

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

**LEUCOTRIENOS NA RESPOSTA IMUNE  
INATA E ADAPTATIVA -  
MODELO EXPERIMENTAL DE  
HISTOPLASMOSE PULMONAR**

**Adriana Secatto**

**Ribeirão Preto – SP**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**LEUCOTRIENOS NA RESPOSTA IMUNE INATA E  
ADAPTATIVA -  
MODELO EXPERIMENTAL DE HISTOPLASMOSE  
PULMONAR**

**Adriana Secatto**

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

**Orientadora: Dra. Alexandra Ivo de Medeiros**

**Ribeirão Preto – SP**

**2008**

## ABREVIATURAS

5-LO	5- lipoxigenase
5-LO KO	5- lipoxigenase “Knockout”
AA	ácido araquidônico
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
BHI	infusão de cérebro e coração
BLT <sub>1,2</sub>	receptor de leucotrienos 1,2
cPLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub> citoplasmática
D.O.	densidade óptica
EBV	vírus Epstein-Barr
ELISA	ensaio imunoenzimático
FLAP	proteína ativadora da 5-lipoxigenase
G-CSF	fator estimulador de colônia de
granulócito	
GKO	interferon gama “Knockout”
GM-CSF	fator estimulador de colônia granulócito
e	monócitos
HIV	vírus da imunodeficiência humana
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratraqueal
ICAM	molécula de adesão inter-celular
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL-	interleucina
KO	“Knockout”
LBA	lavado bronco-alveolar
LPS	lipossacarídeo
LTs	leucotrienos
LTB <sub>4</sub>	leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	leucotrieno C <sub>4</sub>

—

<b>MA</b>	<b>macrófago alveolar</b>
<b>NEED</b> <b>hidratado</b>	<b>cloreto de N-(1-naftil)etil-enediamina di-</b>
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<b>fator nuclear kappa B</b>
<b>NO</b>	<b>óxido nítrico</b>
<b>NO<math>_2^-</math></b>	<b>nitrito</b>
<b>NO<math>_3^-</math></b>	<b>nitrato</b>
<b>PBS</b>	<b>salina tamponada</b>
<b>PMN</b>	<b>polimorfonucleares</b>
<b>SBF</b>	<b>soro bovino fetal</b>
<b>T CD4</b>	<b>linfócito T CD4</b>
<b>T CD8</b>	<b>linfócito TCD8</b>
<b>Th<math>_{1,2}</math></b>	<b>linfócito auxiliary tipo 1,2</b>
<b>TMB</b>	<b>tetrametilbenzidina</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>fator de necrose tumoral alpha</b>
<b>TNFR</b>	<b>receptor do fator de necrose tumoral</b>
<b>UFC</b>	<b>unidades formadoras de colônia</b>
<b>VSV</b>	<b>vírus da estomatite vesicular</b>

–

Secatto, A. **Leucotrienos na resposta imune inata e adaptativa. Modelo experimental de histoplasnose pulmonar.** 2008. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O *Histoplasma capsulatum* é um fungo dimórfico, patogênico e responsável por graves lesões pulmonares, as quais se caracterizam pelo acúmulo de leucócitos ao redor do fungo, resultando na formação de granulomas. A infecção ocorre principalmente pela inalação de conídios ou pequenos fragmentos de micélio que alcançam os alvéolos, onde se transformam em leveduras, que é a forma patogênica do fungo. Recentemente, nós e outros grupos demonstraram a participação de leucotrienos (LTs) nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos. No presente trabalho, nós descrevemos a importância de LTs na regulação da resposta imune *in vivo* e *in vitro*. Os resultados obtidos demonstram que LTs têm importante papel na resposta imune protetora, sendo que a ausência deste mediador em animais 5-LO<sup>-/-</sup> resultou na disseminação e morte 100% dos animais. Além disso, a ausência de LTs resultou no (i) aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e IFN- $\gamma$ , (ii) aumento no recrutamento de neutrófilos (iii) diminuição da ativação de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> efetoras no pulmão, (iv) diminuição da síntese de óxido nítrico e (v) diminuição da fagocitose por macrófagos alveolares infectados com leveduras de *H.capsulatum* opsonizadas com IgG. Nossos resultados sugerem que leucotrienos têm papel importante na

–

defesa do hospedeiro contra infecção por *H.capsulatum* demonstrando nova função de molécula reguladora na modulação de célula T durante a infecção.

Palavras chaves: Histoplasmose, leucotrienos, óxido nítrico, fagocitose e célula T.

–

Secatto, A. **Leukotrienes in innate and adaptative immune response. Experimental model of pulmonary histoplasmosis.** 2008. 81p. Dissertation (Master degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

*Histoplasma capsulatum* is a pathogenic dimorphic fungus and its infection is characterized by accumulation of leukocytes and granuloma formation. Infection occurs mainly by fungal inhalation that reaches the alveoli, which became yeast (the pathogenic form). Recently, we and others have shown the role of the lipid mediator leukotriene in host defense has been characterized. In this study, we evaluate the importance of endogenous and exogenous LTs in the regulation of immune response in vivo and in vitro. The results obtained in the study show that leucotrienos play an important protective role in the control of fungal infection, since mice deficient in LT biosynthesis (5-LO<sup>-/-</sup>) resulted in fungal dissemination and death of 100% of the animals. In addition, LT absence resulted in (i) increase in the synthesis of pro-inflammatory cytokines and IFN- $\gamma$ , (ii) increase in neutrophil recruitment, (iii) decrease of T CD4<sup>+</sup> activation e TCD8<sup>+</sup> effectors cells in the lung, (iv) decrease of synthesis of nitric oxide and (v) decrease of phagocytosis of alveolar macrophages infected with IgG-opsonized yeast *H. capsulatum in vitro*. Thus, our data reinforce the importance leucotrienes in host defense against *H. capsulatum* infection and brings up new information about the regulatory of such molecule in the modulation of T cells during infection.



–

Key words: Histoplasmosis, leucotrienes, nitric oxide, phagocytosis and T cell.

# SUMÁRIO

<b>I- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>II- OBJETIVO.....</b>	<b>16</b>
<b>III- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. Animais.....	19
3.2. Obtenção e cultivo de leveduras do <i>H. capsulatum</i> .....	19
3.3. Infecção pulmonar com <i>H. capsulatum</i> através da inoculação intraqueal, por procedimento cirúrgico.....	20
3.4. Análise da sobrevivência e proteção de camundongos infectados com <i>H. capsulatum</i> .....	20
3.5. Determinação das unidades formadoras de colônia (UFC).....	21
3.6. Obtenção e contagem total e diferencial das células do LBA.....	22
3.7. Imunofenotipagem de células de pulmões de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> .....	22
3.8. Preparação dos homogeneizados de pulmão para dosagem de citocinas e leucotrienos.....	23
3.9. Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	23
3.10. Purificação e detecção de leucotrienos B <sub>4</sub> em homogeneizados de pulmões de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> .....	25
3.11. Detecção de nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) no soro e homogeneizado de pulmões de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> .....	26
3.12. Obtenção de macrófagos alveolares.....	26
3.13. Opsonização de leveduras de <i>H. capsulatum</i> .....	27

3.14. Ensaio de fagocitose.....	27
3.15. Análise estatística.....	29
<b>IV- RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1. Análise da sobrevivência de camundongos WT e 5 LO <sup>-/-</sup> infectados com de <i>H. capsulatum</i> .....	31
4.2 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas de pulmões e baços de animais infectados <i>H. capsulatum</i> .....	33
4.3. Cinética de migração de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> .....	35
4.4. Quantificação de leucotrieno B <sub>4</sub> em homogeneizado de pulmões de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> .....	38
4.5. Quantificação de citocinas em sobrenadante de homogeneizado pulmonar de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> .....	40
4.6. Detecção de nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) no soro e no sobrenadante de homogeneizado de pulmão de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> .....	45
4.7. Avaliação de células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> efetoras no pulmão de camundongos infectados ou não com <i>H. capsulatum</i> .....	48
4.8. Participação de leucotrienos exógenos na fagocitose de macrófagos alveolares de ratos infectados com <i>H. caspulatum</i> .....	52
4.9. Participação de leucotrienos endógenos na fagocitose de macrófagos alveolares de ratos infectados com <i>H. caspulatum</i> .....	54
<b>V- DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>

—

<b>VI- CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>

# ***INTRODUÇÃO***

## I- INTRODUÇÃO

### ***Histoplasmose***

A histoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo *Histoplasma capsulatum*, um fungo dimórfico, parasita intracelular, não encapsulado. O dimorfismo celular do fungo caracteriza-se pela forma saprófita miceliana à temperatura ambiente (25°C) e pela forma de levedura à temperatura do corpo dos mamíferos (37°C). Os conídios do *H. capsulatum* encontram-se presentes em fezes de pássaros e morcegos, motivo pelo qual a histoplasmose também conhecida como “doença das cavernas”. Os mamíferos contraem a infecção pela inalação de conídios que alcançam os alvéolos onde são fagocitados por células residentes (1, 2). A conversão de conídios para leveduras no hospedeiro é dependente principalmente da variação da temperatura corporal. Esta mudança morfológica é crítica para o desenvolvimento da doença, pois a forma de levedura é a responsável pela patogenia na histoplasmose (3).

A histoplasmose tem ampla distribuição pelo mundo, sendo muito endêmica em regiões da América, Ásia e África (4). No Brasil esta micose é endêmica em todas as regiões, sendo que inquéritos epidemiológicos demonstraram maior incidência nas regiões sudeste, sul e centro-oeste (5-7). Relatos recentes na literatura mostram regiões endêmicas nos estados do Rio de Janeiro (4, 6, 8). As manifestações clínicas dos pacientes com histoplasmose podem variar de quadros leves, semelhantes a gripes, até formas graves disseminadas, que dependendo das condições imunológicas do hospedeiro e da carga fúngica inalada, levam o indivíduo à morte. Dentre as principais formas clínicas inaladas temos: infecção assintomática, histoplasmose pulmonar

–

aguda, histoplasmose pulmonar crônica e a histoplasmose pulmonar disseminada (9). A infecção assintomática, que ocorre em cerca de 95% dos casos, é leve e benigna, de regressão espontânea acomete hospedeiros imunocompetentes em áreas endêmicas. A histoplasmose pulmonar aguda acomete hospedeiros imunocompetentes, provenientes de áreas não endêmicas, expostos à inalação de grande carga fúngica. As manifestações clínicas podem durar semanas ou meses e evoluir para formas mais graves levando a insuficiência respiratória. Na histoplasmose pulmonar crônica, o pulmão do paciente tem colonização fúngica com formações cavitárias muito semelhante à tuberculose pulmonar crônica pós-primária. Quando não tratada, a doença é progressiva, com perda de função pulmonar na maioria dos doentes e morte em até 50% dos casos. O desenvolvimento da doença associado com o início da histoplasmose disseminada depende do estado imunológico do hospedeiro (10). A histoplasmose disseminada ocorre geralmente em pacientes que apresentam seu estado imunológico suprimido, como pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), receptores de transplantes e que fazem uso de corticóides (10). Caracteriza-se por ser uma doença sistêmica severa podendo levar o paciente a óbito devido à insuficiência respiratória, insuficiência adrenal, anemia, leucopenia, hepatoesplenomegalia, meningite e endocardite. Esta é a 4<sup>o</sup> doença oportunista que mais acomete pacientes portadores do vírus do HIV e residentes em regiões endêmicas.

Em indivíduos imunocompetentes, durante a primeira semana de infecção, ocorre intenso infiltrado de polimorfonucleares (PMN) no pulmão, seguido de infiltrado de células mononucleares e formação de granulomas

–

compactos. A infecção nestes indivíduos evolui para cura espontânea, sendo esta a forma assintomática da infecção. No entanto, 5% dos indivíduos imunocompetentes manifestam a forma sintomática da infecção, nos quais a histoplasmose pulmonar aguda progride para a forma crônica, que pode ou não evoluir para forma disseminada. Acredita-se que a evolução da doença em indivíduos infectados com *H. capsulatum* esteja associada com a formação de granulomas compactos ou frouxos no pulmão. Ou seja, a formação de granulomas compactos está associada à contenção do fungo ao local da infecção, e predominância de granulomas frouxos está associada à disseminação do fungo para diferentes órgãos como, o baço, o fígado, o sistema nervoso central e as glândulas adrenais (3, 11, 12). Com base em estudos clínicos, indivíduos que desenvolvem a forma disseminada da doença não apresentam reação inflamatória eficiente e nem formação de granulomas compactos que impedem a disseminação do fungo (13). O recrutamento de células inflamatórias e, conseqüentemente, a formação e manutenção de granulomas são processos dependentes, entre outros fatores, dos mediadores quimioatraentes liberados no local da inflamação (revisado em (14). Os patógenos, uma vez delimitados, podem morrer ou permanecer em estado latente, conservando a capacidade de se replicarem e disseminarem, caso ocorra a desorganização do granuloma compacto (11, 15).



–

### ***Células e citocinas na histoplasmose***

O mecanismo pelo qual o hospedeiro é capaz de controlar e erradicar a infecção por *H. capsulatum* ocorre através da indução da resposta imune celular mediada por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células T (16).

A interação entre leveduras e macrófagos é o evento chave na patogenia da histoplasmose. Os macrófagos interagem com as leveduras de *H. capsulatum* através de vários receptores, um deles é integrina CD11b/CD18 presentes nos macrófagos (17). Esta interação promove a adesão e fagocitose das leveduras, onde estas podem se replicar no interior do fagossomo (2). A eliminação do patógeno ocorre através da ativação da resposta imune adaptativa, pela produção de citocinas, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  capazes de ativar macrófagos a aumentarem sua capacidade microbicida (18, 19).

As células dendríticas são as principais células apresentadoras de antígeno capazes de ativar os linfócitos TCD4<sup>+</sup> diferenciando-os em células de um padrão de resposta celular (Th1) ou humoral (Th2). Estas células são capazes de reconhecerem e fagocitarem as leveduras de *H. capsulatum* através do receptor de fibronectina, VLA-5 (20). Além do reconhecimento via VLA-5, Gildea et al. (20) demonstram que células dendríticas humanas fagocitam, matam e apresentam antígenos para os linfócitos T.

Além das células da resposta imune inata, os linfócitos T são as principais células da imune adaptativa responsáveis pela resolução da infecção contra *H. capsulatum*. A ausência de linfócitos T circulantes em animais modificados geneticamente ou através da utilização de anticorpos monoclonais promovem o aumento da susceptibilidade à infecção por *H. capsulatum* (21).

–

Tanto linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> contribuem para resistência do hospedeiro durante a infecção por *H. capsulatum* (22). A transferência adotiva de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> em camundongos “naive” e posteriormente o desafio com o fungo demonstrou diminuição na recuperação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) no baço e aumentando a proteção de animais contra *H. capsulatum* (23). Além disso, o tratamento de animais com anticorpos monoclonais anti-CD8<sup>+</sup> causou aumento da carga fúngica no baço e no fígado, indicando que células TCD8<sup>+</sup> são também importantes na para eliminação do fungo em tecidos de camundongos infectados (24).

A ativação de macrófagos, principal célula efetora contra o *H. capsulatum*, ocorre através da liberação de citocinas por células da resposta imune inata e adaptativa. Lane et al. (25), demonstraram que macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$  recombinante aumentam a atividade fungicida através do aumento da expressão de iNOS, enzima responsável pela síntese de óxido nítrico (NO). Além disso, Zhou et al. (26) descreveram que animais infectados com *H. capsulatum* tratados com anticorpos neutralizantes para IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 apresentaram aumento na taxa de mortalidade, indicando que estas citocinas têm papel importante na proteção dos animais. E a administração exógena de IL-12 recombinante em animais infectados com *H. capsulatum* preveniu a mortalidade dos mesmos através da indução da síntese de IFN- $\gamma$  (26).

Outras citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 estão envolvidas na proteção do hospedeiro contra a infecção por *H. capsulatum*. Deepe et al. (27) demonstraram que animais deficientes do receptor para IL-1 (IL-1R<sup>-/-</sup>) infectados

–

com *H. capsulatum* apresentam aumento na recuperação das (UFC) nos pulmões, diminuição no número de células T CD4<sup>+</sup>, diminuição na expressão de iNOS, diminuição nos níveis de IFN- $\gamma$  contrastando com aumento nos níveis de IL-4 e IL-10 quando comparado com animais controle. Macrófagos peritoneais infectados com *H. capsulatum* produzem grandes quantidades de TNF- $\alpha$  (28). Além disso, a presença deste mediador foi também detectado no fluido do Lavado Broncoalveolar (LBA) de camundongos infectados, por via intranasal, com leveduras do fungo. O tratamento dos animais infectados com anticorpos neutralizantes contra TNF- $\alpha$  levou a recrudescência da infecção e dobrou a mortalidade dos mesmos (28). Quando comparado com camundongos selvagens, animais deficientes para receptor TNF- $\alpha$ , TNFR-1<sup>-/-</sup> e TNFR-2<sup>-/-</sup>, infectados com doses sub-letais de *H. capsulatum*, apresentaram aumento na mortalidade, aumento na produção de IL-4 e IL-10 nos pulmões e na quantidade de fungos recuperados no baço e no pulmão (29).

