

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

ELYARA MARIA SOARES

**Estudo da Participação de β_2 -integrina
nas Atividades Fagocítica e Microbicida
de Macrófagos Alveolares e Peritoneais
na Histoplasmose**

Ribeirão Preto

-2009-

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ELYARA MARIA SOARES

**Estudo da Participação de β_2 -integrina
nas Atividades Fagocítica e Microbicida
de Macrófagos Alveolares e Peritoneais
na Histoplasmose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto, Universidade
de São Paulo, para obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena

Faccioli

Ribeirão Preto – SP

-2009-

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto /USP

Soares, Elyara Maria

**Estudo da Participação de β_2 -integrina nas Atividades Fagocítica e
Microbicida de Macrófagos Alveolares e Peritoneais na Histoplasmose.
Ribeirão Preto, 2009.**

108 p.; il. 30 cm

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

Orientadora: Faccioli, Lúcia Helena.

1. Histoplasmose. 2. β_2 - integrina. 3. *Histoplasma capsulatum*. 4. Leucotrienos.
5. Fagocitose

SOARES, Elyara Maria

Estudo da Participação de β_2 -integrinas nas Atividades Fagocítica e Microbicida de Macrófagos Alveolares e Peritoneais na Histoplasmose

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Profa Dra Lúcia Helena Faccioli

Instituição: FCFRP-USP

Assinatura: _____

Prof Dr. Carlos Pelleschi Taborda

Instituição: ICB-USP

Assinatura: _____

Profa Dra Yara Maria Lucisano Valim

Instituição: FCFRP-USP

Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha Mãe Vera Regina, exemplo de mulher, força, alegria e dignidade...meu bem maior e principal responsável pelo que me tornei.

Ao meu Pai José Adão pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu irmão Eduardo, que sempre gostou de ouvir as histórias sobre a Pós-Graduação e também ao meu irmão Junior.

Vocês que estiveram comigo todo esse tempo, que sofreram comigo a cada adeus e escutaram as histórias mais mirabolantes da minha fase de deslumbramento, ficarão eternamente em meus pensamentos...

A vocês que souberam suportar com firmeza o tempo e a distância, constituindo um modelo de dedicação e fidelidade...

A vocês que em cada despedida, deixavam transparecer nos olhos tristeza, apesar dos lábios esboçarem um sorriso encantador, devo a alegria deste momento...muito obrigada!!!

“Esqueça os dias quando forem cinzentos, mas não esqueça o brilho do Sol. Esqueça as tristezas que encontrarás, mas não esqueça as vezes que sua sorte mudou. Esqueça os dias que você ficou só, mas não esqueça os amigos que teve. Esqueça os planos que pareciam não dar certo, mas não se esqueça de sonhar”.

Agradecimientos

À Deus que ilumina minha vida, meus sonhos e que me dá coragem para continuar a caminhar por mais difícil que possa parecer.

À minha querida orientadora, Profa Dra Lúcia Helena Faccioli, que antes de tudo, me deu a oportunidade de participar de seu grupo de pesquisa. Aquela que me deu atenção sem me conhecer, apenas através de simples e-mails que enviei na tentativa de ser sua aluna. Mais uma vez agradeço pela oportunidade, pela confiança, pelas dicas, conselhos, pela preocupação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho. Tenho o orgulho de poder dizer que hoje, sou totalmente diferente de 3 anos. Hoje, posso dizer com muito mais convicção que tenho base, conceitos e fundamentos para salientar que a cada dia venho me tornando uma pessoa melhor e mais capaz para enfrentar o mundo científico. A você que sempre me incentivou para que tivesse confiança e nunca desistisse... minha eterna gratidão pela paciência, dedicação e por me ensinar a vencer "o desafio". Devo uma parte de todas as minhas realizações a você. Muito obrigada.

*Ao Prof Dr Célio Lopes Silva, por disponibilizar o uso da Cabine Biológica de Segurança Nível 3, para que os procedimentos e experimentos com *Histoplasma capsulatum* pudessem ser realizados.*

*À Profa Dra Cláudia Maffei, pela cepa de *Histoplasma capsulatum* cedida para o desenvolvimento deste trabalho.*

Ao Prof Dr Carlos Pelescchi Taborda e Profa Dra Yara Maria Lucisano Valim, pela disponibilidade de participar da banca examinadora desta dissertação.

À Profa Dra Vania Luiza Deperon Bonato, Profa Dra Cleni Mara Marzocchi Machado e Prof Dr Carlos Rodrigo Zarates Blades (Kaká) pela participação em minha banca de qualificação e pelas valiosas sugestões.

Ao Prof Dr Pérsio Roxo Júnior, pela gentileza de nos ceder material de indivíduos portadores da Doença Granulomatosa Crônica.

A todos os queridos membros que fizeram parte do LIIQ e que eu tive o prazer de conhecer, mas que hoje cada um já seguiu seu caminho: Alexandre Rogério, Anderson Nunes (Homer), Adriana Malheiro, Bete, Caroline Fontanari, Daniela Carlos, Daniela Isabel de Souza, Érika Vitaliano, Fernanda Anibal (que acompanhou de perto minha vida acadêmica e sempre foi um exemplo de força para qualquer ocasião), Lúcia de Paula e Walter Turato (Tatu).

Quero dedicar um espaço para alguns agradecimentos especiais, à pessoas que também fizeram ou fazem parte deste grupo e que de maneira especial estiveram em todos os momentos ao meu lado. Gostaria de deixar registrado aqui, minha emocionante historinha desde o primeiro dia no laboratório, onde fui deixada em um “bercinho” (como dizia o Romulo) e todos me acolheram com muito carinho e me deram toda atenção necessária.

À Alexandra Ivo de Medeiros (Xan), que tive o prazer de conviver por quase 2 anos. Agradeço a você, que pegou em minha mão, e me auxiliou nos estudos para meu ingresso na pós. Agradeço ainda por todo carinho e paciência, pela companhia sempre muito agradável, sendo no laboratório ou fora dele. A você que com seu jeito todo especial, me fez começar a enxergar os primeiros conceitos imunológicos que serão

levados por toda minha vida. As noites de estudos até altas horas no laboratório foram os primeiros passos para que eu pudesse chegar onde estou hoje. Se não fosse seu “empurrãozinho”, talvez não estivesse onde estou hoje. Todos os desafios pelos quais precisei passar, sempre me lembrei daquelas suas reflexões tipo: “Faca na bota”. Você foi essencial para que eu pudesse ver qual o caminho que me levaria mais facilmente e com mais segurança a minha tão desejada vida científica. Muito obrigada por tudo e principalmente por ser minha amiga. Você está tatuada pra sempre em meu coração.

À Camila Matias Peres (Cá), minha querida amiga, companheira, irmã e parceira de qualquer momento e colaboradora deste trabalho... você acompanhou todos os meus passos depois que voltou para o laboratório. Você que me fez enxergar de maneira diferente muitas coisas, sendo elas profissionais ou pessoais. Você que esteve ao meu lado em todos os momentos... fáceis ou difíceis..minha parceira de experimento, que tantos conceitos e procedimentos experimentais me ensinou...sempre com seu jeitinho meigo, com sua calma e sempre com muita, muita paciência. Foi tão engraçado quando nos conhecemos minha amiga, que quando me recordo não tem como não rir do episódio do celular! Agradeço imensamente a você que junto com a Xan, acompanhava minhas jornadas no laboratório e os estudos diários para a prova. Foram dias difíceis, de muito trabalho e que me lembro como se tudo tivesse acontecido ontem. Hoje sou muito diferente daquela época e você contribuiu para que eu fosse uma pessoa muito melhor. Faltam-me palavras para dizer o quanto você é especial e o quanto sua companhia faz falta. Muito obrigada seria pouco para agradecer tudo o que fez e faz por mim. Agradeço pelas palavras meigas e de muito conforto que sempre faziam com que eu me sentisse mais calma...pelo simples fato de estar ao meu lado, mesmo sem dizer uma palavra naqueles dias que eu não estava muito bem ... pelos choros e risos, e por todo seu carinho a mim dedicado. Agradeço ainda, não só pela dedicação voltada para meu ingresso e sucesso na pós, mas pela amizade que nos une e que se fortalece a cada dia, mesmo distantes. "O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas

inexplicáveis e pessoas incomparáveis." Você está guardada aqui em meu coração com muito carinho. Muito obrigada!!!

À Adriana Secatto (Drix), querida amiga que também participou intensamente de todos estes momentos e que até hoje não mede esforços para me ajudar. Meus sinceros agradecimentos a você Dri, que perdia parte de seu tempo, do seu dia, deixava de fazer seus experimentos para estudar junto comigo um capítulo do livro por dia. Por lembrar e tentar me ensinar todas as questões que você afirmava que iria cair na prova e que eu deveria saber. Pelo seu empenho e esforço de me ensinar a como raciocinar e responder questões contando "a historinha". Por estar junto todos os dias, todos os momentos, nos experimentos, por ser também minha parceira e colaboradora...por me ensinar a fazer "as continhas"...por corrigir minhas "pérolas", pelas longas conversas sobre a vida...e muito mais do que isso...pelas conversas de como ser alguém melhor, de como lide com diferentes situações...de só pensar positivamente para que só desfrutasse de bons momentos. Nunca vou esquecer tudo o que fez por mim. Muito obrigada!!!

À Fabiani Frantz (Mix) que também participou de maneira especial durante este período. Pela sua alegria e por seus valiosos conhecimentos científicos que também contribuíram muito para meu crescimento científico. Pela companhia, pelos conselhos e pela força para que meus dias de trabalho fossem mais felizes e proveitosos.

Quero lembrar e registrar aqui um poema que expressa bem o meu sentimento de amizade a vocês que são minhas amigas estrelas! Faltam-me palavras para falar de vocês.

"Há pessoas estrelas e há pessoas cometas. Os cometas passam. Apenas são lembrados pelas datas que passam e retornam. As estrelas permanecem. O Sol permanece. Passam-se anos, milhões de anos e as estrelas permanecem.

Os cometas desaparecem. Há muita gente como os cometas, que passa pela vida da gente apenas por instantes. Gente que não prende ninguém e a ninguém se prende. Gente sem amigos. Gente que apenas passa, sem iluminar, sem aquecer, sem marcar presença.

Assim são as pessoas que vivem na mesma família e que passam um pelo outro sem serem presença. O importante é ser como as estrelas. Permanecer. Clarear. Estar presente. Ser luz. Ser calor. Ser vida. Ser amigo é ser estrela. Podem passar os anos, podem surgir distâncias, mas a marca da amizade fica no coração.

Corações que não querem enamorar-se de cometas, que apenas atraem olhares passageiros e passam. São muitas as pessoas cometas. Passam, recebem as palmas e desaparecem. Ser cometa é ser companheiro apenas por instantes. É explorar os sentimentos humanos. A solidão de muitas pessoas é consequência de não poderem contar com alguém. É resultado de uma vida de cometa. Ninguém fica.

Todos passam uns pelos outros. Há muita necessidade de criar um mundo de pessoas estrelas. Aquelas com as quais todos os dias podemos contar. Todos os dias ver a sua luz e sentir o seu calor. Assim são os amigos estrelas na vida da gente. Pode-se contar com eles. Eles são presença. São coragem nos momentos de tensão. São luz nos momentos de escuridão. São segurança nos momentos de desânimo. Ser estrela neste mundo passageiro, neste mundo cheio de pessoas cometas, é um desafio, mas acima de tudo uma recompensa. É nascer e ter vivido e não apenas existir".

A todos os outros integrantes do laboratório que fazem parte da geração mais nova do LIIQ e que tornam meus dias muito mais felizes e agradáveis:

Bruno Trindade (Brunão) meu amigo-irmão e parceiro de “baladas”; Roberto Nicolete (Beto) pelas agradáveis conversas nas horas do café e reuniões festivas do lab; Franciele Perusso (Fran); Francisco; Lívia Nunes; Marcela Françoso; Laís Rossi; Daiane dos Santos; Romulo Falcucci, meu companheiro de dança e que sempre me ajudou a fazer a todos do LIIQ sorrir; Priscilla Tartari (P) que compartilhou comigo os momentos de ansiedade e também de felicidade pelo nosso ingresso no mestrado e no doutorado; Cláudia Bitencourt (Calúdia) que se tornou minha companheira para qualquer ocasião; Fabiana Rosseto pela sua amizade e alegria contagiante em todos os momentos desde que entrei no laboratório; Milena Sobral, que chegou toda quietinha e hoje se tornou companheira de muitas risadas; Karina e Carlos Sorgi pelos momentos de descontração e apoio, mesmo nos dias em que meu humor não estava “dos 10 mais”...!

À Lílian Cataldi, nossa agregada, pelo companheirismo e também por dicas com protocolos experimentais.

Cada um de vocês tem uma participação diferente e muito importante para cada momento vivido durante este período. Quero lembrar ainda dos alunos do Prof Dr Auro que também estiveram presentes nesta jornada: Luciana Murakami, Denise, Adriana Canavaci (Bob), Andréia, Bruna e Ellen.

Também ao Prof Dr Auro Nomizo, não só agradeço pelo seu papel como professor, mas também pela amizade com longas e agradáveis conversas e valiosas discussões científicas ao longo destes anos.

Ao Prof Dr Marcelo Dias Baruffi, pelas dicas e por disponibilizar seu laboratório para realização de alguns experimentos.

Ao Dr Carlos Artério Sorgi e Érika Vitaliano Garcia, pelo apoio técnico e organização do nosso laboratório.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Tuberculose (NPT): Aninha, Iza, Rogério (Wimbe), Rodrigo, Kaká, Thiago, Paty, Beraba, Priscilla, Marina e Wendy.

À todos os colegas e amigos, mas como são muitos, gostaria de representá-los pelos meus queridos amigos que ingressaram comigo na mesma seleção, ou que foram colegas de disciplinas, especialmente no curso de Imunologia Celular (BOPE): Alex Machado, Breno Melo, Carolina Caliári (Furinho), Carolina Fossa, Cássia Alves (Cassião), Daiani Alves (Thithi), Eduardo Crosara, Felipe Maia, Fernanda Agostinho, Gabriela Scortegagna (Bat Girl 1), Giuliano, Jaqueline, José Eduardo Cury Fiuza (Robin Hood da Paixão), Juliana Ueda (Bat Girl 2), Nadiele Fagundes (Magenta), Paola Fedatto, Ricardo Louzada (Qjo), Rafael Prado (Parcero), Vânia Sammartino, Tiago Medina. Obrigada pela convivência mais do que agradável, pelas discussões científicas mesmo na hora do sufoco e pelas divertidas idas no bar “Os Caipira Country Bar”. Essa disciplina com certeza deixou saudades...

Também a outros colegas da Pós: Manuela, Diego (Beackman), Everton, Rodrigo (Turquinho), Luciana, Jaqueline, Fabrine, Alessandra Souza, Juliana, Kellen, Liliana, Larissa Nicolete e a todos os outros.

"Amigo é aquela pessoa que o tempo não apaga, que a distância não esquece, que a maldade não destrói. É um sentimento que vem de longe, que ganha lugar no seu coração e você não substitui por nada. É alguém que você sente presente, mesmo quando está longe... Ser amigo não é coisa de um dia, são atos, palavras e atitudes que se solidificam no tempo e não se apagam mais."

Ao Prof Dr João Santana da Silva, pela oportunidade de fazer parte do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada e a todos os docentes da FMRP e da FCFRP- USP que contribuíram muito para o início da minha formação científica.

À Ana Cristine, secretária da nossa Pós-Graduação, que torceu por mim a cada minuto desde que cheguei à faculdade. Obrigada pela força, pela confiança e por cuidar com tanto carinho do programa de Imunologia Básica e Aplicada.

Ao Ronaldo Araújo e Reinaldo do Biotério da FCFRP-USP, por cuidarem com tanto carinho e cuidado dos animais utilizados nos experimentos deste trabalho.

Novamente a toda minha família que torceram e vibraram por mim a cada conquista e realização, e também àqueles que de alguma maneira, distantes ou próximos, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- Processo número 2007-02624-0) por conceder a bolsa, fundamental para a realização deste trabalho, e também à FAEPA.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e no Núcleo de Pesquisa em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Essa dissertação foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2007/02624-0, vinculada ao projeto Temático “Modulação das Respostas Imunes Inata e Adquirida por Leucotrienos e Prostaglandinas” (Processo 2002/12856-2).

Resumo

SOARES, EM. Estudo da Participação de β_2 -integrina nas Atividades Fagocítica e Microbicida de Macrófagos Alveolares e Peritoneais na Histoplasmose. 2009. 108 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O *Histoplasma capsulatum* (*H.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. Na resposta imune do hospedeiro, as integrinas participam nos mecanismos fagocíticos, essenciais na resposta à histoplasmose. As β_2 -integrinas contêm uma cadeia β_2 , também conhecida como CD18, comum a várias moléculas de adesão, e uma cadeia α variável. Até o momento foram identificadas quatro cadeias α distintas: α_L , a qual forma o dímero $\alpha_L\beta_2$, também conhecido como LFA-1 (do inglês “leukocyte function antigen-1”) ou CD11aCD18; α_m , formando $\alpha_m\beta_2$, chamado Mac-1 (do inglês “macrophage differentiation antigen 1”) ou CR3 (do inglês “complement receptor 3”) ou CD11bCD18; α_x , formando $\alpha_x\beta_2$, CD11cCD18, gp150, 95 ou CR4 (do inglês “complement receptor 4”) e a cadeia α_d , formando $\alpha_d\beta_2$, CD11dCD18. Neste trabalho, investigamos o papel da molécula CD18 em macrófagos alveolares (MAs) e macrófagos peritoneais (MPs) nas funções efetoras contra *H. capsulatum* e a relação do leucotrieno B₄ (LTB₄) nestas respostas. Inicialmente confirmamos que MAs e MPs provenientes dos animais CD18^{low}, expressam baixa porcentagem de CD11bCD18 (CR3). Demonstramos que, como esperado, MAs e MPs de ambos os grupos fagocitam mais leveduras opsonizadas com complemento do que não opsonizadas. Surpreendentemente, MAs de animais CD18^{low} fagocitam 136% mais leveduras opsonizadas do que MAs de C57BL/6. Também, MPs destes animais fagocitam aproximadamente 240% mais leveduras quando infectados com *H. capsulatum* e opsonizados, quando comparados aos MPs de C57BL/6. A adição de LTB₄ aumenta a atividade fagocítica em 520% por MAs de animais C57BL/6 e 200% por MAs de CD18^{low}, enquanto que a adição de LTB₄ aumentou a fagocitose dos MPs de animais C57BL/6 em 600% vezes quando comparado aos MPs de CD18^{low}. Este fenômeno foi inibido pela pré-incubação destas células com antagonista específico do receptor BLT1 apenas em animais C57BL/6. A adição de LTB₄ na cultura de MPs reduziu a porcentagem de morte das leveduras apenas nos animais C57BL/6. Os animais CD18^{low} produzem espontaneamente mais LTB₄ e apresentaram um grande aumento na produção de óxido nítrico quando comparados aos animais C57BL/6. Pacientes

acometidos pela Doença Granulomatosa Crônica (DGC) possuem deficiência congênita da molécula CD18. Células fagocíticas isoladas do sangue periférico de pacientes com DGC foram incubadas com leveduras opsonizadas e assim como macrófagos de animais deficientes de CD18, fagocitam mais leveduras opsonizadas (900%) ou não (300%), quando comparado com células de indivíduos saudáveis. Sugerimos que a molécula CD18 tem importante participação nos mecanismos efetores da imunidade inata, por mecanismo dependente de mediadores lipídicos, como o LTB₄, no controle dos mecanismos de defesa contra *H. capsulatum*.

Palavras-Chave: Histoplasmose, β_2 -integrina, Fagocitose, LTB₄.

