com os tempos de incubação (Figura 12). Interessantemente, a rápida produção de LTB₄ (30 minutos) sugere que esse mediador poderia estar envolvido na ingestão de *C.albicans*.

Figura 12: Produção do LTB₄ por macrófagos alveolares durante fagocitose de *C.albicans*. Macrófagos alveolares foram incubados com *C.albicans* na proporção de uma levedura para cada macrófago. O LTB₄ foi dosado como descrito nos "Materiais e Métodos". Os resultados representam a média $\pm$ SEM de valores em quintuplicata de um experimento. * $p < 0,05$ versus controle.

4.2.2 – Participação de leucotrienos endógenos na fagocitose de *C. albicans*.

Com o objetivo de avaliar a importância dos leucotrienos endógenos na fagocitose de *C.albicans*, os macrófagos alveolares foram tratados com o inibidor da 5-LO (AA-861 - 10 μ M); inibidor da FLAP (MK886 - 1 μ M); antagonista do BLT₁ (CP 105,696 - 10 μ M) e antagonista do CysLT₁ (MK 571 - 10 μ M).

A inibição da síntese dos leucotrienos e a inibição da FLAP, resultou em uma diminuição significativa na fagocitose de *C.albicans*. O tratamento dos macrófagos alveolares com os antagonistas de BLT₁ e CysLT₁ diminuiu a fagocitose em 50% e 60%, respectivamente. Este resultado demonstra que tanto o LTB₄ como os cisteinil leucotrienos produzidos durante a infecção por *C.albicans* são importantes componentes envolvidos na ingestão deste fungo (Figura 13).

Figura 13: Importância dos leucotrienos endógenos na fagocitose de *C.albicans*. Macrófagos alveolares foram incubados com antagonista de BLT₁ (CP 105.696), antagonista de CysLT₁ (MK 571), inibidor de síntese de 5-LO (AA 861) e inibidor da FLAP (MK886). Após 20 minutos, as leveduras foram adicionadas às células em uma proporção de 30:1 (*C.albicans*:macrófagos). O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos". Os resultados representam a média ± SEM de valores em triplicata de um experimento representativo, de um total de três. * p<0,05 versus controle.

4.2.3 – Efeito da adição de leucotrienos na fagocitose de *C.albicans*.

Uma vez demonstrado que os leucotrienos produzidos durante a infecção por *C.albicans* são essenciais na fagocitose deste fungo, decidimos avaliar se os leucotrienos adicionados exogenamente também aumentam a fagocitose. Inicialmente, realizamos experimentos de dose resposta com macrófagos alveolares estimulados com LTB₄ ou LTD₄ nas concentrações de 1nM, 10nM, 100nM e 1μM por 10 minutos seguido da adição de *C.albicans* na proporção de 30:1 (*C.albicans*:macrófago alveolar) e mantidos por 90 minutos para a fagocitose. Essa proporção de infecção e o tempo de ingestão foram padronizados em experimentos preliminares (dados não mostrados). Na curva de dose resposta aos leucotrienos, observou-se que a melhor concentração tanto do LTB₄ como do LTD₄ capazes de aumentar em 350% a fagocitose foi de 100nM (Figura 14 A, B e 15). As concentrações de 1nM e de 10nM também aumentaram a fagocitose, entretanto o aumento máximo ocorreu com a concentração de 100nM. Sendo assim, padronizou-se para os ensaios subseqüentes a concentração de 100nM para ambos leucotrienos.

Figura 14: Dose-Resposta aos leucotrienos na fagocitose de *C.albicans*. Macrófagos alveolares foram estimulados por LTB₄ (A) e LTD₄ (B) nas concentrações de 1nM, 10nM, 100nM e 1µM em seguida incubados com leveduras de *C.albicans* na proporção de 30:1 (*C.albicans*:macrófagos). O Índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos". Os resultados representam a média ± SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo, de um total de cinco. * p<0,05 versus controle.

Índice de Fagocitose (% sobre o controle)

100%	438%	412%

Figura 15: Ilustração do aumento da fagocitose de *C.albicans* em macrófagos alveolares estimulados com leucotrienos. Macrófagos alveolares foram tratados com LTB₄ e LTD₄ na concentração de 100nM e incubados por 10 minutos antes da adição da suspensão de *C.albicans* na proporção de 30:1 (*C.albicans*:macrófagos). Aumento de 1000x. O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos".

4.2.4 – Leucotrienos potencializam a fagocitose de *C.albicans* via receptores manose.

Com o objetivo de verificar por qual receptor os macrófagos alveolares ingerem a *C.albicans*, prétratamos as células com diferentes doses de manana para bloquear a ação do receptor manose antes da adição das leveduras. Concentrações crescentes do açúcar manose foram adicionadas a fim de determinar qual a dose capaz de bloquear este receptor. Os resultados mostram que as concentrações de 10, 100 e 1000µg/mL foram capazes de bloquear o receptor manose da mesma maneira causando uma diminuição de aproximadamente 50% na fagocitose deste fungo (Figura 16 A). Assim, nossos dados mostram que apesar do receptor manose ser importante para a ingestão da *C.albicans*, como esperado, outros receptores também estão envolvidos na fagocitose deste fungo.

Para demonstrar qual (is) receptores estariam envolvidos nos efeitos dos leucotrienos na fagocitose de *C.albicans*, os macrófagos alveolares foram prétratados com dose de manana, seguido da adição de 100nM de LTB₄ ou LTD₄. Nossos resultados mostram que o principal receptor envolvido nos efeitos amplificadores dos leucotrienos na ingestão da *C.albicans* é o receptor manose, já que o bloqueio deste receptor com manana resultou em uma diminuição de aproximadamente 75% de fagocitose pelos macrófagos alveolares estimulados pelo LTB₄ e em 60% a menos de fagocitose nas células estimuladas por LTD₄ com o receptor manose bloqueado (Figura 16 B).

Figura 16: LTB₄ e LTD₄ aumentam a fagocitose de *C.albicans* de modo dependente da ativação do receptor manose. (A) Doses crescentes de manana (10, 100 e 1000µg/dL) foram adicionadas aos macrófagos alveolares por 30 minutos antes da adição de *C.albicans* na proporção de uma levedura para cada macrófago alveolar. **(B)** Os macrófagos alveolares foram prétratados com 100ug/mL de manana por 30 minutos, seguido da adição de LTB₄ e LTD₄ por 10 minutos. Em seguida, leveduras de *C.albicans* foram adicionadas às células. O Índice de fagocitose foi determinado como descritor em "Materiais e Métodos". Experimentos representativos de 2 experimentos independentes. * p<0,05 versus controle e # p<0,05 versus LTB₄ e LTD₄ sozinhos.

4.2.5 – Perfil de ativação de moléculas sinalizadoras durante a fagocitose de *C.albicans*.

Nossa próxima abordagem foi investigar as vias de sinalização ativadas durante a ingestão da *C.albicans*. Para isso, os macrófagos alveolares foram estimulados por *C.albicans* durante 5 e 30 minutos e a ativação (fosforilação) das PKC α , δ e Akt foi determinada.

Nossos resultados mostram que a PKC δ é fosforilada nos períodos iniciais da ingestão da *C.albicans* (5 minutos) e esse feito diminui após 30 minutos. Por outro lado, a PKC α não foi fosforilada durante a fagocitose de *C.albicans*, em nenhum período estudado. Em relação à ativação da Akt, nossos resultados mostram que essa quinase é ativada após 5 minutos da infecção e esse efeito aumenta após 30 minutos. Esses resultados sugerem que a PKC δ pode estar envolvida nos efeitos iniciais da ingestão da *C.albicans*, enquanto PI3K estaria envolvida tanto nos eventos iniciais como nos efeitos mais tardios da fagocitose. As vias da ERK1/2 e da p38 não foram fosforiladas pela ativação do receptor manose em nenhum período estudado (dados não mostrados).

De modo geral, estes resultados confirmam os achados relacionados à importância das PKC envolvidas nos efeitos dos leucotrienos na fagocitose via receptor manose.

Figura 17: Perfil de ativação das moléculas sinalizadoras durante a fagocitose de *C.albicans*. Macrófagos alveolares foram estimulados por *C.albicans* na proporção de 1 levedura para cada macrófago por 5 e 30 minutos. As células foram colhidas por raspagem e sonicadas em tampão de lise gelado. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram então marcadas com anticorpo primário e secundário apropriados. Experimento representativo de 2 experimentos independentes.

4.2.6 – Envolvimento das PKC na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.

Com relação ao estudo das vias de sinalização envolvidas na fagocitose, sabe-se que enquanto a fagocitose mediada pelo receptor Fc γ ocorre de modo dependente de syk (CANETTI *et al*, 2003), para a fagocitose via receptor manose, a ativação de syk não é necessária (UNDERHILL *et al*, 2005). Foi demonstrado em macrófagos peritoneais de ratos que a fosforilação da PKC é essencial para a fagocitose de partículas de zymosan e que a ativação da PKC α é necessária para a formação e maturação do fagossomo (ALLEN, 1995).

