



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

THIAGO YUITI CASTILHO MASSUDA

**EFEITO PROTETOR DA CICLOSPORINA A EM
CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

THIAGO YUITI CASTILHO MASSUDA

**EFEITO PROTETOR DA CICLOSPORINA A EM
CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2009

THIAGO YUITI CASTILHO MASSUDA

**EFEITO PROTETOR DA CICLOSPORINA A EM CAMUNDONGOS
BALB/c INFECTADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de
Curso de Pós-Graduação em Patologia
Experimental, da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, ____ de _____ de 2009.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano e contou com o apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, FINEP, SETI/PR e PROPPG/UEL.

William Arthur Ward

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Rosely e Almir e a minha namorada Denise, com a certeza de que sem eles os dias chuvosos seriam muito mais longos, os nublados muito mais difíceis, e a recompensa não seria tão bela! Obrigado pelo amor de sempre!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora e amiga Dr^a. Eiko Nakagawa Itano por ter me guiado durante todos esses anos e me ensinado como ser um bom pesquisador.

Aos docentes Prof. Dr. Emerson José Venancio e o Prof^a. Dr^a. Elisa Hirooka pela participação na banca, e ainda ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono pela contribuição na banca de qualificação e o Prof. Dr. Flávio de Queiróz Telles Filho pela contribuição na correção do trabalho.

Aos amigos do Departamento de Ciências Patológicas: professores, funcionários, e estagiários que direta ou indiretamente contribuíram para meu trabalho e minha formação desde a graduação. Aos técnicos Mári Sumigawa Kaminami, Nilson de Jesus Carlos, Jesus Antonio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionizio Filho por terem me ensinado e auxiliado em grande parte da minha formação e também pelas horas de diversão no tempo livre.

Aos professores e coordenadores do programa de pós-graduação em Patologia Experimental, bem como aos colegas de turma pelo por toda ajuda e momentos de descontração. Sucesso a todos.

À minha namorada, Denise Honda Kitamura, pelo amor, dedicação principalmente nos momentos difíceis.

Aos meus amigos de laboratório que muito mais que possibilitaram a realização desse trabalho, tornaram-se parte da minha família. Obrigado a essa maravilhosa equipe: Fernanda, Kaká, Juliana, Luciene, Sasaki, Nádia, Paula, Thiago Fujita, Welder, Solange, Berenice, Audrey, Andréia, Wander, Franciele e Tânia.

Aos meus amigos, companheiros e irmãos Diego, Bruno, Mineiro, Custódio, Jair, Teco, Marcelo, Fábio e Roberto por estarem sempre do meu lado, por fazerem parte do que eu sou.

Às minhas amigas muito mais do que especiais Tatiane, Andréa e Juliana.

À minha família, meu alicerce, minha base pelo apoio, compreensão e dedicação principalmente do meu pai e minha mãe.

Obrigado.

"The mediocre teacher tells. The good teacher explains. The superior teacher demonstrates. The great teacher inspires."

William Arthur Ward

Aos dias chuvosos, que me exigiram paciência...
Aos dias nublados, que me trouxeram a esperança...
Aos dias ensolarados, que me deram a recompensa...