### ***Leucotrienos nas infecções***

Leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pela ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO). Os LTs são liberados após ativação celular por patógenos e mediadores solúveis. Estes fatores produzem um distúrbio da membrana celular e aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação de fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>) da membrana citosólica para membrana nuclear e seletivamente hidrolisa os fosfolipídios do envelope nuclear liberando AA (30). O AA liberado interage com a Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP) que em conjunto com a 5-LO gera o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) que por ser instável é

–

rapidamente convertido em leucotrieno  $A_4$  ( $LTA_4$ ). O  $LTA_4$  pode ser transformado em  $LTB_4$ , pela ação da  $LTA_4$  hidrolase, ou em  $LTC_4$  intracelular pela ação da enzima  $LTC_4$  sintase que catalisa a conjugação de  $LTA_4$  com glutathiona reduzida.  $LTC_4$  intracelular é transportado através da membrana plasmática e convertido extracelularmente, pela ação gama-glutamil transferase, em  $LTD_4$  e  $LTE_4$  os chamados cysenil-leucotrienos (revisado em (31)). As ações biológicas dos leucotrienos são mediadas por receptores acoplados à proteína G. O  $LTB_4$  e os cysenil-leucotrienos ( $LTC_4$ ,  $LTD_4$  e  $LTE_4$ ) interage com dois tipos diferentes de receptores chamados  $BLT_{1,2}$  (32) e  $cys-LT_{1,2}$  (33), respectivamente.

$BLT_1$  é o primeiro receptor descrito para  $LTB_4$ . O  $BLT_1$  é receptor de alta afinidade,  $K_d$  0,39 a 1,5 nM, e sua expressão é predominantemente em leucócitos do sangue periférico. A ativação do  $BLT_1$  está envolvida em vários processos, como quimiotaxia, influxo de cálcio, proliferação celular, aumento das funções efetoras de fagócitos e recrutamento de leucócitos. O bloqueio da interação  $BLT_1$ - $LTB_4$  é mediada por antagonistas como CP-105,696, ZK 158252 e CP195543. O  $BLT_2$  é o receptor de baixa afinidade ( $K_d = 22,7$  nM) e expresso em vários tecidos, como baço, coração, ovário, fígado e também em leucócitos. Sua função ainda não está bem estabelecida, mas acredita-se estar envolvido como receptor quimiotático (34).

Os  $cys-LT_{1,2}$  são expressos em macrófagos, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas, linfócitos T e B e participam de vários processos como quimiotaxia, broncoconstrição, vasodilatação e migração de células dendríticas

–

(33). A inibição do receptor cys-LT<sub>1</sub> ocorre através do uso de antagonistas do receptor como montelukast, zafirlukast, MK571 e LY171833 (34).

Os LTs são secretados por diferentes tipos celulares, entre eles macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (35, 36). Dentre essas células destacam-se os macrófagos alveolares (MA) residentes, que são células responsáveis pela manutenção da esterilidade do espaço alveolar (37) e cuja capacidade fagocítica, microbicida e de síntese de leucotrienos, excede às dos macrófagos de outros tecidos. Leucotrienos estão envolvidos na patogênese de uma variedade de desordens inflamatórias do pulmão, incluindo asma (38) e doenças infecciosas do trato respiratório (39, 40). Esses mediadores são produzidos rapidamente após o estímulo, pois a maquinaria enzimática para síntese destes compostos é constitutiva nas células mielóides. Nesse aspecto, leucotrienos diferem dos mediadores protéicos, que requerem síntese “de novo”, e, portanto são produzidos horas após a estimulação celular (revisado em (41)).

Embora esteja bem estabelecido o papel de LTs como ativador celular e fator quimiotático para neutrófilos e eosinófilos (42-44) pouco se sabe ainda sobre o papel destes mediadores na defesa do hospedeiro contra os agentes infecciosos. O papel dos LTs na defesa do hospedeiro foi demonstrado primeiramente em (45, 46) que demonstravam que LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> aumentam a fagocitose e morte de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos peritoneais. As funções efetoras destes mediadores em células da resposta imune inata inclui efeitos diretos no acúmulo de leucócitos bem como na capacidade fagocítica e microbicida destas células (31).

–

Recentemente, demonstramos aumento na síntese de LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> no pulmão de camundongos infectados com *H. capsulatum* (47). A importância de LTs na histoplasmose pulmonar murina foi recentemente demonstrada por nosso grupo de pesquisa. A inibição da síntese deste mediador, através do tratamento dos animais infectados com o inibidor da FLAP, MK886, resultou na morte de 100% dos animais tratados enquanto nenhum dos animais apenas infectados morreu até 30 dias após a infecção (47). Outros autores também observaram *in vivo e in vitro* a participação dos LTs nos mecanismos de defesa durante infecções por bactérias e vírus (40, 48, 49).

Além disso, pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam aumento da susceptibilidade às infecções pulmonares devido à deficiência na síntese de LTs (49, 50). Nestes indivíduos, a deficiência na produção de leucotrienos está associada com a redução da expressão da FLAP (49, 51). MA e PMN obtidos destes indivíduos apresentaram atividade microbicida reduzida para *Cryptococcus neoformans*, sendo que a adição exógena de LTB<sub>4</sub> reverteu esta deficiência (49).

A realização de experimentos utilizando camundongos “knockout” para 5-lipoxigenase, ou seja, que não possuem o gene funcional da enzima da 5-lipoxigenase (5-LO<sup>-/-</sup>), permitiu a investigação precisa do papel dos leucotrienos endógenos nos diferentes processos de ativação celular e conseqüente importância desses mediadores na defesa do hospedeiro. A primeira evidência que os LTs gerados endogenamente são importantes para o controle da infecção foi demonstrado por Baile et al. (40). Os autores mostraram que animais selvagens infectados, por via intratraqueal (i.t.), com *Klebsiella*

–

*pneumoniae* apresentaram 60% de mortalidade, enquanto 100% dos camundongos 5-LO<sup>-/-</sup> morreram quando infectados com o mesmo inóculo. Além disso, maior número destes microorganismos foi isolado do pulmão e sangue dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> quando comparado com camundongos com o fenótipo selvagem (40). O aumento da susceptibilidade dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> às infecções pulmonares, parece estar associado à deficiência na fagocitose e atividade microbicida pelos MA (31). A adição exógena de LTB<sub>4</sub> às culturas de MA obtidos de animais 5-LO<sup>-/-</sup> aumentou a capacidade fagocítica destas células (40). Além disso, Chen, et al. (52) demonstraram que leucotrienos têm importante função no controle da replicação viral independente da deficiência da síntese de IFN-γ e IL-12.

A importância dos LTs exógenos e endógenos no controle de infecções foram demonstrados em uma série de patógenos, incluindo vírus (53, 54) protozoários (55-57) fungos (44, 47) e bactérias (58-60).

### ***Leucotrienos como moduladores da resposta imune***

Estudos utilizando antagonistas, inibidores da síntese de leucotrienos e mais recentemente animais deficientes da síntese de LTs, (5-LO<sup>-/-</sup>) e também de receptores BLT<sub>1</sub> ou cysLT<sub>1</sub> demonstraram o importante papel imunomodulador de leucotrienos na síntese de diferentes mediadores nos processos infecciosos (37), revisado em (30). Neste contexto foi demonstrado que o aumento da susceptibilidade às infecções pulmonares em animais 5-LO<sup>-/-</sup> e em indivíduos infectados pelo HIV está associado não apenas com a ausência da síntese de leucotrienos, mas também pela modulação na síntese de citocinas (49). Morita

–

et al. (61) descreveram que células do baço estimuladas com anti-CD3 e incubadas com antagonista do receptor de leucotrienos, ONO-4057, apresentaram inibição da proliferação celular e da síntese de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-12. No entanto, Vellenga et al. (62) relataram que monócitos estimulados com LPS na presença de um inibidor da síntese de LTC<sub>4</sub>, composto MK 571, liberaram entre 3 a 5 vezes mais IL-1 e IL-6, do que monócitos apenas estimulados com LPS.

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que células do baço provenientes de animais infectados com *H. capsulatum* e tratados com MK 886 produzem menos IFN- $\gamma$  e IL-12 quando comparados ao grupo selvagem. No entanto, a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1, KC e IL-6 no pulmão destes animais foram moduladas positivamente quando comparado ao grupo selvagem (47). Estes resultados demonstram que leucotrienos estão envolvidos direta ou indiretamente na regulação da síntese de citocinas, sugerindo um importante papel deste mediador na resposta imune protetora na histoplasmose.

Óxido Nítrico (NO) é um potente radical livre com diversos papéis na regulação da atividade celular (63). NO é formado a partir da L-arginina pela NOS (do inglês Nitric Oxide Synthase). A enzima iNOS (do inglês inducible Nitric Oxide Synthase) é regulada positivamente por uma variedade de mediadores inflamatórios, funciona independente dos níveis de Ca<sup>2+</sup> e induz grandes quantidades de NO (64). Embora as citocinas participem da geração e da manutenção da imunidade na histoplasmose, aparentemente o mecanismo pelo quais as mesmas atuam é convergente e parece estar relacionado com a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo o óxido nítrico o



–

mais importante. Nakamura et al., (65) demonstraram que linhagens de macrófagos pré-tratados com IFN- $\gamma$  recombinante foram capazes de inibir o crescimento intracelular de *H. capsulatum*. Essa atividade fungicida foi dependente do metabolismo de L-arginina (L-Arg) e durante esse processo houve aumento nos níveis de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Na ausência desse aminoácido ou na presença de NG-monometil L-Arg (N-MMA), um inibidor competitivo do metabolismo da L-Arg, a atividade fungicida destas células foi inibida e os níveis de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foram mantidos basais (65). Lane et al. (66) demonstraram que após a estimulação com IFN- $\gamma$  recombinante em macrófagos isolados do baço, houve geração de óxido nítrico e aumento da expressão da enzima iNOS. Esta produção de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> inibiu o crescimento do *H. capsulatum in vitro*. Resultados semelhantes foram encontrados quando utilizados macrófagos obtidos dos lavados bronco-alveolares e peritoneais, onde a atividade fungicida *in vitro* dessas células, quando estimuladas por IFN- $\gamma$  e LPS, foi bloqueada pelo N-MMA, mas não pelas enzimas catalase ou superóxido dismutase (67). O mesmo N-MMA, capaz de inibir a atividade fungicida de macrófagos alveolares ativados por IFN- $\gamma$  ou LPS, não foi eficiente quando essas células foram ativadas por M-CSF, sugerindo um mecanismo adicional e alternativo através do qual os macrófagos são capazes de matar o *H. capsulatum* (68). No mesmo ano foi demonstrado que o produto da enzima superóxido dismutase, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, foi capaz de inibir a atividade fungicida de macrófagos humanos ativados com M-CSF, sugerindo que o ânion superóxido poderia ser essa molécula alternativa (69).

Chen et al. (52) demonstraram que neurônios, isolados de animais 5-LO<sup>-/-</sup>, quando infectados com Vírus da Estomatite Vesicular (VSV) apresentam uma

–

redução na expressão da enzima NOS-1 quando comparado aos animais WT, resultando no aumento da replicação viral. No entanto, alguns autores demonstraram que a estimulação de macrófagos alveolares (70-72) e de linhagens de mastócitos (73) *in vitro* com NO inibe síntese de leucotrienos. Também, foi observado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa que células do lavado bronco-alveolar de animais infectados com *H. capsulatum*, quando estimuladas *in vitro* com LPS e IFN- $\gamma$ , produziram níveis elevados de NO. No entanto, a inibição da síntese de leucotrienos, resultante do tratamento dos animais infectados com MK 886, inibiu a síntese de NO $_2^-$  nos 7 $^\circ$  e 15 $^\circ$  dias após a infecção (47). Além disso, Talvani et al (57) e Serezani et al, (56) demonstraram que os efeitos dos LTB $_4$  no aumento da atividade tripanossomicida e leishmanicida, respectivamente, são dependentes da geração de NO em modelos murinos.

No entanto, apesar de inicialmente o composto MK 886 ter sido descrito como um inibidor seletivo da enzima 5-LO, alguns trabalhos demonstraram que MK 886 interage não apenas a FLAP, mas também PPAR- $\alpha$  (do inglês Peroxisome Proliferator – Activated Receptor), um fator de transcrição nuclear com propriedades anti-inflamatória, impedindo a ativação de diferentes genes (74, 75). Com base nestes dados, a utilização de animais deficientes da síntese de leucotrienos (5LO $^{-/-}$ ) nos permite uma avaliação precisa do envolvimento desses mediadores produzidos endogenamente na histoplasnose. Entretanto, neste trabalho (47) não foi possível demonstrar qual leucotrieno estaria envolvido na proteção do hospedeiro contra infecção por *H. capsulatum*. Contudo, sabe-se que leucotrienos são capazes de aumentar a capacidade

–

fagocítica em diversos tipos celulares (31). Porém, ainda não existem relatos na literatura sobre a participação de leucotrienos nos mecanismos de fagocitose por macrófagos alveolares contra *H. capsulatum*.

## ***OBJETIVO***

## II- OBJETIVO

Tivemos como objetivo no presente projeto avaliar *in vivo* a participação de leucotrienos na resposta imune durante a infecção por *H. capsulatum* e *in vitro* a interferência destes mediadores na atividade fagocítica de macrófagos alveolares infectados por esse fungo.

### ***Estratégias de estudo***

#### ***In vivo***

Utilizando animais selvagens e deficientes da enzima 5-LO (5-LO<sup>-/-</sup>) infectados com *H. capsulatum* avaliamos:

1. Sobrevivência dos animais;
2. Recuperação das UFC nos pulmões e baços;
3. Cinética do recrutamento celular no lavado bronco-alveolar;
4. Quantificação de LTB<sub>4</sub> no homogeneizado de pulmões;
5. Quantificação de nitrito no soro e homogeneizado de pulmões;
6. Quantificação de citocinas no homogeneizado de pulmões;
7. Imunofenotipagem de células do parênquima pulmonar;

#### ***In vitro***

Utilizando macrófagos alveolares infectados com leveduras de *H. capsulatum* na presença de inibidores e antagonistas LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>, determinamos:

8. Atividade fagocítica;

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### III – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos adultos machos pertencentes à linhagem 5-LO<sup>-/-</sup>(129-Alox5<sup>tm1Fun</sup>) e sua respectiva linhagem selvagem sv129 (WT) pesando entre 15-20g. Ratos Wistar machos pesando entre 220-270g, todos provenientes do Biotério de animais isogênicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em isoladores com livre acesso a água e alimento. O projeto foi realizado dentro das normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto (PCARP) da Universidade de São Paulo (nº do protocolo 06.1.812.53.3).

#### 3.2. Obtenção e cultivo de leveduras do *H. capsulatum* em meio sólido

A cepa selvagem do *H. capsulatum*, por nós utilizada, foi isolada a partir do sangue de um paciente com diagnóstico positivo para histoplasmose acompanhado clinicamente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A cepa foi mantida na fase miceliar em meio Agar sabouraud (Difco, Detroit, Michigan) em temperatura ambiente (25°C). Para obtenção de leveduras, a forma de micélio foi convertida através do cultivo a 37°C, em meio sólido BHI-ágar (Difco, Detroit, Michigan) suplementado com 5% de hemácias de carneiro, 0,01% de L-cisteína (ACROS Organics, New Jersey, USA) e 0,05% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MA. Após 21 dias de incubação em estufa 37°C e 5% CO<sub>2</sub> as leveduras foram

---

retiradas e coletadas em solução salina tamponada (PBS). Alíquotas desta amostra foram submetidas ao teste de viabilidade com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio (Sigma Chemical Co., St Louis USA) (76). As amostras foram utilizadas quando a viabilidade foi igual ou superior a 90%.

### **3.3. Infecção pulmonar com *H. capsulatum* através da inoculação intratraqueal**

Os camundongos WT e 5LO<sup>-/-</sup> foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com 2,2,2- Tribromoetanol 99% (ACROS), na concentração de 2,5% em PBS, na dose de 250mg/Kg de animal. Para a inoculação das leveduras de *H. capsulatum*, os animais tiveram suas traquéias expostas sendo inoculadas i.t. com 100µL da suspensão 3x10<sup>6</sup> leveduras viáveis. Os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e receberam i.t. 100µL de PBS estéril.

### **3.4. Análise da sobrevivência e proteção de camundongos infectados com *H. capsulatum***

Animais do grupo WT e 5-LO<sup>-/-</sup> foram infectados com 3x10<sup>6</sup> leveduras viáveis de *H. capsulatum* e a sobrevivência foi acompanhada até 120 dias após a infecção. A morte dos animais dos diferentes grupos foi registrada diariamente, e a curva de sobrevivência determinada.



### **3.5. Determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) no baço e no pulmão de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum***

Animais infectados com *H. capsulatum* foram mortos após 7 e 14 dias de infecção e tiveram o baço e o pulmão removidos e submetidos à pesagem em placas de petri (Falcon, BD, Franklin Lakes, N.J.) contendo 3 mL de RPMI-I (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA).