Uma vez demonstrado que tanto os leucotrienos endógenos, como os exógenos aumentam a fagocitose de *C.albicans*, via receptor manose, decidimos avaliar quais são as vias de sinalização envolvidas nesse processo. As vias de sinalização envolvidas na ingestão de *C.albicans* não são bem conhecidas. Assim, estudamos a importância de moléculas sinalizadoras que estão envolvidas na fagocitose via Fc γ R, tais como, PKC α , PKC δ , ERK 1/2, p38 e PI3K.

Inicialmente avaliamos a importância das PKC α e δ no aumento da fagocitose de *C.albicans* pelos leucotrienos. Os macrófagos alveolares foram tratados com o inibidor de PKC α (Ro-32-0432 - 9nM) ou inibidor de PKC δ (Rottlerin - 6 μ M), seguido da adição dos LTB $_4$ ou LTD $_4$. Nossos resultados mostram que a inibição da PKC δ aboliu os efeitos tanto do LTB $_4$ como do LTD $_4$ de maneira similar (inibição de aproximadamente 300% e 250%, respectivamente). Entretanto, a inibição da PKC α não afetou os efeitos dos LTB $_4$ (Figura 18 A) e LTD $_4$ (Figura 18 B) demonstrando que esta via não parece ser importante para fagocitose via receptor manose. Desta forma, estes resultados indicam que leucotrienos são capazes de ativar essas vias de maneira diferente da observada na fagocitose via receptor Fc γ R.

Figura 18: Isoformas das PKC envolvidas na fagocitose de *C.albicans* por macrófagos alveolares estimulados por leucotrienos. Macrófagos alveolares foram tratados com inibidor da PKC α (Ro-32-0432, 9nM) ou inibidor da PKC δ (Rottlerin, 6 μ M) antes da adição do LTB₄ (100 nM) (A) e do LTD₄ (100 nM) (B). Em seguida os macrófagos alveolares foram incubados com leveduras de *C.albicans* na proporção de 30:1 (*C.albicans*:macrófagos). O índice de fagocitose foi determinado como descrito nos "Materiais e Métodos". Os resultados representam a média $\pm$ SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo de um total de cinco. *p<0,05 versus controle e # p<0,05 versus LTB₄ e LTD₄.

4.2.7 – Envolvimento da PI3K na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.

A ativação da PI3K é necessária para os eventos iniciais da polimerização da actina, extensão dos pseudópodes, formação do copo fagocítico e também do fagossomo (ARAKI *et al*, 1996; COX *et al*, 1999; MARSHALL *et al*, 2001). Sabe-se que PI3K é uma quinase essencial para desencadear a fagocitose por meio de diversos receptores (GARCIA-GARCIA *et al*, 2002b), dentre eles para a fagocitose via FcγR em polimorfonucleares (KANAKARAJ *et al*, 1994).

Sendo assim, decidimos avaliar se a PI3K estaria envolvida nos efeitos dos leucotrienos na fagocitose via receptor manose. Os macrófagos alveolares foram tratados com os inibidores de PI3K (Wortmannin – 10nM e LY290042 – 10μM) seguido da adição dos leucotrienos. Nossos resultados mostram que a inibição da PI3K levou a diminuição de aproximadamente 350% na fagocitose tanto mediada por LTB₄ (Figura 19 A), como por LTD₄ (Figura 19 B), mostrando que a via da PI3K é essencial para o aumento da fagocitose via receptor manose em macrófagos alveolares estimulados por ambos leucotrienos.

Figura 19: PI3K na fagocitose de *C.albicans* em macrófagos alveolares estimulados por leucotrienos. Macrófagos alveolares foram tratados com inibidores da PI3K (Wortmannin – 10nM ou LY290042 – 10μM), antes da adição do LTB₄ (100nM) (A) e do LTD₄ (100nM) (B). Em seguida, foram incubados com leveduras de *C.albicans* na proporção de 30:1 (*C.albicans*:macrófagos). O Índice de fagocitose foi determinado como descrito nos “Materiais e Métodos”. Os resultados representam a média ± SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo de um total de cinco. * p<0,05 versus controle e # p<0,05 versus LTB₄ e LTD₄.

4.2.8 – Envolvimento das MAPK na potencialização da fagocitose promovida por leucotrienos.

Dando continuidade ao estudo das vias de sinalização que poderiam estar envolvidas no aumento da fagocitose via receptor manose em macrófagos alveolares estimulados por leucotrienos, decidiu-se investigar a participação das MAPK (ERK 1/2 e p38). Para isto, os macrófagos alveolares foram tratados com inibidores específicos para estas duas vias, antes da adição de LTB₄ e LTD₄.

Os resultados mostraram que mesmo com a inibição destas vias, ambos leucotrienos foram capazes de aumentar a fagocitose de *C.albicans* via receptor manose. Isto demonstra que tanto LTB₄ quanto LTD₄ não utilizam a via da ERK1/2 nem a da p38 para promover o aumento da fagocitose via este receptor (Figura 20 A e B).

Figura 20: MAPK na fagocitose de *C.albicans* em macrófagos alveolares estimulados por leucotrienos. Macrófagos alveolares foram tratados com inibidores da ERK1/2 (PD98059 - 2µM) e da p38 (SB20190 – 10µM) antes da adição do LTB₄ (100nM) (A) e do LTD₄ (100nM) (B). Em seguida, foram incubados com leveduras de *C.albicans* na proporção de 30:1 (*C.albicans*:macrófagos). O Índice de fagocitose foi determinado como descrito nos “Materiais e Métodos”. Os resultados representam a média ± SEM de valores em quintuplicata de um experimento representativo de um total de cinco. * p<0,05 versus controle e # p<0,05 versus LTB₄ e LTD₄.

5 - DISCUSSÃO

Neste trabalho, ampliamos os estudos sobre mecanismos moleculares pelos quais os leucotrienos aumentam a fagocitose via FcγR e mostramos que o efeito potencializador dos leucotrienos não é restrito a um único receptor, já que a fagocitose via receptor manose também foi amplificada pelos leucotrienos. Essa tese mostra também algumas vias de sinalização relacionadas com este efeito dos leucotrienos: PKC clássica (PKCα) e nova (PKCδ), MAPK (p38 e ERK 1/2) e PI3K. Em relação ao receptor manose, mostramos que a fagocitose de *C.albicans* ativa PKCδ e Akt e que os leucotrienos amplificam esses sinais e assim aumentam a ingestão deste fungo.

Nossos resultados mostraram que os leucotrienos endógenos contribuíram de maneira significativa para o aumento da fagocitose via FcγR, visto que a inibição da síntese destes mediadores ou de sua ação através do bloqueio de seus receptores nos macrófagos alveolares diminuiu o índice de fagocitose. Foi visto ainda que, o antagonista do BLT₁ inibiu a fosforilação de PKCα, ERK1/2 e PI3K, enquanto o antagonista do CysLT₁ inibiu a fosforilação de PKCδ, p38 e PI3K durante a ingestão de alvos opsonizados por IgG. Os LTB₄ e LTD₄ exógenos também foram capazes de aumentar a fagocitose via FcγR agindo por diferentes vias de sinalização intracelular. Enquanto o LTB₄ atuou predominantemente via ERK1/2 e PKCα e com menor intensidade via PKCδ, o LTD₄ aumentou a fagocitose exclusivamente via p38 e PKCδ. Ambos leucotrienos aumentaram a fagocitose de alvos opsonizados por IgG via PI3K. Nossos resultados mostram que apesar dos leucotrienos ativarem todas essas vias de sinalização durante a ingestão de alvos opsonizados por IgG, as quinases envolvidas são seletivamente diferentes para o LTB₄ e o LTD₄.

Com relação à ativação do receptor manose, verificou-se que macrófagos alveolares produzem LTB₄ quando estimulados por *C.albicans* e que os leucotrienos produzidos endogenamente participam de maneira significativa no aumento da fagocitose deste fungo. Da mesma forma que para o receptor Fcγ, LTB₄ e LTD₄ adicionados aos macrófagos alveolares foram capazes de aumentar a fagocitose desse fungo. Interessantemente, demonstramos também que o principal receptor envolvido nos efeitos amplificadores dos leucotrienos na ingestão da *C.albicans* é o receptor manose. Verificamos que o antagonista deste receptor, a manana, não só inibe a fagocitose de *C.albicans*, mas também bloqueia os efeitos do LTB₄ e LTD₄. O fato da manana inibir em aproximadamente 50% a ingestão de *C.albicans*, sugere que outros receptores também estariam envolvidos na fagocitose deste fungo. Entretanto, nossos resultados mostram que os efeitos dos leucotrienos foram completamente inibidos na presença de manana, sugerindo que os efeitos dos leucotrienos são exclusivamente dependentes da ativação deste receptor.

Em relação às vias de sinalização utilizadas durante a fagocitose via receptor manose, parecem ser diferentes daquelas ativadas pelo receptor Fcγ. A potencialização da fagocitose de *C.albicans* promovida tanto pelo LTB₄ quanto pelo LTD₄ foi dependente da PKCδ e PI3K, enquanto PKCα, ERK1/2 e p38 não são necessárias para este efeito dos leucotrienos.