MASSUDA, Thiago Yuiti Castilho. **Efeito protetor da ciclosporina A em camundongos BALB/c infectados com *Paracoccidioides brasiliensis***. 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina, e tem o Brasil como centro endêmico. Trabalhos recentes demonstram que as drogas que atuam na via da calcineurina interferem no crescimento de fungos patogênicos, incluindo o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, em ensaios *in vitro*, sugerindo o seu potencial terapêutico. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito da Ciclosporina A (CsA), um inibidor da via da calcineurina, na paracoccidioidomicose experimental em camundongos. Os camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos de 6 animais cada ("Control", "CsA", "Pb" e "Pb/CsA"). Dois grupos de animais ("Pb" e "Pb/CsA") foram inoculados (i.v.) com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18), enquanto os outros dois grupos (Control e CsA) receberam apenas solução salina tamponada (PBS). Durante 30 dias, os grupos CsA e Pb/CsA receberam, em dias alternados, 10mg/kg de CsA (s.c.), já os grupos "Control" e "Pb" receberam PBS. Antigenemia, resposta imune humoral, resposta imune celular, histopatologia e unidades formadoras de colônias foram avaliadas após 30 dias de infecção. A antigenemia, resposta imune humoral e citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10) foram avaliadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). A avaliação da resposta imune celular foi realizada por teste de hipersensibilidade tardia (DTH) e por meio de cultura de linfócitos estimulados com exoantígeno de Pb. Os resultados mostraram que a CsA possui um efeito protetor na PCM experimental, com diminuição da antigenemia e da carga fúngica nos órgãos. A CsA foi capaz de inibir tanto a resposta imune específica humoral como a celular, com a diminuição do nível das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-4. Concluímos pelos resultados que a CsA embora induza imunodepressão apresenta efeito protetor na PCM experimental em camundongos BALB/c.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomicose. Calcineurina. Ciclosporina A. Citocinas. Antigenemia.

MASSUDA, Thiago Yuiti Castilho. **Protector Effect of Cyclosporin A on BALB/c mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis***. 2009. 81 f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an important systemic mycosis prevalent in Latin America with most causes in Brazil. Calcineurin pathway has been described as essential to pathogenic fungi, including *P. brasiliensis*, and its potential therapeutic application throughout pharmacologic inhibition has been described. The objective of this work was to evaluate the protector effect of cyclosporine A (CsA), a calcineurin inhibitor, in murine experimental PCM. Male BALB/c mice were separated into 4 groups composed by 6 animals each ("Control", "CsA", "Pb" and "Pb/CsA"). Groups "Pb" and "Pb/CsA" were inoculated i.v. with 1×10^6 *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells (Pb18), while control and CsA groups received only saline-phosphate buffer (PBS). During 30 days, "CsA" and "Pb/CsA" groups received every other day 10mg/kg of CsA (s.c.), the groups "control" and "Pb" received just PBS. Antigenemia, humoral immune response, cytokines (IFN- γ TNF- α , IL-4 and IL-10) assessed by ELISA, cellular immune response evaluated by delayed hypersensitivity (DTH) test and by lymphocyte culture stimulated with specific Pb exoantigen, the colony-forming units (CFU) and histopathology were all evaluated 30 days post infection. The results showed that CsA has protective effect in experimental PCM, with decreased antigenemia and organs fungal load. Cyclosporin was able to inhibit the specific humoral and cellular immune response, with decrease in IFN- γ , TNF- α and IL-4 cytokine levels. In conclusion, although the immunosuppressive effect, the CsA has protective effect in murine experimental PCM.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomycosis. Calcineurin. Cyclosporin A. Cytokines. Antigenemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> na forma de micélio a temperatura de 25°C	17
Figura 2 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> na forma de levedura a temperatura de 37°C	17
Figura 3 - Mecanismo de ativação de linfócitos e mecanismo de ação dos inibidores da calcineurina	29
Figura 4 - O papel da via da calcineurina em <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> e <i>P. brasiliensis</i>	31
Figura 5 - Estrutura molecular da Ciclosporina A	33