A suspensão de células do baço foi obtida através da dispersão de células dos órgãos em peneiras de nylon. Após a obtenção da suspensão, 200µL das amostras foram adicionadas em placas de petri (Falcon, BD, Franklin Lakes, N.J.) contendo BHI-ágar (Difco Laboratories, Detroit, Mich) suplementado com 5% de hemácia de carneiro, em duplicata para cada baço. Após 15 dias de cultivo em estufa 37°C, o número de UFC foi contado e o valor corrigido em UFC por órgão.

Após a pesagem do segundo lóbulo esquerdo do pulmão dos animais, estes foram cortados em pequenos fragmentos e colocados em tubos cônico de 50mL contendo meio RPMI-I acrescido 0,5µg/mL de colagenases (Liberase Blendzymes, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN, USA) e incubados a 37°C, durante 30 minutos sob agitação (agitador orbital a 150 rpm, Incubator Shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). Decorrido o tempo de incubação, a dispersão das células pulmonares foi realizada com auxílio de uma seringa de 10mL. Alíquotas de 200µL da suspensão celular de cada amostra foram adicionadas em placas de petri (Falcon, BD, Franklin Lakes, N.J.) contendo BHI-ágar (Difco Laboratories, Detroit, Mich) suplementado com 5% de hemácia de carneiro em duplicatas

---

para cada baço. Após 15 dias de cultivo em estufa 37°C, o número de UFC foi contado e o valor corrigido UFC por grama de tecido.

### **3.6. Obtenção, contagem total e diferencial das células do lavado bronco-alveolar**

As células do lavado bronco-alveolar foram obtidas através da inserção de um cateter acoplado a uma seringa contendo 1mL de PBS estéril. Este procedimento foi repetido 3 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. O exsudato foi coletado individualmente de cada animal e adicionados separadamente em tubos de plásticos. A contagem de células totais presentes nos lavados foi feita empregando solução de Turk e câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram feitas a partir de esfregaço preparado em citocentrífuga (Cytospin 3, Shadon Souther Products Ltd., Cheshire, UK) e submetidas a coloração por Panótico Rápido (Laborclin LTDA, Pinhais, Paraná, Brasil)

### **3.7. Imunofenotipagem de células dos pulmões de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum***

A mesma suspensão celular obtida no item 3.5. foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL e 100µl de cada amostra foi adicionada em tubos apropriados para citometria de fluxo. Em seguida, anticorpo anti-CD16/CD32 foi adicionado aos tubos para o bloqueio de ligações inespecíficas da porção Fc do anticorpo. Após a incubação de 40 minutos a 4°C, foram adicionados anticorpos específicos anti-CD4 (PerCP), anti-CD8 (PerCP) , anti-CD44 (FITC), anti-

---

CD62L (PE) (BD Biosciences) e seus respectivos isotipos controles. Após 30 minutos de incubação a 4°C no escuro, as células foram lavadas com 2mL de PBS acrescido 2 % de soro bovino fetal (SBF), centrifugadas a 1500 rpm, por 10 min e em seguida ressuspensas em PBS contendo 1% de formaldeído. As análises foram feitas por porcentagem de células positivas através de Dot Plot e intensidade fluorescência para seleção das populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que apresentam perfil de expressão CD44<sup>hi</sup> e CD62<sup>low</sup>. Todas as amostras foram analisadas em citometro de fluxo FacSort (Becton and Dickinson, San Jose, CA) com auxílio do software CellQuest.

### **3.8. Preparação dos homogeneizados de pulmões para dosagem de citocinas e leucotrienos**

Após a coleta do exsudato do LBA, os pulmões dos animais foram retirados após 2, 7, 14 dias de infecção com *H. capsulatum*. Os órgãos foram armazenados em freezer -70°C até o momento da dosagem. Para quantificação das citocinas e leucotrienos, 2mL de RPMI-I foram adicionados aos respectivos tubos e realizado a homogeneização do tecido (Ultraturrax T 50 IKA – Labortechnik, Germany). Após a homogeneização, o lisado celular total foi centrifugado a 4°C por 15 min a 4000 rpm (centrífuga Avanti 30, Beckman). A seguir, o sobrenadante foi coletado e submetido à dosagem de citocinas e leucotrienos.

### 3.9. Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Empregando o método de ELISA, a quantificação das citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  (BD OptEIA – BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) foi feita empregando anticorpos específicos (purificados e biotinilados) e citocinas-padrões, de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos de captura foram diluídos em tampão carbonato de sódio pH 9,5 (BD OptEIA) e adicionados 100 $\mu$ L/poço, na concentração indicada pelo fabricante. Após a incubação das placas durante uma noite a 4°C, as mesmas foram lavadas 3 vezes com solução tamponada com fosfato 0,05% de Tween 20 (Sigma, St Louis, MO) (tampão de lavagem). Após as sucessivas lavagens e secagem das placas foi adicionado 200 $\mu$ L/poço de tampão fosfato com 1% de BSA (tampão bloqueio) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) seguido de incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados 3 vezes com tampão de lavagem e então adicionados 100 $\mu$ L das amostras para a quantificação das citocinas. A curva-padrão com as citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  recombinantes (BD OptEIA) variou nas concentrações de 15 a 2.500 pg/mL. Estas foram incubadas durante uma noite a 4°C. Depois de repetido o procedimento de lavagem da placa, foi adicionado 100 $\mu$ L/poço dos anticorpos de detecção biotinilados, na concentração indicada pelo fabricante. Anticorpos biotinilados para citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  foram diluídos em tampão bloqueio e a placa incubada por 2 horas. Após a incubação foi repetido novo ciclo de lavagem, e em seguida feito a amplificação da reação pela adição de 100 $\mu$ L/poço de estreptoavidina/biotina (BD OptEIA) e incubado por 1 hora à

temperatura ambiente. Após a adição da enzima, foi adicionado ao poço o volume de 100µL da solução de substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reagente A e Reagente B, BD OptEIA) e a placa incubada por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. A reação foi bloqueada adicionando 50µL/poço de 1M de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A densidade óptica (D.O.) foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca (BioTec Instruments, Inc. - µQuant) com filtro de 450 nm e a concentração de citocinas calculada a partir da curva padrão, sendo o limite de variação de detecção das citocinas de 4000 a 15 pg/mL.

### **3.10. Purificação e detecção de leucotrienos B<sub>4</sub> em homogeneizados de pulmões de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum***

A detecção de LTB<sub>4</sub> nos homogeneizados de pulmões foi feita por ensaio imunoenzimático de competição (EIA, Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Para tanto antes de iniciar a detecção dos leucotrienos, as frações lipídicas das amostras foram purificadas em colunas Sep Pack C18 (Water Associates, Midford, Mass.) conforme recomendado pelo fabricante. As amostras foram acidificadas com HCl 1N e vagarosamente adicionadas nas colunas Sep Pack C18 (Water Associates, Midford, Mass.), previamente tratadas com 20mL de etanol 35% e 20mL de água. As frações lipídicas foram eluídas em 2mL de etanol absoluto e posteriormente secas em “speed vacuum”. Em seguida, as amostras foram reconstituídas em 250µL de solução tamponada (Tampão EIA, Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Foi adicionado o volume de 100µL de cada amostra em placa de 96 poços

fornecida pelo fabricante e a reação enzimática de competição foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (EIA, Amershan Biosciences, Piscataway, NJ, USA). A D.O. foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca (BioTec Instruments, Inc. -  $\mu$ Quant) com filtro de 450 nm e a concentração de  $LTB_4$  foi calculada a partir da curva padrão.

### **3.11. Detecção de nitrito ( $NO_2^-$ ) no soro e no homogeneizado de pulmões de camundongos infectados com *H. capsulatum*.**

A detecção da produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada através da dosagem de nitrito ( $NO_2^-$ ) pelo método de Greiss. Para a dosagem de nitrito, 100 $\mu$ L do homogeneizado do pulmão foram adicionados à 100 $\mu$ L do reagente de Greiss, composto de uma solução de 1:1 de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a D.O. foi avaliada em espectrofotômetro de microplaca (BioTec Instruments, Inc. -  $\mu$ Quant) com filtro de 540 nm. Para determinação quantitativa de nitrito, na mesma placa foi preparado uma curva de nitrito de sódio variando na concentração de 3,12 a 200  $\mu$ M. Os dados estão apresentados em micromoles de  $NO_2^-$ .

### **3.12. Obtenção e cultivo de macrófagos alveolares**

Células do espaço bronco-alveolar foram isoladas de ratos Wistar saudáveis. Os animais foram mortos utilizando o anestésico 2,2,2-Tribromoethanol na concentração de 2,5% em PBS, na dose de 250 mg/kg. As células foram obtidas através da administração de 50mL de PBS estéril gelado

pela via intratraqueal através da utilização de um cateter. Esse procedimento foi repetido 2 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. Os lavados coletados foram adicionados em tubos plásticos de 50ml e submetidos a centrifugação por 10 minutos a 1.500 rpm e reconstituídos em RPMI-1640 (RPMI-I). A contagem do número total de células e sua viabilidade foi feita empregando corante de Azul de Trypan em câmara de Neubauer. A quantidade de célula foi ajustada para  $2 \times 10^5$ /poço e incubadas em RPMI-I por 1h em “chamber slides” (BD Falcon – BD Biosciences Discovery Labware, Two Oak Park, Bedford, MA, USA). Após o período de incubação as células foram lavadas 2 vezes com RPMI-I para remoção de células não aderentes e acrescentado 200µL RPMI contendo 10% de soro bovino fetal (RPMI-C) e incubado por um período de 18h a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> (77).

### **3.13. Opsonização de leveduras de *H. capsulatum***

Após a obtenção e contagem de leveduras do fungo estas foram opsonizadas com 10% soro imune de rato e incubados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, por 40 min. Após este período a suspensão foi lavada e centrifugada 1500rpm por 10 min. A proporção de leveduras utilizada neste trabalho foi 3:1 (leveduras:macrófago alveolar) adaptado (78).

### **3.14. Ensaio de fagocitose.**

Macrófagos alveolares, obtidos conforme descrito anteriormente, foram pré-tratados por um período de 20 minutos com seguintes drogas:

- inibidor da enzima 5-lipoxigenase: 10µM Zileuton (Biomol)

- antagonista do receptor BLT<sub>1</sub>: 1μM CP105-696 (Biomol)
- antagonista do receptor cys-LT<sub>1</sub>: 1μM MK571 (Biomol)
- LTB<sub>4</sub> 10nM (Biomol)
- LTC<sub>4</sub> 100nM (Biomol)

As concentrações das drogas foram utilizadas conforme descrito previamente por Mancuso et al. (77). Nos poços restantes foram adicionados volumes equivalentes de RPMI-C. Após o pré-tratamento ou não com as respectivas drogas as leveduras de *H. capsulatum* previamente opsonizadas com soro imune (3:1) foram adicionadas e incubadas por um período de 4 h. Esse período de incubação foi determinado após realização prévia de ensaio de cinética de fagocitose (dados não mostrados). Os sobrenadantes foram retirados e em seguida realizados a lavagem dos poços (“chamber slides”) com PBS aquecido a 37°C para retirada de leveduras não fagocitadas. Após a secagem das lâminas as mesmas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin LTDA, Pinhais, Paraná, Brasil). O total de 100 células foram enumeradas em microscópio ótico. O índice fagocítico foi determinado através da multiplicação das células contendo pelo menos uma ou mais leveduras multiplicado pelo número de leveduras e dividido pelo número de células positivas (células contendo leveduras).

$$\text{Índice Fagocítico (IF)} = \frac{\text{células fagocíticas} \times \text{n}^{\circ} \text{ de leveduras}}{\text{células positivas}}$$



**3.15. Análise estatística**

O teste Análise da Variância (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni de múltipla comparação foi utilizado para análise das diferenças entre os grupos experimentais em todas as análises. A significância estatística foi considerada para valores de  $P < 0,05$

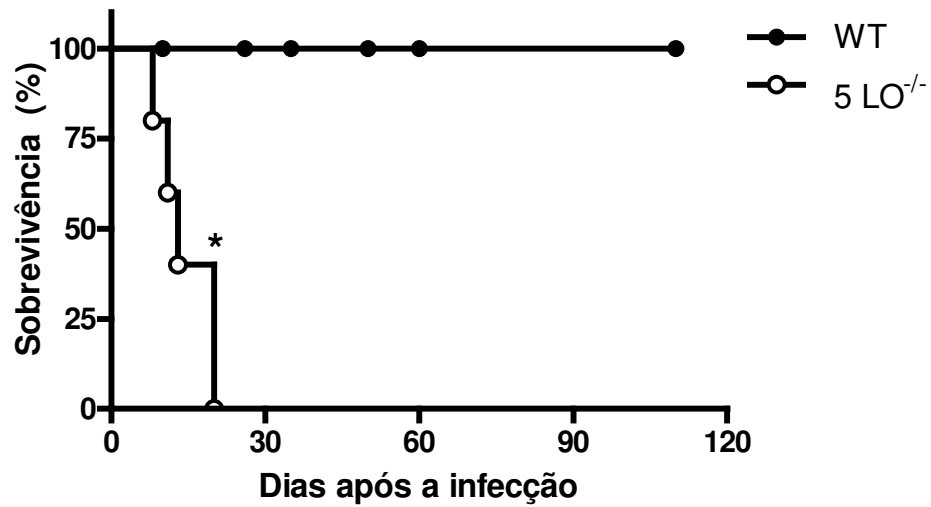
## ***RESULTADOS***

---

#### **4.1. Análise da sobrevivência de camundongos WT e 5 LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum*.**

Para determinarmos o papel de leucotrienos na histoplasmose pulmonar murina, inicialmente avaliamos a sobrevivência de animais 5-LO<sup>-/-</sup> (deficientes da enzima 5-LO) infectados com *H. capsulatum*.

Nossos resultados demonstram que 100% dos animais WT sobreviveram até 120 dias após a infecção (período final de observação), enquanto animais 5-LO<sup>-/-</sup> tiveram 100% de mortalidade no período avaliado. Vale ressaltar que os animais deficientes de 5-LO morrem durante o primeiro mês de infecção. O perfil de mortalidade dos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> foi semelhante ao observado anteriormente com animais infectados e tratados com MK886 (47).



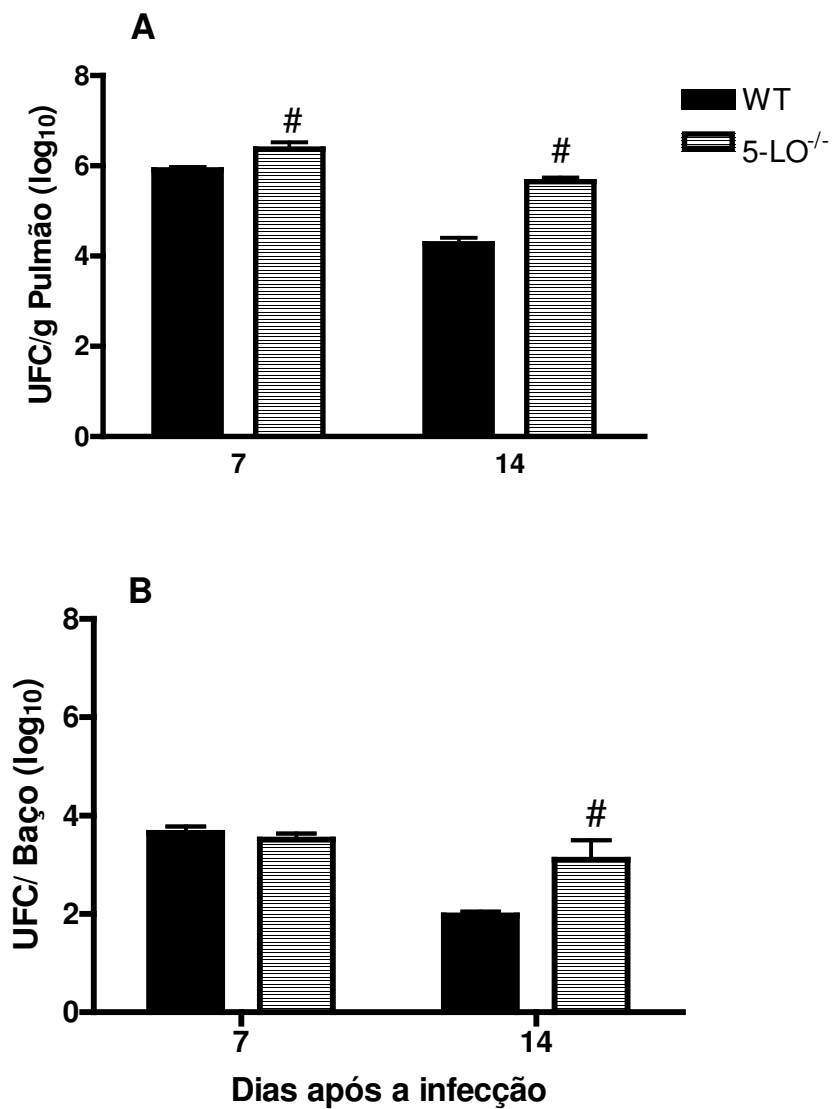
**Figura 1. Papel de leucotrienos na sobrevivência de camundongos infectados com *H. capsulatum*.** Curva de sobrevivência dos animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> infectados i.t. com  $3 \times 10^6$  leveduras em 100 $\mu$ L e acompanhados por 120 dias após a infecção. Dados representativos de dois experimentos (n= 6). \* WT versus 5-LO<sup>-/-</sup>. P< 0,05.