Houve interesse em estudar a *C.albicans*, pois em casos de debilidade do sistema imunológico, este fungo pode infectar mucosas, incluindo os pulmões, resultando na morte de pacientes (LACAZ *et al*, 2002). Apesar de terapias apropriadas, a mortalidade causada pela disseminação sistêmica de *C.albicans* em indivíduos imunocomprometidos é de aproximadamente 30% (WENZEL, 1991). Em indivíduos imunocompetentes, é um fungo que faz parte da microbiota. A resistência do hospedeiro contra a infecção pela *C.albicans* é mediada predominantemente por neutrófilos e macrófagos (GREENFIELD, 1992). Macrófagos

de ratos e de humanos podem se ligar e internalizar este fungo principalmente via receptor manose (KITZ *et al*, 1992; MARODI *et al*, 1991). Tem sido demonstrado que através do reconhecimento via receptor manose, células dendríticas de ratos são capazes de fagocitar e matar leveduras da *C.albicans* (D'OSTIANI *et al*, 2000).

Foi demonstrado que ambos, LTB₄ (via BLT₁) e cisteinil leucotrienos (via CysLT₁) aumentaram a fagocitose de alvos opsonizados tanto por complemento C3 (neutrófilos) (MANCUSO, 2001) como por IgG (neutrófilos e macrófagos) (MANCUSO *et al*, 1998; MANCUSO *et al*, 2001). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos. Estudos prévios estabeleceram que tanto a depleção da PKC pelo tratamento prolongado com PMA, quanto a inibição destas moléculas aboliram o efeito de ambos leucotrienos (LTB₄ e LTC₄) na fagocitose via FcγR. Entretanto, CANETTI e colaboradores (2003), mostraram que a amplificação do efeito de LTB₄, mas não de cisteinil leucotrienos, foi dependente de uma proteína tirosina quinase, denominada syk.

Na mesma linha, PERES e colaboradores (2007), demonstraram que os efeitos dos leucotrienos nas funções efetoras dos macrófagos alveolares, tais como fagocitose e atividade microbicida são dependentes de diferentes proteínas G acopladas ao BLT₁ e CysLT₁. Foi mostrado que o BLT₁ está acoplado tanto à proteína Gi como Gq, enquanto que o CysLT₁ está acoplado apenas à Gq. Devido às diferenças nos padrões de ligação da proteína G, ativação da syk e dependência das PKC nos efeitos das duas classes de leucotrienos, tivemos interesse em estudar as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito dos leucotrienos B₄ e D₄ durante a fagocitose via Fcγ e manose. Devido a grande variedade de sinais induzidos pelas diferentes proteínas G, e como o BLT₁ está acoplado à proteína Gi e Gq, nossa hipótese é que o BLT₁ poderia estar ativando um programa mais complexo e diverso do que a ligação do CysLT₁.

Os leucotrienos são produzidos durante a infecção por vários patógenos, incluindo bactérias, vírus, protozoários e fungos (PETERS-GOLDEN, 2005) e a importância deste mediador na defesa do hospedeiro foi demonstrada primeiramente em macrófagos peritoneais onde LTB₄ e LTC₄ exógenos aumentaram a fagocitose e a eliminação de *Trypanosoma cruzi* (WIRTH, 1985a; WIRTH, 1985b). Além disso, esses dois leucotrienos foram capazes não só de potencializar a fagocitose de *K.pneumoniae* opsonizadas, em macrófagos alveolares (MANCUSO *et al.* 1998) e neutrófilos (BAILIE *et al.* 1996), como também de aumentar a atividade microbida em diferentes tipos de microrganismos tais como *Trypanosoma cruzi* (WIRTH, 1985 a; WIRTH, 1985 b; TALVANI *et al.* 2002), *Toxoplasma gondii* (YONG *et al.* 1994), *Leishmania amazonensis* (SEREZANI *et al.* 2006), *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium* (apenas o LTB₄) (DEMITSU *et al.* 1989 b). A administração exógena do LTB₄, o produto mais abundante da 5-LO nos neutrófilos, aumentou a atividade microbida de neutrófilos para *Mycobacterium bovis* (COFFEY *et al.* 2004) e *Schistosoma mansoni* (MOQBEL *et al.* 1983). Nossos resultados sugerem que o efeito protetor dos leucotrienos nas infecções esteja relacionado ao aumento da fagocitose promovido por estes mediadores. Nós mostramos que este efeito potencializador ocorre tanto na fagocitose via receptor Fcγ como via receptor manose.

De modo geral, nossos resultados sugerem que os leucotrienos são potentes moduladores da imunidade natural, aumentando as funções efetoras de fagócitos contribuindo desse modo para o controle de infecções.

Ampliando os estudos sobre as vias de sinalização utilizadas pelos leucotrienos no aumento da fagocitose de alvos opsonizados, nossa primeira abordagem foi demonstrar o papel específico da PKC clássica (PKCα) e nova (PKCδ). Dentre as isoformas de PKC estudadas, decidimos focar na PKCα e δ, pois (i) tais isoformas são mais abundantes em

macrófagos alveolares; (ii) mais facilmente ativadas do que em outras populações de macrófagos (PETERS-GOLDEN *et al.*, 1991), (iii) ambas isoformas translocam para o copo fagocítico e fagossomo durante a ingestão por alvos opsonizados por IgG ou zymosan; (iv) macrófagos deficientes de PKC α são incapazes de fagocitar alvos opsonizados por IgG; (v) além disso, são ativadas por ambos leucotrienos (LTB₄ e cisteinil leucotrienos) em diferentes tipos celulares (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005). Nossos resultados demonstraram claramente que o aumento da fagocitose via Fc γ R pelo LTB₄ foi dependente principalmente da PKC α , enquanto o LTD₄ agiu exclusivamente via PKC δ . Por outro lado, na fagocitose de *C.albicans* observamos que ambos leucotrienos utilizaram a PKC δ para aumentar a fagocitose deste fungo. De maneira diferente ao observado para o receptor Fc γ , LTB₄ e LTD₄ não utilizaram a PKC α para aumentar a fagocitose via receptor manose.

Nosso grupo demonstrou previamente que o efeito do LTB₄ na ativação da NADPH oxidase e subsequente atividade microbicida foi dependente da PKC δ mas não da PKC α (SEREZANI *et al.*, 2005). Entretanto, as vias de sinalização responsáveis pelos efeitos do LTD₄ na atividade microbicida não são conhecidas. Os diferentes papéis da PKC α e da PKC δ na fagocitose e na atividade microbicida, respectivamente, podem ser explicados pelos diferentes programas intracelulares utilizados nas funções efectoras dos macrófagos alveolares estimulados pelos leucotrienos. Enquanto LTB₄ e cisteinil leucotrienos são igualmente potentes em aumentar a fagocitose de alvos opsonizados por IgG por macrófagos alveolares (MANCUSO *et al.*, 1998), a capacidade em aumentar a fosforilação de motivos ITAM – associados a tirosina quinase syk é limitada ao LTB₄ (CANETTI *et al.*, 2003). Além disso, BLT₁ está ligado tanto a proteína G α i quanto a G α q, enquanto CysLT₁ está ligado apenas a G α q (PERES *et al.*, 2007). Outro motivo para essas diferenças é que o LTB₄ é 100 vezes mais

potente que os cisteinil leucotrienos em aumentar a atividade microbicida e ativação de NADPH oxidase em macrófagos alveolares (SEREZANI *et al*, 2005).

Foi demonstrado em macrófagos peritoneais de ratos que a fosforilação da PKC é essencial para a fagocitose de partículas de zymosan e que a ativação da PKC α é necessária para a formação e maturação do fagossomo (ALLEN, 1995). Nossos resultados mostram que para a fagocitose de *C. albicans* por macrófagos alveolares estimulados por ambos leucotrienos é necessária a ativação da PKC δ . Desta forma podemos sugerir que a fosforilação da PKC δ é necessária nos eventos iniciais do processo de fagocitose de fungos, enquanto a PKC α participa da formação e maturação do fagossomo, o que irá promover a eliminação do microrganismo fagocitado.

Uma das possíveis explicações para as diferentes vias de sinalização acionadas pelo LTB₄ e LTD₄ tanto na potencialização da fagocitose como da atividade microbicida pode ser a localização dos receptores BLT₁ e CysLT₁ nos microdomínios da membrana plasmática denominados *lipid rafts*. São pequenos domínios formados por colesterol e esfingolípideos que podem agir como plataformas de sinalização onde existe uma concentração de receptores, proteínas G, quinases, GTPases entre outras e assim compartimentalizar uma variedade de processos celulares (PIKE, 2006; SIMONS, 2000; BARNETT-NORRIS, 2005).