Abstract

SOARES, EM. The Role of β_2 -integrin in Alveolar and Peritoneal Macrophages Phagocytic and Antimicrobial Activities in Histoplasmosis. 2009. 108 p. Dissertation (Master Degree). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. *Histoplasma capsulatum* (*H. 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). In the immune response of host, integrins participate in phagocytic mechanisms, fundamental in the response against histoplasmosis. β_2 -integrin has a β_2 chain known as CD18, usual to many adhesion molecules, and a variable α chain. Until the moment, it was identified four variable α chains: α_L , that constitutes the dimer $\alpha_L\beta_2$, also known as LFA-1 (leukocyte function antigen) or CD11aCD18; α_m forming the $\alpha_m\beta_2$ or Mac-1 (macrophage differentiation antigen 1) and CR3 (complement receptor 3) and CD11bCD18; α_x , constituting the dimer $\alpha_x\beta_2$, CD11cCD18, gp150, 95 or CR4 (complement receptor 4) and α_d chain, that constitutes $\alpha_d\beta_2$, CD11dCD18. In the present study, we sought to investigate the effect of CD18 in alveolar (AMs) and peritoneal macrophages (PMs) effector functions against *H. capsulatum* and the relation of LTB₄ in those responses. We confirm that AMs and PMs of CD18^{low} mice have low expression of β_2 -integrin compared to wild type mice (WT). We demonstrate that, as expected, AMs and PMs from WT and CD18^{low}, phagocytosed more complement (C)-opsonized yeasts than the unopsonized yeasts. Surprisingly, AMs from CD18^{low} mice phagocytosed 136% more (C)-opsonized yeasts than AMs obtained from WT. Also, PMs of CD18^{low} mice phagocytosed 240% more (C)-opsonized yeasts than PMs of WT. The addition of LTB₄, increases the phagocytic activity by AMs of WT mice in 520% and by AMs from CD18^{low} mice in 200%, while the addition of LTB₄ only increased the phagocytosis of C-opsonized *H. capsulatum* by PMs of C57BL/6 mice in 600%, when compared with PMs from CD18^{low} mice. This phenomenon was inhibited by pretreatment of these cells with an specific BLT1 receptor antagonist only in PMs from C57BL/6 mice. The addition of LTB₄ in the culture of MPs reduced the percentage of death of yeasts in animals C57BL/6. CD18^{low} mice, spontaneously produce more LTB₄ and showed a large increase in the production of nitric oxide when compared to C57BL/6. Patients affected by Chronic Granulomatous Disease (DGC) have congenital deficiency of the CD18 molecule. Phagocytic cells isolated from peripheral blood of patients with DGC were incubated with C-opsonized yeasts and as well as macrophages from CD18^{low}, phagocytosed more C-opsonized yeasts (900%) or not (300%) when compared with cells from healthy individuals. Therefore, we suggest that the CD18 molecule has important participation in the effector mechanisms of innate immunity, a mechanism dependent on lipid mediators such as LTB₄, to control these mechanisms in defense against *H. capsulatum*.

Keywords: Histoplasmosis, β_2 -integrin, Phagocytosis, LTB₄.

Lista de Figuras

- Figura 1.** *MAs obtidos de animais CD18^{low} expressam baixa porcentagem da molécula CD18.* Pág. 34
- Figura 2.** *MPs obtidos de animais CD18^{low} expressam baixa porcentagem da molécula CD18* Pág. 36
- Figura 3.** *Neutrófilos provenientes de indivíduos com DGC expressam menos CD18 do que os de indivíduos controle.* Pág. 38
- Figura 4.** *Opsonização das leveduras de *H. capsulatum* com soro de camundongo induz fagocitose mais eficiente.* Pág. 40
- Figura 5.** *“Padronização” do tempo de fagocitose.* Pág. 42
- Figura 6.** *(A) Curva “dose-resposta” da intensidade de fluorescência de diferentes diluições de leveduras marcadas com FITC. (B) Números de UFCs recuperadas após marcação das leveduras com FITC foi igual aos não marcados.* Pág. 45
- Figura 7.** *Fagocitose mais eficiente ocorre quando 1 MA é incubado com 1 levedura.* Pág. 47
- Figura 8.** *Fagocitose (A) mais eficiente e maior produção de NO₂⁻ (B) ocorre quando 1 MP é incubado com 1 levedura.* Pág. 49
- Figura 9.** *Deficiência da molécula CD18 favorece a fagocitose de *H. capsulatum* opsonizada ou não com complemento.* Pág. 52
- Figura 10.** *LTB₄ exógeno aumenta a fagocitose de *H. capsulatum* opsonizado, mas não daqueles não opsonizados.* Pág. 54
- Figura 11.** *Efeito do Antagonista de BLT1 na Fagocitose.* Pág. 56
- Figura 12.** *Deficiência de CD18 diminui a atividade microbicida de MPs.* Pág. 58
- Figura 13.** *MPs de animais CD18^{low} liberam mais LTB₄ espontaneamente após a fagocitose de leveduras.* Pág. 60
- Figura 14.** *Deficiência de CD18 aumenta a produção de NO por MPs.* Pág. 62

Lista de Tabelas

Tabela 1- *Comparação do Porcentual de Macrófagos Expressando as Moléculas CD11b, CD18 e CD11bCD18* Pág. 36

Lista de Abreviaturas

- 5-LO:** enzima 5 lipoxigenase
- 5HPETE:** hidroperoxieicosatetraenóico
- AA:** ácido araquidônico
- BLT₁:** antagonista do receptor LTB₄
- CR3:** receptor do complemento tipo 3
- CR:** receptor de complemento
- DGC:** Doença Granulomatosa Crônica
- ELISA:** ensaio imunoenzimático
- FLAP:** proteína ativadora da 5- lipoxigenase
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- H. capsulatum:*** *Histoplasma capsulatum*
- ICAM:** molécula de adesão intercelular
- i.p.:** intraperitoneal
- i.t.:** intratraqueal
- IFN- γ :** interferon gama
- IL:** interleucina
- LAD I:** (do inglês Leukocyte Adhesion Defficiency-I)
- LFA-1:** antígeno de função de leucócitos 1
- LTA₄:** leucotrieno A₄
- LTA_H:** leucotrieno A₄ hidrolase
- LTA_C:** leucotrieno A₄ sintetase
- LTB₄:** leucotrieno B₄
- LTC₄:** leucotrieno C₄
- LBA:** lavado broncoalveolar
- LCP:** lavado da cavidade peritoneal
- LT:** leucotrieno
- MAs:** macrófagos alveolares
- MPs:** macrófagos peritoneais
- MIF:** média da intensidade de fluorescência
- NADPH:** (do inglês “nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”)
- NEED:** cloreto de N-etil-enediamina di-hidratado

NO: óxido nítrico

NO²⁻: Nitrito

NO³⁻: nitrato

PG: prostaglandina

PLA_{2c}: fosfolipase A₂ citosólica

PGE₂: prostaglandina E₂

PBS: salina tamponada com fosfato

PMN: polimorfonucleares

ROS: espécies reativas do oxigênio

SBF: soro bovino fetal

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFC: unidades formadoras de colônias

Sumário

<i>Resumo</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>ii</i>
I- Introdução	Pág. 01
1.1. <i>Histoplasrose</i>	Pág. 02
1.2. <i>Leucotrienos e Prostaglandinas nas Infecções</i>	Pág. 04
1.3. <i>Macrófagos na Histoplasrose</i>	Pág. 07
1.4. <i>Resposta Imune na Infecção por Histoplasma capsulatum</i>	Pág. 08
1.5. <i>Integrinas</i>	Pág. 10
1.6. β_2 – <i>integrinas</i>	Pág. 11
1.7. β_2 - <i>integrinas e os Mecanismos de Entrada de Histoplasma capsulatum</i>	Pág. 12
1.8. β_2 - <i>integrinas na Ativação da Capacidade Fagocítica e Microbicida</i>	Pág. 13
II- Justificativa e Objetivo	Pág. 15
2.1. <i>Estratégias de Estudo</i>	Pág. 17
III- Materiais e Métodos	Pág. 18
3.1. <i>Animais</i>	Pág. 19
3.2. <i>Obtenção e Cultivo de Leveduras de H. capsulatum em Meio Sólido</i>	Pág. 19
3.3. <i>Obtenção e Cultivo de Macrófagos Alveolares e Peritoneais</i>	Pág. 20
3.4. <i>Isolamento de Neutrófilos e Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano</i>	Pág. 21
3.5. <i>Obtenção do Soro para a Opsonização de Leveduras de H. capsulatum</i>	Pág. 22
3.6. <i>Opsonização de H. capsulatum com Soro (Fonte de Complemento)</i>	Pág. 23
3.7. <i>Ensaio de Fagocitose</i>	Pág. 23

3.7.1. Fagocitose Avaliada Através da Contagem de Leveduras no Interior das Células após Coloração Panótico.....	Pág. 24
3.7.2. Fagocitose Avaliada Empregando-se Leveduras Marcadas com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).....	Pág. 25
3.8. Confeção de Lâminas para Avaliação da Fagocitose de Leveduras por Microscopia de Fluorescência.....	Pág. 26
3.9. Avaliação da Atividade Microbicida.....	Pág. 27
3.10. Avaliação da Produção de Nitrito em Sobrenadante de Cultura de Células.....	Pág. 27
3.11. Análise da Expressão das Moléculas CD11b e CD18 por Citometria de Fluxo.....	Pág. 28
3.12. Detecção de Leucotrieno B ₄ (LTB ₄) em Sobrenadante de Cultura de Macrófagos.....	Pág. 29
3.13. Análise Estatística.....	Pág. 29
3.14. Soluções e Meios Utilizados nos Procedimentos Experimentais.....	Pág. 30
IV- Resultados.....	Pág. 32
4.1. Análise da Porcentagem de Expressão das Moléculas CD11b, CD18 e CD11bCD18 (CR3) por Macrófagos Alveolares.....	Pág. 33
4.2. Análise da Porcentagem de Expressão das Moléculas CD11b, CD18 e CD11bCD18 (CR3) em Macrófagos Peritoneais.....	Pág. 35
4.3. Análise da Porcentagem de Expressão de CD18 por Neutrófilos de Pacientes com Doença Granulomatosa Crônica.....	Pág. 37
4.4. Padronização do Ensaio de Fagocitose	Pág. 39
4.4.1. Determinação do Soro mais Adequado como a Fonte de Complemento.....	Pág. 39
4.4.2. Avaliação do Melhor Tempo de Fagocitose de Leveduras de <i>H. capsulatum</i>	Pág. 41
4.4.3. Padronização do Ensaio de Fagocitose Avaliada pela Média de Intensidade de Fluorescência.....	Pág. 43

4.4.3.1- Curva “dose-resposta”.....	Pág. 43
4.4.4. Avaliação da Melhor Proporção entre o Número de Leveduras e o de Macrófagos Alveolares.....	Pág. 46
4.4.5. Avaliação da Melhor Proporção de Leveduras e de Macrófagos Peritoneais.....	Pág. 48
4.5. Deficiência da Molécula CD18 Favorece a Fagocitose de <i>H. capsulatum</i> por Macrófagos Alveolares e Peritoneais.....	Pág. 50
4.6. Leucotrieno B ₄ Exógeno Aumenta a Fagocitose de <i>H. capsulatum</i> Opsonizado, mas não daqueles não Opsonizados.....	Pág. 53
4.7. Efeito do Antagonista de BLT ₁ na Fagocitose de MAs e MPs.....	Pág. 55
4.8. LTB ₄ Exógeno Aumenta a Atividade Microbicida Somente de MPs de Animais C57BL/6.....	Pág. 57
4.9. MPs Deficientes de CD18 Liberam Menos Mediadores Lipídicos do que Aqueles de Animais C57BL/6	Pág. 59
4.10. Deficiência da Molécula CD18 aumenta Produção de NO por MPs.....	Pág. 61
V- Discussão	Pág. 63
VI- Conclusão	Pág. 71
VII- Referências Bibliográficas	Pág. 73

Introdução

I-INTRODUÇÃO

1.1. Histoplasmose

A histoplasmose é uma doença infecciosa causada pelo *Histoplasma capsulatum*, que foi descrito primeiramente por Samuel Darling, no início do século XX, quando este analisava material de trabalhadores empregados na construção do Canal do Panamá ¹. Nas primeiras descrições, acreditava tratar-se de um protozoário de hábito intracelular, pois havia sido observado no interior de macrófagos. Em 1912 foi demonstrado ser um fungo, sendo denominado *Histoplasma capsulatum*. Em 1933 foram descritas as características de cultivo do mesmo ².

O *H. capsulatum* é um fungo dimórfico, de distribuição mundial, parasita intracelular, não encapsulado, presente no solo contaminado e em fezes de pássaros e morcegos na forma de micélio, que é a forma infectante. 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 de *H. capsulatum* encontram-se em fezes de pássaros e morcegos, motivo pelo qual a histoplasmose também é conhecida como “doença das cavernas”. Os mamíferos contraem a infecção pela inalação de conídios que alcançam os alvéolos onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares ^{3,4}. A conversão de conídios para leveduras pode variar de horas a dias dependendo da variação da temperatura ⁵. Esta mudança é crítica, pois as leveduras são as responsáveis pela patogenia na histoplasmose ⁶. A histoplasmose, embora endêmica em vários continentes, é predominante na América Central e América do Norte ⁷. No Brasil, esta micose

é endêmica em todas as regiões, sendo que inquéritos epidemiológicos demonstram maior incidência nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste ⁸⁻¹¹.

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. Em 95% dos 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 contendo o fungo. A infecção nestes indivíduos evolui para cura espontânea, sendo esta a forma assintomática. No entanto, 5% dos indivíduos imunocompetentes manifestam a forma sintomática, nos quais a histoplasmose pulmonar aguda progride para a forma crônica, que pode ou não evoluir para forma disseminada. Acredita-se que nos indivíduos infectados a formação de granulomas compactos ou frouxos no pulmão é o que determina a contenção do fungo ao local da infecção ou sua disseminação para o baço, fígado, sistema nervoso central e glândulas adrenais, que são órgãos que possuem células do sistema mononuclear fagocítico ^{6,12,13}. Com base em estudos clínicos, sabe-se que indivíduos que desenvolvem a forma disseminada da doença não apresentam (a) reação inflamatória eficiente e (b) formação de granulomas compactos que impedem a disseminação do fungo ¹⁴. A inflamação granulomatosa é uma reação do tecido a diversos estímulos como bactérias, fungos e parasitas ¹⁵. 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 ¹⁶. 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, processo desencadeado por imunossupressão ^{1,6,13}.

1.2. Leucotrienos e Prostaglandinas nas Infecções

Leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA) pela via da enzima 5-lipoxigenase (5-LO). Estes são potentes mediadores quimioatraentes para neutrófilos e eosinófilos ¹⁷⁻¹⁹, e são liberados após ativação celular como, por exemplo, por patógenos e mediadores solúveis. Estes fatores produzem um distúrbio da membrana celular e aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação de fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) para a membrana nuclear. Este processo culmina na liberação do AA dos fosfolipídios de membrana. O AA liberado é transformado no ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) que por ser instável é rapidamente convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) pela ação da enzima 5-LO. Esta enzima é transposta do citosol para a membrana nuclear e ativada pela Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP). O LTA₄ pode ser transformado em LTB₄, pela ação da LTA₄ hidrolase, ou em LTC₄ intracelular pela ação da enzima LTC₄ sintase que catalisa a conjugação de LTA₄ com glutathiona reduzida. LTC₄ intracelular é transportado através da membrana e convertido, pela ação gamaglutamiltransferase, em LTD₄ e LTE₄, conjuntamente denominados de cisteinil-leucotrienos ²⁰.

Os LTs são secretados por diferentes células, entre elas macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos ^{21,22}. Dentre essas células, destacam-se os macrófagos alveolares (MAs) residentes, que são células responsáveis pela

manutenção da esterilidade do espaço alveolar ²³ e cuja capacidade fagocítica, microbicida e de síntese de LTs, excede às dos macrófagos de outros tecidos. LTs são liberados em uma variedade de desordens inflamatórias do pulmão, incluindo asma ²⁴ e doenças infecciosas ²⁵⁻²⁷. Esses mediadores são produzidos rapidamente após o estímulo, pois a maquinaria enzimática para síntese destes compostos é constitutiva nas células mielóides. Nesse aspecto, LTs diferem dos mediadores protéicos, que requerem novamente uma síntese, e, portanto são produzidas horas após a estimulação celular ²⁸.

Além do papel de LTs como ativador celular e fator quimiotático para neutrófilos e eosinófilos ¹⁷⁻¹⁹, vários trabalhos demonstram seu papel na defesa do hospedeiro contra os agentes infecciosos. O papel dos LTs na defesa do hospedeiro foi demonstrado primeiramente por Wirth *et al.* ²⁹. Eles mostraram que LTB₄ e LTC₄ aumentam a fagocitose e morte de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos peritoneais. Trabalhos do nosso grupo de pesquisa demonstraram aumento na síntese de LTB₄ e LTC₄ no pulmão de camundongos infectados com *H. capsulatum* ²⁵, *Strongyloides venezuelensis* ³⁰ e de LTB₄ na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* ³¹. Na histoplasmose murina, a depleção deste mediador, através do tratamento dos animais infectados com inibidor da síntese de LTs, resultou na morte de 100% dos animais tratados, enquanto nenhum dos animais apenas infectados morreu até 30 dias após a infecção ²⁵. Ainda, Secatto *et al* ³², demonstraram que MPs obtidos de camundongos 5LO^{-/-} apresentaram uma diminuição de 50% na capacidade fagocítica de leveduras opsonizadas com soro imune (IgG) quando comparado com MPs dos camundongos selvagens, e que a adição de LTB₄ e LTC₄ exógeno foi capaz de restaurar a capacidade fagocítica dos MPs obtidos dos camundongos 5LO^{-/-}.

Neste contexto, Mancuso e Peters-Golden ³³ demonstraram *in vitro* que LTs aumentam a fagocitose de bactérias opsonizadas com soro imune ou IgG. As interações dessas opsoninas com seus receptores ativam cascatas de sinalização que resultam, no aumento de Ca²⁺ intracelular, liberação de AA e ativação de quinases como SyK, PI-3K, MAPK e PKC. Além disso, sabe-se que diferentes isoformas de PKC ativam proteínas do complexo NADPH oxidase, responsáveis pela geração dos intermediários reativos do oxigênio (ROI) importantes nos mecanismos microbicidas dos macrófagos ³⁴.

Além dos LTs, as PGs também são mediadores lipídicos derivados do AA pela via das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). As duas isoformas catalisam uma reação de dois passos que convertem AA em PGH₂, que é instável ³⁵. De maneira geral, a COX-1 é constitutivamente expressa em todas as células nucleadas, enquanto a COX-2 é preferencialmente detectada em tecidos inflamados. Baseado nesta expressão diferenciada, a hipótese sugerida é que a COX-1 é responsável pela produção basal de prostanóides envolvidos em processos fisiológicos, enquanto a COX-2 é responsável pelo aumento de prostanóides, principalmente de PGE₂, durante a inflamação e injúria tecidual ^{36,37}. Dentre as células do sistema imune, PGE₂ é produzida pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos e células dendríticas ^{38,39}. Este mediador apresenta funções reguladoras na ativação de linfócitos T e na secreção de citocinas ^{40,41}. Snijdwint *et al* ⁴⁰, demonstraram que a PGE₂ inibe de modo dose-dependente, a produção de IFN-γ por leucócitos do sangue periférico e linfócitos CD4⁺, aumenta a liberação de IL-5, mas não altera a de IL-4. Ainda, a PGE₂ solúvel ou encapsulada inibe a

produção de IL-1⁴² e TNF- α por macrófagos, e a produção de IL-2 por linfócitos⁴⁰, diminuem a fagocitose^{43,44} e suprimem a atividade microbicida das células NK⁴⁵. Aronoff *et al*⁴³, demonstraram *in vitro*, que a PGE₂ inibe a fagocitose de bactérias mediada pelo receptor Fc γ R.

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa, demonstraram o papel das PGs na Histoplasmose, sendo que as PGs contribuem para a patogênese da doença, e sua inibição com celecoxibe resultou na sobrevivência de até 80% dos animais infectados com o inóculo letal de *H. capsulatum*, quando comparados com os animais somente infectados, que tiveram 100% de mortalidade. Ainda a inibição das PGs, resultou na diminuição da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da resposta imune celular, diminuição do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o espaço broncoalveolar, aumento da síntese de NO e da fagocitose⁴⁶.