#### **4.2. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas dos pulmões e baços de animais infectados *H. capsulatum*.**

Nossos resultados demonstram um aumento na susceptibilidade em animais 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum* quando comparados com animais WT. Desta forma, nosso próximo passo foi comprovar se a diminuição na sobrevivência no animais 5-LO<sup>-/-</sup> estaria relacionada com a multiplicação e disseminação do fungo para estes órgãos.

Assim, realizamos a recuperação de UFC a partir de pulmões e baços obtidos de animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum*. O número de UFC recuperadas de pulmões de animais WT infectados com *H. capsulatum* diminuiu no decorrer da infecção (Figura 2A). No entanto, nos pulmões de animais 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com o fungo observamos um aumento na recuperação de 0,3 log<sub>10</sub> e 1,4 log<sub>10</sub> nos 7° e 14° dia de infecção, respectivamente, quando comparado com os valores obtidos em animais WT infectados (Figura 2A).

A recuperação de UFC nos baços dos animais WT infectados com *H. capsulatum* diminuiu no decorrer da infecção (Figura 2B). No entanto, nos baços de animais 5-LO<sup>-/-</sup> infectados observamos um aumento de 1,12 log<sub>10</sub> de UFC quando comparado com animais do grupo WT infectados (Figura 2B).



**Figura 2.** Avaliação da carga fúngica no pulmão e no baço de camundongos infectados WT e 5-LO<sup>-/-</sup> com *H. capsulatum*. UFC recuperadas dos pulmões (A) e baços (B) de animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum* após 7 e 14 dias de infecção. Os resultados estão expressos como média ± SEM (n=6). # WT versus 5LO<sup>-/-</sup>. P < 0,05. Animais 5-LO<sup>-/-</sup> infectados morreram até 20 dias após a infecção.

### **4.3. Cinética de migração de células inflamatórias no lavado bronco-alveolar de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.**

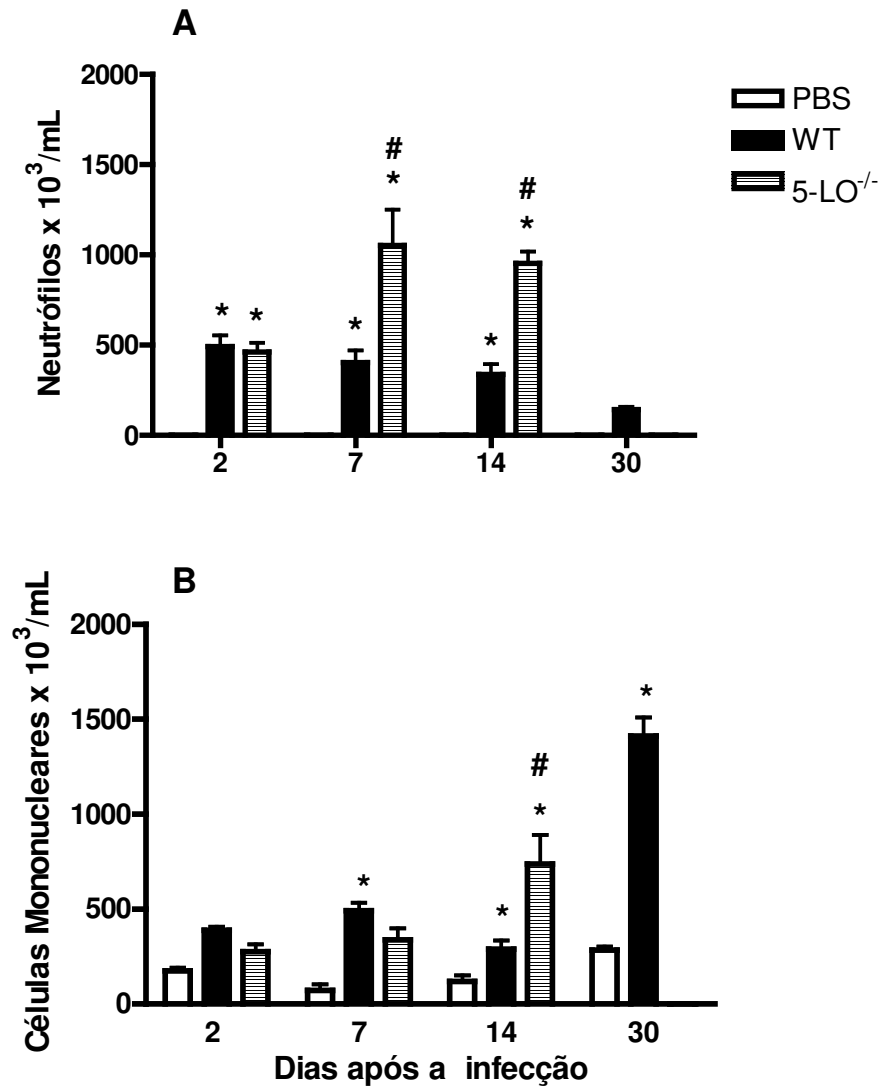
A partir dos resultados obtidos na análise de sobrevivência, nosso próximo passo foi avaliar se a mortalidade de 100% dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> estaria associada ao recrutamento de células para o local da infecção.

Nossos resultados demonstram que infecção i.t com *H. capsulatum* induziu um intenso infiltrado neutrofílico para o espaço bronco-alveolar (Figura 3A) de animais WT entre o 2° e 30° dias da infecção pelo fungo quando comparado com os resultados obtidos pelo grupo controle, que recebeu apenas PBS. O recrutamento de neutrófilos diminuiu progressivamente durante o curso da infecção, no entanto, mesmo após 30 dias, foi ainda observado a presença de neutrófilos em número superior ao obtido em animais do grupo controle. No entanto, observamos um aumento no recrutamento de neutrófilos para espaço bronco-alveolar de animais 5-LO<sup>-/-</sup> de aproximadamente 250% e 290% no 7° e 14° dia de infecção respectivamente, quando comparado com o grupo de animais WT (Figura 3A).

O influxo de células mononucleares para espaço bronco-alveolar em resposta ao fungo foi estatisticamente significativa a partir do 7° dia de infecção e aumentou progressivamente até o 30° dia de infecção quando comparado com animais injetados com PBS (período final de observação) (Figura 3B). No entanto, observamos um aumento estatisticamente significativo no número de células mononucleares para o espaço bronco-alveolar de animais 5-LO<sup>-/-</sup> a partir 14° de infecção quando comparado com grupo WT infectado. Como podemos observar na Figura 3A e 3B não foi possível avaliar o recrutamento

de células para o espaço bronco-alveolar de animais 5-LO<sup>-/-</sup> no 30º dia de infecção devido a morte dos mesmo até o 20º dia de infecção.





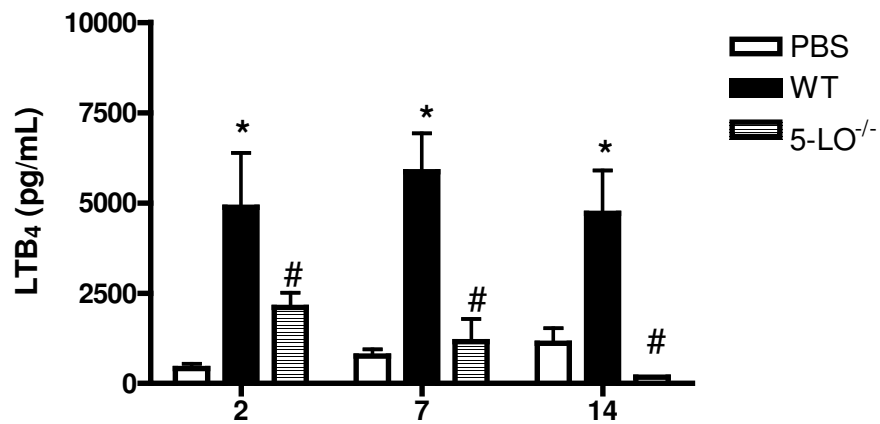
**Figura 3. Cinética da migração de neutrófilos e células mononucleares para o espaço bronco-alveolar de camundongos infectados com *H. capsulatum*.** Camundongos WT e 5-LO<sup>-/-</sup> foram infectados i.t. com 3x10<sup>6</sup> leveduras de *H. capsulatum*. Animais controles receberam 100μL de PBS estéril. Os resultados estão expressos como média ± SEM (n=6). \* WT e 5-LO<sup>-/-</sup> versus PBS, # WT versus 5-LO<sup>-/-</sup>. P < 0,05. Animais 5-LO<sup>-/-</sup> infectados morreram até 20 dias após a infecção.

#### **4.4. Quantificação de leucotrieno B<sub>4</sub> em homogeneizado de pulmões de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.**

Uma vez demonstrado que animais deficientes da 5-LO são mais susceptíveis a infecção por *H. capsulatum*, avaliamos se LTB<sub>4</sub> é produzido nos pulmões de camundongos infectados.

Nossos resultados demonstram que a infecção pelo *H. capsulatum* induziu a produção de LTB<sub>4</sub> por células de pulmões a partir do 2º dia de infecção e durante todo o curso da infecção quando comparado com animais injetados com PBS. (Figura 4).

Os níveis de LTB<sub>4</sub> nos pulmões de animais deficiente da enzima 5-LO (5-LO<sup>-/-</sup>) foram drasticamente inibidos quando comparado aos valores obtidos em animais do grupo WT. Os pulmões obtidos de animais WT infectados com *H. capsulatum* tiveram um aumento que variou de 231% a 6834% entre o 2º e 14º dias de infecção comparado com os valores obtidos em animais do grupo 5-LO<sup>-/-</sup> (Figura 4A). No entanto, vale ressaltar que, para nossa surpresa os valores detectados nos pulmões de animais 5-LO<sup>-/-</sup> foram semelhantes, com exceção no 2º dia de infecção, aos valores basais encontrados em animais do grupo WT injetados apenas com PBS.



**Figura 4. Produção de LTB<sub>4</sub> por células do pulmão de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.** Concentração de LTB<sub>4</sub> no sobrenadante de homogeneizado de pulmões de animais infectados com *H. capsulatum* em diferentes dias de infecção. Animais controles receberam 100μL de PBS estéril. Os resultados estão expressos como média ± SEM (n=6) de 2 experimentos diferentes. \* WT e 5-LO<sup>-/-</sup> versus PBS, # WT versus 5-LO<sup>-/-</sup>. P < 0,05.

#### **4.5. Quantificação de citocinas em sobrenadante de homogeneizado pulmonar de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.**

Para avaliarmos se a diminuição na sobrevivência, aumento das UFC e aumento exacerbado de recrutamento de neutrófilos para o espaço bronco alveolar nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> estaria associado à produção de citocinas no local da infecção, quantificamos IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  no sobrenadante do homogeneizado de pulmão nos diferentes grupos experimentais.

A liberação de IL-1 $\alpha$  por células de pulmões de animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com o fungo foi aumentada a partir do 2º dia e permaneceu constante durante todo o curso da infecção quando comparado com o grupo de animais que receberam PBS. No entanto, no 14º dia de infecção a síntese de IL-1 por células de pulmões de animais 5-LO<sup>-/-</sup> foi aumentada 115% quando comparado com grupo WT (Figura 5A).

A síntese de IL-6 foi aumentada em células do pulmão de animais WT infectados apenas no 2º dia de infecção quando comparado com animais que receberam PBS. No entanto, a síntese deste mediador diminuiu gradativamente durante o curso de infecção. No entanto, entre o 2º e 7º dia de infecção houve um aumento de 132% e 238%, respectivamente, na produção de IL-6 em células de pulmão de animais 5-LO<sup>-/-</sup> quando comparado com o grupo WT. A partir do 14º dia de infecção não houve diferença estatisticamente significativa quanto a produção de IL-6, entre os grupos experimentais (Figura 5B).

A liberação de TNF- $\alpha$  por células do pulmão de animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum* foi aumentada a partir do 2º dia de infecção quando comparado com o grupo que recebeu apenas PBS. A produção de TNF- $\alpha$  por células do pulmão de animais WT diminuiu gradativamente no decorrer da infecção. No entanto, entre o 7º e 14º dia de infecção houve um aumento estatisticamente significativo de 152% e 244% na produção desta TNF- $\alpha$  por células pulmão de animais 5-LO<sup>-/-</sup> quando comparado com o grupo WT (Figura 5C).

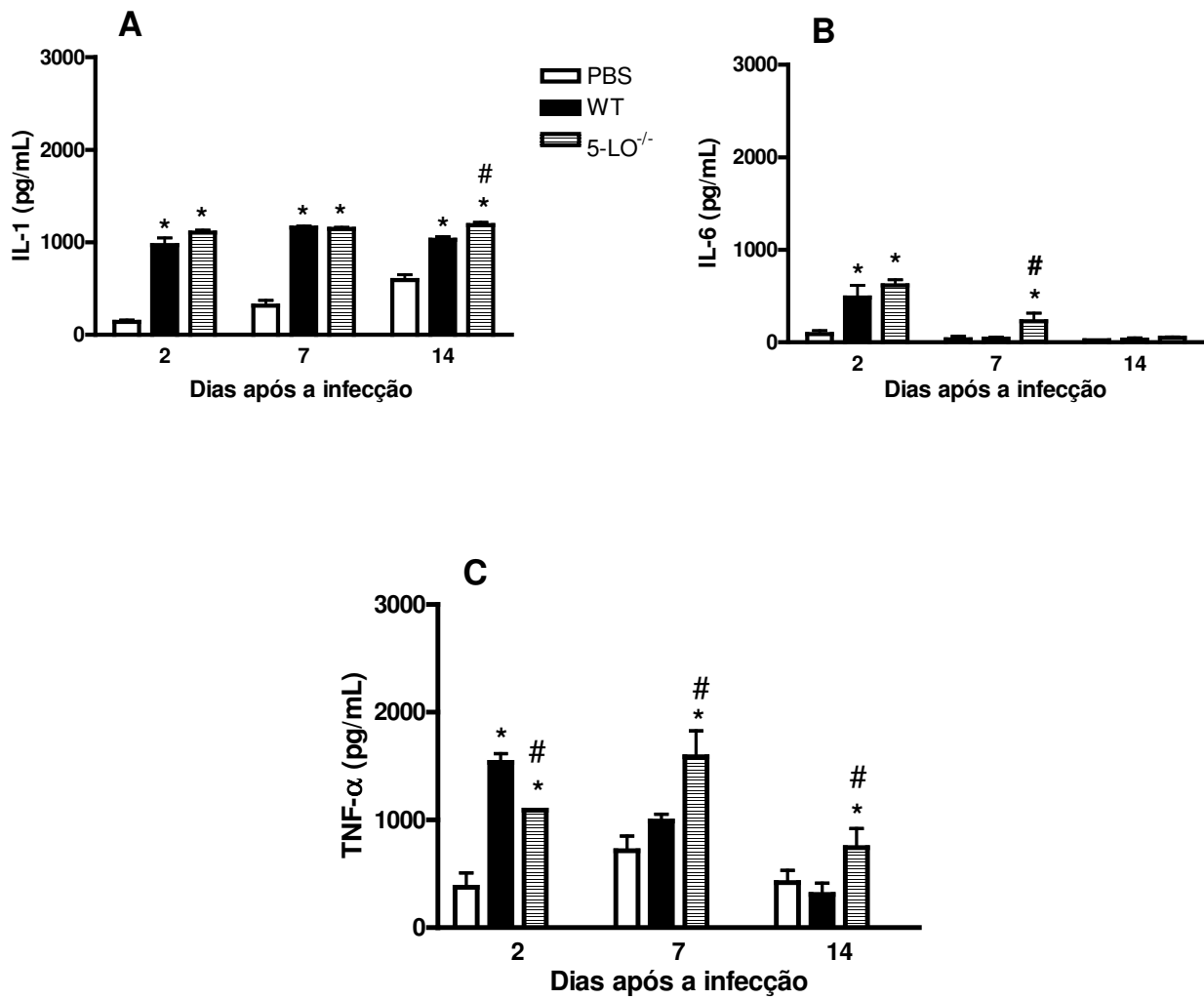
A produção de IL-12 por células de pulmões de animais WT infectados com *H. capsulatum* foi elevada a partir do 2º dia de infecção e permaneceu contanto durante todo o curso da infeccao quando comparado com os animais que receberam PBS. No entanto, entre o 2º e o 7º dia após a infecção foi observado o aumento não significativo de 145% e 118% respectivamente na produção de IL-12 por células de pulmões de animais 5-LO<sup>-/-</sup> quando comparado aos animais WT. No entanto, no 14º dia de infecção foi observado uma diminuição de 76% da síntese de IL-12 por células de pulmões de animais 5-LO<sup>-/-</sup> quando comparado ao grupo WT infectados com *H. capsulatum* (Figura 6A).