A importância desses *lipid rafts* na fagocitose de alvos opsonizados por IgG ainda não está claro (NAROENI, 2002). De acordo com SEREZANI e colaboradores (submetido), tanto os receptores BLT₁ como CysLT₁ e Fc γ RI translocam para os *lipid rafts* durante a fagocitose de alvos opsonizados por IgG, e esse microdomínio é necessário para a interação física entre BLT₁ e Fc γ RI. Além disso, a ativação das PKC α e δ em macrófagos alveolares estimulados por LTB₄ ocorre nos *lipid rafts*, enquanto a ativação destas moléculas pelo LTD₄ ocorre fora dos

lipid rafts. Isso poderia explicar as diferentes vias de sinalização acionadas durante o aumento da fagocitose via FcγR nos macrófagos alveolares estimulados por LTB₄ e LTD₄.

Por outro lado SEREZANI e colaboradores (submetido) demonstraram que essa distribuição dos receptores para leucotrienos nos microdomínios *lipid rafts* não foi observada durante a ligação do receptor manose à *C.albicans*, o que pode explicar o fato de ambos leucotrienos utilizarem a mesma via de sinalização, PKCδ, para aumentar a fagocitose deste fungo via receptor manose. Embora pouco se saiba sobre os *lipid rafts* nos macrófagos alveolares ou a localização dos receptores para leucotrienos nesses *lipid rafts*, SITRIN e colaboradores (2006) reportaram que em neutrófilos humanos, o BLT₁ é constitutivamente localizado nos *lipid rafts* e tal localização é importante para induzir a fosforilação de ERK1/2 e a liberação de cálcio.

O envolvimento da ERK1/2 na sinalização via FcγR tem sido estudado em neutrófilos e monócitos humanos (GARCIA, 2002). Entretanto, a importância dessas vias de sinalização na ingestão de alvos opsonizados por IgG por macrófagos alveolares não são conhecidos. A ativação da ERK1/2 e da p38 durante a fagocitose de alvos opsonizados por IgG foi mostrada por vários autores em macrófagos (SUCHARD, 1997; MANSFIELD *et al*, 2000; KARIMI, 1998). Entretanto, em macrófagos alveolares não está bem esclarecido o perfil de ativação destas moléculas. Foi demonstrado por McLEISH e colaboradores (1998) que a ERK1/2 e a p38 são ativadas durante a fagocitose de *S.aureus* opsonizados por IgG, e que a ativação destas vias ocorre em tempos distintos. (KNALL *et al*, 1996; KRUMP *et al*, 1997; RANE *et al*, 1997).

Com relação às vias das MAPK, nossos resultados mostraram que LTB₄ aumenta a fagocitose via FcγR utilizando ERK1/2, enquanto o LTD₄ utiliza a via de p38 para desempenhar esta função. Por outro lado, no aumento da fagocitose de *C.albicans* via receptor manose, nem ERK1/2 nem p38 foram utilizadas. Sabe-se da importância destas moléculas para a fagocitose,

entretanto, esta foi a primeira vez que a ativação destas moléculas foi estudada em macrófagos alveolares estimulados por leucotrienos.

Para que ocorra fagocitose são necessários diversos processos de ativação celular, dentre eles a polimerização da actina que leva à extensão da membrana plasmática denominada pseudópode. A extensão do pseudópode sobre a partícula forma o fagossomo (Marshall *et al*, 2001). O processo de formação do copo fagocítico requer a ativação de tirosina quinases e a participação de membros da família Rho GTPases (COX *et al*, 1999; ARAKI *et al*, 1996). Todos esses eventos iniciais da fagocitose são dependentes da PI3K. Para que ocorra a fagocitose via FcγR ou mediada por receptor para complemento 3 é necessária a ativação da PI3K (COX, 2001). Também possui um papel muito importante na fagocitose via receptor para manose. Foi demonstrado que a proteína surfactante pulmonar, o principal componente do surfactante pulmonar, possui a capacidade de se ligar a macrófagos e que através da ativação da PI3K, aumenta a expressão de receptores para manose na superfície destas células (BEHARKA, *et al*, 2005).

Nossos resultados mostraram que a inibição da PI3K, utilizando dois diferentes inibidores, diminuiu de maneira significativa a ação potencializadora de ambos leucotrienos (LTB₄ e LTD₄) tanto na fagocitose via FcγR como na fagocitose de *C.albicans* via receptor manose..

Com relação à cinética de ativação das vias, nossos resultados preliminares mostraram que a adição simultânea de alvos opsonizados e LTB₄ ativou a ERK1/2 em torno de 2,5 minutos e a PKCα em torno de 15 minutos. Quando foi utilizado o LTD₄, a p38 foi ativada entre 2,5 e 5 minutos, antes da ativação da PKCδ que ocorreu somente após 15 minutos. A adição simultânea de leucotrienos, tanto LTB₄ quanto LTD₄ e alvos opsonizados, ativou a PI3K (Akt) nos períodos iniciais de estimulação celular, isso ocorreu em torno de 2,5 minutos (dados não mostrados - resultados preliminares).

Desta forma, podemos sugerir que BLT₁ e CysLT₁ ativam diferentes vias de sinalização, sendo a PI3K o ponto de convergência. Em seguida ocorre ativação de diferentes vias efetoras tais como PKC α e ERK 1/2 no caso do BLT₁ e PKC δ e p38 para CysLT₁. O fato do BLT₁ estar ligado a Gi e Gq, ambos resultam na diminuição do AMPc e formação do DAG/IP3/Ca⁺⁺, respectivamente, enquanto CysLT₁ está ligado apenas a Gq, pode ajudar a explicar como receptores recrutam diferentes quinases para o aumento da fagocitose via Fc γ R. Outra possível explicação é a localização diferencial de tais receptores nos microdomínios da membrana plasmática, levando a diferentes interações entre receptores para leucotrienos e componentes da sinalização via Fc γ R na membrana plasmática.

De acordo com o McLEISH e colaboradores (1998), demonstrou-se que PI3K e tirosina quinases, mas não PKC, desempenham um importante papel na ativação da ERK 1/2. Por outro lado, PKC e tirosina quinases, mas não PI3K contribuem para ativação da p38 durante a fagocitose. Foi observado em fagócitos de mamíferos que fosfolipases, PKC e PI3K, levam a ativação da MAPK (BOKOCH *et al*, 1995; UNDERHILL *et al*, 1995). De acordo com nossos resultados, podemos sugerir um modelo de ativação das vias de sinalização em macrófagos alveolares ativados por leucotrienos. Com relação ao aumento da fagocitose via Fc γ R por macrófagos alveolares ativados por LTB₄, parece que a primeira via a ser fosforilada é a PI3K, que irá ativar ERK1/2 e em seguida a PKC α . A ligação do LTD₄ com seu receptor CysLT₁ parece que também ativa inicialmente a PI3K, entretanto as vias seguintes a serem ativadas são p38 e PKC δ . A ativação desta cascata de sinalização intracelular irá culminar com o aumento da fagocitose de alvos opsonizados por IgG mediado por leucotrienos. De maneira diferente, para o aumento da fagocitose via receptor manose, as mesmas vias são utilizadas tanto por LTB₄ quanto por LTD₄, que são a PI3K e a PKC δ .

Até pouco tempo acreditava-se que os leucotrienos participavam da resposta imune inata apenas por aumentar a permeabilidade vascular e a migração de células para o tecido inflamado. Hoje, após diversos estudos nesta linha, sabe-se que estas moléculas possuem funções importantes na defesa contra infecções, pois tem a capacidade de promover não só o aumento da fagocitose como também da atividade microbicida. A importância em desvendar as vias de sinalização envolvidas na fagocitose tanto de alvos opsonizados por IgG como na fagocitose de *C.albicans* em macrófagos alveolares estimulados ou não com leucotrienos, poderá auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o controle de infecções pulmonares causadas por bactérias e fungos.

6 - CONCLUSÕES

Os leucotrienos B₄ e D₄ endógenos e exógenos amplificam os sinais necessários para a fagocitose via receptor Fcγ e manose em macrófagos alveolares. Para isso LTB₄ e LTD₄ utilizam diferentes vias de sinalização intracelular na fagocitose de hemácias opsonizadas por IgG, enquanto na fagocitose de *C.albicans*, as mesmas vias são utilizadas por esses leucotrienos. Assim, nossos resultados mostram que os leucotrienos são potentes imunoestimuladores das funções efectoras de macrófagos estimulados por uma série de alvos, tais como IgG ou por componentes microbianos, como a manana na parede de *C.albicans*. Além disso, observamos que a ativação de PKCδ e PI3K parece ser um denominador comum na fagocitose por esses dois receptores.

Conclusões específicas:

- LTB₄ e LTD₄ endógenos e exógenos aumentam a fagocitose via FcγR e para isso utilizam diferentes vias de sinalização intracelular. Enquanto LTB₄ age via ERK 1/2 e PKCα para aumentar a fagocitose, LTD₄ utiliza a via da p38 e PKCδ. PI3K é uma molécula de sinalização intracelular importante para a ação de ambos leucotrienos.

- A *C.albicans* é fagocitada principalmente via receptor manose por macrófagos alveolares estimulados ou não por leucotrienos.