1.3 . Macrófagos na Histoplasmose

Os macrófagos alveolares são as primeiras células a entrarem em contato com conídios e leveduras de *H. capsulatum* dentro dos alvéolos do hospedeiro. Nos pulmões, os macrófagos localizam-se no epitélio respiratório, no parênquima pulmonar e no interior dos alvéolos, possibilitando o contato com diferentes agentes agressores ambientais⁴⁷⁻⁴⁹. O local estratégico de macrófagos nos tecidos, como pulmão, sugere que estas células podem ter importante papel na interface entre a resposta imune inata e adquirida contra patógenos. Basicamente, há dois mecanismos pelos quais estes fagócitos podem destruir os microorganismos. O primeiro mecanismo é através da

síntese de radicais tóxicos de oxigênio e/ou óxido nítrico. Um segundo mecanismo, seria através das hidrolases lisossomais liberadas no fagolisossomo. Após a fagocitose, o *H. capsulatum* permanece no compartimento endocítico dos macrófagos alveolares, multiplicando-se no fagolisossomo. Um dos mecanismos pelos quais *H. capsulatum* sobrevive no interior de macrófagos está relacionado à alcalinização do microambiente do fagolisossomo, impedindo a ação de enzimas proteolíticas dependentes de pH ideal para sua ação biológica ^{50,51}. Além disso, em monócitos humanos, leveduras são capazes de impedir a fusão das vesículas lisossomais ao fagossomo como estratégia de sobrevivência no interior destas células ^{52,53}. A ineficiência na fusão destas vesículas parece estar relacionada com a síntese de proteínas por *H. capsulatum*, no interior do fagossoma ⁵⁴.

Bullock e Wright ⁵⁵ demonstraram pela primeira vez a ligação e internalização de *H. capsulatum* via receptores da família CD18 (MAC-1 ou CR3 ou CD11bCD18) em macrófagos derivados de monócitos humanos. Posteriormente, Newman *et al.* ⁴ demonstraram que esta interação também ocorre em macrófagos alveolares e em menor extensão em monócitos humanos, sendo que LONG *et al.* ⁵⁶ descreveram que o componente de *H. capsulatum* responsável pela interação com CD18 é uma proteína de 60 kilodaltons denominada hsp60 presente na superfície do patógeno.

1.4. Resposta Imune na Infecção por *Histoplasma capsulatum*

A resposta imune nesta micose é caracterizada por ativação de macrófagos e padrão de resposta celular, dependente de linfócitos T auxiliares tipo I (Th1), sendo que a produção de TNF- α , IL-12, IFN- γ e moléculas

microbicidas como óxido nítrico (NO) são fundamentais para destruição de *H. capsulatum*. Zhou, Miller e Seder, e Allendoerfer e Deepe ⁵⁷ descreveram a importância de TNF- α na histoplasmose primária e secundária. A ausência de TNF- α durante a histoplasmose pulmonar primária, resultou na diminuição da síntese de IL-12, citocina fundamental para indução de respostas imunes do padrão Th1. No entanto, o bloqueio de TNF- α na reinfecção pulmonar resultou no aumento de IL-4 e IL-10 e direcionamento da resposta imune para padrão humoral (Th2) ^{57,58}. Allendoerfer e Deepe ⁵⁹ descreveram as funções desempenhadas pelos dois receptores de TNF- α , TNF-R1 e TNF-R2 no decorrer da infecção. Em infecções primárias, os dois receptores são fundamentais, sendo TNF-R1 relacionado à reação inflamatória e TNF-R2 à geração de IFN- γ . Em reinfecções, somente TNF-R1 é fundamental, sendo que seu bloqueio resultou na síntese exacerbada de IL-4 e IL-10. Zhou *et al.* ⁶⁰ descreveram que animais infectados intravenosamente com *H. capsulatum* e tratados com IL-12 exógena têm mortalidade e a carga fúngica no baço reduzidas. Os efeitos deste tratamento são eliminados pela administração concomitante de anticorpos anti-IFN- γ , demonstrando um mecanismo indireto de ação da IL-12 nesta infecção. Allendoerfer e Deepe ⁶¹ demonstraram que IL-12 é fundamental nas infecções secundárias por *H. capsulatum*, pois animais tratados com anticorpos anti-IL-12 não são capazes de resolver a infecção, apresentam diminuição na sobrevivência e aumento na carga fúngica em relação à animais tratados com anticorpos irrelevantes. Recentemente Deepe e Gibbons ⁶², demonstraram o papel protetor das IL-17 e IL-23 na infecção por *H. capsulatum*. A IL-17 participa da formação de uma resposta inflamatória ótima para proteção, sendo dependente ainda do aumento de IL-6 e IL-10. A IL-23

apresenta um papel regulador em conjunto com a IL-17 nesta infecção. Também Lane *et al.*⁶³ demonstraram que IFN- γ aumenta a atividade fungicida de macrófagos *in vitro* por mecanismos dependentes do aumento da expressão de iNOS, que é a enzima responsável pela síntese de NO.

Medeiros *et al.*²⁵ demonstraram que os LTs têm papel fundamental durante a histoplasmose experimental, sendo que a inibição da síntese destes mediadores resultou no aumento da produção de TNF- α , IL-1 e KC e da carga fúngica e diminuição da sobrevivência e da síntese de IL-2, IL-12, IL-5 e IFN- γ e NO. Sabendo-se que os LTs têm importante papel na resposta protetora contra *H. capsulatum*, Secatto *et al.*³² demonstraram que a ausência deste mediador em animais 5-LO^{-/-} resultou na disseminação e morte 100% dos animais. Além disso, a ausência de LTs resultou no aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e IFN- γ , (ii) aumento no recrutamento de neutrófilos (iii) diminuição da ativação de células TCD4⁺ e TCD8⁺ efetoras no pulmão e (iv) diminuição da síntese de NO.

1.5. Integrinas

Ao longo da evolução, seres vivos desenvolveram moléculas especializadas em interações entre células ou células e matriz extracelular, sendo estas denominadas moléculas de adesão. Atualmente as moléculas de adesão são classificadas em famílias de acordo com características funcionais e estruturais, como selectinas, integrinas e membros da superfamília das imunoglobulinas^{64,65}. O termo integrina foi usado pela primeira vez em 1987, para descrever um grupo de proteínas estruturais e funcionalmente relacionadas⁶⁶. Estas são moléculas glicoprotéicas, transmembrânicas,

compostas de duas cadeias distintas, α e β , ligadas entre si não covalentemente^{67,68}, e são responsáveis por interações célula-célula, células-matriz extracelular ou ainda célula-patógeno. Integrinas são estruturas Até o momento foram clonadas 17 cadeias α e 8 cadeias β e identificados 24 dímeros $\alpha\beta$ distintos⁶⁷. As integrinas têm papel funcional e estão incluídas na homeostase, morfogênese tecidual, regulação no crescimento e diferenciação celular, inflamação, imunidade inata e adaptativa⁶⁸. Na resposta imune, as integrinas participam na fagocitose, apresentação de antígenos, formação da sinapse imunológica com ativação de linfócitos T e migração celular⁶⁵.

1.6. β_2 – integrinas

As β_2 – integrinas contêm uma cadeia β_2 , também conhecida como CD18, comum a várias moléculas de adesão e uma cadeia α variável. Até o momento foram identificadas quatro cadeias α distintas: α_L , a qual forma o dímero $\alpha_L\beta_2$, também conhecido como LFA-1 (do inglês “leukocyte function antigen-1”) ou CD11aCD18; α_m , formando $\alpha_m\beta_2$, chamado Mac-1 (do inglês “macrophage differentiation antigen 1”) ou CR3 (do inglês “complement receptor 3”) ou CD11bCD18; α_x , formando $\alpha_x\beta_2$, CD11cCD18, gp150, 95 ou CR4 (do inglês “complement receptor 4”) e a cadeia α_d , formando $\alpha_d\beta_2$, CD11dCD18. Assim sendo, a família das β_2 – integrinas tem até o momento quatro membros distintos⁶⁸.

A função primeiramente descrita das β_2 – integrinas foi a adesão celular de leucócitos ao endotélio vascular para que ocorra a migração celular para o foco inflamatório. Durante processos inflamatórios, o endotélio vascular passa a

expressar moléculas chamadas ICAM (do inglês “intercellular adhesion molecule”), as quais são ligantes para β_2 -integrinas expressas em leucócitos.

Assim, para uma melhor compreensão da função das β_2 -integrinas, utilizamos neste trabalho, os camundongos CD18^{low} que apresentam fenótipo similar aos pacientes com deficiência da adesão leucocitária ou LAD I (do inglês Leukocyte Adhesion Deficiency-I), os quais, por terem deficiência na expressão de CD18 são mais suscetíveis a infecções recorrentes ⁶⁹. Ainda, pacientes com Doença Granulomatosa Crônica (DGC), doença esta que causa uma disfunção na capacidade fagocítica, decorrente de defeitos na produção de NADPH (do inglês “nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”), uma oxidase produzida pelas espécies reativas do oxigênio (ROS) durante o “burst” respiratório. Os indivíduos que possuem a DGC, também apresentam deficiência na expressão de CD18, e seus fagócitos (neutrófilos e mononucleares) são incapazes de matar microrganismos, resultando também em suscetibilidade à infecções ⁷⁰⁻⁷².

1.7. β_2 -Integrinas e os Mecanismos de Entrada de *Histoplasma capsulatum*

Bullock e Wright ⁵⁵ demonstraram pela primeira vez a ligação e internalização de *H. capsulatum* via receptores da família CD18 (MAC-1 ou CR3 ou CD11bCD18) em macrófagos derivados de monócitos humanos. Tal processo pode ser inibido parcialmente por anticorpos contra CD11a, CD11b ou CD11c, e totalmente por anticorpos contra a cadeia CD18, comum aos três heterodímeros. Posteriormente, Newman *et al.* ⁴ demonstraram que esta interação também ocorre em macrófagos alveolares e em menor extensão em monócitos humanos. No entanto, estes trabalhos não estabeleceram qual o componente do patógeno responsável por esta interação.

1.8. β_2 - integrinas na Ativação da Capacidade Fagocítica e Microbicida

Dois mecanismos distintos de fagocitose têm sido descritos, dependendo do tipo de receptor envolvido. Tipo 1: mediado por receptores Fc γ R, nos quais se ligam partículas opsonizadas com IgG; Tipo 2: mediado por receptores do complemento tipo 3, que ligam alvos opsonizados com C3bi⁷³. O sistema complemento consiste em várias proteínas plasmáticas que são ativadas por microrganismos e promovem a inflamação e destruição destes. O fragmento C3b é resultado da ativação do sistema complemento, cuja principal função é a opsonização de partículas.

Dois domínios de ligação têm sido identificados no CR3⁷⁴. O primeiro domínio é o CD11b que liga ICAM-1, C3bi e fibrinogênio; e possui um domínio semelhante à lectina que reconhece manose e β -glucana. Alguns fungos como, por exemplo, *Candida albicans* podem interagir diretamente com ambas as subunidades de CR3⁷⁵, ao passo que outros como o *H. capsulatum* interagem com CD18⁴.

Em nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que animais CD18^{low} são menos eficientes no desenvolvimento de resposta imune na infecção por *H. capsulatum*, pois apresentam menor reação de hipersensibilidade do tipo tardio, maior carga fúngica nos pulmões e no baço e menor sobrevivência em relação aos animais selvagens⁷⁶. Surpreendentemente, animais CD18^{low} apresentam reação inflamatória exacerbada, com recrutamento pulmonar de neutrófilos significativamente aumentado em relação aos animais selvagens. A análise histopatológica de pulmão dos animais CD18^{low} mostraram maior comprometimento deste órgão durante a infecção. Além disso, estes animais

produzem menos LTB₄, IL-10, TNF- α , IL-12 e IFN- γ em relação aos selvagens, sugerindo o envolvimento desta molécula nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra *H. capsulatum*. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na fagocitose e atividade microbicida não foram investigados.

Objetivo

II- JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Entender os mecanismos de entrada de patógenos em células responsáveis pelo seu reconhecimento, como os MAs, é de fundamental importância nas áreas básica e clínico-terapêutica. Embora a molécula CD18 (β_2 -integrina) esteja envolvida neste reconhecimento, ainda pouco se sabe sobre seu papel nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções. Como citado anteriormente, recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que animais CD18^{low} (que tem baixa expressão de β_2 - integrina) infectados com *H. capsulatum* apresentam mais UFC nos pulmões, reação de hipersensibilidade do tipo tardio menos intensa e que células do pulmão produzem menos LTB₄ em relação aos animais selvagens (C57BL/6) ²⁷, resultando em aumento da mortalidade dos mesmos. Sabe-se também que LTB₄ é um mediador inflamatório produzido por MAs e MPs, dentre outras células, e está envolvido no recrutamento e ativação celular. Seu papel na defesa do hospedeiro contra infecções tem sido extensivamente estudado em várias infecções, entre elas, na histoplasmose. Medeiros *et al.* ²⁵ demonstraram que 100% dos camundongos infectados com *H. capsulatum* e tratados com inibidor da síntese deste mediador morrem até o 15^o dia de infecção, e apresentam maior recuperação de UFC dos pulmões e baço, quando comparado com animais apenas infectados.

Com base nestes resultados, tivemos como objetivo no presente projeto, o estudo do envolvimento da molécula CD18 nas atividades fagocítica e microbicida de MAs e MPs infectados *in vitro* com *H. capsulatum*. Além disso, avaliamos a relação entre a liberação de mediadores lipídicos como o LTB₄ e os mecanismos efetores mediados por β_2 -integrina.

2.1. Estratégias de Estudo

Em MAs e MPs obtidos de animais C57BL/6 (selvagem) e CD18^{low}, infectados *in vitro* com *H. capsulatum* opsonizado complemento ou não, na presença ou não de LTB₄ e/ou de seu antagonista do receptor de alta afinidade BLT₁ avaliamos:

- ✓ A atividade fagocítica;
- ✓ A atividade microbicida;
- ✓ Produção de LTB₄ e nitrito no sobrenadante de cultura.

Materiais e Métodos

III- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos ou fêmeas pertencentes às linhagens C57BL/6 e CD18^{low} (linhagem B6.129S7- Itgb2^{tm1Bay}). Esta mutação resulta teoricamente em somente 2 a 16% da expressão desta molécula em leucócitos normais não ativados e ativados, respectivamente. Os CD18^{low} foram adquiridos de “The Jackson Laboratories” e criados na unidade II livres de patógenos específicos (“SPF”) do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, e posteriormente mantidos em isoladores com livre acesso a água e alimento. Todos os experimentos foram repetidos três vezes. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Campus de Ribeirão Preto com protocolo número 07.1.366.53.4 em 13 de agosto de 2007 e os experimentos realizados com células provenientes de indivíduos normais e pacientes com Doença Granulomatosa Crônica possuem termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2. Obtenção e Cultivo de Leveduras de *H. capsulatum* em Meio Sólido

A cepa selvagem do *H. capsulatum* utilizada, foi isolada a partir do sangue de um paciente com diagnóstico confirmado para histoplasmose acompanhado clinicamente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A cepa foi mantida na fase filamentosa, a temperatura ambiente (25 °C), em ágar BHI (Difco). Para obtenção de leveduras, a forma miceliar foi convertida através do cultivo a 37 °C, em meio sólido BHI-ágar suplementado com 5% de hemácias de carneiro.

Alíquotas desta amostra foram submetidas ao teste de viabilidade com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio ⁷⁸ e somente foram utilizadas quando a viabilidade do fungo foi superior a 90%. Para recuperação de leveduras [unidades formadoras de colônia (UFC)] para o ensaio de atividade microbiana foi utilizado o meio sólido BHI-ágar (Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro.

3.3. Obtenção e Cultivo de Macrófagos Alveolares e Peritoneais

Os macrófagos alveolares (MAs) e os macrófagos peritoneais (MPs) foram obtidos a partir do lavado dos espaços broncoalveolar (LBA) e peritoneal (LCP), respectivamente. Camundongos C57BL/6 e CD18^{low} não infectados foram mortos individualmente em câmara contendo CO₂/O₂. Os MAs foram obtidos através da inserção de um catéter acoplado a uma seringa contendo 1 ml de RPMI 1640-I estéril acrescido de gentamicina (RPMI-incompleto) na traquéia. O procedimento foi repetido 10 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. Os MPs foram obtidos com o auxílio de uma seringa de 5 mL contendo meio RPMI 1640-I estéril também acrescido de gentamicina, que foi inserida na cavidade peritoneal e o lavado foi repetido 2 vezes após massagem abdominal. Os lavados coletados foram adicionados em tubos plásticos de 50 ml, mantidos no gelo e a seguir submetidos à centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm e ressuspensos em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro bovino fetal (RPMI-completo) sem vermelho de fenol e acrescido de gentamicina. Quando apropriado as hemácias foram lisadas com NH₄Cl à 0,85% por 3 minutos, seguida de centrifugação a 1500 rpm e suspensão em RPMI-I. A contagem do número total de células foi feita em

câmara de Neubauer empregando-se a solução de Tripán, para conferir a viabilidade das células. As suspensões de MAs e MPs contendo 1×10^4 ou 2×10^5 células/poço respectivamente, foram adicionadas em placas de fundo preto (Nunc, Rochester, NY) ou “chamber slides” (BD Falcon – BD Biosciences Discovery Labware, Two Oak Park, Bedford, MA, USA) e incubadas de 1 a 3 horas em estufa (37°C , 5% CO_2) para permitir a aderência das células. Após esse período, as células não aderentes foram removidas através de lavagem com RPMI-I (2 vezes) a 37°C e as aderentes foram cultivadas por um período de 18h a 37°C em 5% CO_2 na presença de $200 \mu\text{l}$ RPMI-C ⁷⁹.

3.4. Isolamento de Neutrófilos e Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano

Neutrófilos e células mononucleares foram obtidos a partir do sangue periférico humano de indivíduos saudáveis e de portadores da Doença Granulomatosa Crônica (DGC). Para obtenção das células, foi coletado um tubo com 10 mL de sangue, contendo EDTA como anticoagulante (concentração final de 1,5-2,0 mM). Em um tubo falcon de 15 ml foram adicionados 3,5 ml de Mono-Poly Tm (MP Biomedicals) e cuidadosamente, adicionou-se sob o mesmo, 8 mL de sangue total. A seguir foi feita uma centrifugação a 500 g a temperatura ambiente por 30-35 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi removido e o anel de células mononucleares e o anel de células contendo os neutrófilos, foram colocados em diferentes tubos falcon de 15 mL e submetidos à centrifugação com PBS 1x ou HBSS, a 400 g, por 10 minutos a temperatura ambiente. As hemácias foram removidas quando necessário, com solução de 0,2% a 1,6% de NaCl. Em seguida novamente as

células foram lavadas com PBS 1x ou HBSS, 400 g, por 10 minutos, a temperatura ambiente. O sedimento das células foi ressuspensão com 1 ml de tampão PBS 1x ou HBSS, e a contagem do número total de células foi feita em câmara de Neubauer empregando-se a solução de Tripán, para conferir a viabilidade das células. As suspensões de células mononucleares contendo 1×10^5 células/poço, foram adicionadas em placas de fundo preto (Nunc, Rochester, NY) e incubadas de 1 a 3 horas em estufa (37 °C, 5% CO₂) para permitir a aderência das células. Após esse período, as células não aderentes foram removidas através de lavagem com RPMI-I (2 vezes) a 37 °C e as aderentes foram cultivadas por um período de 18h a 37°C em 5% CO₂ na presença de 200 µl RPMI-C ⁷⁹.

Todas as soluções necessárias para este procedimento foram mantidas à temperatura ambiente; a aceleração e o freio da centrífuga foram desativados. As células mononucleares foram utilizadas para fagocitose como descrito no item 3.7.2 e os neutrófilos para imunofenotipagem como descrito no item 3.10.