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- Figura 1** - Nível de antígeno solúvel no soro (antigenemia) em camundongos infectados e tratados com CsA (Pb/CsA), ou somente infectados (Pb) após 30 dias de infecção63
- Figura 2** - Unidades formadoras de colônias (CFU) do pulmão dos camundongos infectados e tratados com CsA (Pb/CsA), ou somente infectados (Pb) após 30 dias de infecção64
- Figura 3** - Análise histopatológica do pulmão de camundongos infectados ou infectados e tratados com CsA após 30 dias de infecção. Coloração HE66
- Figura 4** - Análise histopatológica do pulmão de camundongos infectados ou infectados e tratados com CsA após 30 dias de infecção. Coloração Grocott67
- Figura 5** - Análise histopatológica do fígado de camundongos infectados ou infectados e tratados com CsA após 30 dias de infecção. Coloração HE68
- Figura 6** - Análise histopatológica do fígado de camundongos infectados ou infectados e tratados com CsA após 30 dias de infecção. Coloração Grocott69
- Figura 7** - Índice de proliferação de linfócitos com exoantígeno dos camundongos infectados e tratados (Pb/CsA), somente infectados (Pb) e controles (CsA e Control)70
- Figura 8** - Teste de DTH (Media de inchaço da pata) dos camundongos infectados e tratados (Pb/CsA), somente infectados (Pb) e controles (CsA e Control)71
- Figura 9** - Níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-gp43 no soro de camundongos infectados e tratados com CsA (Pb/CsA), somente infectados (Pb) e controles (CsA e Control) após 30 dias de infecção72
- Figura 10** - Perfil de citocinas (IFN- γ , IL-4, TNF- α e IL-10) no soro de camundongos infectados e tratados com CsA (Pb/CsA) ou somente infectados (Pb) após 30 dias de infecção72

LISTA DE SIGLAS

μL	microlitro
μm	micrometro
°C	graus Celsius
μg	micrograma
BHI	meio <i>brain-heart-infusion</i>
BSA	soro albumina bovina
Ca²⁺	íon cálcio
CaM	calmodulina
CaN	calcineurina
CFA	antígeno livre da célula
CFU	<i>Colony forming unit</i> (unidade formadora de colônia)
cm²	centímetro quadrado
CsA	ciclosporina a
CyPA	ciclofilina a
D.O.	densidade óptica
DC	célula dendrítica
DMSO	dimetilsulfóxido
DTH	hipersensibilidade tardia
ELISA	ensaio imunoenzimático
EXO	exoantígeno
FK506	Tacrolimus
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>
G	grama
gp43	glicoproteína de 43 kDa
h	hora
HE	hematoxilina-eosina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina

IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
IFN-γ	interferon gama
kDa	kilo Dalton
kg	kilograma
MAb	anticorpo monoclonal
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide)
N	Normal
NFAT	fator nuclear de células T ativadas
ng	nanograma
nm	nanômetro
OPD	ortho- phenylenediamine dihydrochloride
Pb18	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cepa 18
PBS	tampão fosfato salina
PBST	tampão de lavagem (PBS + Tween 20)
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
rpm	rotações por minuto
s.c.	sub cutâneo
Th0	Linfócito T virgem ou <i>naive</i>
Th1	Linfócito T auxiliar ou <i>helper 1</i>
Th2	Linfócito T auxiliar ou <i>helper 2</i>
TMB	tetrametilbenzidina
TNFα	fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E A PARACOCCICIOIDOMICOSE	16
1.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA PCM	20
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	24
1.4 DESENVOLVIMENTO A 37°C.....	26
1.5 CALCINEURINA.....	28
1.6 INIBIDORES DA CALCINEURINA.....	32
2 OBJETIVO	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
REFERÊNCIAS	38
ARTIGO A: EFEITO PROTETOR DA CICLOSPORINA A EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	51
1.1 INTRODUÇÃO	52
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
1.2.1 Animais.....	56
1.2.2 Manutenção do Fungo <i>P. Brasiliensis</i>	56
1.2.3 Protocolo Experimental	56
1.2.3.1 Infecção dos animais	57
1.2.3.2 Tratamento dos animais	57
1.2.4 Obtenção de Exoantígeno de <i>P. Brasiliensis</i>	57
1.2.5 Purificação de gp43.....	58
1.2.6 ELISA de Inibição para Detecção de gp43 Solúveis no Soro.....	58
1.2.7 Unidades Formadoras de Colônia-CFU	59
1.2.8 Histopatologia.....	59
1.2.9 Proliferação de Linfócitos	60