A produção de IFN- $\gamma$  por células de pulmões de animais infectados com *H. capsulatum* foi elevada apenas a partir do 7º dia e diminui a partir do 14º dia de infecção quando comparado com os animais que receberam PBS. No entanto, no 7º e 14º dia de infecção houve um aumento estatisticamente significativo de 189% e 273% respectivamente de produção de IFN- $\gamma$  por

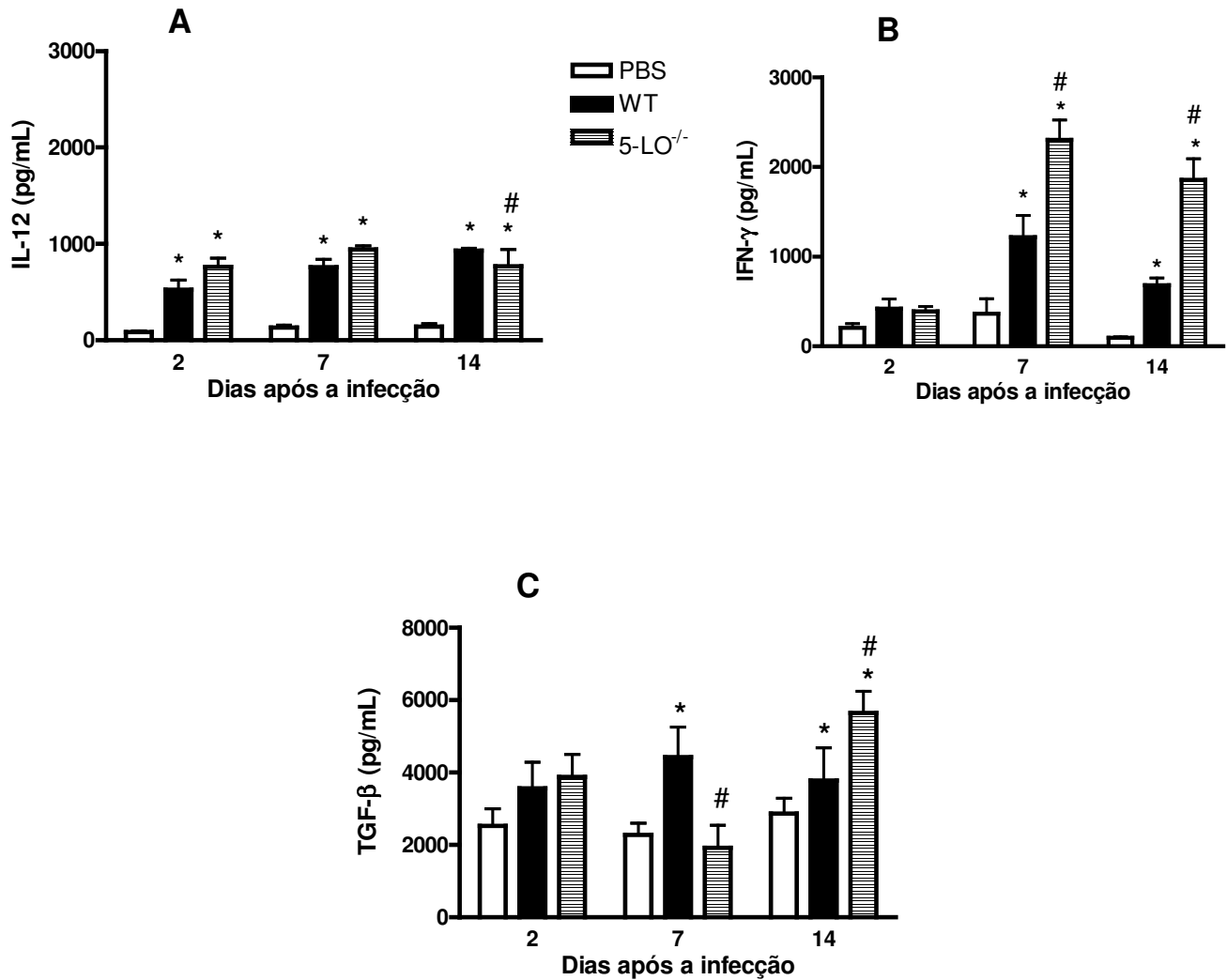
---

células de pulmões de animais 5-LO<sup>-/-</sup> quando com grupo WT infectados com *H. capsulatum* (Figura 6B).

A produção de TGF- $\beta$  por células de pulmões de animais WT e 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum* foi estatisticamente significativa entre o 7° e 14° dia de infecção quando comparado com grupo que recebeu PBS. No entanto, no 14° dia de infecção houve um aumento de 184% na a produção de TGF- $\beta$  por células de pulmões de animais 5-LO<sup>-/-</sup> quando comparado aos valores obtidos no grupo WT (Figura 6C).



**Figura 5. Produção de citocinas por células do pulmão de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.** Concentração de IL-1 (A), IL-6 (B) e TNF- $\alpha$  (C) no sobrenadante do homogeneizado de pulmões de animais infectados com *H. capsulatum*. Animais controles receberam 100 $\mu$ L de PBS estéril. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM (n=6) de 2 experimentos diferentes. \* WT e 5-LO<sup>-/-</sup> versus PBS, # WT versus 5-LO<sup>-/-</sup>. P < 0,05.



**Figura 6. Produção de citocinas por células do pulmão de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.** Concentração de IL-12 (A), IFN- $\gamma$  (B) e TGF- $\beta$  (C) no sobrenadante do homogeneizado de pulmões de animais infectados com *H. capsulatum*. Animais controles receberam 100 $\mu$ L de PBS estéril. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM (n=6) de 2 experimentos diferentes. \* WT e 5-LO<sup>-/-</sup> versus PBS, # WT versus 5-LO<sup>-/-</sup>. P < 0,05.



#### **4.6. Detecção de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no soro e no sobrenadante de homogeneizado de pulmão de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.**

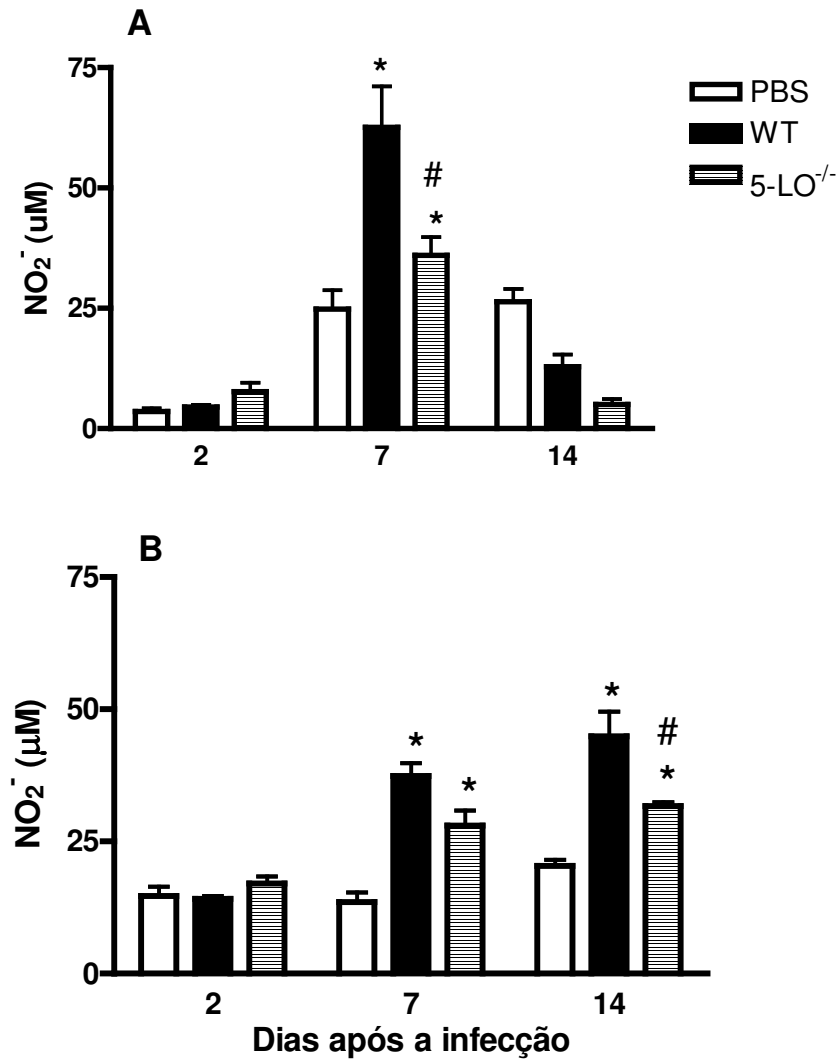
Para avaliarmos se a diminuição na sobrevivência em animais  $5\text{-LO}^{-/-}$  poderia estar associada à deficiência na produção de óxido nítrico, um importante radical livre envolvido na atividade fungicida de macrófagos alveolares e peritoneais (67, 68), avaliamos a produção de nitrito no soro e no sobrenadante de homogeneizado de pulmão de animais dos diferentes grupos experimentais.

O soro dos animais infectados com *H.capsulatum* foi obtido através da coleta do sangue nos períodos de 2, 7 e 14 dias de infecção. No 2º e 14º dia de infecção não houve diferença na produção de  $\text{NO}_2^-$  em nenhum dos grupos experimentais avaliados. No 7º dia de infecção a produção de  $\text{NO}_2^-$  foi aproximadamente 240% maior no soro dos animais WT quando comparado com o grupo controle. No entanto, apenas no 7º dia de infecção por *H. capsulatum* foi observada uma inibição de 57% na síntese de  $\text{NO}_2^-$  quando comparado com o grupo WT infectado (Figura 7A).

No sobrenadante de homogeneizado de pulmão não foi observado diferenças significativas entre os grupos analisados no 2º dia de infecção. No entanto, a partir do 7º e 14º dia de infecção foi observado um aumento de aproximadamente 277% e 221% respectivamente na produção de  $\text{NO}_2^-$  no pulmão de animais WT quando comparado com o grupo controle. No entanto, no pulmão de animais  $5\text{-LO}^{-/-}$  foi observado uma diminuição de 64% (não

---

estatisticamente significativo) e 70% na síntese de  $\text{NO}_2^-$  entre o 7° e 14° de infecção, respectivamente (Figura 7B)



**Figura 7. Produção de  $\text{NO}_2^-$  no soro e no sobrenadante de homogeneizado de pulmão de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.**

Produção de nitrito no soro (A) e no sobrenadante do homogeneizado de pulmões (B) de animais WT e 5- $\text{LO}^{-/-}$  infectados com leveduras de *H. capsulatum* e animais controles que receberam PBS. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM (n=5). \* WT e 5- $\text{LO}^{-/-}$  versus PBS, # WT versus 5- $\text{LO}^{-/-}$ . P < 0,05.

#### **4.7. Avaliação de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> efetoras no pulmão de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*.**

Uma vez demonstrado que existem diferenças na produção de citocinas e NO entre os camundongos WT e 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum*, avaliamos se existem diferença nas populações de células T.

Após 7, 14 e 30 dias de infecção por *H. capsulatum* as sub-populações de linfócitos T efetoras foram identificadas através de tripla marcação destas células com anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44, anti-CD62L. As análises foram feitas por porcentagem de células positivas através de Dot Plot e intensidade fluorescência para seleção das populações CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que apresentam perfil de expressão CD44<sup>hi</sup> e CD62<sup>low</sup>.

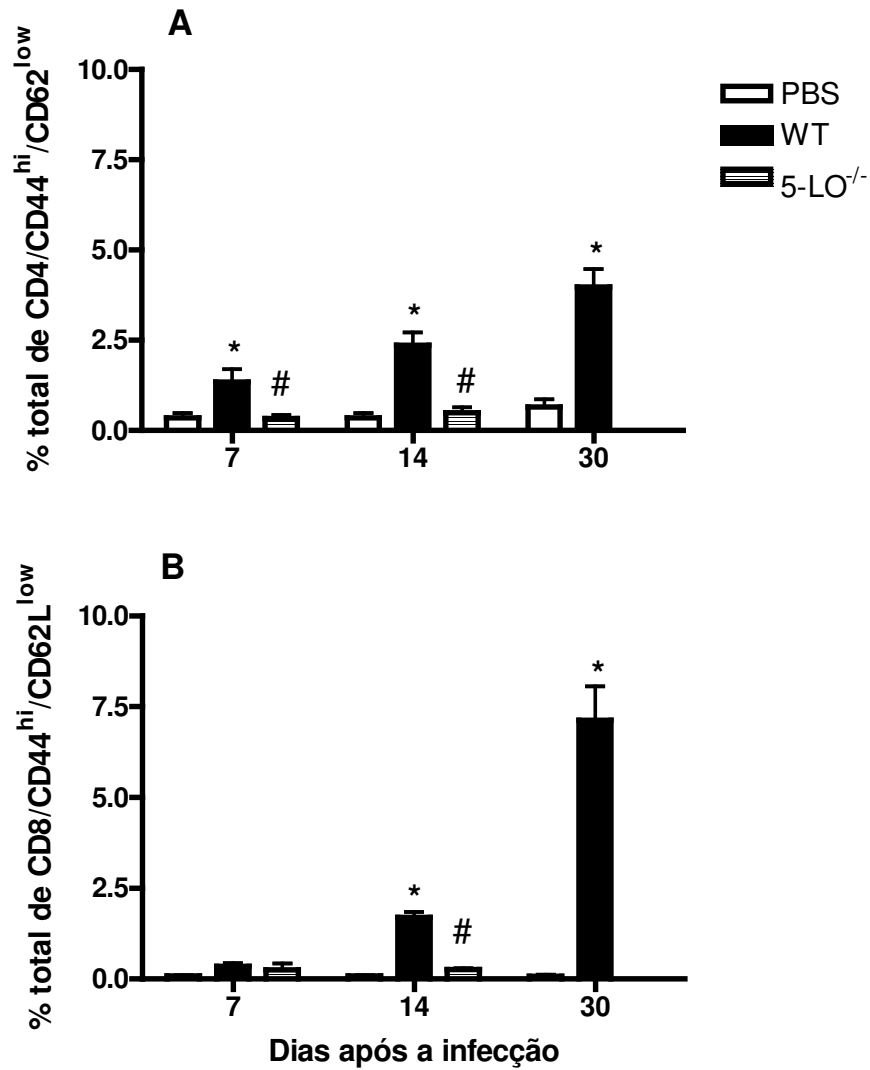
Nossos resultados demonstram que 7°, 14° e 30° dias após a infecção por *H. capsulatum* houve um aumento 10 e 50 vezes na porcentagem de linfócitos CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>hi</sup>/CD62L<sup>low</sup> no pulmão de animais do grupo WT quando comparado à porcentagem obtida nos pulmões de animais do grupo PBS. No entanto, após 7, 14 e 30 dias de infecção com *H. capsulatum* em animais 5-LO<sup>-/-</sup> foi observada a diminuição na porcentagem de linfócitos CD4<sup>+</sup>/CD44<sup>hi</sup>/CD62L<sup>low</sup> quando comparado à porcentagem obtida nos pulmões de animais WT infectados. A porcentagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> com fenótipo de célula efetora no pulmão de animais 5-LO<sup>-/-</sup> foi semelhante a observada em animais injetados com PBS (Figura 8A).

Além de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, nós também avaliamos o papel leucotrienos no recrutamento de linfócitos TCD8<sup>+</sup> com fenótipo de célula efetora (CD8<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>CD62<sup>low</sup>). Nossos resultados demonstram que 14 e 30 dias após a

---

infecção por *H. capsulatum* houve um aumento 10 e 100 vezes, respectivamente, na porcentagem de linfócitos CD8<sup>+</sup>/CD44<sup>hi</sup>/CD62L<sup>low</sup> no pulmão de animais do grupo WT quando comparado à porcentagem obtida nos pulmões de animais do grupo PBS. No entanto, apenas 14 dias após a infecção com *H. capsulatum* em animais 5-LO<sup>-/-</sup> foi observada a diminuição 3 vezes na porcentagem de linfócitos CD8<sup>+</sup>/CD44<sup>hi</sup>/CD62L<sup>low</sup> quando comparado à porcentagem obtida nos pulmões de animais WT infectados. A porcentagem de linfócitos TCD8<sup>+</sup> com fenótipo de célula efetora no pulmão de animais 5-LO<sup>-/-</sup> foi semelhante a observada em animais injetados com PBS no 7° e 14° dia após a infecção (Figura 8B).

No período 30° dia de infecção não foram determinadas as porcentagens de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>/CD44<sup>hi</sup>/CD62L<sup>low</sup> nos pulmões de animais 5-LO<sup>-/-</sup> devido à morte dos mesmos até 20 dias após a infecção por *H. capsulatum*.