3.5. Obtenção do Soro para a Opsonização de Leveduras de *H. capsulatum*

Camundongos C57BL/6 “SPF” não infectados foram utilizados para obtenção do soro. A coleta do soro foi feita a partir da retirada de sangue do plexo orbital, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro. O sangue foi mantido à temperatura ambiente por 45 minutos para retração do coágulo e centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos, à 4° C. Em seguida, foi rapidamente aliquoteado em “ependorfs” e armazenados a – 70 °C para posterior uso.

Nenhum método de eutanásia, ou utilização de anestésicos foram empregados para a coleta, uma vez que qualquer procedimento pode interferir na atividade do complemento. Para obtenção de uma quantidade relevante de sangue para obtenção deste soro, foi feito um “pool” com o sangue de 10 camundongos saudáveis. Estes foram mantidos em jejum para a coleta do sangue a ser utilizado. Quando necessária, a inativação do complemento foi realizada através da incubação dos ependorfs em banho Maria a 56 °C por 1 hora (empregado como controle- soro deficiente). Também soro de ratos e cobaias obtidos como descrito, foram utilizados no experimento de padronização (Figura 4).

3.6. Opsonização de *H. capsulatum* com Complemento

Leveduras de *H. capsulatum* foram opsonizadas com complemento presente no soro de camundongo, rato ou cobaia. Para tanto 2×10^5 ou 1×10^4 células/mL (de acordo com o tipo celular utilizado para padronização) foram incubadas com 200 µL de soro (*H. capsulatum* opsonizado) ou com o mesmo volume de RPMI-1 (*H. capsulatum* não opsonizado) ou ainda com 200 µL do soro cujo complemento foi previamente inativado (soro deficiente de complemento) a 37 °C sob agitação, durante 40 minutos. A seguir, foi centrifugado uma vez a 1500 rpm por 10 minutos. Após a padronização, apenas soro de camundongos C57BL/6 foi utilizado para os demais experimentos, uma vez que este foi o mais eficiente em aumentar a fagocitose do fungo.

3.7. Ensaio de Fagocitose

Duas diferentes técnicas foram utilizadas e extensivamente realizadas para se obter o melhor protocolo experimental. Vários parâmetros foram

avaliados, como o número de leveduras por célula, o tempo de fagocitose, a melhor fonte de complemento e a melhor forma de avaliação do número de leveduras fagocitadas.

3.7.1. Fagocitose Avaliada Através da Contagem de Leveduras no Interior das Células após Coloração com Panótico empregando Microscopia de Campo Claro

MA's ou MP's obtidos conforme descrito anteriormente, foram incubados com *H. capsulatum* opsonizados ou não com complemento. Após a opsonização das leveduras (item 3.6), estas foram centrifugadas e a seguir ressuspensas no volume adequado para cada experimento. As células aderentes foram incubadas com *H. capsulatum* opsonizado ou não com complemento e incubadas a 37 °C por 2 ou 4 horas (tempo da fagocitose), na proporção de 3 leveduras para 1 macrófago (3:1). Após esse período, os sobrenadantes foram descartados ou guardados para posterior dosagem e os poços das "chamber slides" (BD Biosciences) foram lavados 2 vezes com 200 µL de RPMI-I. A seguir, foram coradas com corante Panótico rápido (Laborclin) e o número de leveduras fagocitadas foi determinado após contagem utilizando microscópio de campo claro (Leica) com aumento de 1000 vezes. O índice fagocítico foi determinado através da multiplicação das células contendo uma ou mais leveduras, pelo número total de leveduras fagocitadas e dividido pelo número de células que foram contadas (100 células).

IF= nº de células que fagocitaram pelo menos 1 levedura x nº total de leveduras fagocitadas/100.

3.7.2. Fagocitose Avaliada Empregando Leveduras Marcadas com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

MAs ou MPs, foram incubados com *H. capsulatum* opsonizados ou não com complemento. Após a opsonização das leveduras (item 3.6), estas foram centrifugadas e a massa obtida foi incubada a 37 °C por 1 hora com 1 mL de solução estéril de FITC (Amresco; 0,5 mg/mL). Após este período, as suspensões foram lavadas 2 vezes e ressuspensas em RPMI-I. Previamente à infecção *in vitro*, os MAs ou MPs foram ou não pré-tratados por 20 minutos a 37 °C com o composto CP-105,696 (1µM) (Pfizer) [antagonista do receptor BLT1]; e/ou por 10 minutos a 37 °C com LTB₄ (Cayman) (10nM) e também com ambos, conforme protocolos pré estabelecidos na literatura ^{79,80}.

A seguir, as células foram incubadas com *H. capsulatum* opsonizado ou não com complemento na proporção de uma levedura para um macrófago (1:1) e incubadas em estufa (5% CO₂ a 37 °C) por 2 horas para ocorrer a fagocitose. Após esse período, os sobrenadantes foram descartados e a placa de cultura foi lavada duas vezes com 100 µL/poço de PBS 1x (uma vez concentrado). Em seguida foram adicionados aos poços 100 µL de Azul de Tripán (0,25 mg/mL), deixando-o agir por 1 minuto no escuro, para eliminar qualquer resíduo extracelular. A leitura da fluorescência presente nas células foi realizada em espectrofluorímetro (485 nm) (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices).

Como controle da fagocitose parte das células foram pré-tratadas com citocalasina D (Cito D) (Sigma) (0,5 µg/mL; para inibir a fagocitose); e a ligação não-específica (LNE) foi verificada pela leitura da fluorescência em poços contendo apenas *H. capsulatum*-FITC (sem macrófagos). A avaliação da

fagocitose foi determinada através da média de intensidade de fluorescência obtida da leitura dos poços contendo células e *H. capsulatum*, subtraído dos valores obtidos nos poços cito D e LNE.

Embora nosso objetivo inicial tenha sido estudar preferencialmente MAs, devido ao pequeno número destes recuperados do LBA, após a padronização das condições experimentais, ampliamos o nosso estudo utilizando MPs. Como os mesmos fenômenos foram observados nos dois tipos celulares, apresentando diferenças apenas quanto à intensidade, optamos por MPs quando necessário uso de grande número de células.

3.8. Confeção de Lâminas para Avaliação da Fagocitose de Leveduras por Microscopia de Fluorescência

Foram utilizados 2×10^5 MPs obtidos de camundongos C57BL/6 e CD18^{low} conforme descrito anteriormente. Após a opsonização das leveduras (item 3.6), estas foram centrifugadas e a massa obtida foi incubada a 37 °C por 1 hora com 1 mL de solução estéril de FITC (Amresco; 0,5 mg/mL). Após este período, as suspensões foram lavadas 2 vezes e ressuspensas em RPMI-I. As células aderentes foram incubadas com *H. capsulatum* opsonizado ou não com complemento marcados com FITC e incubadas a 37 °C com 5% CO₂ em “chamber slides” por 2 horas na ausência de luz. O sobrenadante foi descartado e as lâminas foram fotografadas com aumento de 100x em Microscópio de Fluorescência Leica DM5000B, com câmera DFC500 digital acoplada.

3.9. Avaliação da Atividade Microbicida

MPs foram incubados com *H. capsulatum* opsonizado ou não com complemento, na proporção de uma levedura para um macrófago (1:1), por 2 horas, tempo para ocorrer a fagocitose (tempo e proporção escolhidos após padronização). Após esse período, os meios foram removidos e poços lavados extensivamente para remover as leveduras não fagocitadas. Nos poços empregados para avaliar a fagocitose (espelho), as células foram imediatamente lisadas com 200 µl de saponina (Sigma) a 0,05% e plaqueadas em meio BHI-ágar (BD Biosciences; Amresco) suplementado com 5% de hemácias de carneiro. Nos poços empregados para avaliar a atividade microbicida, a placa com as células contendo as leveduras opsonizadas ou não com complemento foram incubadas por 48 horas a 37 °C na presença ou não de LTB₄ 10 nM e/ou seu antagonista de receptor BLT1. Após esse período, o meio foi removido, as células lisadas com saponina 0,05% e as leveduras plaqueadas em meio BHI-ágar 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). Após 15 dias de cultivo a 37 °C, o número de UFC foi contado ⁸¹.

3.10. Avaliação da Produção de Nitrito (NO₂⁻) em Sobrenadante de Cultura de Células

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada através da dosagem de nitrito (NO₂⁻) pelo método de Greiss, no sobrenadante de cultura de MAs e MPs. Para a dosagem, foram utilizadas microplacas sendo adicionados 100 µL/poço dos sobrenadantes de cultura do período de 48 horas, de MPs

infectados com *H. capsulatum* e opsonizados com complemento ou não e também na presença ou não de 10 nM de LTB₄, nos quais foram adicionados à 100µL 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 (H₃PO₄)]. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica foi avaliada em espectrofotômetro (BioTec Instruments, Inc.- µQuant) com filtro de 540 nm. Para determinação quantitativa de NO₂⁻, na mesma placa foi preparado uma curva de nitrito de sódio com concentrações entre 3,12 a 200 µM. Os dados estão apresentados em micromoles de NO₂⁻.

3.11. Análise da Expressão das Moléculas CD11b e CD18 por Citometria de Fluxo

As suspensões de MAs e MPs obtidas como descrito no item 3.3 de ambas as linhagens de camundongos, foram ajustadas para 1x10⁵ / 1x10⁶ células/mL respectivamente, e adicionadas nos tubos apropriados para citometria de fluxo. Em seguida, o anticorpo anti-CD16/CD32 foi adicionado aos tubos para o bloqueio de ligações inespecíficas da porção Fc do anticorpo. Após a incubação por 40 minutos a 4 °C, foram adicionados os anticorpos específicos anti-CD11b (APC) e anti-CD18 (FITC), e seus respectivos isotipos controles (BD Biosciences). Após 30 minutos de incubação a 4 °C no escuro, as células foram lavadas com 2 mL de PBS 1x (uma vez concentrado) acrescido de 2 % de soro bovino fetal (SBF), centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, e em seguida ressuspensas em PBS 1x contendo 1% de formaldeído.

Ainda, os neutrófilos obtidos conforme descrito no item 3.4, foram ajustados para 1x10⁵ células/mL e adicionados nos tubos apropriados para

aquisição em citômetro de fluxo, e foi utilizado o anticorpo anti-CD18 (FITC) específico para humanos e seu respectivo isotipo controle (BD Biosciences). Após 30 minutos de incubação a 4 °C no escuro, as células foram lavadas com 2 mL de PBS 1x (uma vez concentrado) acrescido de 2% de soro bovino fetal (SBF), centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos, e em seguida ressuspensas em PBS 1x contendo 1% de formaldeído. A porcentagem de células positivas para as moléculas avaliadas foi determinada através da média de intensidade de fluorescência. Todas as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (BD FACsCanto) com auxílio do software Diva.

3.12. Quantificação de Leucotrieno B₄ (LTB₄) em Sobrenadante de Cultura de Macrófagos

LTB₄ foi quantificado em sobrenadante de cultura de MPs após 2 horas de animais C57BL/6 e CD18^{low} infectados *in vitro* com *H. capsulatum* e opsonizados ou não com complemento. Após este período o sobrenadante foi coletado e estocado para dosagem de mediadores lipídicos empregando Ensaio Imunoenzimático Competitivo (ACETM EIA) (Armeshan Pharmacia) de acordo com as instruções do fabricante. A densidade óptica das amostras foi determinada em filtro de 412 nm.

3.13. Análise Estatística

Os testes Análise da Variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni de múltipla comparação e *t* teste (MANN WHITNEY) foram utilizados para análise das diferenças entre três ou dois grupos experimentais, respectivamente. Os dados foram expressos como média ± SEM, e as análises foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.14. Soluções e Meios Utilizados nos Procedimentos Experimentais

✓ BHI – Ágar Sangue

BHI (Brain Heart Infusion) (BD).....	3,7g (ou BHI agar 5,2g)
Agar bacteriológico (Amresco).....	1,5g
Glutamina (200mmlos/mL) (Sigma).....	1,0mL
Sangue de carneiro (5%).....	5,0mL
Cisteína (1%) (Sigma).....	1,0mL
Água destilada ou Milli-Q q.s.p.....	100mL

✓ Solução PBS (Solução 10x concentrada)

NaCl.....	80g
KCL.....	2,0g
Na ₂ HPO ₄	11,5g
KH ₂ PO ₄	2,0g
H ₂ O Milli-q (q.s.p).....	1000 mL

Solução de Uso: Diluir 1:10

✓ Solução PBS 1% Formol

Diluir 1:10 a solução 10x concentrada e acrescentar 1% formaldeído.

✓ Solução PBS 2% Soro Bovino Fetal (SBF) (Gibco)

Diluir 1:10 a solução 10x concentrada e acrescentar 2% SBF

✓ Solução de Turk (GIBCO)

Ácido Acético Glacial.....	15 mL
Violeta genciana (2%).....	1 mL
H ₂ O Milli-q (q.s.p).....	485 mL

Para contagem de macrófagos alveolares foram utilizados: 320 μ L da solução de Turk + 80 μ L da amostra

Para contagem de macrófagos peritoneais foram utilizados: 380 μ L da solução de Turk + 20 μ L da amostra

✓ **Meio RPMI Incompleto (GIBCO)**

RPMI (1640) (Gibco).....10,4 g
Bicarbonato de Sódio.....2,0 g
L-glutamina.....0,146 g
Hepes.....2,4 g
H₂O Milli-q (q.s.p).....1000 mL
pH: 7,4

✓ **Meio RPMI Completo (GIBCO)**

RPMI incompleto (Gibco).....10,4 g
Soro bovino fetal (Gibco).....10%
Gentamicina (Gibco)..... 0,5 mL para cada 500 mL de meio. pH:7,4

✓ **Meio HANKs´ (GIBCO)**

CaCl₂.2H₂O.....0,185g
MgO₂.6H₂O.....0,1g
MgSO₄.7H₂O.....0,1g
NaHCO₃.....0,35g para cada 1000 mL de meio.

Resultados

IV-RESULTADOS

4.1. Análise da Porcentagem de Expressão das Moléculas CD11b, CD18 e CD11bCD18 (CR3) por Macrófagos Alveolares

MAs foram obtidos de camundongos C57BL/6 e CD18^{low} como descrito no item 3.3 e processados como descrito em 3.10, com o objetivo de confirmarmos a expressão da molécula CD18 e a expressão de CD11bCD18 (CR3). Para isso avaliamos a expressão comparativa de CD11b, CD18 e CD11bCD18 por citometria de fluxo (BD FACs Canto) através da porcentagem parental. Como pode ser observado na figura 1B, 22,1% de MAs de animais C57BL/6 expressam CD11bCD18, enquanto que somente 2,1% de MAs provenientes de camundongos CD18^{low} expressam CD11bCD18 (Figura 1D). Além disso, somente 12% de MAs de animais CD18^{low} expressam somente CD18, enquanto nos animais selvagens 35% de MAs expressam CD18. Podemos observar ainda, que MAs de C57BL/6 expressam 7,7% de CD11b em contraste com apenas 2,4% nos CD18^{low}. A porcentagem parental foi relacionada ao total de eventos adquiridos da gate feita para macrófagos.

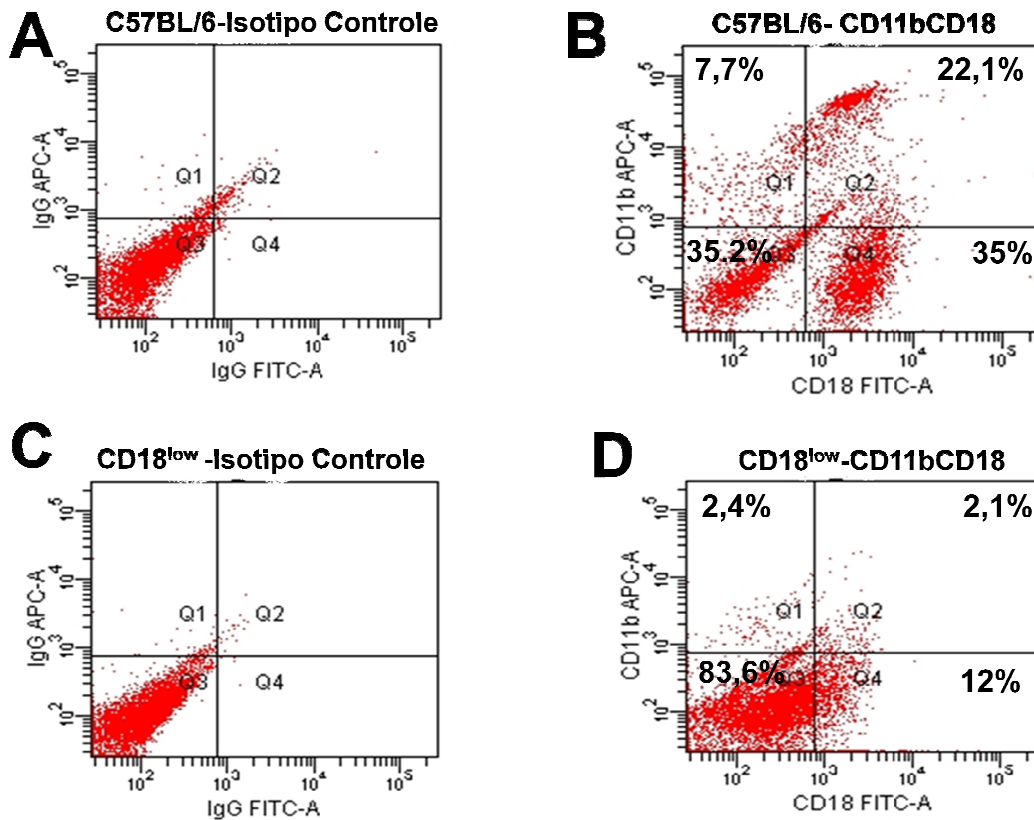


Figura 1. MAs obtidos de animais CD18^{low} expressam baixa porcentagem da molécula CD18. Foram utilizados 1×10^5 macrófagos alveolares provenientes de camundongos C57BL/6 ou CD18^{low}, sendo estes marcados com os anticorpos específicos anti-CD11b (APC) e anti-CD18 (FITC) e seus respectivos isotipos controles. Os diagramas ilustram a porcentagem parental de 5.942 eventos adquiridos para os MAs do C57BL/6 e 7.273 eventos para os MAs do CD18^{low}. Figura representativa de 3 experimentos realizados independentemente com um animal por vez.

4.2. Análise da Porcentagem de Expressão das Moléculas CD11b, CD18 e CD11bCD18 (CR3) por Macrófagos Peritoneais

MPs foram obtidos de camundongos C57BL/6 e CD18^{low} como descrito no item 3.3 e processados como descrito em 3.10, também com objetivo de avaliar a expressão de CD18 especialmente nos camundongos CD18^{low} e a expressão de CR3. A figura 2 mostra a expressão comparativa das moléculas CD11b, CD18 e CD11bCD18 através da porcentagem parental em MPs. Podemos observar que 61,3% (Figura 2B) e 1,4% (Figura 2D) de MPs de animais C57BL/6 e CD18^{low}, respectivamente expressam CD11bCD18; enquanto que 29,4% de MPs expressaram CD11b e 0,7% de CD18 nos C57BL/6 e os CD18^{low}, expressaram 73,1% de CD11b e 0,2% de CD18. Como visto para MAs, a porcentagem parental foi relacionada ao total de eventos adquiridos da gate feita para macrófagos.