1.2.10 Reação de Hipersensibilidade Cutânea (DTH).....	60
1.2.11 ELISA para IgG Total Anti-gp43.....	61
1.2.12 ELISA para Detecção de IgG1 e IgG2a Anti-gp43	61
1.2.13 Determinação do Nível de Citocinas	62
1.2.14 Análise Estatística	62
2 RESULTADOS	63
2.1 NÍVEIS DE GP43 NO SORO (ANTIGENEMIA).....	63
2.2 CFU	64
2.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	64
2.4 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS	69
2.5 TESTE DE DTH	70
2.6 NÍVEIS DE IGG TOTAL, IGG1 E IGG2A ANTI-GP43.....	71
2.7 PERFIL DE CITOCINAS.....	72
2.8 DISCUSSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	76

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E A PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Nas últimas décadas os fungos de importância médica vêm ganhando destaque, principalmente em virtude das infecções que acometem pacientes imunodeprimidos (ROMANI, 2004). Dentre esses fungos, os dimórficos são os responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas de humanos e outros mamíferos. Representados por patógenos como *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, esses fungos possuem um mecanismo de transição dimórfica fundamental para o estabelecimento da infecção. Esse processo de dimorfismo é desencadeado por uma série de alterações intracelulares em virtude de fatores relacionados à interação patógeno – hospedeiro e à mudança de temperatura (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1994; ODDS et al., 2001; GOW et al., 2002; ROONEY; KLEIN, 2002).

Inicialmente relatada por Lutz em 1908, a Paracoccidioidomicose (PCM), doença de natureza granulomatosa e evolução predominantemente crônica, tem como agente etiológico o fungo *P. brasiliensis*. O processo de transição dimórfica do fungo *P. brasiliensis*, *in vitro*, é dependente da mudança de temperatura; sugerindo que de alguma forma o fungo percebendo esse estímulo responde, via sinalização celular, a esse sinal. À temperatura ambiente (25°C), o fungo apresenta-se com micélio septados - podendo apresentar conidiogênese - (Figura 1), diferenciando-se para a forma de levedura, com parede bi-refringente e múltiplos brotamentos quando à temperatura de 37°C (*in vitro*) ou a partir da invasão de tecidos do hospedeiro (Figura 2) (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1982; BRUMMER et al., 1993). Dessa forma, esse processo de transição dimórfica é facilmente reproduzido *in vitro* a partir da simples mudança da temperatura de incubação do microrganismo, o que faz de *P. brasiliensis* um excelente modelo para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no dimorfismo (SAN-BLAS, 1985).



Figura 1 - *Paracoccidioides brasiliensis* na forma de micélio a temperatura de 25°C.
Fonte: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/jan2005.html)