**Figura 8.** Perfil de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> com fenótipo de células efetoras presentes nos pulmões de camundongos infectados ou não com *H. capsulatum*. Células de pulmão foram obtidas após 7, 14 e 30 dias após a infecção conforme descrito em material e métodos. Os linfócitos foram delimitados de acordo com parâmetros de tamanho (SSC) e granularidade (FSC). Em seguida, apenas linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A) e TCD8<sup>+</sup> (B) foram selecionados e avaliados quanto à expressão de CD44<sup>hi</sup> e CD62<sup>low</sup>. Os

---

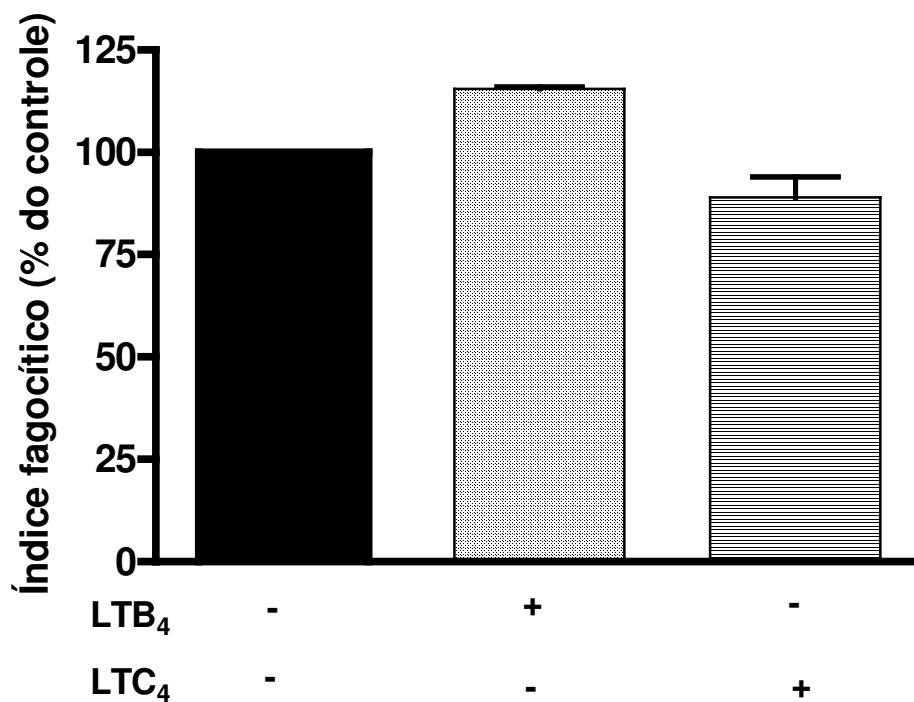
resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM (n=5). \* WT e 5-LO<sup>-/-</sup> versus PBS, # WT versus 5-LO<sup>-/-</sup>. P < 0,05.

---

#### **4.8. Participação de leucotrienos exógenos na fagocitose de macrófagos alveolares de ratos infectados com *H. capsulatum*.**

Para determinar a capacidade dos leucotrienos modularem a fagocitose de macrófagos alveolares (MA), examinamos o efeito da adição de LTB<sub>4</sub> (10nM) e LTC<sub>4</sub> (100nM) exógeno na fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com soro imune. Como demonstrado na Figura 9, a adição exógena de LTB<sub>4</sub> na cultura de MA apresentou um aumento de 15% a fagocitose de *H. capsulatum*, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. A adição exógena de LTC<sub>4</sub> não foi capaz de modular a capacidade fagocítica dos MA contra *H. capsulatum*.





**Figura 9. Papel dos leucotrienos exógenos na fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por MA.** MA obtidos de ratos Wistar foram incubados ou não com 10nM de LTB<sub>4</sub> e 100nM de LTC<sub>4</sub> por um período de 20 minutos antes da adição das leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com 10% soro imune na proporção de 3:1. Os MA infectados foram incubados por 4 horas para avaliação da capacidade fagocítica. A contagem de leveduras foi feita por microscopia óptica e o cálculo do índice fagocítico determinado conforme descrito no materiais e métodos. Dados são expressos como média ± SE de valores de triplicata de 1 de 2 experimentos representativos. \* MA (sem tratamento) versus MA incubado LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>. P < 0,05.

#### **4.9. Participação de leucotrienos endógenos na fagocitose de macrófagos alveolares de ratos infectados com *H. capsulatum*.**

Como mostrado na Figura 4, LTB<sub>4</sub> é produzido durante infecção por *H. capsulatum*. Assim, avaliamos se a geração de LTs seria importante no aumento da fagocitose de MA de ratos infectados com *H. capsulatum*. Para isso, MA foram pré-tratados com o inibidor da 5-LO, Zileuton, na presença ou não de LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> exógenos, seguido da adição de leveduras opsonizadas com soro imune.

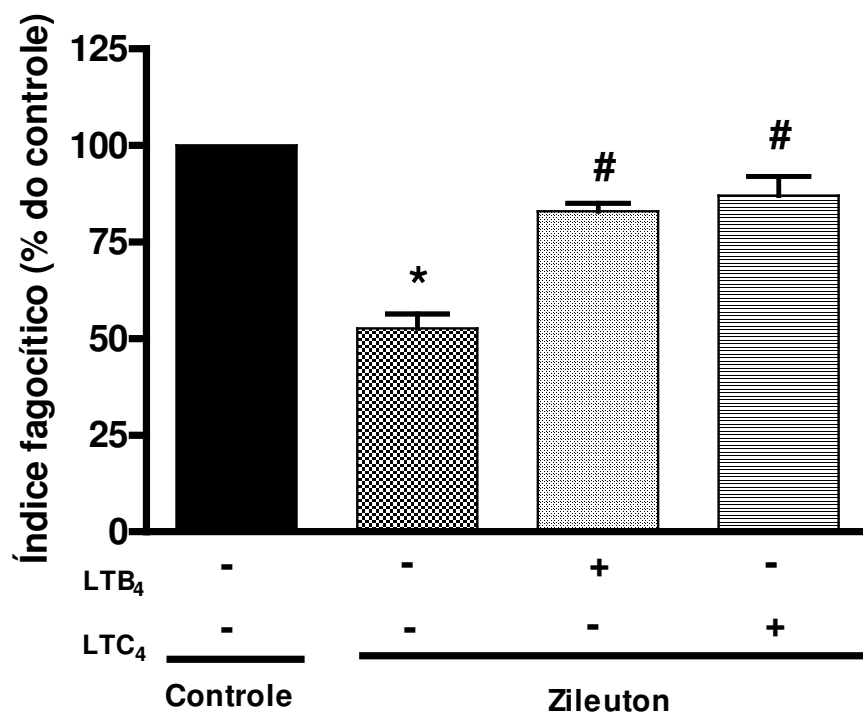
Nossos resultados demonstram que a inibição da síntese de leucotrienos, inibiu em aproximadamente 50% a capacidade fagocítica de MA infectados com *H. capsulatum* quando comparado com MA que não receberam tratamento com a droga (Figura 10). Além disso, a adição de LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> exógeno restaurou em 40% a capacidade fagocítica de MA tratados com inibidor da 5-LO (Zileuton) contra *H. capsulatum* (Figura 10).

Os dados acima mostram o papel do LTs endógenos, mas não distingue entre o LTB<sub>4</sub> e cys-LTs (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>). Para determinar o papel específico destes diferentes mediadores lipídicos na fagocitose de *H. capsulatum* por MA, utilizamos o antagonista do receptor BLT<sub>1</sub> (CP-105,696) para avaliar o papel do LTB<sub>4</sub> e antagonista de cys-LT<sub>1</sub> (MK 571) para avaliar o papel de cysLTs.

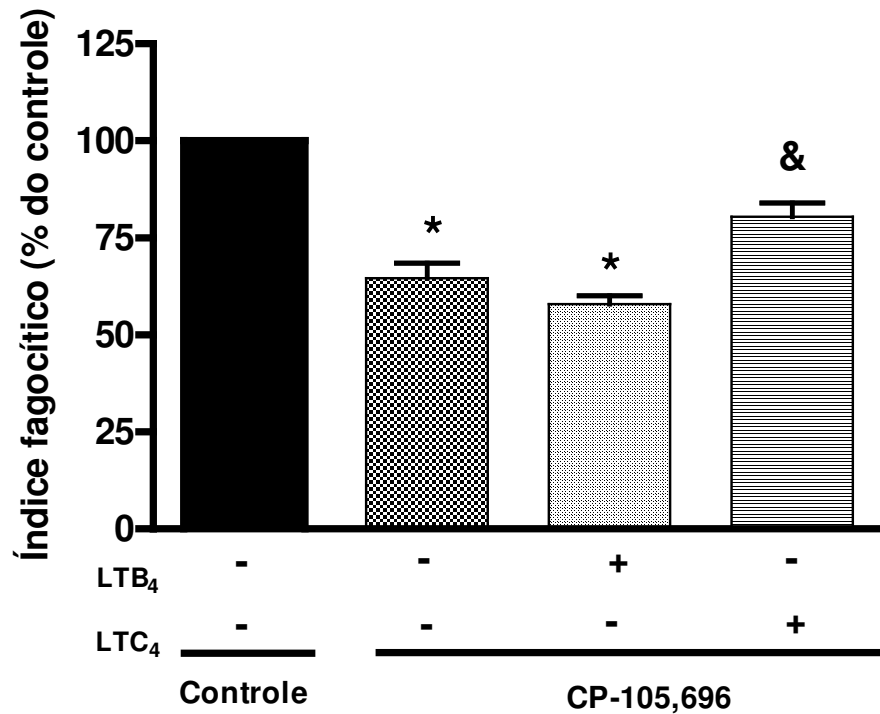
Tanto MA tratados com antagonista para receptor BLT<sub>1</sub> (Figura 11) como para cys-LT<sub>1</sub> (Figura 12) apresentaram diminuição de 50% da capacidade fagocítica. Para comprovar a especificidade do bloqueio do receptor através dos antagonistas foi adicionado os respectivos LTs exogenamente à cultura de

---

MA. O tratamento de macrófagos com antagonista de receptor BLT<sub>1</sub> e cys-LT<sub>1</sub> e adição de LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>, respectivamente, não reverteu a capacidade fagocítica. No entanto, a adição exógena de LTC<sub>4</sub> em macrófagos tratados com CP-105,696 (antagonista de LTB<sub>4</sub>) e a adição exógena de LTB<sub>4</sub> nos MA tratados com MK 571 (antagonista de LTC<sub>4</sub>) restaurou em 20% e 60%, respectivamente a capacidade fagocítica dos MA (Figura 11 e 12).



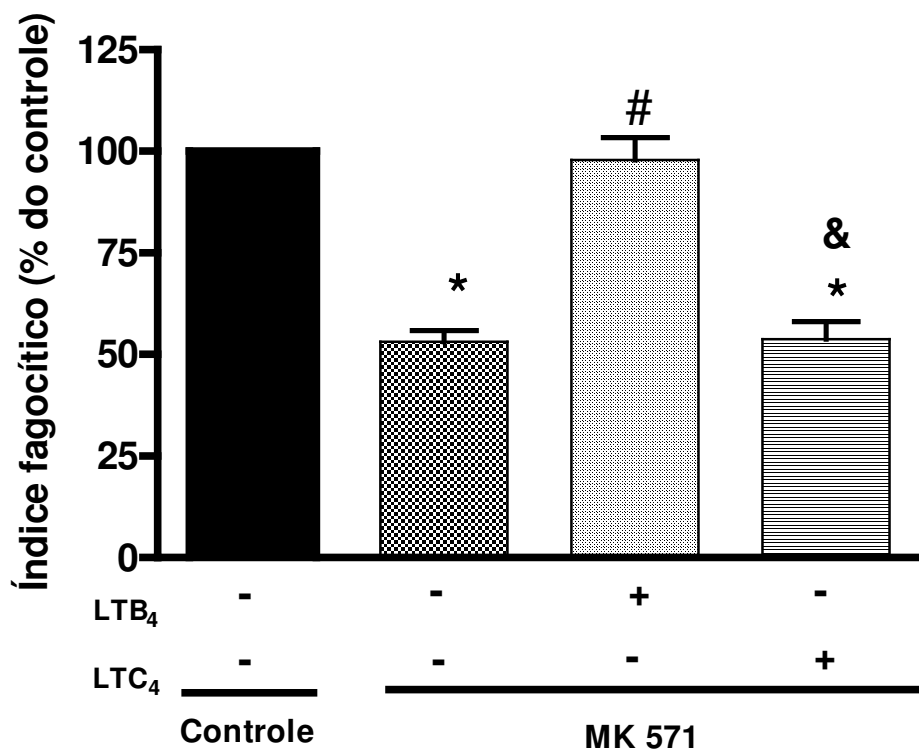
**Figura 10. Papel dos leucotrienos endógenos na fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por MA.** MA obtidos de ratos Wistar foram tratados ou não com 10 $\mu$ M de Zileuton (inibidor da 5-LO) por 20 minutos. Após este período foi adicionado ou não com 10nM de LTB<sub>4</sub> e 100nM de LTC<sub>4</sub> e incubado 20 minutos antes da adição das leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com 10% soro imune na proporção de 3:1. Os MA infectados com leveduras de foram incubados por 4 horas para avaliação da capacidade fagocítica. A contagem de leveduras foi feita por microscopia óptica e o cálculo do índice fagocítico determinado conforme em materiais e métodos. Dados são expressos como média  $\pm$  SE de valores de triplicata de 1 de 2 experimentos representativos. \* MA controle (sem tratamento) versus MA incubado LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>. # MA tratado e incubado com LTB<sub>4</sub> e/ou LTC<sub>4</sub> versus MA tratado com inibidor. P < 0,05.



**Figura 11. Papel do receptor BLT<sub>1</sub> na fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por MA.** MA obtidos de ratos Wistar foram tratados ou não com 1 $\mu$ M de CP-105,696 (antagonista de BLT<sub>1</sub>) por 20 minutos. Após este período foi adicionado ou não com 10nM de LTB<sub>4</sub> e 100nM de LTC<sub>4</sub> e incubado 20 minutos antes da adição das leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com 10% soro imune na proporção de 3:1. Os MA infectados foram incubados por 4 horas para avaliação da capacidade fagocítica. A contagem de leveduras foi feita por microscopia óptica e o cálculo do índice fagocítico determinado conforme em materiais e métodos. Dados são expressos como média  $\pm$  SE de valores de triplicata de 1 de 2 experimentos representativos. \* MA controle (sem tratamento) versus MA incubado LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>. # MA tratado e incubado

---

com LTB<sub>4</sub> e/ou LTC<sub>4</sub> versus MA tratado com inibidor. & MA tratado e incubado com LTB<sub>4</sub> versus MA tratado e incubado com LTC<sub>4</sub> P < 0,05.



**Figura 12. Papel do receptor cys-LT<sub>1</sub> fagocitose de leveduras de *H. capsulatum* por MA.** MA obtidos de ratos Wistar foram tratados ou não com 1 $\mu$ M de MK 571 (antagonista de cys-LT<sub>1</sub>) por 20 minutos. Após este período foi adicionado ou não com 10nM de LTB<sub>4</sub> e 100nM de LTC<sub>4</sub> e incubado 20 minutos antes da adição das leveduras de *H. capsulatum* opsonizadas com 10% soro imune na proporção de 3:1. Os MA infectados foram incubados por 4 horas para avaliação da capacidade fagocítica. A contagem de leveduras foi feita por microscopia óptica e o cálculo do índice fagocítico determinado conforme em materiais e métodos. Dados são expressos como média  $\pm$  SE de valores de triplicata de 1 de 2 experimentos representativos. \* MA controle (sem tratamento) versus MA incubado LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>. # MA tratado e incubado com

LTB<sub>4</sub> e/ou LTC<sub>4</sub> versus MA tratado com inibidor. & MA tratado e incubado com LTB<sub>4</sub> versus MA tratado e incubado com LTC<sub>4</sub> P < 0,05.



***DISCUSSÃO***

## V – DISCUSSÃO

Nos últimos anos, estudos referentes à função de leucotrienos (LTs) nos processos infecciosos demonstram não apenas a participação destes como mediadores quimiotáticos envolvidos no recrutamento celular, mas também como moduladores dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos.

Neste trabalho, estudamos o papel de LTs na histoplasmose pulmonar murina, através da utilização de animais deficientes da síntese da enzima 5-lipoxigenase (5-LO<sup>-/-</sup>) ou através de uma abordagem farmacológica. A ausência de LTs resultou na disseminação e proliferação do fungo para diferentes órgãos e morte de 100% dos animais. Além disso, foi observado um aumento no recrutamento de neutrófilos para o pulmão, assim como o aumento de citocinas inflamatórias, IFN- $\gamma$  e diminuição de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> por células do pulmão de animais 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum*.

A morte de 100% dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> está diretamente relacionado a proliferação do *H. capsulatum* no pulmão e baço destes animais (Figura 2A e 2B). O aumento da susceptibilidade de animais 5-LO<sup>-/-</sup> foi previamente demonstrado utilizando animais 5-LO<sup>-/-</sup> em outros processos infecciosos, como bactérias e vírus. Nós e outros pesquisadores demonstramos que a ausência de LTs resultou na diminuição da sobrevivência de animais 5-LO<sup>-/-</sup>, assim como o aumento de UFC de bactérias (40), fungos (47), de parasitas (79) e na replicação viral (52). Bailie et al, (40) demonstraram que o aumento da susceptibilidade destes animais está relacionado à deficiência na fagocitose e da capacidade microbicida de macrófagos alveolares dos animais 5-LO<sup>-/-</sup>.