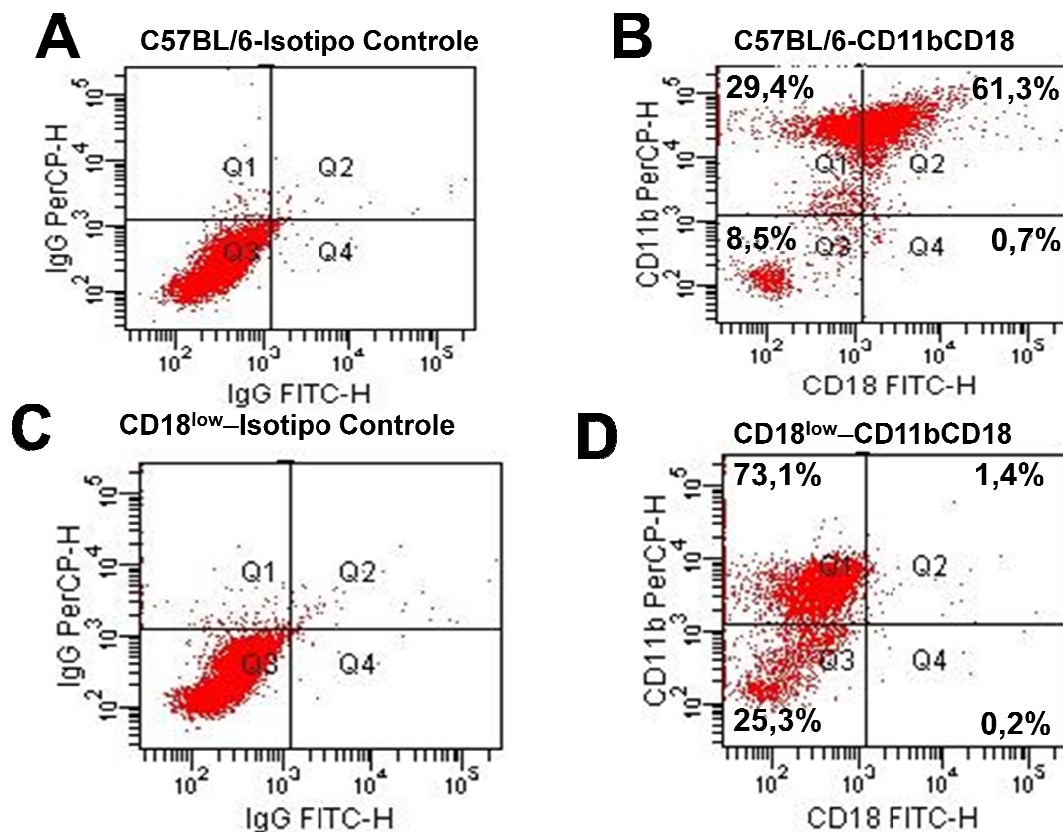


Figura 2. MPs obtidos de animais CD18^{low} expressam baixa porcentagem da molécula CD18. Foram utilizados 1×10^6 macrófagos peritoneais obtidos de animais C57BL/6 ou CD18^{low}, marcados com os anticorpos específicos anti-CD11b (APC) e anti-CD18 (FITC) e seus respectivos isotipos controles. Os diagramas ilustram a porcentagem parental de 6.387 eventos adquiridos para os MPs de C57BL/6 e 5.293 eventos para os MPs do CD18^{low}. Figura representativa de 3 experimentos realizados independentemente com um animal por vez.

A tabela 1 a seguir, mostra comparativamente os resultados obtidos com MAs e MPs.

Tabela 1- Comparação do Porcentual de Macrófagos Expressando as Moléculas CD11b, CD18 e CD11bCD18

	CD11b		CD18		CD11bCD18 (CR3)	
	C57BL/6	CD18 ^{low}	C57BL/6	CD18 ^{low}	C57BL/6	CD18 ^{low}
Macrófago Alveolar	7,7%	2,4%	35%	12%	22,1%	2,1%
Macrófago Peritoneal	29,4%	73,1 %	8,5%	0,2%	61,3%	1,4%

4.3. Análise da Porcentagem de Expressão de CD18 por Neutrófilos de Pacientes com Doença Granulomatosa Crônica

A figura 3 ilustra a expressão da porcentagem parental da molécula CD18 por neutrófilos provenientes de um paciente com Doença Granulomatosa Crônica (DGC) e um controle. Podemos observar que os neutrófilos deste paciente, expressaram 66,4% da molécula CD18 de 12.230 eventos da gate de neutrófilos, enquanto que os provenientes do indivíduo controle, 92,2% de 17.648 eventos.

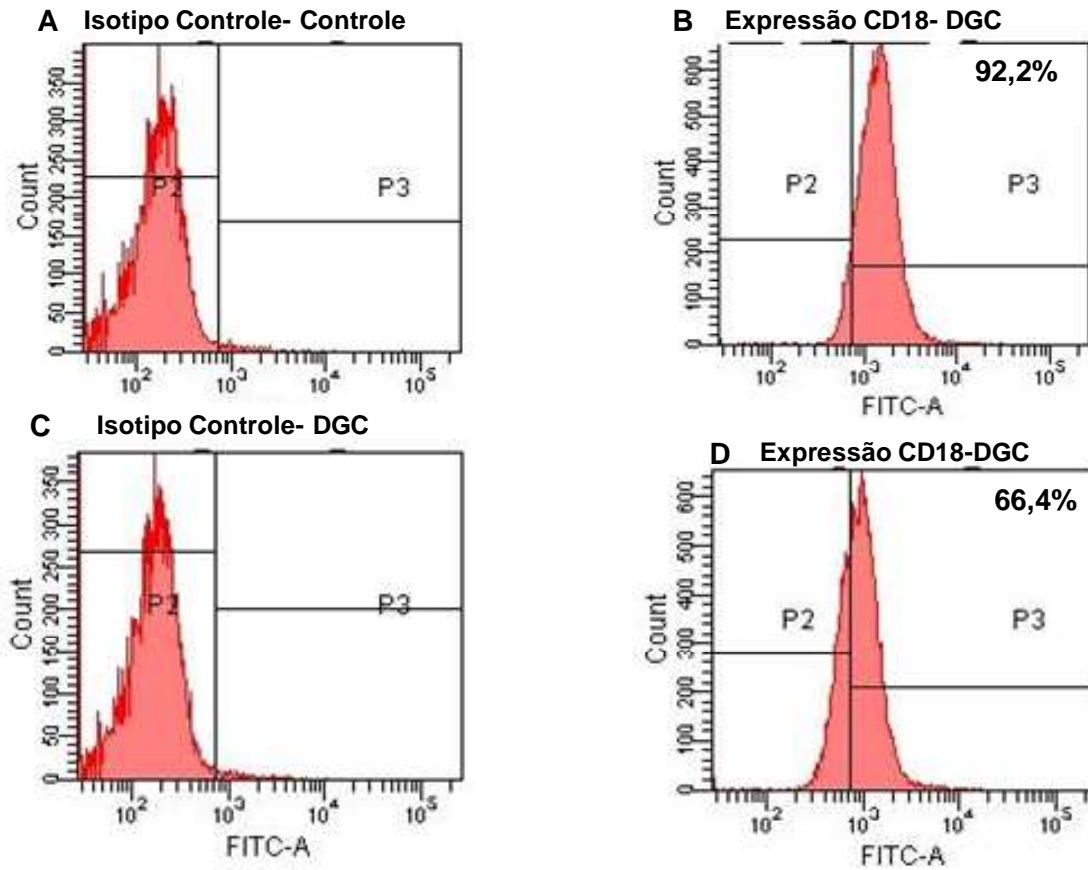


Figura 3. Neutr3filos provenientes de indiv3duos com DGC expressam menos CD18 do que os de indiv3duos controle. Foram utilizados 1×10^5 neutr3filos provenientes de indiv3duos controle e com DGC, sendo estes marcados com o anticorpo espec3fico para anti-CD18 (FITC) humano e seu respectivo isotipo controle. Os histogramas ilustram a porcentagem parental da gate de neutr3filos. Figura representativa de 1 experimento com neutr3filos provenientes de um indiv3duo normal e um portador da DGC.

4.4. Padronização do Ensaio de Fagocitose

4.4.1 Determinação do Soro mais Adequado como Fonte de Complemento

Inicialmente, para que pudéssemos utilizar a melhor fonte de complemento para opsonização das leveduras de *H. capsulatum*, foi realizado o ensaio de fagocitose com MAs de animais C57BL/6 incubados com *H. capsulatum* opsonizado com soro proveniente de camundongo C57BL/6, rato Wistar ou cobaia. Para determinar o papel do complemento na fagocitose de *H. capsulatum*, os soros foram inativados à 56 °C por 1 hora e empregados nos ensaios [*este foi denominado de soro deficiente de complemento ou somente soro deficiente*] (como descrito em materiais e métodos). Como mostrado na Figura 4, os soros obtidos das três espécies de animais foram eficientes em aumentar a fagocitose de *H. capsulatum* quando comparado com os respectivos soros deficientes. No entanto, podemos notar que o soro de camundongos foi mais eficiente, seguido do soro de rato. Embora o soro de cobaia também tenha aumentado a fagocitose de *H. capsulatum*, este foi 150% menos eficiente do que o soro de camundongo (Figura 4). Desta forma, optamos por utilizar soro de camundongos como fonte de complemento para a opsonização de leveduras de *H. capsulatum* nos demais experimentos. O índice fagocítico foi determinado conforme descrito em materiais e métodos no item 3.7.1.

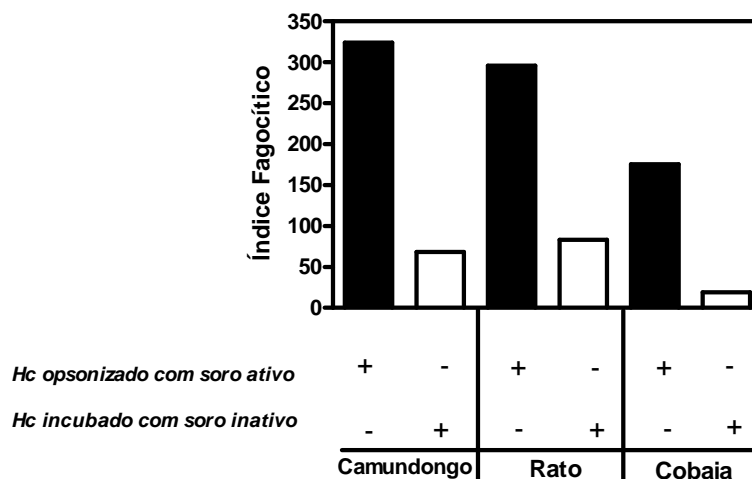


Figura 4. Opsonização das leveduras de *H. capsulatum* com soro de camundongo induz fagocitose mais eficiente. O soro proveniente de camundongo, rato e cobaia foram obtidos conforme descrito em Materiais e Métodos. A inativação do complemento foi realizada a 56 °C por 1 hora. Foram utilizados 2×10^5 MAs de animais C57BL/6 e estes foram incubados por 4 horas à 37 °C com o fungo na proporção de 3 leveduras para 1 macrófago (3:1). O fungo foi previamente incubado por 40 minutos com soro fresco ou soro inativado a 37 °C. Após coloração das lâminas por Panótico, o número de leveduras internalizadas pelos MAs, foi determinado através da contagem em microscópio de campo claro. O índice fagocítico foi determinado conforme a equação: Índice Fagocítico (IF) = número de células contendo pelo menos 1 levedura x n° de leveduras/ células contadas (100). Experimento representativo de 2 realizados independentemente com 4 poços por condição (n=4).

4.4.2 Avaliação do Melhor Tempo de Fagocitose de Leveduras de *H. capsulatum*

O melhor tempo para fagocitose também foi investigado. Para tanto, empregamos células de animais C57BL/6 incubados com leveduras opsonizadas ou não com complemento. Neste ensaio, 2×10^5 MPs/poço foram infectados *in vitro* com 6×10^5 leveduras de *H. capsulatum*/poço, (proporção de 3 leveduras para 1 macrófago) e incubados por 2 ou 4 horas. Resultados semelhantes foram observados nos dois tempos avaliados como mostrado na Figura 5. Pudemos observar novamente que a opsonização de *H. capsulatum* com complemento aumentou a fagocitose em 150% após 2 (A) e 200% após 4 horas (B), respectivamente, quando comparado com fagocitose de fungo não opsonizado (100% de fagocitose). Como esperado, quando o complemento foi inativado, a fagocitose foi menor após 2 horas, mas semelhante àquela de fungo não opsonizado após 4 horas, e menor do que à de *H. capsulatum* incubado com soro ativo (Figura 5). Com base nestes resultados, optamos por utilizar 2 horas como o tempo para avaliar a fagocitose dependente de complemento.

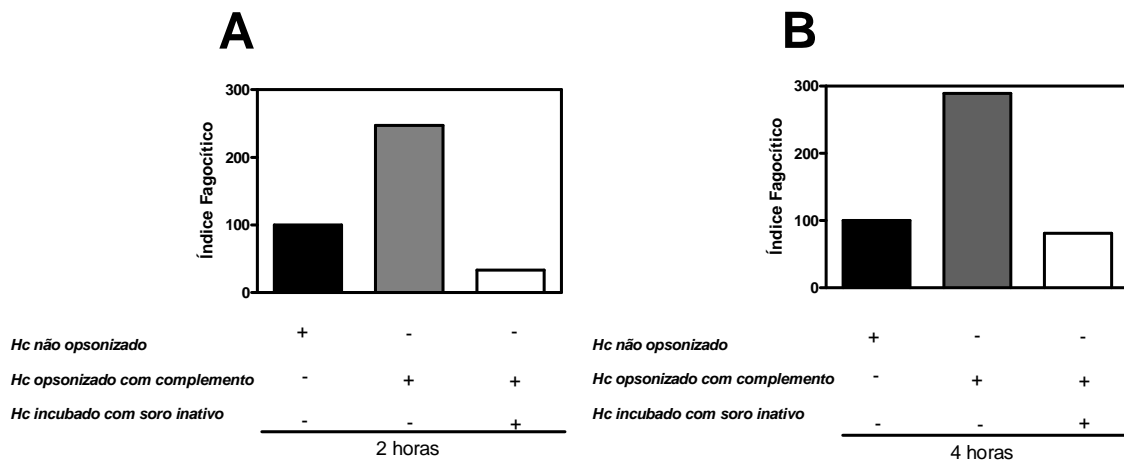


Figura 5. “Padronização” do tempo de fagocitose. Foram utilizados 2×10^5 MPs de camundongos C57BL/6, incubados *in vitro* por 2 ou 4 horas com 6×10^5 leveduras opsonizadas ou incubadas com soro inativo (proporção de 3 leveduras para 1 macrófago) . O índice fagocítico foi determinado conforme a equação: Índice Fagocítico (IF) = n° de células contendo pelo menos 1 levedura x n° de leveduras/ células contadas (100) com 4 poços por condição (n=4). Experimento representativo de 2 realizados independentemente. Para calcular o índice fagocítico, os valores da fluorescência de MPs infectados com *H. capsulatum* não opsonizado foi considerado como 100%.

4.4.3 Padronização do Ensaio de Fagocitose Avaliada pela Média de Intensidade de Fluorescência

Embora a avaliação da fagocitose através da contagem de leveduras internalizadas pelas células seja reprodutível e bastante utilizada por outros pesquisadores ^{27,82-84}, esta demanda mais tempo para obtenção dos resultados. Assim, optamos por padronizar a fagocitose empregando outra técnica com o objetivo de: 1) validar os resultados obtidos; 2) evitar o erro humano da contagem e 3) agilizar a obtenção dos resultados.

4.4.3.1- “Curva dose-resposta”

O emprego de microorganismos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) é muito utilizado em outros laboratórios para o estudo da fagocitose de bactérias ^{43,85}, e também para fungos ⁸⁶. Neste caso, a metodologia consistiu da utilização de *H. capsulatum*, marcado com a substância fluorescente FITC (como descrito no item 3.7.2) para os ensaios *in vitro*. Para a padronização inicial, utilizamos diferentes números de leveduras de *H. capsulatum*-FITC em RPMI-I, neste caso, inicialmente nosso objetivo foi avaliar a sensibilidade do espectrofluorímetro em detectar a fluorescência presente nas diferentes diluições das leveduras na ausência de células. Uma vez que todas as leveduras estavam extracelulares, não quelamos a fluorescência com o azul de Tripán. A fluorescência foi determinada imediatamente após as diferentes diluições de *H. capsulatum*-FITC serem adicionadas nas placas, empregando comprimento de onda entre 485 nm. Como podemos observar na Figura 6, a média da intensidade de fluorescência foi maior com 1×10^4 leveduras/poço, do que com 1×10^3 leveduras/poço. No

entanto não notamos diferenças na fluorescência quando as leveduras estavam em suspensões inferiores a 1×10^3 (Figura 6A). Para avaliarmos se leveduras marcadas com FITC, continuavam viáveis, realizamos ensaio de atividade microbica, empregando MPs e fungo não opsonizado. Após 48 horas os MPs foram rompidos e as leveduras semeadas em meio de cultura, para determinar as UFCs. Como podemos observar na Figura 6B, o FITC não interfere na viabilidade das leveduras, uma vez que recuperamos números praticamente iguais de UFCs tanto do fungo não marcado quanto do marcado com FITC.

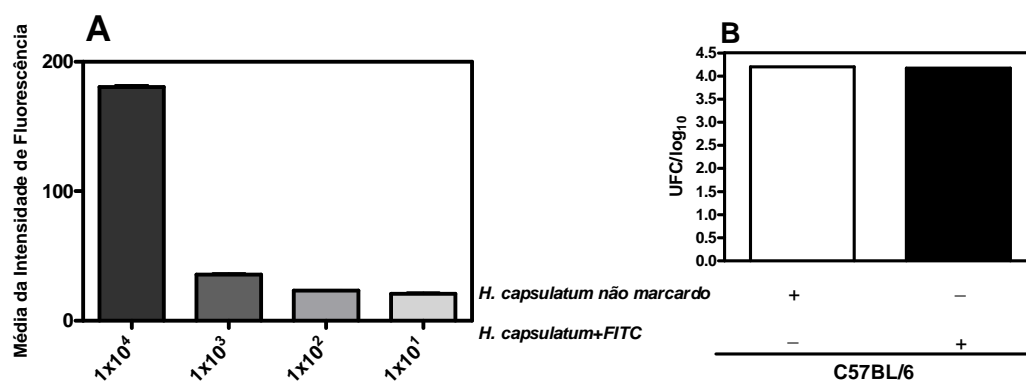


Figura 6. (A) Curva “dose-resposta” da intensidade de fluorescência de diferentes diluições de leveduras marcadas com FITC. **(B)** Números de UFCs recuperadas após marcação das leveduras com FITC foi igual aos não marcados. Foram utilizadas para este ensaio 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 e 1×10^1 leveduras/poço não opsonizadas para determinação da fluorescência. A média da intensidade de fluorescência foi avaliada imediatamente após marcação com FITC em espectrofluorímetro (485 nm). O experimento foi realizado 2 vezes e os resultados estão expressos como média \pm SEM e 5 poços por condição (n=5). **(B)** Foram utilizados 2×10^5 MPs/poço obtidos de camundongos C57BL/6. Os mesmos foram infectados com 2×10^5 leveduras não opsonizadas por poço (proporção de uma levedura para um macrófago) e incubados por 48 horas. O número de UFCs recuperadas foi contado após 15 dias de cultivo em ágar-BHI. Os resultados estão expressos como média \pm SEM com 3 poços por condição (n=3).

4.4.4 Avaliação da Melhor Proporção entre o Número de Leveduras e o de MAs para o Ensaio de Fagocitose

Uma vez estabelecida a melhor fonte de complemento para a opsonização (Figura 4), e tendo demonstrado que a intensidade de fluorescência é proporcional ao número de leveduras (Figura 6), a seguir padronizamos o número de leveduras por macrófago a serem empregadas nos ensaios. Para isso, realizamos o ensaio de fagocitose, avaliando a média da intensidade de fluorescência empregando MAs (1×10^4 /poço) de animais C57BL/6 incubados 2 horas com diferentes números de leveduras não opsonizadas, mas marcadas com FITC. Assim, os MAs foram infectados com 1 levedura por macrófago (1×10^4 leveduras), uma levedura para dois macrófagos (5×10^3 leveduras) ou uma levedura para cinco macrófagos (2×10^3 leveduras) que correspondem respectivamente a 1:1; 2:1 e 5:1. Quando 2 células foram incubadas com 1 levedura (2:1) ou 5 células com 1 levedura (5:1), a intensidade de fluorescência foi correspondente a 50% e 25%, respectivamente daquela obtida com a proporção de 1 macrófago por 1 levedura (Figura 7). Baseado na Figura 7 e dados da literatura ^{87,88}, na Figura 7 e também pelo fato de ocorrer uma maior produção NO_2^- (Figura 8B), optamos por utilizar nos demais experimentos a proporção de 1 macrófago para 1 levedura (1:1).