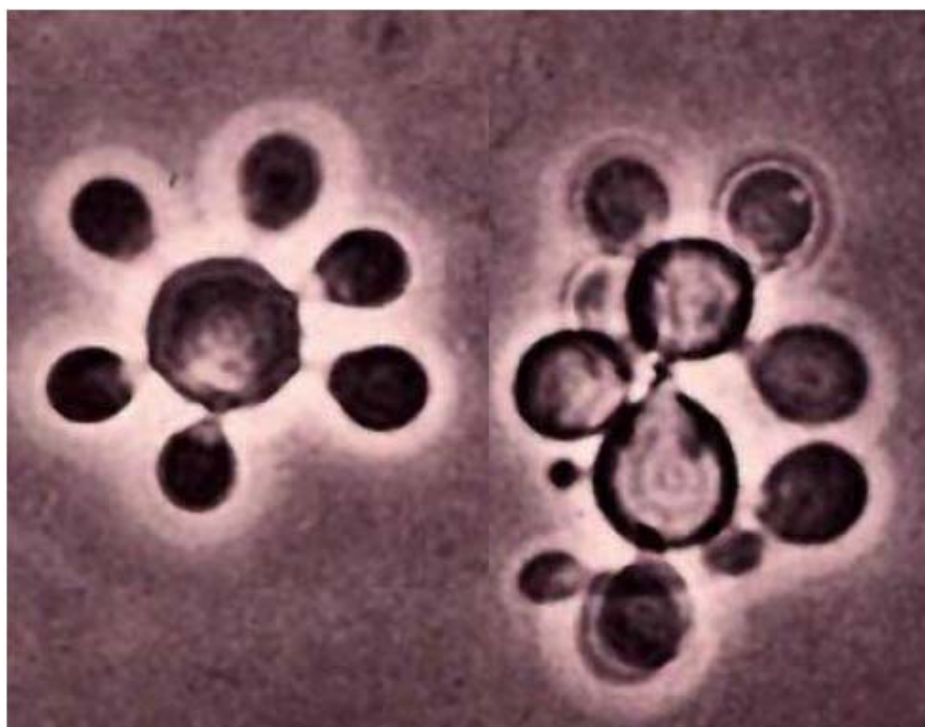


Figura 2 - *Paracoccidioides brasiliensis* na forma de levedura a temperatura de 37°C.
Fonte: http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/jan2005.html

A PCM, uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina (SAN-BLAS, 1993; LACAZ, 1994), é considerada por Coutinho e colaboradores (2002) a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica ou repetitiva entre as patologias infecciosas ou parasitárias.

No *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* realizado em Medellín, Colômbia, 1986, a PCM foi classificada em PCM-infecção, PCM-doença de forma aguda ou subaguda (forma juvenil), forma crônica (tipo adulta) ou forma residual (seqüelas). A PCM crônica pode ser novamente subdividida em PCM unifocal ou multifocal conforme o número de locais de lesões (FRANCO et al., 1987).

A grande maioria dos indivíduos expostos ao fungo apresenta uma infecção assintomática (PCM infecção), podendo levar à doença cerca de 2% dos indivíduos infectados cujo número na América Latina é estimado em 10 milhões (MCEWEN et al., 1995).

Estudos epidemiológicos utilizando-se teste intradérmico com paracoccidioidina para a detecção de contato prévio com *P. brasiliensis* ou pelo uso de teste imunoenzimático (ELISA), detectando anticorpos IgG específicos, revelam que a exposição ao fungo é alta em populações de indivíduos adultos e saudáveis, principalmente em áreas rurais (DIXON et al., 1998, BOTTEON et al., 2002). A infecção primária da PCM pode persistir em focos quiescentes por décadas, como observado em casos importados, sugerindo que durante este período estes pacientes foram capazes de controlar a disseminação fúngica. Alguns tipos de medicamentos utilizados contra a rejeição de órgãos ou quimioterápicos podem levar à reativação do *P. brasiliensis* latente por indução de imunossupressão do hospedeiro. O desenvolvimento da doença fica então dependente de fatores como a virulência do patógeno, da suscetibilidade genética e do estado imunitário do hospedeiro. (FRANCO, 1987; SAN-BLAS et al., 2002).

Na PCM-doença, a forma aguda é mais grave e menos freqüente - entre 3% e 5% dos casos - (BRUMMER et al., 1993), acomete principalmente crianças e adultos jovens em igual proporção entre os sexos masculino e feminino. É caracterizada por uma rápida evolução, com envolvimento do sistema reticuloendotelial, causando linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Como ocorre hipertrofia de baço, fígado e linfonodos, além de disfunção da medula óssea essa

forma da doença é facilmente confundida com uma desordem linfoproliferativa nas disseminações graves.

Nesta forma da doença, os pulmões, apesar de serem a porta de entrada da infecção, dificilmente são acometidos, logo não apresentam manifestações clínicas ou radiológicas, exeto em linfadenopatias para-hilares (BRUMMER et al., 1993; BENARD et al., 1995).