Alguns autores relataram que pacientes portadores dos vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) apresentaram aumento na susceptibilidade às infecções pulmonares devido à deficiência na síntese de LTs, decorrente da baixa expressão da FLAP (49-51). Ou seja, entre outros fatores a diminuição atividade fagocítica e microbicida pode ser um dos fatores associados ao aumento da susceptibilidade destes animais na resolução da infecção contra o *H. capsulatum*. Assim, neste trabalho investigamos *in vivo* e *in vitro* os possíveis fatores envolvidos no aumento da susceptibilidade de animais 5-LO<sup>-/-</sup>.

Sabe-se que leucotrienos apresentam um importante papel como fator quimotático para células da resposta imune inata e adquirida. Desta forma, fomos avaliar se o aumento da susceptibilidade de animais 5-LO<sup>-/-</sup> estaria associado a deficiência no recrutamento de leucócitos para o local da infecção. Nossos resultados demonstram que a infecção com *H. capsulatum* induziu intenso infiltrado inflamatório nos pulmões com predominância de neutrófilos nos primeiros dias de infecção, seguido de influxo de células mononucleares (Figura 3B). Entretanto, animais deficientes da 5-LO<sup>-/-</sup> apresentaram um influxo exacerbado de neutrófilos para o espaço bronco-alveolar até 14 dias após a infecção (Figura 3A). Nós e outros grupos de pesquisa demonstramos previamente a presença de neutrófilos na resposta inflamatória induzida pela infecção i.p. e i.t. com *H. capsulatum* (27, 44, 47). No entanto não há um consenso sobre a função desta célula na resposta imune contra o *H. capsulatum*. O intenso e persistente influxo de neutrófilos no pulmão de animais 5-LO<sup>-/-</sup> associado a morte dos animais e aumento de UFC nos permite

---

sugerir que a presença desta célula nem sempre está relacionado com controle da infecção. Resultados publicados anteriormente por Schaffner et al. (80) demonstram que a forma miceliana do *H. capsulatum* é susceptível à morte pelos neutrófilos *in vitro*, mas leveduras são resistentes. Além disso, nossos dados são consistentes com outros estudos mostrando a resistência do *H. capsulatum* à morte pelos neutrófilos, os quais possuem apenas atividade fungistática contra leveduras (81-83). No entanto, recentes dados obtidos em nosso laboratório (84) sugerem a hipótese que os neutrófilos participam da resposta imune protetora contra o *H. capsulatum*, não através de alterações na produção de citocinas e óxido nítrico, mas através da capacidade de restringir o crescimento do fungo nos primeiros dias de infecção, diminuindo a disseminação para outros órgãos. A migração exacerbada de neutrófilos e células mononucleares para o local da infecção nos animais dos grupos 5-LO<sup>-/-</sup> sugerem que estas células não estão exercendo suas funções efetoras microbidas e ou microbistáticas. Nossos resultados sugerem que a incapacidade destes neutrófilos em exercer suas funções microbidas no local da infecção pode estar prejudicada pela ausência de diversos fatores, entre eles a síntese de LTs. Mancuso et al. (85) demonstraram que tanto a ausência de LTs em neutrófilos humanos, tratados com o inibidor de 5-LO<sup>-/-</sup> (Zileuton), ou neutrófilos obtidos de animais 5-LO<sup>-/-</sup> diminuem a fagocitose de bactérias por estas células. Entretanto a adição de LTB<sub>4</sub> exógena restaurou a capacidade fagocítica dos neutrófilos comparado com neutrófilos controle. Ou seja, podemos sugerir que a deficiência na síntese leucotrienos estaria impedindo a ativação destes neutrófilos e outros fagócitos presentes no local da infecção a

exercerem ou sua capacidade fagocítica ou suas funções efetoras para contenção do fungo no local da infecção.

A resposta imune protetora na histoplasmose depende da ativação da imunidade adaptativa, caracterizada por ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas para o antígeno (16). Recentemente foi descrito que LTs são importantes fatores quimiotáticos também para linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (86, 87). Desta forma, sabendo da importância destas células na histoplasmose pulmonar murina avaliamos se morte de animais 5-LO<sup>-/-</sup> não estaria relacionado à deficiência no recrutamento de linfócitos para o local da infecção. Como já demonstrado anteriormente, por Deepe (16) células T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> são importantes na proteção do hospedeiro durante a infecção por *H. capsulatum*. Nossos resultados demonstram que a infecção pelo fungo induz um aumento na porcentagem de linfócitos CD4/CD44<sup>hi</sup>/CD62L<sup>low</sup> e CD8/CD44<sup>hi</sup>/CD62L<sup>low</sup> no pulmão de animais WT quando comparado à porcentagem obtida nos pulmões de animais do grupo controle que receberam PBS (Figura 8). No entanto, animais 5-LO<sup>-/-</sup> não foram capazes de promover o recrutamento destas subpopulações de linfócitos para o pulmão destes animais, sendo a porcentagem destas células igual à de animais que receberam somente PBS (Figura 8). Recentes dados da literatura demonstram o recrutamento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetoras e de memória são dependente da expressão de BLT<sub>1</sub>, demonstrando a importância deste mediador no recrutamento destas (86). Goodarzi et al. (87) demonstraram que LTB<sub>4</sub> através de seu receptor BLT<sub>1</sub> controla o recrutamento de célula T CD8<sup>+</sup> efetora para os tecidos inflamados. Islame et al (88) demonstraram também que LTB<sub>4</sub>-BLT<sub>1</sub> são quimioatraentes

para células T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> efetoras e de memória migrarem para o local da inflamação. Desta forma, podemos sugerir que um outro componente da resposta imune envolvido no aumento de UFC e morte de animais 5-LO<sup>-/-</sup> está relacionado a inibição do recrutamento e ou ativação de células T efetoras para o local da infecção. Nossos resultados, juntamente com os dados da literatura, sugerem que leucotrienos têm um importante papel não apenas na ativação de linfócitos T específicos, mas também no recrutamento destes para o local da infecção.

Para confirmar a importância de leucotrienos na resposta imune contra o *H. capsulatum*, nós quantificamos LTB<sub>4</sub> produzidos nos pulmões de animais infectados. Como já demonstrado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, a infecção pelo *H. capsulatum* induz liberação de LTB<sub>4</sub> nos pulmões de animais infectados (47). Como podemos observar na Figura 4, a presença de LTB<sub>4</sub> no homogeneizado de pulmão de animais 5-LO<sup>-/-</sup> foi inferior ao níveis obtidos pelos animais selvagens, porem ainda em níveis bastante significativos. A presença deste metabólito em animais depletados da enzima 5-LO é provavelmente decorrente de uma reação cruzada com outros metabólitos do AA liberados durante a infecção. Este fenômeno também foi observado em vários trabalhos utilizando animais 5-LO<sup>-/-</sup> em processos infecciosos (79, 89).

A partir dos dados acima, formulamos a hipótese que embora leucotrieno seja um mediador chave nos mecanismos de defesa do hospedeiro, nós e outros pesquisados demonstramos que LTs são capazes de modular a síntese de diferentes citocinas (47, 79). Nossos resultados demonstram que a infecção por *H. capsulatum* induz o aumento na liberação de citocinas

---

inflamatórias nos pulmões dos animais infectados quando comparados com grupo controle que recebeu PBS (Figura 5). Sabe-se que TNF- $\alpha$  é uma citocina imprescindível para resolução da infecção por *H. capsulatum*. Diversos trabalhos demonstraram que animais infectados com o fungo e tratados com anticorpo anti-TNF- $\alpha$  apresentaram mortalidade acelerada e aumento da carga fúngica recuperada dos órgãos (28, 90, 91). O papel do TNF- $\alpha$  foi mais bem compreendido quando se descobriu que esta citocina também era importante na resposta imune secundária contra o *H. capsulatum* (18). No mesmo ano mostrou-se que, mais do que importante, o TNF- $\alpha$  é essencial durante a resposta imune secundária na histoplasmose, principalmente na ausência de IFN- $\gamma$  (92). No entanto, os níveis de TNF- $\alpha$  detectados nos pulmões obtidos de animais 5-LO<sup>-/-</sup> foi maior que os valores obtidos nos grupos WT. Vellenga et al. (62) demonstraram que linhagens de monócitos estimulados com LPS na presença do antagonista de receptor de cys-LT1, MK571, produzem 3 a 5 vezes mais IL-1 e IL-6 quando comparado com monócitos apenas estimulados com LPS. Nossos dados sugerem a ausência de LTs pode modular positivamente a síntese de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-6. No entanto, apesar de TNF- $\alpha$  ser um citocina associada à resolução da infecção por *H. capsulatum*, nossos dados sugerem a morte destes animais pode estar associada que a presença de elevados níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 e conseqüentemente ao recrutamento exacerbado de neutrófilos para o local da infecção. A persistência desta célula resulta na injúria tecidual, proliferação do fungo e conseqüentemente a morte destes animais.

---

Sabe-se que além de TNF- $\alpha$  a resposta imune protetora contra a histoplasmose é mediada pela resposta imune celular através da ativação de linfócitos T<sub>H</sub>1 secretores de IFN- $\gamma$ . Zhou et al (26) demonstraram o tratamento com anticorpos neutralizantes IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 em animais infectados com *H. capsulatum* apresentaram aumento na taxa de mortalidade, indicando que estas citocinas têm papel importante na proteção dos animais. E a administração exógena de IL-12 recombinante em animais infectados com *H. capsulatum* preveniu a mortalidade dos mesmos através da indução da síntese de IFN- $\gamma$ . Nossos resultados demonstram que a infecção por *H. capsulatum* induziu aumento na produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  quando comparado com animais que receberam PBS (Figura 6). Apesar do caráter protetor destas citocinas, os pulmões de animais deficientes 5-LO<sup>-/-</sup> apresentaram altos níveis de IL-12 e IFN- $\gamma$ . Os elevados níveis destas citocinas provavelmente é uma consequência da ativação excessiva do sistema imune em decorrência da excessiva carga fúngica nesse órgão. Alguns trabalhos apresentam uma estreita relação entre a produção exagerada desses mediadores com o dano tecidual e morte, em modelos experimentais de algumas doenças e mesmo na histoplasmose (91). Neutrófilos são células capazes de secretar grandes quantidades de IL-12 e TNF- $\alpha$  em diferentes processos infecciosos (93, 94) além de produzir IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$  em resposta ao estímulo com LPS (95). Esses dados sugerem que a produção exacerbada destas citocinas pode estar associada ao intenso influxo de neutrófilos, e também de células mononucleares, no local da infecção. No entanto, a presença de neutrófilos concomitante à produção destas citocinas foi deletéria, resultando na morte destes animais.



---

Além do papel de leucotrienos como imunomodulador no recrutamento celular e síntese de citocinas, sabe-se estes mediadores lipídicos contribuem para geração de óxido nítrico. Vários trabalhos têm demonstrado que reativos intermediários do oxigênio produzidos por macrófagos estão entre os principais fatores microbicidas envolvidos na inibição do crescimento de *H. capsulatum* (67, 81). Desta forma, avaliamos se a morte de animais 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum* poderia estar associada a ausência de leucotrienos nestes animais. Nossos dados demonstram que células de pulmões e soro dos animais WT são capazes de produzir altos níveis de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no decorrer da infecção (Figura 7). No entanto, a deficiência da enzima 5-LO inibiu a liberação de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> durante a infecção por *H. capsulatum*. Nakamura et al. (65) demonstraram que macrófagos da linhagem RAW 264.7 pré-tratados com IFN- $\gamma$  recombinante foram capazes de inibir o crescimento intracelular de *H. capsulatum*, verificou-se que essa atividade fungicida era dependente do metabolismo de L-arginina (L-Arg) e que durante esse processo houve aumento nos níveis de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Trabalhos recentes descreveram que a ausência de leucotrienos pode modular a síntese de NO (47, 96). Chen et al. (52) demonstraram que neurônios isolados de animais 5-LO<sup>-/-</sup> quando infectados com VSV, expressavam menos enzima NOS-1, resultando no aumento da replicação viral. Talvani et al. (57) descreveram que LTB<sub>4</sub> induz a produção de NO em macrófagos peritoneais obtidos de animais infectados com *Trypanosoma cruzi* de maneira dose e tempo dependente. Além disso, Serezani et al. (97) demonstraram que leucotrienos ativam NADPH oxidase, uma enzima importante na geração dos intermediários reativos do oxigênio

(ROI). Assim, sugerimos que a ausência de leucotrienos modula negativamente a geração de  $\text{NO}_2^-$  levando assim a ineficiência destes fagócitos na destruição do leveduras no interior da fagolisossomo, contribuindo para a morte destes animais 5-LO<sup>-/-</sup> infectados com *H. capsulatum*.

Sabe-se que macrófagos alveolares representam à primeira linha de defesa do pulmão mantendo a esterilidade pulmonar através da fagocitose e atividade microbicida dos patógenos inalados (37). Além disso, MA são células capazes de produzirem grandes quantidades de LTs (98). Para tentar compreender os diferentes mecanismos pelos quais a ausência de leucotrienos estaria interferindo no mecanismo de defesa contra o *H. capsulatum* avaliamos a capacidade fagocítica de MA de animais 5-LO<sup>-/-</sup>. Nossos resultados demonstram que a adição de LTB<sub>4</sub> exógeno aumenta 15% a capacidade fagocítica de MA comparado com MA controle (sem tratamento) (Figura 9). No entanto, a ausência de leucotrieno endógeno, através da inibição farmacológica da 5-LO (Zileuton) diminuiu em aproximadamente 50% da capacidade fagocítica dos MA, porém a adição de LTB<sub>4</sub> ou LTC<sub>4</sub> restaurou capacidade fagocítica (Figura 10). Sabe-se que macrófagos expressam receptor BLT<sub>1</sub> (99) e cys-LT<sub>1</sub> (100). O tratamento de MA com antagonistas de receptor BLT<sub>1</sub> (CP-105,696) e cys-LT<sub>1</sub> (MK571) na presença de inibidores endógenos de LTs, refletiu na diminuição na capacidade fagocítica dos MA (Figura 11 e 12). Wirth e Kierszenbaum, demonstraram que a adição de LTB<sub>4</sub> (46) e LTC<sub>4</sub> (45) aumentou a fagocitose de macrófagos infectados com *Trypanossoma cruzi*. Mancuso et al. (77) demonstraram que ambos LTs (LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>) foram capazes de modular positivamente a fagocitose de *Klebsiella pneumoniae* por

MA. O aumento na recuperação de bactérias e na mortalidade destes animais está relacionado à deficiência de fagocitose e da capacidade microbicida de macrófagos alveolares dos animais 5-LO<sup>-/-</sup> (77, 85).

Os resultados obtidos neste trabalho trazem uma contribuição inédita no entendimento dos mecanismos pelos quais LTs participam na defesa do hospedeiro contra o *H. capsulatum* trazendo novas informações sobre a participação deste mediadores na fagocitose deste patógeno assim como no recrutamento de linfócitos T para o local da infecção.

***CONCLUSÃO***

Leucotrienos participam na proteção de animais infectados com *H. capsulatum* associado à fagocitose por macrófagos alveolares e recrutamento de células T efectoras para local da infecção.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

**VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Medoff, G., A. Painter, and G. S. Kobayashi. 1987. Mycelial- to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 169:4055-4060.
2. Newman, S. L., C. Bucher, J. Rhodes, and W. E. Bullock. 1990. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *J Clin Invest* 85:223-230.
3. Goodwin, R. A. D. P., R.M. . 1978. Histoplasmosis. *Am. Rev. Respir. Dis* 117:929-956.
4. Leimann, B. C., C. V. Pizzini, M. M. Muniz, P. C. Albuquerque, P. C. Monteiro, R. S. Reis, R. Almeida-Paes, M. S. Lazera, B. Wanke, M. A. Perez, and R. M. Zancope-Oliveira. 2005. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. *Rev Iberoam Micol* 22:141-146.
5. Ferreira, O. G., S. V. Cardoso, A. S. Borges, M. S. Ferreira, and A. M. Loyola. 2002. Oral histoplasmosis in Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93:654-659.
6. Unis, G., M. Oliveira Fde, and L. C. Severo. 2004. [Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop* 37:463-468.
7. Capone, D., B. Wanke, P. C. Monteiro, M. S. Lazera, G. de Noronha Andrade, A. C. do Valle, A. M. Moreno, and A. T. Londero. 1999. Chronic pulmonary histoplasmosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* 145:75-79.
8. Chang, M. R., C. L. Taira, A. M. Paniago, D. L. Taira, R. V. Cunha, and B. Wanke. 2007. Study of 30 cases of histoplasmosis observed in the Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 49:37-39.
9. Severo, L. C., F. M. Oliveira, K. Irion, N. S. Porto, and A. T. Londero. 2001. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43:183-187.
10. Kauffman, C. A. 2007. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev* 20:115-132.
11. Goodwin, R. A. L., J. E.; Des Prez, R.M. 1980. Histoplasmosis in patients normal host. *Medicine* 60.
12. Wheat, L. J. 1988. Systemic fungal infections: diagnosis and treatment. I. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am* 2:841-859.
13. Pillay, T., D. G. Pillay, and A. Bramdev. 1997. Disseminated histoplasmosis in a human immunodeficiency virus-infected African child. *Pediatr Infect Dis J* 16:417-418.
14. Adams, D. O. 1976. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am J Pathol* 84:164-191.
15. Limaye, A. P., P. A. Connolly, M. Sagar, T. R. Fritsche, B. T. Cookson, L. J. Wheat, and W. E. Stamm. 2000. Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. *N Engl J Med* 343:1163-1166.
16. Deepe, G. S., Jr. 2000. Immune response to early and late *Histoplasma capsulatum* infections. *Curr Opin Microbiol* 3:359-362.