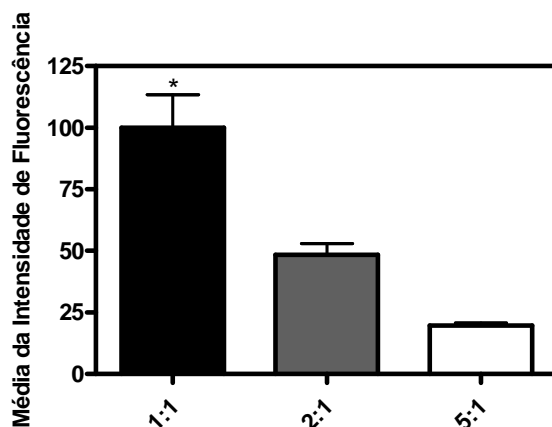


Figura 7. Fagocitose mais eficiente ocorre quando 1 MA é incubado com 1 levedura. Foram utilizados 1×10^4 MAs/poço provenientes de camundongos C57BL/6. Os mesmos foram incubados *in vitro* por 2 horas com diferentes números de levedura-FITC, ou seja, um macrófago para uma levedura, 2 macrófagos para uma levedura e 5 macrófagos para uma levedura (1:1; 2:1 e 5:1 respectivamente). As leveduras não fagocitadas foram retiradas por lavagens sucessivas dos poços, e a fluorescência extracelular foi quelada com azul de Tripan por 1 minuto. O azul de Tripan foi descartado e a fluorescência lida imediatamente em espectrofluorímetro (485 nm). O experimento foi realizado 1 sendo os resultados obtidos pela leitura de 5 poços por condição (n=5). Os resultados são expressos como média \pm SEM e significância estabelecida para $p < 0,05$. A intensidade de fluorescência obtida com a proporção de um macrófago para uma levedura foi considerada como 100%.

4.4.5 Avaliação da Melhor Proporção de Leveduras e de MPs

O mesmo protocolo descrito no item 4.4.4 foi utilizado para avaliação da melhor proporção de leveduras, e MPs. Foram utilizados 2×10^5 MPs de camundongos C57BL/6. Estes foram incubados com diferentes números de leveduras não opsonizadas para cada macrófago. Foram utilizadas 2×10^5 , 4×10^4 , 2×10^4 , 4×10^3 e 2×10^3 leveduras que foram incubadas por 2 horas, de modo que a média da intensidade de fluorescência foi determinada em 485 nm. De modo semelhante ao obtido com MAs, a intensidade obtida na proporção 1:1 foi maior quando comparada com todas as outras utilizadas (Figura 8 A).

O sobrenadante de cultura deste experimento foi utilizado para quantificação de NO_2^- sendo que com a proporção 1:1, foi obtida uma maior produção NO_2^- pelos MPs (Figura 8B).

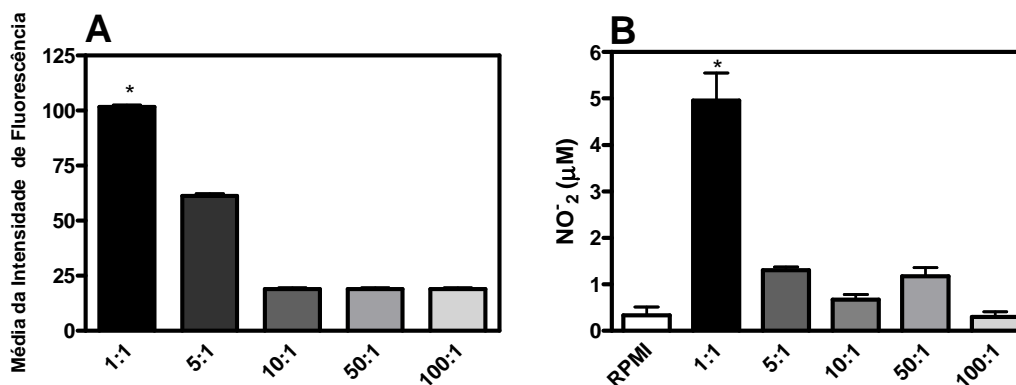


Figura 8. Fagocitose (A) mais eficiente e maior produção de NO₂⁻ (B) ocorre quando 1 MP é incubado com 1 levedura. (A) Foram utilizados 2×10^5 MPs/poço provenientes de camundongos C57BL/6. Os mesmos foram incubados *in vitro* por 2 horas com diferentes números de leveduras não opsonizadas de 1, 5, 10, 50 ou 100 MPs para uma levedura de modo se obter as proporções 1:1, 5:1, 10:1, 50:1, 100:1. As leveduras não fagocitadas foram retiradas por lavagem sucessiva dos poços, e a fluorescência extracelular foi quelada com azul de Tripán por 1 minuto. O azul de Tripán foi descartado e a fluorescência foi lida imediatamente em espectrofluorímetro (485 nm). O experimento foi realizado 1 vez com 6 poços por condição e estes estão apresentados como média \pm SEM e com significância estabelecida para $p < 0,05$. A intensidade de fluorescência obtida com MPs infectados com uma levedura foi considerada como 100%. Em **(B)** o NO₂⁻ foi quantificado pelo método de Greiss no sobrenadante obtido após a fagocitose.

4.5. Deficiência da Molécula CD18 Favorece a Fagocitose de Leveduras de *H. capsulatum* por MAs e MPs

Como proposto em objetivos, avaliamos a participação da molécula CD18 na fagocitose. A figura 9A, demonstra que MAs de animais C57BL/6 fagocitam 600% mais leveduras opsonizadas do que as não opsonizadas. No entanto, contrário ao esperado, MAs de animais CD18^{low} também fagocitaram mais leveduras opsonizadas do que aquelas não opsonizadas (136%). Além disso, os MAs de animais CD18^{low} incubados com leveduras não opsonizadas, também fagocitaram aproximadamente 400% mais fungo do que fizeram os MAs de C57BL/6.

Como mencionado, extendemos nossos estudos para os MPs, devido à dificuldade para conseguir células do lavado broncoalveolar, em número suficiente para incluir todos os controles necessários. Além disso, tivemos como objetivo investigar possíveis diferenças entre as duas populações de macrófagos. Como podemos observar na Figura 9B, os resultados obtidos com MPs foram semelhantes aos encontrados com MAs, mostrando nestas células que a deficiência de CD18 também favorece a fagocitose de leveduras opsonizadas ou não com complemento. Isso nos incentivou a prosseguir nossos experimentos com MPs, devido à facilidade em se obter maior número de células e conseqüentemente utilizar menor número de animais por experimento. A figura 9B mostra que MPs de animais CD18^{low} fagocitaram aproximadamente 300 % mais leveduras não opsonizadas e aproximadamente 240 % mais leveduras opsonizadas do que os MPs de animais C57BL/6 nas mesmas condições. Quando comparamos a capacidade fagocítica de MAs (Figura 9A) a de MPs (Figura 9B) notamos que os MAs são mais eficientes. Na

figura 9C, comprova-se que MPs de animais CD18^{low} fagocitam mais leveduras opsonizadas ou não, do que células de C57BL/6.

Sabendo-se da literatura que indivíduos portadores da DGC, possuem menor expressão da molécula CD18 ⁷², também avaliamos a fagocitose de leveduras opsonizadas ou não por células mononucleares destes indivíduos, comparando com células de pessoas normais (ou não deficientes de CD18) os resultados obtidos em animais com os de humanos. A figura 9D demonstra que as células mononucleares de um indivíduo com a DGC quando comparado com células de pessoas normais, fagocitam 300% e 900% a mais leveduras não opsonizadas ou opsonizadas, respectivamente.

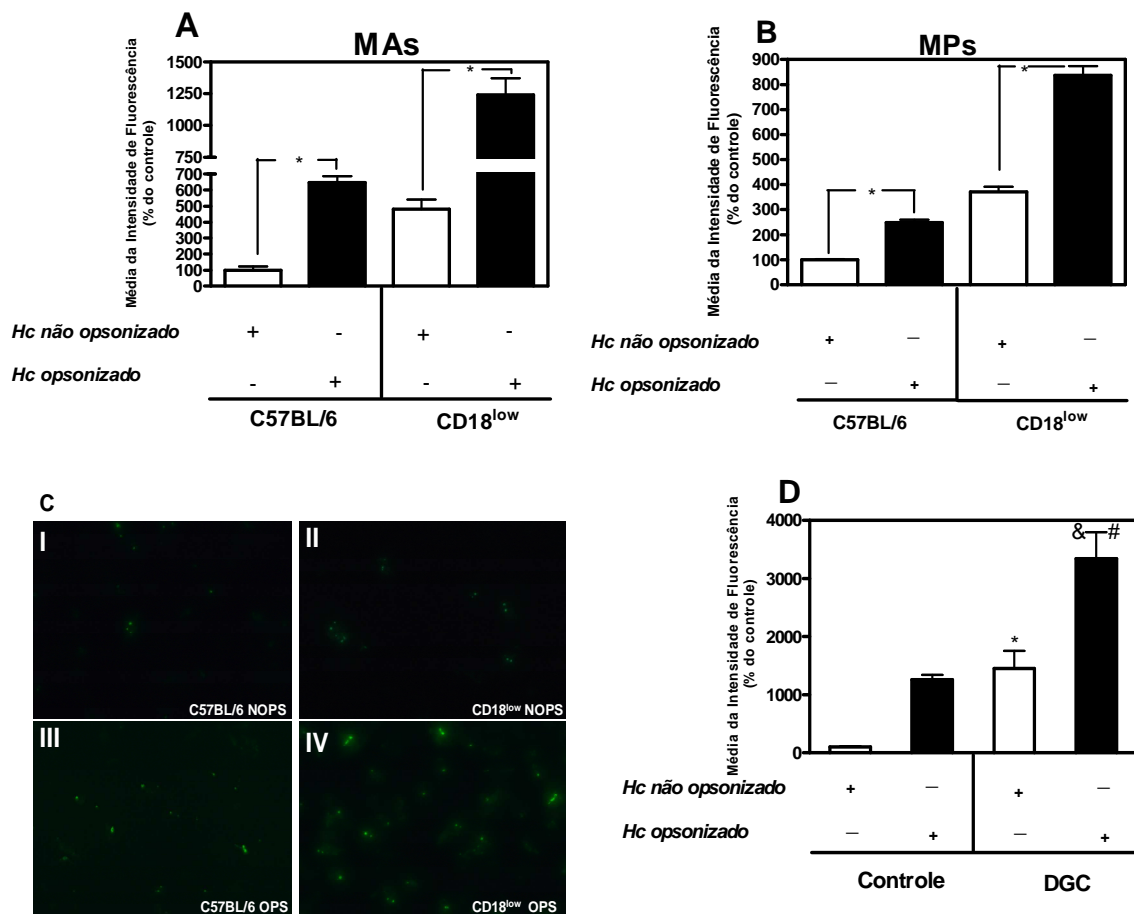


Figura 9. Deficiência da molécula CD18 favorece a fagocitose de *H. capsulatum* opsonizado ou não com complemento. (A) Foram utilizados 1×10^4 MAs/poço obtidos de camundongos C57BL/6 e CD18^{low}, incubados com 1×10^4 leveduras-FITC opsonizadas ou não com complemento. **(B)** Foram utilizados 2×10^5 MPs/poço obtidos de camundongos C57BL/6 e CD18^{low}, incubados com 2×10^5 leveduras-FITC opsonizados ou não com complemento. A fagocitose foi determinada após 2 horas de incubação a 37 °C, com 5% de CO₂. Gráfico representativo de 3 experimentos realizados independentemente. A intensidade de fluorescência obtida em MAs e MPs de C57BL/6 infectados com *Hc* não opsonizado foi considerada como 100%. **(C)** A fotografia foi tirada com 100x de aumento das células fagocíticas descritas em B. **(D)** Foram utilizados 1×10^5 células mononucleares do sangue periférico de um indivíduo normal ou de um paciente com DGC. As células foram incubadas com 1×10^5 leveduras-FITC opsonizadas ou não com complemento (proporção de 1 levedura para 1 macrófago). A fagocitose foi determinada após 2 horas de incubação. Os resultados estão expressos como média \pm SEM da intensidade de fluorescência obtidas em 5 poços (n=5), sendo * em relação ao *H. capsulatum* não opsonizado do indivíduo controle, # em relação ao *H. capsulatum* opsonizado também do indivíduo controle e & em relação ao *H. capsulatum* não opsonizado do paciente com DGC.

Como os dados obtidos com MPs reproduzem aqueles observados com MAs, passamos a utilizar preferencialmente nos experimentos seguintes, células obtidas da cavidade peritoneal.

4.6 Leucotrieno B₄ Exógeno Aumenta a Fagocitose de *H. capsulatum* Opsonizado, mas não daqueles não Opsonizados

Para investigar a capacidade dos LTs modularem a fagocitose via receptor de complemento de MAs e MPs de animais CD18^{low} e C57BL/6 que foram pré-tratados com LTB₄ (10 nM). A figura 10 A demonstra que na presença de LTB₄ exógeno, a média da intensidade de fluorescência (MIF) dos MAs de C57BL/6, incubados com *H. capsulatum* opsonizado, aumentou 520% quando comparado com os valores obtidos na ausência de LTB₄. Em relação aos MAs de animais CD18^{low}, observamos aumento de aproximadamente 200% da fagocitose na presença de LTB₄. Também a figura 10B demonstra que na presença de LTB₄ exógeno a fagocitose de *H. capsulatum* opsonizado por MPs de C57BL/6, aumentou em torno de 600% quando comparado com os valores obtidos na ausência de LTB₄. Nenhuma alteração foi observada na capacidade fagocítica do MPs dos animais CD18^{low} quando estes foram pré-tratados com LTB₄. No entanto LTB₄ exógeno, não modificou a fagocitose de leveduras não opsonizadas, nem por células de animais C57BL/6 e nem por células de CD18^{low} tanto para MAs quanto para MPs (Figura 10C e D).

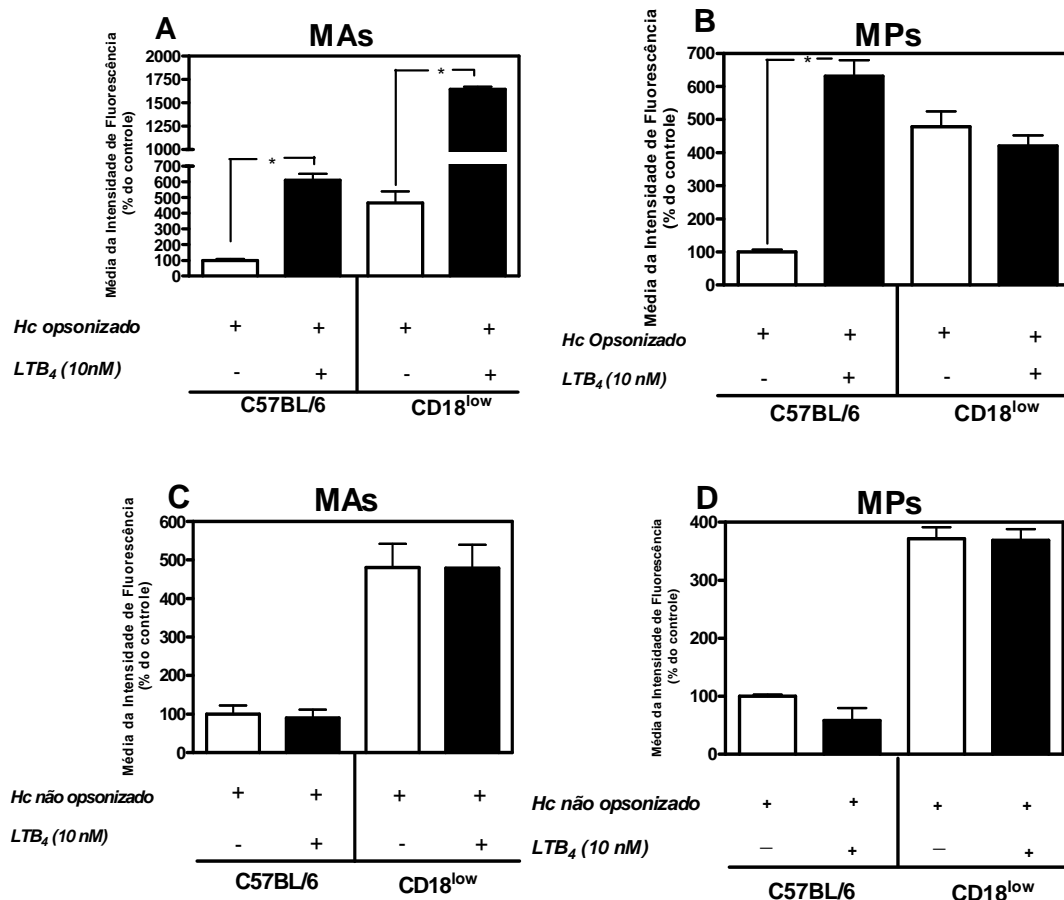


Figura 10. LTB₄ exógeno aumenta a fagocitose de *H. capsulatum* opsonizado, mas não daqueles não opsonizados. Foram utilizados 1×10^4 MAs/poço (A) ou 2×10^5 MPs/poço (B) provenientes de camundongos C57BL/6 e CD18^{low}. Os mesmos foram pré-tratados com 10 nM de LTB₄ por 10 minutos, e depois infectados com 1×10^4 leveduras-FITC opsonizadas (A) ou 2×10^5 leveduras-FITC opsonizadas (B), ou em (C) e (D) leveduras-FITC não opsonizadas. A fagocitose foi determinada após 2 horas de incubação. Os resultados estão expressos como média \pm SEM da intensidade de fluorescência com 6 poços por condição (n=6) e p<0,05. Gráfico representativo de 3 experimentos. A intensidade de fluorescência obtida em MAs de C57BL/6 infectados com *H. capsulatum* opsonizado foi considerada como 100%.

4.7 Efeito do Antagonista do Receptor BLT1 na Fagocitose de MAs e MPs

Ainda, para demonstrar que LTB₄ aumenta a fagocitose de leveduras opsonizadas após ligação ao seu receptor de alta afinidade, as células foram pré-tratadas com o antagonista do receptor BLT₁ (composto CP-105,696). Como podemos observar nas Figuras 11A e B, o aumento da fagocitose induzido por LTB₄ foi revertido somente quando os MAs e MPs eram de animais C57BL/6. De modo não esperado, a presença somente do CP-105,696 em MAs de ambas as linhagens de animais, aumentou a fagocitose das leveduras (Figura 11A), por um fenômeno que precisa ser investigado. Fato interessante foi a observação de que embora LTB₄ não tenha aumentado a fagocitose de leveduras opsonizadas por MPs de animais CD18^{low}, a presença do antagonista diminui este fenômeno.

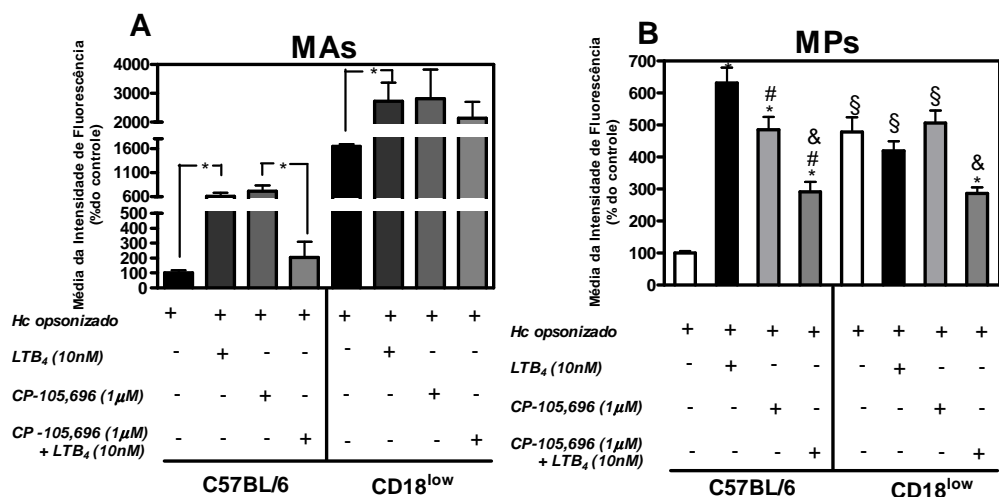


Figura 11. Efeito do Antagonista de BLT1 na Fagocitose. Foram utilizados 1×10^4 MAS/poço (A) ou 2×10^5 MPs/poço (B) obtidos de camundongos C57BL/6 e CD18^{low}. Os mesmos foram pré-tratados com 1 μM de CP-105,696, na presença ou ausência de 10 nM de LTB₄, e a seguir as células foram incubadas com leveduras, na proporção de 1 levedura por célula. Gráfico representativo de 3 experimentos. Os resultados estão expressos como média ± SEM da intensidade de fluorescência com 6 poços por condição (n=6) e p<0,05. A intensidade de fluorescência obtida em MAS e MPs de C57BL/6 infectados com *H. capsulatum* opsonizado foi considerada como 100%.