Por outro lado, a forma crônica como já mencionado pode apresentar desde uma forma benigna e localizada (unifocal), com acometimento predominantemente do pulmão ou tecidos mucocutâneos, até casos mais graves e disseminados (multifocal), dependendo da competência da imunidade celular do indivíduo (FRANCO et al., 1987; BRUMMER et al., 1993).

Na pcm crônica, 90% dos pacientes possuem manifestações clínicas pulmonares evidentes, e em aproximadamente 25% dos casos os pulmões constituem os únicos órgãos clinicamente acometidos (unifocal). Contudo, muitas vezes o envolvimento pulmonar é silencioso, e clinicamente o paciente apresenta lesões extrapulmonares (multifocal) (FRANCO et al., 1987; MANNIS et al., 1996).

A pcm é restrita a América Latina com uma distribuição não uniforme, estendendo-se do México até a Argentina. O Brasil é o país com maior incidência (80% dos casos relatados), possuindo focos de ocorrência os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul. A doença é menos freqüente no Nordeste do país, devido à aridez do clima (WANKE; LONDERO, 1994; COUTINHO et al., 2002).

O habitat e o ciclo biológico de *p. Brasiliensis* ainda não estão totalmente esclarecidos, contudo, diversos estudos ecoepidemiológicos sugerem que esse fungo sobreviva na sua fase miceliana de forma saprobiota em regiões com solos úmidos, ricos em matéria orgânica e com pequenas alterações de temperatura (RESTREPO et al., 1985; 2001). Em condições adversas como limitação de umidade e nutrientes o fungo pode produzir propágulos da forma miceliana denominados de conídios, os quais podem infectar, via aerógena, o homem (RESTREPO et al., 2001).

Após inalados, os conídios atingiriam os pulmões, onde sofreriam a transição para a forma de levedura, fundamental para o estabelecimento da infecção (ROONEY; KLEIN, 2002). A partir dos pulmões, o fungo pode disseminar-se por

todo o corpo (através da via sanguínea e/ou linfática) causando lesões nos órgãos ou tecidos internos e até lesões mucocutâneas. Caso não ocorra a disseminação, a infecção pode tornar-se latente ou crônica, ou ainda ser erradicada, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro e da virulência do fungo (FRANCO, 1987; SAN-BLAS et al., 2002). Não são descartadas as ocorrências de infecções acidentais pela inoculação direta em outras partes do corpo, como nas regiões oral e anal (FRANCO, 1987).

1.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA PCM

A defesa imunológica do hospedeiro mamífero contra as micoses sistêmicas além de complexa é multifatorial, dependendo de mecanismos da resposta imunológica do hospedeiro, tanto inatos quanto adaptativos (HUFFNAGLE; DEEPE, 2003; ROMANI, 2004).

A imunidade adaptativa, essencial para o controle das micoses sistêmicas, é didaticamente dividida em resposta celular ou humoral. A imunidade celular é coordenada principalmente pela subpopulação de linfócito T auxiliar ou *helper* 1 (Th1) enquanto que a humoral pela subpopulação Th2. Nos últimos anos, cada vez mais vêm sendo demonstrando que a resistência aos fungos causadores das micoses sistêmicas causadas por *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* e *Paracoccidioides brasiliensis* está associada a uma resposta imunológica celular efetiva, enquanto que a suscetibilidade a uma resposta predominantemente humoral (ROMANI, 2004).

Os linfócitos Th1 e Th2 diferenciam-se a partir de uma célula T precursora denominada de Th0. A diferenciação desse precursor em Th1 ou Th2 é dirigida principalmente, mas, não unicamente pelas citocinas - interleucina 12 (IL-12) para Th1 e interleucina 4 (IL-4) para Th2 - produzidas por células da imunidade inata no início da infecção. Desse modo, em uma resposta típica à infecção fúngica, ocorre uma produção de IL-12 pelas células dendríticas (DCs) e macrófagos, seguida pela produção de IFN- γ . Esse cenário induz uma resposta mediada por Th1,