17. Bullock, W. E., and S. D. Wright. 1987. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of *Histoplasma capsulatum* by human macrophages. *J Exp Med* 165:195-210.
18. Allendoerfer, R., and G. S. Deepe, Jr. 1998. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. *J Immunol* 160:6072-6082.
19. Newman, S. L. 2001. Cell-mediated immunity to *Histoplasma capsulatum*. *Semin Respir Infect* 16:102-108.
20. Gildea, L. A., R. E. Morris, and S. L. Newman. 2001. *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *J Immunol* 166:1049-1056.
21. Allendorfer, R., G. D. Brunner, and G. S. Deepe, Jr. 1999. Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis. *J Immunol* 162:7389-7396.
22. Schnizlein-Bick, C., M. Durkin, S. Kohler, P. Connolly, A. LeMonte, T. Garringer, J. Goldberg, M. Smedema, E. Brizendine, and L. J. Wheat. 2003. Effects of CD4 and CD8 T lymphocyte depletion on the course of histoplasmosis following pulmonary challenge. *Med Mycol* 41:189-197.
23. Deepe, G. S., Jr. 1988. Protective immunity in murine histoplasmosis: functional comparison of adoptively transferred T-cell clones and splenic T cells. *Infect Immun* 56:2350-2355.
24. Deepe, G. S., Jr. 1994. Role of CD8+ T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice. *J Immunol* 152:3491-3500.
25. Lane, T. E., B. A. Wu-Hsieh, and D. H. Howard. 1993. Gamma interferon cooperates with lipopolysaccharide to activate mouse splenic macrophages to an antihistoplasma state. *Infect Immun* 61:1468-1473.
26. Zhou, P., M. C. Sieve, J. Bennett, K. J. Kwon-Chung, R. P. Tewari, R. T. Gazzinelli, A. Sher, and R. A. Seder. 1995. IL-12 prevents mortality in mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN-gamma. *J Immunol* 155:785-795.
27. Deepe, G. S., Jr., and M. McGuinness. 2006. Interleukin-1 and host control of pulmonary histoplasmosis. *J Infect Dis* 194:855-864.
28. Smith, J. G., D. M. Magee, D. M. Williams, and J. R. Graybill. 1990. Tumor necrosis factor-alpha plays a role in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *J Infect Dis* 162:1349-1353.
29. Allendoerfer, R., and G. S. Deepe, Jr. 2000. Regulation of infection with *Histoplasma capsulatum* by TNFR1 and -2. *J Immunol* 165:2657-2664.
30. Peters-Golden, M. 1998. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 157:S227-231; discussion S231-222, S247-228.
31. Peters-Golden, M., C. Canetti, P. Mancuso, and M. J. Coffey. 2005. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 174:589-594.
32. Toda, A., T. Yokomizo, and T. Shimizu. 2002. Leukotriene B4 receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:575-585.
33. Kanaoka, Y., and J. A. Boyce. 2004. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J Immunol* 173:1503-1510.



34. Kim, N., and A. D. Luster. 2007. Regulation of immune cells by eicosanoid receptors. *ScientificWorldJournal* 7:1307-1328.
35. Samuelsson, B. 1983. Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 11:1-13.
36. Lewis, R. A. 1984. How are prostaglandins and leukotrienes involved in immunological alterations? *J Trauma* 24:S125-137.
37. Lohmann-Matthes, M. L., C. Steinmuller, and G. Franke-Ullmann. 1994. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 7:1678-1689.
38. O'Byrne, P. M. 1997. Leukotrienes in the pathogenesis of asthma. *Chest* 111:27S-34S.
39. Buret, A., M. Dunkley, R. L. Clancy, and A. W. Cripps. 1993. Effector mechanisms of intestinally induced immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in the rat lung: role of neutrophils and leukotriene B4. *Infect Immun* 61:671-679.
40. Bailie, M. B., T. J. Standiford, L. L. Laichalk, M. J. Coffey, R. Strieter, and M. Peters-Golden. 1996. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumonia* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol* 157:5221-5224.
41. Peters-Golden, M., and M. Coffey. 1998. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. *J Lab Clin Med* 132:251-257.
42. Shak, S., H. D. Perez, and I. M. Goldstein. 1983. A novel dioxygenation product of arachidonic acid possesses potent chemotactic activity for human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 258:14948-14953.
43. Faccioli, L. H., S. Nourshargh, R. Moqbel, F. M. Williams, R. Sehmi, A. B. Kay, and T. J. Williams. 1991. The accumulation of <sup>111</sup>In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. *Immunology* 73:222-227.
44. Medeiros, A. I., C. L. Silva, A. Malheiro, C. M. Maffei, and L. H. Faccioli. 1999. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. *Br J Pharmacol* 128:1529-1537.
45. Wirth, J. J., and F. Kierszenbaum. 1985. Effects of leukotriene C4 on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 15:1-10.
46. Wirth, J. J., and F. Kierszenbaum. 1985. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 134:1989-1993.
47. Medeiros, A. I., A. Sa-Nunes, E. G. Soares, C. M. Peres, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2004. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun* 72:1637-1644.
48. Mancuso, P., A. Gottschalk, S. M. Phare, M. Peters-Golden, N. W. Lukacs, and G. B. Huffnagle. 2002. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *J Immunol* 168:4018-4024.
49. Coffey, M. J., S. M. Phare, S. George, M. Peters-Golden, and P. H. Kazanjian. 1998. Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils. *J Clin Invest* 102:663-670.

50. Krarup, E., J. Vestbo, T. L. Benfield, and J. D. Lundgren. 1997. Interleukin-8 and leukotriene B4 in bronchoalveolar lavage fluid from HIV-infected patients with bacterial pneumonia. *Respir Med* 91:317-321.
51. Coffey, M. J., S. M. Phare, P. H. Kazanjian, and M. Peters-Golden. 1996. 5-Lipoxygenase metabolism in alveolar macrophages from subjects infected with the human immunodeficiency virus. *J Immunol* 157:393-399.
52. Chen, N., A. Restivo, and C. S. Reiss. 2001. Leukotrienes play protective roles early during experimental VSV encephalitis. *J Neuroimmunol* 120:94-102.
53. Flamand, L., P. Borgeat, R. Lalonde, and J. Gosselin. 2004. Release of anti-HIV mediators after administration of leukotriene B4 to humans. *J Infect Dis* 189:2001-2009.
54. Flamand, L., M. J. Tremblay, and P. Borgeat. 2007. Leukotriene B4 triggers the in vitro and in vivo release of potent antimicrobial agents. *J Immunol* 178:8036-8045.
55. Yong, E. C., E. Y. Chi, and W. R. Henderson, Jr. 1994. Toxoplasma gondii alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. *J Exp Med* 180:1637-1648.
56. Serezani, C. H., J. H. Perrela, M. Russo, M. Peters-Golden, and S. Jancar. 2006. Leukotrienes are essential for the control of Leishmania amazonensis infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol* 177:3201-3208.
57. Talvani, A., F. S. Machado, G. C. Santana, A. Klein, L. Barcelos, J. S. Silva, and M. M. Teixeira. 2002. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in Trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun* 70:4247-4253.
58. Peres, C. M., L. de Paula, A. I. Medeiros, C. A. Sorgi, E. G. Soares, D. Carlos, M. Peters-Golden, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2007. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect* 9:483-489.
59. Coffey, M. J., S. M. Phare, and M. Peters-Golden. 2004. Role of leukotrienes in killing of Mycobacterium bovis by neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 71:185-190.
60. Malaviya, R., and S. N. Abraham. 2000. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leukoc Biol* 67:841-846.
61. Morita, H., K. Takeda, H. Yagita, and K. Okumura. 1999. Immunosuppressive effect of leukotriene B(4) receptor antagonist in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 264:321-326.
62. Vellenga, E., L. Tuyt, B. J. Wierenga, M. Muller, and W. Dokter. 1999. Interleukin-6 production by activated human monocytic cells is enhanced by MK-571, a specific inhibitor of the multi-drug resistance protein-1. *Br J Pharmacol* 127:441-448.
63. Grisham, M. B., D. Jour'd'Heuil, and D. A. Wink. 1999. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276:G315-321.
64. Alderton, W. K., C. E. Cooper, and R. G. Knowles. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.

65. Nakamura, L. T., B. A. Wu-Hsieh, and D. H. Howard. 1994. Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun* 62:680-684.
66. Lane, T. E., G. C. Otero, B. A. Wu-Hsieh, and D. H. Howard. 1994. Expression of inducible nitric oxide synthase by stimulated macrophages correlates with their antihistoplasma activity. *Infect Immun* 62:1478-1479.
67. Brummer, E., and D. A. Stevens. 1995. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Clin Exp Immunol* 102:65-70.
68. Khemani, S., E. Brummer, and D. A. Stevens. 1995. In vivo and in vitro effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on bronchoalveolar macrophages for antihistoplasma activity. *Int J Immunopharmacol* 17:49-53.
69. Desai, G., F. Nassar, E. Brummer, and D. A. Stevens. 1995. Killing of *Histoplasma capsulatum* by macrophage colony stimulating factor-treated human monocyte-derived macrophages: role for reactive oxygen intermediates. *J Med Microbiol* 43:224-229.
70. Coffey, M. J., S. M. Phare, and M. Peters-Golden. 2000. Prolonged exposure to lipopolysaccharide inhibits macrophage 5-lipoxygenase metabolism via induction of nitric oxide synthesis. *J Immunol* 165:3592-3598.
71. Coffey, M., S. Phare, and M. Peters-Golden. 2004. Induction of inducible nitric oxide synthase by lipopolysaccharide/interferon gamma and sepsis down-regulates 5-lipoxygenase metabolism in murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res* 30:615-633.
72. Brunn, G., C. Hey, I. Wessler, and K. Racke. 1997. Endogenous nitric oxide inhibits leukotriene B4 release from rat alveolar macrophages. *Eur J Pharmacol* 326:53-60.
73. Gilchrist, M., S. D. McCauley, and A. D. Befus. 2004. Expression, localization, and regulation of NOS in human mast cell lines: effects on leukotriene production. *Blood* 104:462-469.
74. Kehrer, J. P., S. S. Biswal, E. La, P. Thuillier, K. Datta, S. M. Fischer, and J. P. Vanden Heuvel. 2001. Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)alpha by MK886. *Biochem J* 356:899-906.
75. Morishima, A., N. Ohkubo, N. Maeda, T. Miki, and N. Mitsuda. 2003. NFkappaB regulates plasma apolipoprotein A-I and high density lipoprotein cholesterol through inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem* 278:38188-38193.
76. Calich, V. L., Purchio, A; Paula, C.R. 1979. new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathology*. 66:175-177.
77. Mancuso, P., T. J. Standiford, T. Marshall, and M. Peters-Golden. 1998. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 66:5140-5146.
78. Schnur, R. A., and S. L. Newman. 1990. The respiratory burst response to *Histoplasma capsulatum* by human neutrophils. Evidence for intracellular trapping of superoxide anion. *J Immunol* 144:4765-4772.
79. Machado, E. R., M. T. Ueta, E. V. Lourenco, F. F. Anibal, C. A. Sorgi, E. G. Soares, M. C. Roque-Barreira, A. I. Medeiros, and L. H. Faccioli. 2005.

- Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *J Immunol* 175:3892-3899.
80. Schaffner, A., C. E. Davis, T. Schaffner, M. Markert, H. Douglas, and A. I. Braude. 1986. In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest* 78:511-524.
  81. Brummer, E., N. Kurita, S. Yoshida, K. Nishimura, and M. Miyaji. 1991. Fungistatic activity of human neutrophils against *Histoplasma capsulatum*: correlation with phagocytosis. *J Infect Dis* 164:158-162.
  82. Kurita, N., K. Terao, E. Brummer, E. Ito, K. Nishimura, and M. Miyaji. 1991. Resistance of *Histoplasma capsulatum* to killing by human neutrophils. Evasion of oxidative burst and lysosomal-fusion products. *Mycopathologia* 115:207-213.
  83. Newman, S. L., L. Gootee, and J. E. Gabay. 1993. Human neutrophil-mediated fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. Localization of fungistatic activity to the azurophil granules. *J Clin Invest* 92:624-631.
  84. Sa-Nunes, A., A. I. Medeiros, C. A. Sorgi, E. G. Soares, C. M. Maffei, C. L. Silva, and L. H. Faccioli. 2006. Gr-1(+) cells play an essential role in an experimental model of disseminated histoplasmosis. *Microbes Infect.*
  85. Mancuso, P., P. Nana-Sinkam, and M. Peters-Golden. 2001. Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 69:2011-2016.
  86. Tager, A. M., S. K. Bromley, B. D. Medoff, S. A. Islam, S. D. Bercury, E. B. Friedrich, A. D. Carafone, R. E. Gerszten, and A. D. Luster. 2003. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol* 4:982-990.
  87. Goodarzi, K., M. Goodarzi, A. M. Tager, A. D. Luster, and U. H. von Andrian. 2003. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat Immunol* 4:965-973.
  88. Islam, S. A., S. Y. Thomas, C. Hess, B. D. Medoff, T. K. Means, C. Brander, C. M. Lilly, A. M. Tager, and A. D. Luster. 2006. The leukotriene B4 lipid chemoattractant receptor BLT1 defines antigen-primed T cells in humans. *Blood* 107:444-453.
  89. Bafica, A., C. A. Scanga, C. Serhan, F. Machado, S. White, A. Sher, and J. Aliberti. 2005. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest* 115:1601-1606.
  90. Wu-Hsieh, B. A., G. S. Lee, M. Franco, and F. M. Hofman. 1992. Early activation of splenic macrophages by tumor necrosis factor alpha is important in determining the outcome of experimental histoplasmosis in mice. *Infect Immun* 60:4230-4238.
  91. Wu-Hsieh, B. A. 1993. Resistance mechanisms in murine experimental histoplasmosis. *Arch Med Res* 24:233-238.
  92. Zhou, P., G. Miller, and R. A. Seder. 1998. Factors involved in regulating primary and secondary immunity to infection with *Histoplasma capsulatum*: TNF-alpha plays a critical role in maintaining secondary immunity in the absence of IFN-gamma. *J Immunol* 160:1359-1368.
  93. Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, G. Del Sero, I. Nicoletti, G. Trinchieri, F. Bistoni, and P. Puccetti. 1997. Neutrophil production of IL-12 and

- 
- IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J Immunol* 158:5349-5356.
94. Bliss, S. K., A. J. Marshall, Y. Zhang, and E. Y. Denkers. 1999. Human polymorphonuclear leukocytes produce IL-12, TNF-alpha, and the chemokines macrophage-inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in response to *Toxoplasma gondii* antigens. *J Immunol* 162:7369-7375.
  95. Yeaman, G. R., J. E. Collins, J. K. Currie, P. M. Guyre, C. R. Wira, and M. W. Fanger. 1998. IFN-gamma is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol* 160:5145-5153.
  96. Sforzin, J. M., G. A. Nunes, F. Missima, A. Sa-Nunes, and L. H. Faccioli. 2007. Effect of a leukotriene inhibitor (MK886) on nitric oxide and hydrogen peroxide production by macrophages of acutely and chronically stressed mice. *J Pharm Pharmacol* 59:1249-1254.
  97. Serezani, C. H., D. M. Aronoff, S. Jancar, and M. Peters-Golden. 2005. Leukotriene B4 mediates p47phox phosphorylation and membrane translocation in polyunsaturated fatty acid-stimulated neutrophils. *J Leukoc Biol* 78:976-984.
  98. Phare, S. M., M. Peters-Golden, and M. J. Coffey. 1998. Alveolar lining fluid regulates mononuclear phagocyte 5-lipoxygenase metabolism. *Eur Respir J* 12:1141-1146.
  99. de Brum-Fernandes, A. J., G. Guillemette, and P. Sirois. 1990. Leukotriene B4 binding sites in guinea-pig alveolar macrophages. *Prostaglandins* 40:515-527.
  100. Rochette, C., D. W. Nicholson, and K. M. Metters. 1993. Identification and target-size analysis of the leukotriene D4 receptor in the human THP-1 cell line. *Biochim Biophys Acta* 1177:283-290.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)