4.8. Leucotrieno B₄ Exógeno Aumenta a Atividade Microbicida Somente de MPs de Animais C57BL/6

Na resposta imune inata, além da fagocitose, outro mecanismo efetor importante dos macrófagos é a atividade microbicida.

MPs de animais C57BL/6 e CD18^{low} foram incubados com *H. capsulatum* e opsonizados ou não com complemento como descrito no item 3.6. Como podemos observar na figura 12, a deficiência da molécula CD18 inibe a atividade fungicida dos MPs, quando infectados com *H. capsulatum* e opsonizados ou não com complemento na presença ou ausência de LTB₄ e/ou seu antagonista. Fato interessante observado em células de animais C57BL/6 foi a constatação que MPs matam mais fungo, independentemente do complemento, na presença ou ausência de LTB₄. No entanto, a adição de LTB₄ aumentou em quase 30% a porcentagem de morte de leveduras opsonizadas, sendo que este efeito foi revertido pela adição do antagonista de BLT1. Estes dados são semelhantes à outros descritos na literatura.

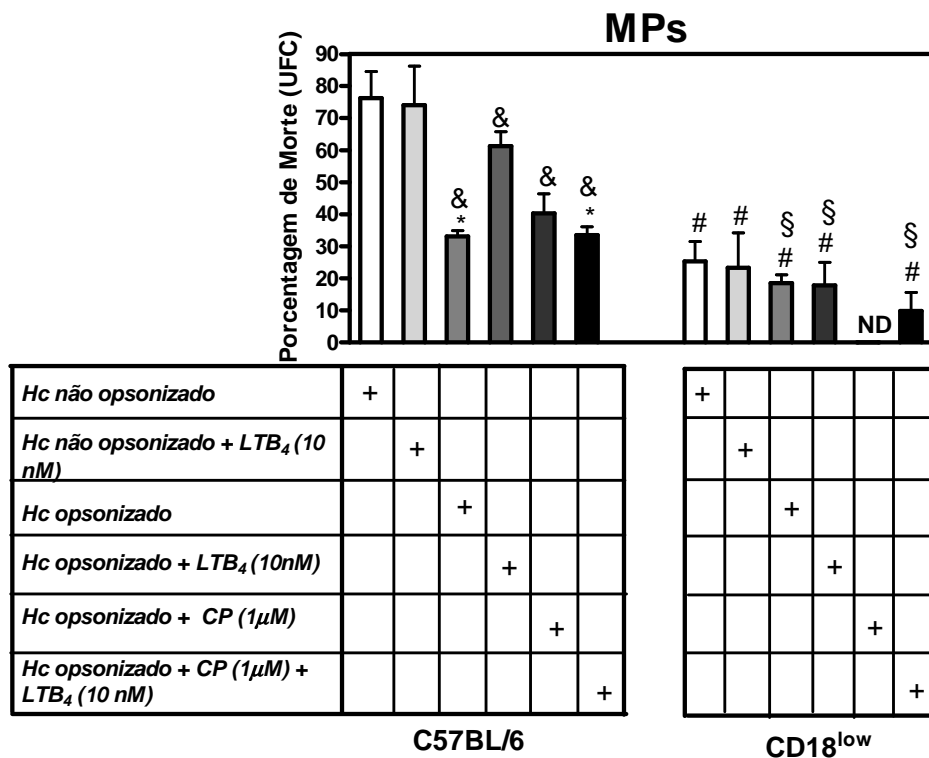


Figura 12. Deficiência de CD18 diminui a atividade microbicida de MPs.

Foram utilizados 2×10^5 MPs de camundongos C57BL/6 e CD18^{low}. Os mesmos foram incubados 2 horas com 2×10^5 leveduras opsonizadas ou não com complemento (não marcadas com FITC) na presença ou não de LTB_4 (10 nM) e/ou seu antagonista, composto CP-105,696 (1 μ M). Para avaliar o número de leveduras fagocitadas, as células foram lisadas e o fungo semeado em meio de cultura, sendo as UFC contadas após 15 dias de cultivo em ágar-BHI. Os valores obtidos nesta placa denominada de espelho foram empregados para os cálculos da atividade microbicida, como descrito abaixo. Em paralelo, foi realizado outro ensaio com MPs incubados por 48 horas, nas mesmas condições e com mesmos estímulos. após este período os MPs foram lisados e as leveduras semeadas para se determinar o número de UFCs que cresceram após 15 dias de cultivo em ágar-BHI. O cálculo da porcentagem de morte (“killing”) foi feito utilizando a média dos valores obtidos no espelho (como sendo 100%) divididos pela média dos valores encontrados no killing. O valor resultante foi subtraído de 100 e estes foram expressos como média \pm SEM e $p < 0,05$ com 5 poços por condição ($n=5$), sendo # em relação ao grupo C57BL/6 *H. capsulatum* não opsonizado e *H. capsulatum* opsonizado. (ND: Não detectado). Gráfico representativo de 3 experimentos.

4.9. MPs Deficientes de CD18 Liberam Menos Mediadores Lipídicos do que Aqueles de Animais C57BL/6

Como demonstrado na figura 9, a molécula CD18 tem participação importante na fagocitose, visto que a opsonização do fungo aumentou a capacidade fagocítica das células de animais C57BL/6. No entanto, inesperadamente, sua deficiência resultou em aumento da fagocitose, achado este contrário ao esperado por nós. Sabendo que LTB₄ regula as atividades fagocítica e microbicida, avaliamos a capacidade das células de ambas as linhagens, em liberarem estes mediadores após 2 horas de fagocitose. Para isso, MPs de animais C57BL/6 e CD18^{low} foram incubados com *H. capsulatum* e opsonizados ou não com complemento, mas não marcado com FITC. Após 2 horas, o sobrenadante desta cultura foi coletado e LTB₄ quantificado. Curiosamente, como podemos observar na figura 13 os MPs de animais CD18^{low} liberam espontaneamente mais LTB₄ do que os MPs de animais C57BL/6.

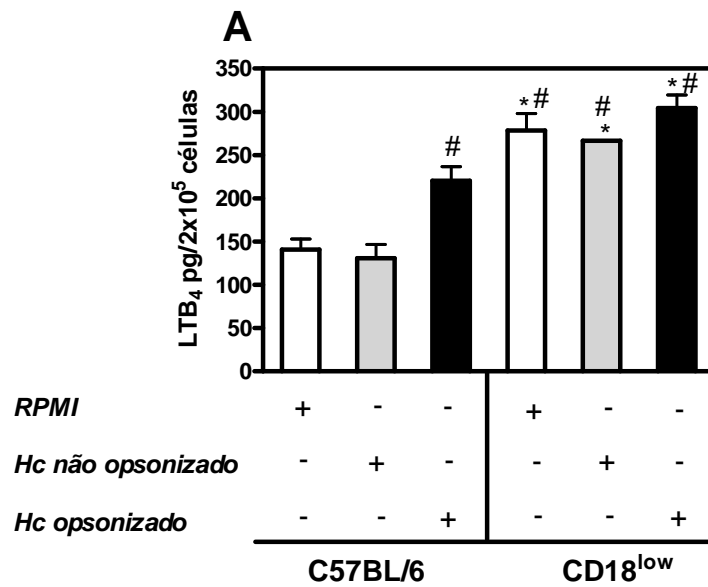


Figura 13. MPs de animais CD18^{low} liberam mais LTB₄ espontaneamente após a fagocitose de leveduras. Foram utilizados 2x10⁵ MPs/poço de animais C57BL/6 e CD18^{low} e foram incubados por 2 horas com ou sem leveduras opsonizadas ou não com complemento (2x10⁵ leveduras/poço ou somente RPMI). Após a coleta dos sobrenadantes para dosagem de LTB₄. Resultados de um experimento estão apresentados como média ± SEM com 6 poços para cada condição experimental (n=6). Diferenças foram consideradas significativas quando p<0,05. * em relação às células incubadas com somente meio; # comparando células de animais CD18^{low} com aquelas de C57BL/6.

4.10. Deficiência da Molécula CD18 aumenta Produção de NO por MPs

O NO é um importante radical livre envolvido na atividade fungicida de MAs e MPs ^{89,90} e sua quantificação pode ser utilizada para avaliar atividade microbicida, uma vez que o oxigênio produzido por macrófagos está entre os principais fatores microbicidas envolvidos na inibição do crescimento do *H. capsulatum* ⁸¹.

A Figura 14 a seguir, demonstra que MPs dos animais CD18^{low} produzem significativamente mais NO₂⁻ quando comparado com células de C57BL/6, submetidas às mesmas condições.

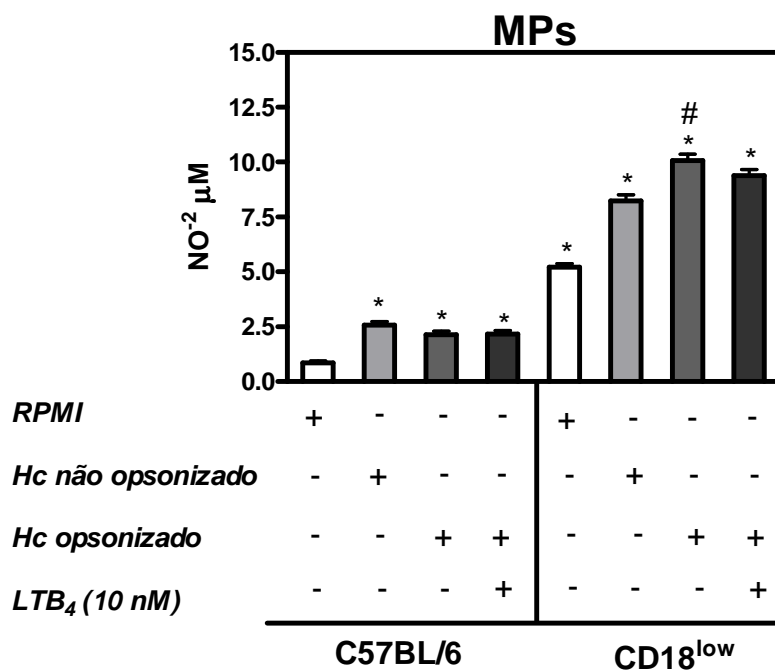


Figura 14. Deficiência de CD18 aumenta a produção de NO por MPs. Foram utilizados 2×10^5 MPs/poço de camundongos C57BL/6 e CD18^{low}. Os mesmos foram pré-tratados com 10 nM de LTB₄ e infectados com 2×10^5 leveduras opsonizadas ou não com complemento e incubados por 48 horas a 37 °C, 5% CO₂. O sobrenadante foi coletado e armazenado até o momento da dosagem. Os resultados estão expressos como média \pm SEM com 6 poços por condição (n=6) e p<0,05 em * em relação ao RPMI do grupo C57BL/6; # em relação ao Hc opsonizado do CD18^{low}. Gráfico representativo de 2 experimentos.

Discussão

V- DISCUSSÃO

A molécula CD18, ou cadeia β_2 das integrinas, é constitutivamente expressa em todos os leucócitos⁶⁸ e está envolvida na adesão e transmigração de neutrófilos através do endotélio, nos processos de ativação celular e na interação de patógenos com as células do sistema imune^{55,91}. O envolvimento da molécula CD18 foi investigado por nós anteriormente na histoplasrose murina⁷⁷. Quando comparamos animais C57BL/6 (selvagem), demonstramos que animais deficientes da molécula CD18 quando infectados com *H. capsulatum*, apresentam maior carga fúngica nos pulmões, reação de hipersensibilidade do tipo tardio menos intensa, menor produção de LTB₄ nos pulmões⁷⁷, sugerindo que os eventos desencadeados pela interação do fungo com esta molécula, são essenciais para os mecanismos de defesa do hospedeiro. No entanto, os mecanismos envolvidos não foram determinados, e assim neste projeto tivemos como objetivo investigar a participação da molécula CD18 nos mecanismos efetores dos MAs e MPs. Para tanto, empregando animais deficientes da molécula CD18 e, portanto do receptor Mac-1/CR3 (Figura 1, Tabela 1) investigamos o papel desta molécula na fagocitose e na atividade microbicida de MAs e de MPs.

Depois de estabelecer que o soro de camundongos é a melhor fonte de complemento, e que o tempo de 2 horas, é o ideal para investigar a fagocitose mediada ou não por complemento, padronizamos no laboratório, outra metodologia para avaliar a fagocitose, a qual já é utilizada por outros grupos mas para bactérias^{43,92}. Empregando fungo marcado com FITC, mostramos que este método é extremamente reproduzível e confiável, sendo que os resultados da intensidade de fluorescência foram confirmados por três outros

procedimentos, os quais compreendem a contagem das leveduras no interior dos macrófagos empregando microscópio de campo, recuperação das UFC de leveduras do interior das células, e microfotografia empregando microscópio de fluorescência. O uso de FITC para avaliar a fagocitose do fungo se mostrou muito útil, uma vez que facilita e agiliza a obtenção dos resultados. Também empregando leveduras marcadas com FITC, estabelecemos que a melhor proporção para nossos estudos, é a de uma levedura para cada um MP ou MA.

A fagocitose de fungos, incluindo o *H. capsulatum*, por macrófagos ocorre após interação de componentes da parede celular do patógeno (PAMPs) com moléculas presentes nas células do hospedeiro ou “PRRs”⁹³. Entre estas interações podemos citar aquelas entre β -glucana da parede do fungo e receptores de manose ou dectina nas células⁹⁴⁻⁹⁶. Também β -glucana, presentes na superfície do *H. capsulatum* não opsonizado pode interagir diretamente com as cadeias CD18, CD11a, CD11b ou com CD11c, as quais fazem parte do receptor de complemento CR3 e CR4^{4,55,94}. Alguns dos resultados obtidos neste projeto (Figura 3, 4 e 8) confirmam dados da literatura, uma vez que demonstramos que MAs e MPs de animais C57BL/6 fagocitam leveduras de *H. capsulatum* não opsonizadas^{4,55}. No entanto, este é o primeiro relato, mostrando que a opsonização de leveduras de *H. capsulatum*, com complemento, aumenta significativamente o número de leveduras internalizadas (Figura 4) como descrito para outros fungos (Calich et al.⁹⁷, Shikanai-Yasuda et al.⁹⁸ e Zaragoza et al.⁸⁸. No entanto, contrário ao esperado, observamos que quando comparado com animais selvagens (que têm 22 % dos MAs, e 61% dos MPs expressando o receptor CD11b/CD18), animais CD18^{low} (que têm menor porcentagem de células expressando

CD18/CD11b, MAs, 2,0 % e MPs 1,4%), fagocitam mais de leveduras opsonizadas ou não (Figura 9). Estes resultados sugerem que outra(s) molécula(s) pode(m) estar envolvida(s) na fagocitose de *H. capsulatum* por células de camundongos CD18^{low}, e que esta(s) pode(m) estar super expressa(s), para compensar a baixa expressão de β_2 -integrina. Embora estivesse em nossos objetivos investigar qual seria(m) esta(s) molécula(s), por circunstâncias diversas, como dificuldade em obter o fungo na forma de levedura em determinado período do ano, nós não pudemos realizar o mesmo. No entanto, com base em dados da literatura que mostram que CD14 e CD11b⁹⁹, dectina1¹⁰⁰ TLR2¹⁰¹ podem participar da fagocitose de fungos, iremos investigar a participação destas moléculas na fagocitose do *H. capsulatum* por MAs e MPs das duas linhagens de camundongos.

Está bem estabelecido no meio científico, o papel fundamental dos LTs, endógenos e exógenos, na fagocitose de microorganismos mediada pelo receptor Fc para IgG (Fc γ R)^{27,33,79}. Sabe-se ainda que o aumento da fagocitose induzida pela adição de LTs ocorre devido à amplificação do receptor Fc γ R que induz a ativação de Syk, PI-3K, MAPK e PKC por um processo dependente do influxo de Ca⁺⁺^{33,102}. Lee e colaboradores⁸⁰ demonstraram que uma relação existente entre LTB₄ e PGE₂ regula a fagocitose de MAs via adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Sabe-se ainda, que após fagocitose de alvos opsonizados com IgG, há liberação de LTB₄, o qual se liga ao seu receptor BLT1, que ativa a cascata de sinalização intracitoplasmática culminando com a diminuição de AMPc e aumento da fosforilação de Syk levando à ativação celular. Essa ligação também ativa PLC (via proteína G α -q/11) que leva ao aumento de IP3, e juntamente com a

sinalização desencadeada por FCγR favorecem a fagocitose e morte de bactérias intracelulares por MAs⁸⁵. No entanto, nada existe sobre o papel destes mediadores lipídicos na fagocitose mediada pelo complemento. Nossos resultados mostraram que a adição exógena de LTB₄ aumenta a fagocitose de leveduras opsonizadas, por MAs e MPs de animais selvagens, mas somente por MAs de animais deficientes de CD18. Curiosamente, LTB₄ não modificou a fagocitose de leveduras não opsonizadas nem por MAs e nem MPs de ambas as linhagens de camundongos. O aumento da fagocitose por LTB₄ exógeno, observado em MAs e MPs de animais selvagens, foi inibido pelo pré-tratamento das células com o antagonista CP-105,696, sugerindo que este fenômeno é mediado pelo receptor de alta afinidade ou BLT1, como descrito por outros para fagocitose mediada por anticorpos^{34,79}.

Curiosamente, embora a adição de LTB₄ não tenha aumentado em MAs e em MPs de animais deficientes de CD18 a fagocitose de leveduras opsonizadas, o tratamento com o antagonista de BLT1, inibiu significativamente este fenômeno nos MPs, sugerindo que LTB₄ liberado por estas células durante a fagocitose, participe do aumento de ingestão do fungo. Partido do pressuposto que o aumento de fagocitose por células de animais deficientes de CD18 estivesse relacionado com maior produção de LTB₄, a concentração deste mediador foi determinada no sobrenadante de células, 2 horas após fagocitose. Os resultados mostraram que células de animais deficientes da molécula CD18, mesmo na ausência do fungo, liberam mais LTB₄, do que células de animais C57BL/6. Estes dados, explicam pelo menos parcialmente, porque células de animais CD18^{low} fagocitam mais fungo que aquelas de animais selvagens. Estes dados estão de acordo com outros da literatura que

mostram que LTs potenciam a fagocitose de diferentes patógenos ^{29,82,103}. Embora não tenhamos quantificado LTB₄ no sobrenadante de MAs de ambos os animais, podemos supor estas células de animais CD18^{low}, também liberam mais LTs. Já está descrito que quando comparado com MPs, MAs produzem mais LTs que os outros macrófagos ¹⁰⁴, e como nós observamos também que MAs de animais CD18^{low}, fagocitam mais fungo opsonizado do que o fazem os MPs, podemos sugerir que este é um fenômeno relacionado com produção diferencial de LTs pelas duas subpopulações de macrófagos. Por esta razão, iremos também quantificar LTB₄ no sobrenadante de MAs de ambas linhagens de animais.