- LTB₄ e LTD₄ endógenos e exógenos aumentam a fagocitose de *C.albicans* via receptor manose utilizando para isso as mesmas vias de sinalização intracelular: PKCδ e PI3K. As vias da PKCα e MAPK parecem não ser importantes para a ação dos leucotrienos no aumento da fagocitose via receptor manose.

Segue abaixo, esquema ilustrativo da ativação das vias de sinalização utilizadas pelos leucotrienos, que levam ao aumento da fagocitose via FcγR e via receptor manose.

Fagocitose via receptor Fcγ:

Fagocitose via receptor manose:

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S.. *Imunologia Celular e Molecular*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Ed Revinter, 2003.
- ADEREM, A., UNDERHILL, D.M.. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623, 1999.
- ALLEN, L.A.H., ADEREM, A.. A role for MARCKS, the isozyme of protein kinase C and a myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* 182, 829-840, 1995.
- ARAKI, N., JOHNSON, M.T., SWANSON, J.A.. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis in macrophages. *J. Cell Biol.* 135, 1249–1260. *J. Immunol.* 173, 2615–2623, 1996.
- ARCOLEO, F., et al. Effect of exogenous leukotriene B₄ (LTB₄) on BALB/c mice splenocyte production of Th1 and Th2 lymphokines. *Int. J. Immunopharmacol.* p. 457-63, 1995.
- ARONOFF, D.M., et al. Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *J. Immunol.* p. 595-9, 2005.
- BAILIE, M.B., STANDIFORD, T.J., LAICHALK, L.L., COFFEY, M.J., STRIETER, R., PETERS-GOLDEN M.. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J. Immunol.*, 157(12): p. 5221-5224, 1996.
- BARNETT-NORRIS, J., LYNCH, D., REGGIO, P.H.. Lipids, lipid rafts and caveolae: their importance for GPCR signaling and their centrality to the endocannabinoid system. *Life Sci* 77:1625-1639, 2005.
- BEEKMAN, J.M., VAN DER LINDEN, J.A., VAN DE WINKEL, J.G., LEUSEN, J.H.. FcγRI (CD64) resides constitutively in lipid rafts. *Immunol Lett* 116:149-155, 2008.
- BEHARKA, A.A., CROWTHER, J.E., MCCORMACK, F.X., DENNING, G.M., LEES, J., TIBESAR, E., SCHLESINGER L.S.. Pulmonary Surfactant Protein A Activates a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Calcium Signal Transduction Pathway in Human Macrophages: Participation in the Up-Regulation of Mannose Receptor Activity. *The Journal of Immunology*, 175: 2227–2236, 2005.
- BERON, W., ALVAREZ-DOMINGUEZ, C., MAYORGA, L., STAHL, P.D. Membrane trafficking along the phagocytic pathway. *Trends Cell Biol.* 5, 100–104, 1995.
- BEY, E.A., XU B., BHATTACHARJEE, A., OLDFIELD, C.M., ZHAO, X., LI, Q., SUBBULAKSHMI, V., FELDMAN, G.M., WIENTJES, F.B., CATHCART, M.K.. Protein kinase C delta is required for p47phox phosphorylation and translocation in activated human monocytes. *J. Immunol.* 173:5730, 2004.

BOKOCH G.M.. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*; 86:1649–60, 1995.

BONVENTRE, J.V., HUANG, Z., TAHERI, M.R., O'LEARY, E., LI, E., MOSKOWITZ, M.A., SAPIRSTEIN, A.. Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature* 390, 622 – 625, 1997.

BROCK, T.G., MCNISH, R.W., BAILIE, M.B., PETERS-GOLDEN, M.. Rapid import of cytosolic 5-lipoxygenase into the nucleus of neutrophils after in vivo recruitment and in vitro adherence. *J. Biol. Chem.* 272, 8276–8280, 1997.

BROWN, E.J.. Complement receptors, adhesion, and phagocytosis. *Infect. Agents Dis.* 1, 63–70, 1992.

BROWN, G.D., GORDON, S.. Immune recognition. A new receptor for β -glucans. *Nature*. 413, 36–37, 2001.

BRETON, A., DESCOTEAUX, A.. Protein kinase C- α participates in Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 276:472, 2000.

BROWN, G.D., HERRE, J., WILLIMACRÓFAGOS ALVEOLARES, D.L., WILLMENT, J.A., MARSHALL, A.S., GORDON, S.. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J. Exp. Med.* 197, 1119–1124, 2003.

BROWN, G.D.. Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 33–43, 2006.

CANETTI, C., HU, B., CURTIS, J.L., PETERS-GOLDEN, M.. Syk activation is a leukotriene B₄-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. *Blood* 102, 1877 – 1883, 2003.

CANETTI, C., SEREZANI, C.H., ATRASZ, R.G., WHITE, E.S., ARONOFF, D.M., PETERS-GOLDEN, M.. Activation of phosphatase and tensin homolog on chromosome 10 mediates the inhibition of Fc γ R phagocytosis by prostaglandin E2 in alveolar macrophages. *J Immunol* 179, 8350-6, 2007.

CASADEVALL, A.. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect. Immun.* 63, 4211-4218, 1995.

CLAESSON, H.E., FEINMARK, S.J.. Relationship of cyclic-AMP levels in leukotriene B₄-stimulated leukocytes to lysosomal enzyme release and the generation of superoxide anions. *Biochim. Biophys. Acta* 804, 52 – 57, 1984.

CLAESSON, H., LINDGREN, J., GUSTAFSSON, B.. Opsonized bacteria stimulate leukotriene synthesis in human leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 836, 361 – 367, 1985.

COFFEY, M.J., PHARE, S.M., GEORGE, S., PETERS-GOLDEN, M., KAZANJIAN, P.H.. Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils. *J. Clin. Invest* 102:663-670, 1998.

COFFEY, M. J., PHARE, S.M., PETERS-GOLDEN, M.. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 71, 185 – 190, 2004.

COONEY, D.S., PHEE, H., JACOB, A., COGGESHALL, K.M.. Signal transduction by human-restricted FcγRIIa involves three distinct cytoplasmic kinase families leading to phagocytosis. J. Immunol. 167, 844–854, 2001.

COX, D., TSENG, C.C., BJEKIC, G., GREENBERG, S.. A requirement for phosphatidylinositol 3- kinase in pseudopod extension. J. Biol. Chem. 274, 1240–1247, 1999.

COX, D., GREENBERG, S.. Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. Semin. Immunol. 13:339, 2001.

COXON, P.Y., RANE, M.J., POWELL, D.W., KLEIN, J.B., MCLEISH, K.R.. Differential mitogen-activated protein kinase stimulation by Fcγ receptor IIa and Fcγ receptor IIb determines the activation phenotype of human neutrophils. J. Immunol. 164, 6530–6537, 2000.

CROWLEY, M.T., COSTELLO, P.S., FITZER-ATTAS, C.J., TURNER, M., MENG, F., LOWELL, C., TYBULEWICZ, V.L., DEFRANCO, A.L.. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcγ receptor on macrophages. J. Exp. Med. 186, 1027–1039, 1997.

CUNNINGHAM, F.M., SHIPLEY, M.E., SMITH, M.J.. Aggregation of rat polymorphonuclear leucocytes in vitro. J. Pharm. Pharmacol. 32, 377 – 380, 1980.

DAERON, M.. Fc receptor biology. Annu. Rev. Immunol. 15, 203–234, 1997.

DAHLEN, S.E., BJORK, J., HEDQVIST, P., ARFORS, K.E., HAMMARSTROM, S., LINDGREN, J.A., SAMUELSSON, B.. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3887 – 3891, 1981.

DEMITSU, T., et al. Enhanced bactericidal activity of macrophages by exogenous leukotriene B₄. Dermatological, 179 Suppl. 1: p. 129-30, 1989 a.

DEMITSU, T., KATAYAMA, H., SAITO-TAKI, T., YAOITA, H. AND NAKANO, M. Phagocytosis and bactericidal action of mouse peritoneal macrophages treated with leukotriene B₄. Int. J. Immunopharmacol. 11, 801 – 808, 1989 b.

DEWALD, B., BAGGIOLINI, M.. Activation of NADPH oxidase in human neutrophils. Synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB₄. Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 297 – 304, 1985.

DIVIRGILIO, F., MEYER, B.C., GREENBERG, S., SILVERSTEIN, S.C.. Fc receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic Ca² levels. *J. Cell Biol.* 106, 657–666, 1988.

DOEPPING, S., FUNK, C.D., HABENICHT, A.J., SPANBROEK, R.. Selective 5-lipoxygenase expression in Langerhans cells and impaired dendritic cell migration in 5-LO-deficient mice reveal leukotriene action in skin. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1692 – 1700, 2007.

D'OSTIANI, C. F., DEL SERO, G., BACCI, A., MONTAGNOLI, C., SPRECA, A., MENCACCI, A., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., ROMANI, L.. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 191:1661–1674, 2000.