Tendo observado que células de animais CD18^{low} fagocitam mais leveduras do que aquelas de animais C57Bl/6, investigamos se este fenômeno resultaria no aumento da capacidade fungicida. Surpreendentemente, observamos que células de animais selvagens, embora fagocitem menos matam mais leveduras em todas as condições estudadas. Além disso, curiosamente, células de animais selvagens, embora fagocitem menos leveduras não opsonizadas, elas matam mais fungo na ausência de complemento (Figura 12). Uma possível razão para este fenômeno seria a liberação de menos PGs pelas células de animais C57BL/6, do que de CD18^{low}, quando infectadas com leveduras opsonizadas ou não. Para esclarecer este aspecto, a produção de PGs será investigada nos sobrenadantes das células. Aronoff *et al* ⁴³, demonstraram, que a PGE₂ inibe a fagocitose de bactérias mediada pelo receptor FcγR, por mecanismo dependente do aumento de AMPc após a interação de PGE₂ com o receptor EP2. Posteriormente o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que tanto PGE₂ endógena quanto exógena suprime a

capacidade microbicida de MAs infectados com *Klebsiella pneumoniae* e que estes efeitos são mediados pelos receptores EP2 e EP4, os quais também levam ao aumento de AMPc ¹⁰⁵. Sabe-se também que este lipídio aumenta a produção de NO ^{106,107} e nossos resultados (Figura 14), demonstraram que em todas as condições estudadas, células de animais CD18^{low}, produzem mais NO₂⁻, reforçando nossa hipótese de que estas células também produzem mais PGs. Embora NO₂⁻ seja um dos principais mediadores envolvidos na morte de microorganismos ^{81,108}, sabe-se que a produção excessiva do mesmo, é deletéria para as células do sistema imune ¹⁰⁹.

Em conjunto, nossos dados sugerem que o receptor CR3 está envolvido na regulação da produção de mediadores lipídicos, pelos MPs e MAs, uma vez que células de animais CD18^{low}, espontaneamente produzem mais LTB₄, e possivelmente mais PGE₂. O envolvimento do receptor de complemento na modulação da liberação de mediadores lipídicos também pode ser sugerido pela observação de que células de animais C57BL/6 produzem mais LTB₄ após fagocitose do fungo opsonizado, do que de não opsonizado (Figura 13). Sabe-se da literatura que estimulação de CD18 ou de CD11b por anticorpos específicos, aumenta ativação da fosfolipase D (PLD), e inibição da PLC ¹¹⁰. Sabendo que o *H. capsulatum* se liga à molécula CD18 de macrófagos ⁴ e que o C3bi se liga à molécula CD11b ¹¹¹, podemos sugerir que tanto na fagocitose do fungo não opsonizado como opsonizado, ocorre ativação da PLD, uma enzima envolvida na desgranulação de mastócitos por mecanismo dependente de PKC ¹¹². No entanto, a observação que células de animais CD18^{low} na ausência do fungo produzem mais LTB₄ sugere que um mecanismo mais complexo está envolvido na regulação da produção dos mediadores lipídicos.

Assim, em sendo este um fenômeno complexo, novos experimentos são necessários para esclarecer nossos resultados.

Finalmente, nossos resultados são extremamente relevantes, pois poderão auxiliar no entendimento das alterações que ocorrem nos mecanismos efetores de pacientes com DGC, os quais também têm diminuição da porcentagem de macrófagos que expressam o receptor CR3, e do mesmo modo que os camundongos CD18^{low}, fagocitam mais o fungo do que células de indivíduos normais. Esta é a primeira demonstração do aumento de fagocitose por macrófagos destes pacientes, dado este antagônico aos da literatura que mostram que seus neutrófilos fagocitam e matam menos patógenos do que células de indivíduos normais ⁷². Assim, animais CD18^{low} parecem ser um bom modelo para os estudos das alterações dos mecanismos efetores das células fagocíticas de pacientes com DGC.

Conclusão

VI- CONCLUSÃO

A molécula CD18 tem importante participação nos mecanismos efetores da imunidade inata, por mecanismo dependente de mediadores lipídicos, como o LTB₄, para o controle dos mecanismos de defesa contra *H. capsulatum*.

*Referências Bibliográficas**

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style)
Grupo de Vancouver, Outubro 2007.

1. Darling STA. A protozoan general infection producing pseudotubercles in the lungs and focal necroses in the liver, spleen, and lymph nodes. *Journal of the American Association*, Chicago. 1906;46:1283.
2. Silverman FN, Schwarz J, Lahey ME, Carson RP. Histoplasmosis. *Am J Med*. 1955;19:410-459.
3. Medoff G, Kobayashi GS, Painter A, Travis S. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1987;55:1355-1358.
4. Newman SL, Bucher C, Rhodes J, Bullock WE. Phagocytosis of *Histoplasma capsulatum* yeasts and microconidia by human cultured macrophages and alveolar macrophages. Cellular cytoskeleton requirement for attachment and ingestion. *J Clin Invest*. 1990;85:223-230.
5. Kimberlin CL, Hariri AR, Hempel HO, Goodman NL. Interactions between *Histoplasma capsulatum* and macrophages from normal and treated mice: comparison of the mycelial and yeast phases in alveolar and peritoneal macrophages. *Infect Immun*. 1981;34:6-10.
6. Goodwin RA, Loyd JE, Des Prez RM. Histoplasmosis in normal hosts. *Medicine (Baltimore)*. 1981;60:231-266.
7. Cano MV, Hajjeh RA. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Semin Respir Infect*. 2001;16:109-118.
8. Ferreira OG, Cardoso SV, Borges AS, Ferreira MS, Loyola AM. Oral histoplasmosis in Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93:654-659.
9. Unis G, Oliveira Fde M, Severo LC. [Disseminated histoplasmosis in Rio Grande do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37:463-468.
10. Capone D, Wanke B, Monteiro PC, et al. Chronic pulmonary histoplasmosis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia*. 1999;145:75-79.
11. Ferreira MS, Borges AS. [Histoplasmosis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42:192-198.
12. Goodwin RA, Jr., Des Prez RM. State of the art: histoplasmosis. *Am Rev Respir Dis*. 1978;117:929-956.
13. Limaye AP, Connolly PA, Sagar M, et al. Transmission of *Histoplasma capsulatum* by organ transplantation. *N Engl J Med*. 2000;343:1163-1166.
14. Pillay T, Pillay DG, Bramdev A. Disseminated histoplasmosis in a human immunodeficiency virus-infected African child. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:417-418.
15. Medeiros AI, Malheiro A, Jose PJ, Conroy DM, Williams TJ, Faccioli LH. Differential release of MIP-1alpha and eotaxin during infection of mice by *Histoplasma capsulatum* or inoculation of beta-glucan. *Inflamm Res*. 2004;53:351-354.
16. Adams DO. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am J Pathol*. 1976;84:164-191.
17. Shak S, Perez HD, Goldstein IM. A novel dioxygenation product of arachidonic acid possesses potent chemotactic activity for human polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem*. 1983;258:14948-14953.
18. FACCIOLI LH, NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F.M.; SEHMI, R.; KAY, A.B.; WILLIAMS, T.J. The accumulation of eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. *Immunology*. 1991;73:222-227.
19. Medeiros AI, Silva CL, Malheiro A, Maffei CM, Faccioli LH. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the beta-glucan present in their cell wall. *Br J Pharmacol*. 1999;128:1529-1537.
20. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol*. 2005;174:589-594.
21. Samuelsson B. Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*. 1983;11:1-13.

22. Lewis RA, Austen KF. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J Clin Invest.* 1984;73:889-897.
23. Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J.* 1994;7:1678-1689.
24. O'Byrne PM, Israel E, Drazen JM. Antileukotrienes in the treatment of asthma. *Ann Intern Med.* 1997;127:472-480.
25. Medeiros AI, Sa-Nunes A, Soares EG, Peres CM, Silva CL, Faccioli LH. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. *Infect Immun.* 2004;72:1637-1644.
26. Buret A, Cripps AW. The immunoevasive activities of *Pseudomonas aeruginosa*. Relevance for cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:793-805.
27. Bailie MB, Standiford TJ, Laichalk LL, Coffey MJ, Strieter R, Peters-Golden M. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. *J Immunol.* 1996;157:5221-5224.
28. Peters-Golden M, Coffey M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. *J Lab Clin Med.* 1998;132:251-257.
29. Wirth JJ, Kierszenbaum F. Effects of leukotriene C4 on macrophage association with and intracellular fate of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1985;15:1-10.
30. Machado ER, Ueta MT, Lourenco EV, et al. Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis. *J Immunol.* 2005;175:3892-3899.
31. Peres CM, de Paula L, Medeiros AI, et al. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect.* 2007.
32. Secatto ASEC, L; Sorgi, CA; Medeiros, AI; Faccioli LH. Role of leukotrienes in the susceptibility by infection with *Histoplasma capsulatum*. *Manuscrito em preparação.* 2009.
33. Mancuso P, Peters-Golden M. Modulation of alveolar macrophage phagocytosis by leukotrienes is Fc receptor-mediated and protein kinase C-dependent. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23:727-733.
34. Serezani CH, Aronoff DM, Jancar S, Mancuso P, Peters-Golden M. Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. *Blood.* 2005;106:1067-1075.
35. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.
36. Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1995;12:139-156.
37. Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1299:125-140.
38. Weinlich R, Bortoluci KR, Chehab CF, et al. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death Differ.* 2008;15:1901-1909.
39. D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RC, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol.* 2008;10:2589-2604.
40. Snijdewint FG, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *J Immunol.* 1993;150:5321-5329.
41. Borger P, Vellenga E, Gringhuis SI, et al. Prostaglandin E2 differentially modulates IL-5 gene expression in activated human T lymphocytes depending on the costimulatory signal. *J Allergy Clin Immunol.* 1998;101:231-240.
42. Kunkel SL, Chensue SW, Phan SH. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J Immunol.* 1986;136:186-192.

43. Aronoff DM, Canetti C, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol.* 2004;173:559-565.
44. Nicolete R, Lima Kde M, Junior JM, Jose PJ, Sanz MJ, Faccioli LH. Prostaglandin E(2)-loaded microspheres as strategy to inhibit phagocytosis and modulate inflammatory mediators release. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70:784-790.
45. Goto T, Herberman RB, Maluish A, Strong DM. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity. *J Immunol.* 1983;130:1350-1355.
46. Pereira PAT, Trindade BC, Secatto A, et al. Cyclooxygenase-Derived Mediators Regulate Immune Response in Histoplasmosis. *Manuscrito em preparação.* 2009.
47. Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA, Shevach EM. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med.* 1986;163:436-451.
48. Holt PG, Schon-Hegrad MA. Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. *Immunology.* 1987;62:349-356.
49. Nicod LP, Lipscomb MF, Weissler JC, Toews GB. Mononuclear cells from human lung parenchyma support antigen-induced T lymphocyte proliferation. *J Leukoc Biol.* 1989;45:336-344.
50. Eissenberg LG, Goldman WE, Schlesinger PH. Histoplasma capsulatum modulates the acidification of phagolysosomes. *J Exp Med.* 1993;177:1605-1611.
51. Woods JP. Histoplasma capsulatum molecular genetics, pathogenesis, and responsiveness to its environment. *Fungal Genet Biol.* 2002;35:81-97.
52. Newman SL, Gootee L, Kidd C, Ciralo GM, Morris R. Activation of human macrophage fungistatic activity against Histoplasma capsulatum upon adherence to type 1 collagen matrices. *J Immunol.* 1997;158:1779-1786.
53. Sa-Nunes A, Bolzoni RM, Medeiros AI, et al. Ultrasonically nebulized distilled water prevents exogenous histamine hyperreactivity in Toxocara canis-infected mice. *Inflamm Res.* 2005;54:243-248.
54. Newman SL, Gootee L. Colony-stimulating factors activate human macrophages to inhibit intracellular growth of Histoplasma capsulatum yeasts. *Infect Immun.* 1992;60:4593-4597.
55. Bullock WE, Wright SD. Role of the adherence-promoting receptors, CR3, LFA-1, and p150,95, in binding of Histoplasma capsulatum by human macrophages. *J Exp Med.* 1987;165:195-210.
56. Long KH, Gomez FJ, Morris RE, Newman SL. Identification of heat shock protein 60 as the ligand on Histoplasma capsulatum that mediates binding to CD18 receptors on human macrophages. *J Immunol.* 2003;170:487-494.
57. Allendoerfer R, Deepe GS, Jr. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. *J Immunol.* 1998;160:6072-6082.
58. Zhou P, Miller G, Seder RA. 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.* 1998;160:1359-1368.
59. Allendoerfer R, Deepe GS, Jr. Regulation of infection with Histoplasma capsulatum by TNFR1 and -2. *J Immunol.* 2000;165:2657-2664.
60. Zhou P, Sieve MC, Bennett J, et al. IL-12 prevents mortality in mice infected with Histoplasma capsulatum through induction of IFN-gamma. *J Immunol.* 1995;155:785-795.
61. Allendoerfer R, Deepe GS, Jr. Intrapulmonary response to Histoplasma capsulatum in gamma interferon knockout mice. *Infect Immun.* 1997;65:2564-2569.

62. Deepe GS, Jr., Gibbons RS. Interleukins 17 and 23 Influence the Host Response to *Histoplasma capsulatum*. *J Infect Dis.* 2009;200:142-151.
63. Lane TE, Wu-Hsieh BA, Howard DH. Antihistoplasma effect of activated mouse splenic macrophages involves production of reactive nitrogen intermediates. *Infect Immun.* 1994;62:1940-1945.
64. Gahmberg CG, Valmu L, Fagerholm S, et al. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54:549-555.
65. Clemetson KJ, Clemetson JM. Integrins and cardiovascular disease. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54:502-513.
66. Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 1987;48:549-554.
67. Dib K. BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci.* 2000;5:D438-451.
68. Shimaoka M, Salas A, Yang W, Weitz-Schmidt G, Springer TA. Small molecule integrin antagonists that bind to the beta2 subunit I-like domain and activate signals in one direction and block them in the other. *Immunity.* 2003;19:391-402.
69. Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med.* 1987;38:175-194.
70. Dinauer MC, Orkin SH. Chronic granulomatous disease. *Annu Rev Med.* 1992;43:117-124.
71. Roos D. The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol Rev.* 1994;138:121-157.
72. Hartl D, Lehmann N, Hoffmann F, et al. Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;121:375-382 e379.
73. Caron E, Hall A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science.* 1998;282:1717-1721.
74. Ehlers MR. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect.* 2000;2:289-294.
75. Forsyth CB, Plow EF, Zhang L. Interaction of the fungal pathogen *Candida albicans* with integrin CD11b/CD18: recognition by the I domain is modulated by the lectin-like domain and the CD18 subunit. *J Immunol.* 1998;161:6198-6205.
76. Turato WM. Participação de B-2 integrinas na histoplasmose pulmonar murin. *Dissertação de Mestrado.* 2006.
77. Turato WM. Participação de B2 integrinas na histoplasmose pulmonar murina. *Dissertação de Mestrado.* 2006.
78. Calich VL, Purchio A, Paula CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia.* 1979;66:175-177.
79. Mancuso P, Standiford TJ, Marshall T, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 1998;66:5140-5146.
80. Lee SP, Serezani CH, Medeiros AI, Ballinger MN, Peters-Golden M. Crosstalk between prostaglandin E2 and leukotriene B4 regulates phagocytosis in alveolar macrophages via combinatorial effects on cyclic AMP. *J Immunol.* 2009;182:530-537.
81. Brummer E, Kurita N, Yoshida S, Nishimura K, Miyaji M. Fungistatic activity of human neutrophils against *Histoplasma capsulatum*: correlation with phagocytosis. *J Infect Dis.* 1991;164:158-162.
82. Mancuso P, Nana-Sinkam P, Peters-Golden M. Leukotriene B4 augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2001;69:2011-2016.
83. Tabora CP, Casadevall A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity.* 2002;16:791-802.
84. Esposito AL, Clark CA, Poirier WJ. An assessment of the respiratory burst and bactericidal activity of alveolar macrophages from adult and senescent mice. *J Leukoc Biol.* 1988;43:445-454.

85. Peres CM, Aronoff DM, Serezani CH, Flamand N, Faccioli LH, Peters-Golden M. Specific leukotriene receptors couple to distinct g proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *J Immunol.* 2007;179:5454-5461.
86. Gildea LA, Morris RE, Newman SL. *Histoplasma capsulatum* yeasts are phagocytosed via very late antigen-5, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *J Immunol.* 2001;166:1049-1056.
87. Cox GM, Harrison TS, McDade HC, et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. *Infect Immun.* 2003;71:173-180.
88. Zaragoza O, Taborda CP, Casadevall A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur J Immunol.* 2003;33:1957-1967.
89. Brummer E, Stevens DA. Antifungal mechanisms of activated murine bronchoalveolar or peritoneal macrophages for *Histoplasma capsulatum*. *Clin Exp Immunol.* 1995;102:65-70.
90. Khemani S, Brummer E, Stevens DA. In vivo and in vitro effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on bronchoalveolar macrophages for antihistoplasmal activity. *Int J Immunopharmacol.* 1995;17:49-53.
91. Le Cabec V, Carreno S, Moisand A, Bordier C, Maridonneau-Parini I. Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *J Immunol.* 2002;169:2003-2009.
92. Aronoff DM, Peres CM, Serezani CH, et al. Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities. *J Immunol.* 2007;178:1628-1634.
93. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:240-273, Table of Contents.
94. Sorgi CA, Secatto A, Fontanari C, et al. *Histoplasma capsulatum* cell wall {beta}-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. *J Immunol.* 2009;182:4025-4035.
95. Parti RP, Loper R, Brown GD, et al. Cytosolic Phospholipase A2 Activation by *Candida albicans* in Alveolar Macrophages: Role of Dectin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009.
96. Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol.* 2009;39:1379-1386.
97. Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, Dias da Silva WD. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infection. *Clin Immunol Immunopathol.* 1979;12:21-30.
98. Shikanai-Yasuda MA, Assis CM, Takeda KM, Tamashiro N, Bueno JP. Monocyte adherence to *Paracoccidioides brasiliensis*, zymosan-C3b and erythrocyte-hemolysin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1997;138:65-69.
99. Hmama Z, Mey A, Normier G, Binz H, Revillard JP. CD14 and CD11b mediate serum-independent binding to human monocytes of an acylpolygalactoside isolated from *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994;62:1520-1527.
100. Heinsbroek SE, Taylor PR, Martinez FO, Martinez-Pomares L, Brown GD, Gordon S. Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000218.
101. Ferreira KS, Bastos KR, Russo M, Almeida SR. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. *J Infect Dis.* 2007;196:1108-1115.

102. Canetti C, Hu B, Curtis JL, Peters-Golden M. Syk activation is a leukotriene B4-regulated event involved in macrophage phagocytosis of IgG-coated targets but not apoptotic cells. *Blood*. 2003;102:1877-1883.
103. Wirth JJ, Kierszenbaum F. Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 1985;134:1989-1993.
104. Martin TR, Altman LC, Albert RK, Henderson WR. Leukotriene B4 production by the human alveolar macrophage: a potential mechanism for amplifying inflammation in the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1984;129:106-111.
105. Serezani CH, Chung J, Ballinger MN, Moore BB, Aronoff DM, Peters-Golden M. Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37:562-570.
106. Panaro MA, Brandonisio O, Sisto M, et al. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. *Clin Exp Med*. 2001;1:137-143.
107. Desouza IA, Franco-Penteado CF, Camargo EA, et al. Inflammatory mechanisms underlying the rat pulmonary neutrophil influx induced by airway exposure to staphylococcal enterotoxin type A. *Br J Pharmacol*. 2005;146:781-791.
108. Nakamura LT, Wu-Hsieh BA, Howard DH. Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*. 1994;62:680-684.
109. Nascimento FR, Calich VL, Rodriguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol*. 2002;168:4593-4600.
110. Fallman M, Andersson R, Andersson T. Signaling properties of CR3 (CD11b/CD18) and CR1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles. *J Immunol*. 1993;151:330-338.
111. Ueda T, Rieu P, Brayer J, Arnaout MA. Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:10680-10684.
112. Peng Z, Beaven MA. An essential role for phospholipase D in the activation of protein kinase C and degranulation in mast cells. *J Immunol*. 2005;174:5201-5208.

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](#)