DRAZEN, J.M., AUSTEN, K.F., LEWIS, R.A., CLARK, D.A., GOTO, G., MARFAT, A., COREY, E.J.. Comparative airway and vascular activity of leukotrienes C-1 *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4354 – 4358, 1980.

EL BENNA, J., HAN, J., PARK, J.W., SCHMID, E., ULEVITCH, R.J., BABIOR, B.M.. Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47phox by p38 and ERK but not by JNK. *Arch. Biochem. Biophys.* 334, 395–400, 1996.

FANGER, G.R., GERWINS, P., WIDMANN, C., JARPE, M.B., JOHNSON, G.L.. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and Tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 67–74, 1997.

FLAMAND, L., BORGEAT, P., LALONDE, R., GOSSELIN, J.. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B₄ to humans. *J. Infect. Dis.* 189, 2001 – 2009, 2004.

FLAMAND, N., MANCUSO, P., SEREZANI, C.H.C., BROCK, T.G.. Leukotrienes: Mediators that have been typecast as villains. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007.

FORD-HUTCHINSON, A.W., BRAY, M.A., DOIG, M.V., SHIPLEY, M.E., SMITH, M.J.H.. Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286, 264 – 265, 1980.

GARCIA-GARCIA, E., ROSALES, C.. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 72:1092, 2002 a.

GARCIA-GARCIA, E., ROSALES, R., ROSALES, C.. Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte to macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 72, 107–114, 2002 b.

GARCIA-GARCIA, E., BROWN, E.J., ROSALES, C.. Transmembrane mutations to FcγRIIIa alter its association with lipid rafts: implications for receptor signaling. *J. Immunol.* 178:3048-3058, 2007.

GESSNER, J.E., HEIKEN, H., TAMM, A., SCHMIDT, R.E.. The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* 76:231, 1998.

GHOSH, S.K. et al. Involvement of p21racA, PI3K and vacuolar ATPase in phagocytosis of bacteria and erythrocytes by *Entamoeba histolytica*: suggestive evidence for coincidental evolution of amebic invasiveness. Infect. Immun., v.65, p.4243, 1997.

GIJÓN, M.A., SPENCER, D.M., SIDDIQI, A.R., BONVENTRE, J.V., LESLIE, C.C.. J.Biol. Chem. 275, 20146–20156, 2000.

GIMBRONE, M.A., BROCK, A.F., SCHAFER, A.I.. Leukotriene B₄ stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. J. Clin. Invest. 74, 1552 – 1555, 1984.

GORDON, S.B., READ R.C.. Macrophage defences against respiratory tract infections. Br Med Bull. p. 45-61, 2002.

GOSSELIN, J., BORGEAT, P., FLAMAND, L.. Leukotriene B₄ protects latently infected mice against murine cytomegalovirus reactivation following allogeneic transplantation. J. Immunol. 174, 1587 – 1593, 2005.

GREENBERG, S., GRINSTEIN, S.. Phagocytosis and innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 14, 136–145, 2002.

GREENFIELD, R. A.. Host defense system interactions with *Candida*. J. Med. Vet. Mycol. 30:89–104, 1992.

HENDERSON, R.F., LEUNG, H.W., HARMSSEN, A.G., MCCLELLAN, R.O.. Species differences in release of arachidonate metabolites in response to inhaled diluted diesel exhaust. Toxicol. Lett. 42, 325 – 332, 1988.

HII, C.S., et al. Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in human neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and in migration. Infect. Immunol., v.67, p. 1297, 1999.

HIRATA, K., MAGHNI, K., BORGEAT, P., SIROIS, P.. Guinea pig alveolar eosinophils and macrophages produce leukotriene B₄ but no peptidoleukotrienes. J. Immunol. 144, 1880 – 1885, 1990.

HUBBARD, N.E., ERICKSON K.L.. Role of 5'-lipoxygenase metabolites in the activation of peritoneal macrophages for tumoricidal function. Cell Immunol. p. 115-22, 1995.

HUNTER, T., KARIN M.. The regulation of the transcription by phosphorylation. Cell. 70, 375-387, 1992.

HUNTER, S., INDIK, Z.K., KIM, M.K., CAULEY, M.D., PARK, J.G., SCHREIBER, A.D.. Inhibition of Fc γ receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fc γ receptor. Blood 91, 1762–1768, 1998.

IBRAHIM, A.S., MIRBOD, F., FILLER, S.G., BANNO, Y., COLE, G.T., KITAJIMA, Y., EDWARDS, J.E. NAZAWA, Y., GHANNOUM, M.A.. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect. Immun. 63, 1993-1998, 1995.

INDIK, Z.K., HUNTER, S., HUANG, M.M., PAN, X.Q., CHIEN, P., KELLY, C., LEVINSON, A.I., KIMBERLY, R.P., SCHREIBER, A.D.. The high affinity Fcγ receptor (CD64) induces phagocytosis in the absence of its cytoplasmic domain: the gamma subunit of FcγRIIIA imparts phagocytic function to FcγRI. *Exp. Hematol.* 22, 599–606, 1994.

INGLESE, J., KOCH, W.J., TOUHARA, K., LEFKOWITZ, R.J.. Gbg interactions with pH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *TIBS.* 20, 151-156, 1995.

ITO N., Yokomizo, T., Sasaki T.. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B₄-induced enzyme release. *J. Biol. Chem.*, 277:44898-44904, 2002.

JANCAR, S., CRESPO, M.S.. Immune-complex mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends in Immunol.* v.26(1): p. 50-55, 2005.

JONES, S.L., LINDBERG, F.P., BROWN, E.J.. Phagocytosis. In *Fundamental Immunology* (W. E. Paul, ed.), Philadelphia, PA, Lippincott- Raven, 997–1020, 1999.

KARIMI K., LENNARTZ M.R.. Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis. *J Immunol* 155, 5786-94, 1995.

KARIMI, K., LENNARTZ, M.R.. Mitogen-activated protein kinase is activated during IgG-mediated phagocytosis, but is not required for target ingestion. *Inflammation* 22:67, 1998.

KANAKARAJ, P., DUCKWORTH, B., AZZONI, L., KAMOUN, M., CANTLEY, L.C., PERUSSIA, B.. Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon FcγRIIIA-ligand interaction. *J. Exp. Med.* 179, 551–558, 1994.

KIM, N.D., RICHARD, C.C., SEUNG, E., TAGER, A.M., LUSTER, A.D.A.. Unique requirement for the leukotriene B₄ receptor BLT₁ for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 203, 829 – 835, 2006.

KITZ, D.J., STAHL, P.D., LITTLE, J.R.. The effect of a mannose binding protein on macrophage interactions with *Candida albicans*. *Cell Mol. Biol.* 38:407–412, 1992.

KNALL, C., YOUNG, S., NICK, J. A., BUHL, A. M., WORTHEN, G.S., JOHNSON, G.L. Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 271, 2832–2838, 1996.

KOLACZKOWSKA, E., SHAHZIDI, S., SELJELID, R., VAN ROOIJEN, N., PLYTYCZ, B. *Inflammation* 26, 61–71, 2002.

KONO, H., SUZUKI, T., YAMAMOTO, K., OKADA, M., YAMAMOTO, T., HONDA, Z.. Spatial raft coalescence represents an initial step in Fcγ R signaling. *J Immunol* 169:193-203, 2002.

KORADE-MIRNICS, Z., COREY, S.J.. Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 68, 603–613, 2000.

KRARUP, E., VESTBO, J., BENFIELD, T.L., LUNDGREN, J.D. Interleukin-8 and leukotriene B₄ in bronchoalveolar lavage fluid from HIV-infected patients with bacterial pneumonia. *Respir. Med.* 91:317-321, 1997.

KRUMP, E., SANGHERA, J.S., PELECH, S.L., FURUYA, W., GRINSTEIN, S.. Chemiotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 272, 937–944, 1997.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T.. *Tratado de Micologia Médica*. 9^a ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LARFARS, G. L. F., DEVYNCK, M. A., PALMBLAD, J., GYLLENHAMMER, H.. Activation of nitric oxide release and oxidative metabolism by leukotrienes B₄, C₄, and D₄ in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 93, 1399 – 1405, 1999.

LARSEN, E.C., DIGENNARO, J.A., SAITO, N., MEHTA, S., LOEGERING, D.J., MAZURKIEWICZ, J.E., LENNARTZ, M.R.. Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J. Immunol.* 165, 2809–2817, 2000.

LE CABEC, V., COLS, C., MARICONNEAU-PARINI, I.. *Infect. Immun.* 68, 4736–4745, 2000.

LENNARTZ M.R., BROWN E.J.. Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. *J Immunol* 147, 621-6, 1991.

LERNER, C.G., GOLDMAN, C.. Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1643-1651, 1993.

LI, R.K., CUTLER, J.E.. Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 268, 18293-18299, 1993.

LUNDY, S.R., DOWLING, R.L., STEVENS, T.M., KERR, J.S., MACKIN, W.M., AND GANS, K.. *J. Immunol.* 144, 2671–2677, 1990.

LUO, M., JONES, S.M., PETERS-GOLDEN, M., BROCK, T.G.. Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B₄ synthetic capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 12165–12170, 2003.

LUO, M., FLAMAND, N., BROCK, T.G.. Metabolism of arachidonic acid to eicosanoids within the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 618 – 625, 2006.

MAJEED, M., CAVEGGION, E., LOWELL, C. A., BERTON, G.. Role of Src kinases and Syk in Fcγ receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J. Leukoc. Biol.* 70, 801–811, 2001.

MALAVIYA, R., ABRAHAM, S. N.. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J. Leukoc. Biol.* 67, 841 – 846, 2000.

MANCUSO, P., STANDIFORD, T., MARSHALL, T., PETERS-GOLDEN, M.. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. Infect. Immun. 66, 5140 – 5146, 1998.

MANCUSO, P., PETERS-GOLDEN, M.. Modulation of alveolar macrophage phagocytosis by leukotrienes is Fc receptor-mediated and protein kinase C-dependent. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. p. 727-33, 2000.

MANCUSO, P., et al. Evaluation of phagocytosis and arachidonate metabolism by alveolar macrophages and recruited neutrophils from F344xBN rats of different ages. Mech Ageing Dev. p. 1899-913, 2001.

MANCUSO, P., NANA-SINKAM, P., PETERS-GOLDEN, M.. Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. Infect. Immun. 69, 2011 – 2016, 2001.

MANNS, J.M., MOSSER, D.M., BUCKLEY, H.R.. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. Infect. Immun. 62, 5152-5156, 1994.

MANSFIELD, P.J., SHAYMAN, J.A., BOXER, L.A.. Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. Blood 95:2407, 2000.

MARODI, L., KORCHAK, H.M., JOHNSTON JR., R.B.. Mechanisms of host defense against *Candida* species. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. J. Immunol. 146:2783–2789, 1991.

MARQUIS, G., GARZON, S., MONTPLAISIR, S., STRYKOWSKI, H., BENHAMOU, N.. Histochemical and immunochemical study of the fate of *Candida albicans* inside human neutrophil phagolysosomes. J. Leuk. Biol. 50, 587-599, 1991.

MARODI, L., SCHREIBER, S., ANDERSON, D.C., MACDERMOTT, R.P., KORCHAK, H.M., JOHNSTON, R.B.JR.. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon- γ : increased phagocytosis, killing and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. J. Clin. Invest. 91, 2596-2601. 1993.

MARSHALL, J.G., BOOTH, J.W., STAMBOLIC, V., MAK, T., BALLA, T., SCHREIBER, A.D., MEYER, T., GRINSTEIN, S.. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc γ receptor-mediated phagocytosis. J. Cell Biol. 153, 1369–1380, 2001.

MARTIN, T.R., et al. Relative contribution of leukotriene B₄ to the neutrophil chemotactic activity produced by the resident human alveolar macrophage. J. Clin. Invest. p. 1114-24, 1987.

MARODI, L., KORCHAK, H.M., JOHNSTON, R.B.JR.. Mechanisms of host defense against *Candida* species I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. J. Immunol. 146, 2783-2789, 1991.

MATSUKAWA, A., HOGABOAM, C.M., LUKACS, N.W., LINCOLN, P.M., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L.. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: Cross-talk between MCP-1 and Leukotriene B₄. *J. Immunol.* 163, 6148 – 6154, 1999.

MEDEIROS, A.I., SA-NUNES, A., SOARES, E.G., PERES, C.M., SILVA, C.L., FACCIOLI, L.H.. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 72:1637, 2004.

McLEISH, K.R., KLEIN, J.B., COXON, P.Y., HEAD, K.Z., WARD, R.A.. Bacterial phagocytosis activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase cascades in human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*; V 64, 1998.

METCHNIKOFF, E.. Über eine Sprosspilzkrankheit der Daphnei: Betrag zur libre über den Kampf der Phagocyten gegen Darmkrankheitserreger. *Vischows Arch.* 96, 177–185, 1884.

METCHNIKOFF, E.. Sur la lutte des cellules de l'organisme contre l'invasion des microbes. *Ann. Inst. Pasteur* 1, 321–345, 1887.

MONICK, M.M., CARTER, A.B., GUDMUNDSSON, G., GEIST, L.J., HUNNINGHAKE, G.W.. Changes in PKC isoforms in human alveolar macrophages compared with blood monocytes. *Am. J. Physiol.* 275:L389-L397, 1998.

MOQBEL, R., SASS-KUHN, S., GOETZL, E., KAY, A.. Enhancement of neutrophil- and eosinophil-mediated complement-dependent killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro by leukotriene B₄. *Clin. Exp. Immunol.* 52, 519 – 527, 1983.

MYERS, J.T., SWANSON, J.A.. Calcium spikes in activated macrophages during Fc γ receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 72, 677–684, 2002.

NAROENI, A., PORTE, F.. Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* 70:1640-1644, 2002.

NETEA, M.G., SUTMULLER, R, HERMANN, C.. Toll-like receptor 2 inhibits cellular responses against *Candida albicans* through pathways mediated by IL-10 and CD4+CD25+regulatory T cells. *J. Immunol.* 172: 3712- 3718, 2004.

NETEA, M.G., GOW, N.A., MUNRO, C.A., BATES, S., COLLINS, C.. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.* 116, 1642–1650, 2006.

NICK, J.A., AVDI, N.J., GERWINS, P., JOHNSON, G.L., WORTHEN, G.S.. Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 156, 4867–4875, 1996.

NICK, J.A., AVDI, N.J., YOUNG, S.K., KNALL, C., GERWINS, P., JOHNSON, G.L., WORTHEN, G.S.. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J. Clin. Invest.* 99, 975–986, 1997.

NIMMERJAHN, F., RAVETCH J.V.. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24:19, 2006.

ODA, L.M.; KUBELKA, C.F., ALVIANI, C.S. & TRAVASSOS, L.R.. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 39:497-504, 1983.

O'FLAHERTY, J.T., et al. Translocation of protein kinase C in human polymorphonuclear neutrophils. Regulation by cytosolic Ca⁺⁺-independent and Ca⁺⁺-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* a. p. 9146-52, 1990.

O'FLAHERTY, J.T., REDMAN, J.F., JACOBSON, D.P.. Mechanisms involved in the bidirectional effects of protein kinase C activators on neutrophil responses to leukotriene B₄. *J. Immunol.* p. 1909-13, 1990.

OFEK, I., GOLDHAR, J., KEISARI, Y., SHARON, N.. Non-opsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 239–276, 1995.

PARK, J.G., ISAACS, R.E., CHIEN, P., SCHREIBER, A.D.. In the absence of other Fc receptors Fcγ₃ transmits a phagocytic signal that requires the cytoplasmic domain of its γ₃ subunit. *J. Clin. Investig.* 92, 1967–1973, 1993.

PARKER, P.J., MURRAY-RUST, J.. PKC at a glance. *J. Cell Sci.* p. 131-2, 2004.

PARUCHURI, S., HALLBERG, B., JUHAS, M., LARSSON, C., SJOLANDER, A.. Leukotriene D₄ activates MAPK through a Ras-independent but PKC ε-dependent pathway in intestinal epithelial cells. *J. Cell Sci.* 115:1883, 2002.

PERES, C.M., ARONOFF, D. M., SEREZANI, C. H., FLAMAND N., FACCIOLI L.H., PETERS-GOLDEN M.. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *J. Immunol.* 179:5454, 2007.

PETERS-GOLDEN, M., MCNISH, R.W., SPORN, P.H., BALAZOVICH, K.. Basal activation of protein kinase C in rat alveolar macrophages: implications for arachidonate metabolism. *Am. J. Physiol.* 261:L462, 1991.

PETERS-GOLDEN, M., BROCK, T.G.. 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot.Essent. Fatty Acids.* p. 99-109, 2003.

PETERS-GOLDEN, M.. The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am. J. Respir Cell. Mol. Biol.*, v.31, p.3, 2004.

PETERS-GOLDEN, M., CANETTI, C., MANCUSO, P., COFFEY, M.J.. Leukotrienes: Underappreciated mediators of innate immune responses. *J. Immunol.* 174, 589 – 594, 2005.

PIKE, L.J.. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47:1597-1598, 2006.

POUBELLE, P.E., et al. Leukotriene B₄ up-regulates IL-6 rather than IL-1 synthesis in human monocytes. *Agents Actions.* p. 42-5, 1991.

RABINOVITCH, M.. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends Cell Biol. 5, 85–87, 1995.

RADMARK, O., SAMUELSSON, B.. Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 102 – 110, 2005.

RAEDER, E.M., MANSFIELD, P.J., HINKOVSKA-GALCHEVA, V., KJELDSEN, L., SHAYMAN, J.A., BOXER, L.A.. Sphingosine blocks human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis through inhibition of mitogenactivated protein kinase activation. Blood 93, 686–693, 1999a.

RAEDER, E.M., MANSFIELD, P.J., HINKOVSKA-GALCHEVA, V., SHAYMAN, J.A., BOXER, L.A. Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. J. Immunol. 163, 6785–6793, 1999b.

RAGHAVAN, M., BJORKMAN, P.J.. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12:181, 1996.

RANE, M.J., CARRITHERS, S.L., ARTHUR, J.M., KLEIN, J.B., MCLEISH, K.R.. Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways. Role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. J. Immunol.;159, 5070–5078, 1997.

RAVETCH, J.V., BOLLAND, S.. IgG Fc receptors. Annu. Rev. Immunol. 19, 275–290, 2001.

ROSE, D.M., WINSTON, B.W., CHAN, E.D., RICHES, D.W.H., GERWINS, P., JOHNSON, G. L., HENSON, P.M.. Fc γ receptor cross linking activates p42, p38, and JNK/SAPK mitogen-activated protein kinases in murine macrophages. Role for p42MAPK in Fc γ receptor-stimulated TNF- α synthesis. J. Immunol. 158, 3433–3438, 1997.

RUCKDESCHEL, K., MACHOLD, J., ROGGENKAMP, A., SCHUBERT, S., PIERRE, J., ZUMBIHL, R., LIAUTARD, J., HEESEMANN, J., ROUOT B.. *Yersinia enterocolytica* promotes deactivation of macrophage mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase-1/2, p38, and c-Jun NH2-terminal Kinase. The Journal of Biological Chemistry V.272, N. 25, 15920–15927, 1997.

SÁNCHEZ-MEJORADA, G., ROSALES, C.. Fc γ receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. J. Biol. Chem. 273, 27610–27619, 1998.

SCHERLE, P.A., JONES, E.A., FAVATA, M.F., DAULERIO, A.J., COVINGTON, M.B., NURNBERG, S.A., MAGOLDA, R.L., TRZASKOS, J.M.. Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes. J. Immunol. 161, 5681– 5686, 1998.

SCOTT, W.A., ZRIKE, J.M., HAMILL, A.L., KEMPE, J., COHN, Z.A.. J. Exp. Med. 152, 324–335, 1980.

SEDLIK, C., ORBACH, D., VERON, P., SCHWEIGHOFFER, E., COLUCCI, F., GAMBERALE, R., IOAN-FACSINAY, A., VERBEEK, S., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., BONNEROT, C., TYBULEWICZ, V.O., DI SANTO, J., AMIGORENA, S.. A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 170, 846–852, 2003.

SEGAL, A.W., WIENTJES, F., STOCKLEY, R.W., DEKKER, L.V.. Components and organization of the NADPH oxidase of phagocytic cells: its role in microbial killing and in the molecular pathology of chronic granulomatous disease. *Phagocytosis: The Host* (S. Gordon, ed.), Stamford, CT, JAI, - 441, 1999.

SEGER, R., KREBS, E.G.. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9,726–735, 1995.

SEREZANI, C.H., ARONOFF, D.M., JANCAR, S., MANCUSO, P., PETERS-GOLDEN, M.. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood* 106, 1067 – 1075, 2005.

SEREZANI, C.H., PERRELA, J.H., RUSSO, M., PETERS-GOLDEN, M., JANCAR, S.. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J. Immunol.* 177, 3201 – 3208, 2006.

SERHAN, C.N., et al. Leukotriene B₄ and phosphatidic acid are calcium ionophores. Studies employing arsenazo III in liposomes. *J Biol Chem.* p. 4746-52, 1982a.

SERHAN, C., RADIN, A., SMOLEN, J., KORCHAK, H.B.S., WEISSMANN, G.. Leukotriene B₄ is a complete secretagogue in human neutrophils: A kinetic analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1006 – 1012, 1982 b.

SIMONS, K., TOOMRE, D.. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39, 2000.

SINGH, S.S., CHAUHAN, A., BROCKERHOFF, H., CHAUHAN, V.P.S.. Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 104–112, 1993.

SITRIN, R.G., EMERY, S.L., SASSANELLA, T.M., BLACKWOOD, R.A., PETTY, H.R.. Selective localization of recognition complexes for leukotriene B₄ and formyl-Met-Leu-Phe within lipid raft microdomains of human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 177:8177-8184, 2006.

STRZELECKA, A., KWIATKOWSKA, K., SOBOTA, A.. Tyrosine phosphorylation and Fcγ receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Lett.* 400, 11–14, 1997.

SUCHARD, S.J., MANSFIELD, P.J., BOXER, L.A., SHAYMAN, J.A.. Mitogen-activated protein kinase activation during IgG-dependent phagocytosis in human neutrophils: inhibition by ceramide. *J Immunol* 158:4961, 1997.

TAGER, A.M., LUSTER, A.D.. BLT₁ and BLT₂: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* p. 123-34, 2003 a.

TAGER, A.M., BROMLEY, S.K., MEDOFF, B.D., ISLAM, S.A., BERCURY, S.D., FRIEDRICH, E.B., CARAFONE, A.D., GERSZTEN, R.E., LUSTER, A.D.. Leukotriene B₄ receptor BLT₁ mediates early effector T cell recruitment. *Nat. Immunol.* 4, 982 – 990, 2003 b.

TALVANI, A., MACHADO, F. S., SANTANA, G. C., KLEIN, A., BARCELOS, L., SILVA, J. S., TEIXEIRA, M. M. Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi* infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect. Immun.* 70, 4247 – 4253, 2002.

THODETI, C.K., et al. The epsilon isoform of protein kinase C is involved in regulation of the LTD(4)-induced calcium signal in human intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* p. 95-103, 2001.

TOKER, A., MEYER, M., REDDY, K.K., FALCK, J.R., ANEJA, R., ANEJA, S., PARRA, A., BURNS, D.J., BALLAS, L.M., CANTLEY, L.C.. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PI-3,4-P₂ and PI-3,4,5-P₃. *J. Biol. Chem.* 269, 32358–32367, 1994.

TOKER, A., CANTLEY, L.C.. Signaling through the lipid products of phosphoinositide 3-OH-kinase. *Nature* 387, 673–676, 1997.

TROTTA, R., KANAKARAJ, P., PERUSSIA, B.. FcγR-dependent mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: a common signal transduction event necessary for expression of TNF-α and early activation genes. *J. Exp. Med.* 184, 1027–1035, 1996.

TUIJNMAN, W.B., CAPEL, P.J.A., VAN DE WINKEL, J.G.J.. Human low-affinity IgG receptor FcγRIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes. *Blood* 79, 1651–1656, 1992.

TURNER, M., SCHWEIGHOFFER, E., COLUCCI, F., DI SANTO, J.P., TYBULEWICZ, V.L.. Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol. Today* 21, 148–154, 2000.

UNDERHILL, D.M.. *J. Endotoxin Res.* 9, 176–180, 2003.

UNDERHILL, D.M., GANTNER, B.. *Microbes Infect.* 6, 1368–1373 9, 2004.

UNDERHILL, D.M., ROSSNAGLE, E., LOWELL, C.A., SIMMONS, R.M.. Dectin-1 activates syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood.* 106, 2543–2550, 2005.

VIVANCOS, M., MORENO, J.J.. Role of Ca⁺⁺-independent phospholipase A(2) and cyclooxygenase/lipoxygenase pathways in the nitric oxide production by murine macrophages stimulated by lipopolysaccharides. *Nitric Oxide.* p. 255-62, 2002.

XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R.J., GREENBERG, M.E.. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326–1331, 1995.

YAMAMORI, T., et al. Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47phox by controlling cPKC/PKC δ but not Akt. Biochemical and Biophysical Research Communications. p. 720-30, 2004.

YOKOMIZO, T., IZUMI, T., CHANG, K., TAKUWA, Y., SHIMIZU, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. Nature 387, 620 – 624, 1997.

YONG, E. C., CHI, E.Y., HENDERSON, W.R.J.. *Toxoplasma gondii* alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. J. Exp. Med. 180, 1637 – 1648, 1994.

YOUNG, S.H., YE, J., FRAZER, D.G., SHI, X., CASTRANOVA, V.J.. Biol. Chem. 276, 20781–20787, 2001.

WENZEL, R.P., PFALLER, M.A.. *Candida* species: emerging hospital bloodstream pathogens. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 12:523–524, 1991.

WIJKANDER, J., et al. 5-Lipoxygenase products modulate the activity of the 85-kDa phospholipase A₂ in human neutrophils. J. Biol. Chem. p. 26543-9, 1995.

WIRTH, J.J., KIERSZENBAUM, F.. Stimulatory effects of leukotriene B₄ on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 134, 1989 – 1993, 1985 a.

WIRTH, J. J., KIERSZENBAUM, F.. Effects of leukotriene C₄ on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 15, 1 – 10, 1985 b.

WOO, C.H., YOU, H.J., CHO, S.H., EOM, Y.W., CHUN, J.S., YOO, Y.J., KIM, J.H.. Leukotriene B(4) stimulates Rac-ERK cascade to generate reactive oxygen species that mediates chemotaxis. J. Biol. Chem. 277:8572, 2002.

ZHENG, L., et al. Arachidonic acid, but not its metabolites, is essential for Fc γ R-stimulated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocytes. Immunology. p. 90-7, 1999.