que caracteriza a imunidade celular. Por outro lado, a produção inicial de IL-4 pelas DCs ou por outros leucócitos direciona uma resposta do tipo Th2, responsável pela ativação da imunidade humoral (D'OSTIANI et al., 2000; MALDONADO-LÓPEZ; MOSER, 2001; KIDD, 2003; ROMANI, 2004). Assim, o fenótipo da célula fúngica, sua carga antigênica, o subtipo da DC, o receptor utilizado pelas DC, o *background* genético, tanto do fungo como do hospedeiro além do microambiente co-estimulatório parecem ser fatores que contribuem para a polarização de uma resposta imune ser celular ou humoral (KUCHROO et al., 1995; D'OSTIANI et al., 2000; MALDONADO-LÓPEZ; MOSER, 2001; BOZZA et al., 2002; FERREIRA et al., 2003; HUFFNAGLE; DEEPE, 2003; ROMANI, 2004).

Na PCM humana, pacientes que desenvolvem a forma crônica geralmente apresentam imunidade celular preservada, exceto em formas mais graves da doença onde a imunidade celular é deficiência. Análises histopatológicas de lesão de pacientes com PCM crônica mostram granulomas epitelióides típicos, que circundam as lesões e dificultam a multiplicação do fungo (MONTENEGRO, 1986). A PCM é caracterizada como uma doença de padrão granulomatoso, sendo o granuloma a lesão fundamental, apresentando-se como componente essencial na defesa anti *P. brasiliensis*. Essa lesão resulta de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do agente infeccioso, ocorrendo também em outras doenças infecciosas, como tuberculose, hanseníase e histoplasmose. O desenvolvimento do granuloma permite a contenção do patógeno, impedindo sua disseminação pelo organismo (ROMANI, 1997). O macrófago é a principal célula integrante do granuloma, apresentando atividades microbidas e de apresentador de antígeno, além de, juntamente com linfócitos T, produzir citocinas. Plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos também estão presentes no granuloma (DE BRITO; FRANCO, 1994). A atividade de linfócitos T e a resposta granulomatosa são características das formas localizadas da infecção, enquanto que nas formas disseminadas não se observa formação de granulomas epitelióides (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA, 2001; MURPHY, 1998).

A resposta imunológica humoral na forma crônica apresenta níveis menores de anticorpos específicos, quando comparada com a forma aguda. Na forma crônica encontramos níveis mais elevados de anticorpos do tipo IgG1 na

forma crônica unifocal, e de IgG4 e IgE na forma multifocal (MAMONI et al., 2001; MAMONI et al., 2002).

Pacientes com a forma aguda apresentam uma resposta imunológica humoral preservada, com altos níveis de anticorpos específicos do tipo IgG4, IgE e IgA (BENARD et al., 2001; MAMONI et al., 2002; MAMONI et al., 2001), enquanto a resposta imunológica celular a antígenos do fungo está deprimida (BENARD et al., 1996, MOTA et al., 1985). A análise histopatológica das lesões mostra reação inflamatória não específica com formação de granulomas frouxos, observando-se multiplicação ativa do fungo dentro das células fagocitárias (FRANCO et al., 1996; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Em modelo experimental tem sido comparada a resposta imune utilizando-se linhagens de camundongos resistentes (A/Sn) e susceptíveis (B10-A) à infecção por *P. brasiliensis* (CANO et al., 1995).

Camundongos da linhagem resistente à infecção apresentam uma efetiva resposta imune celular quando infectados através da via intraperitoneal (i.p.), com a cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18), com eficiente ativação de macrófagos e altos níveis de IFN- γ (mostrando tendência de resolução do processo infeccioso, por meio de resposta mediada pelos clones Th1). Esses animais apresentam ainda baixos níveis de anticorpos específicos IgG1 e IgG2b, característico de um perfil Th2. (CALICH; KASHINO, 1998; KURITA et al., 1999; SOUTO et al., 2000).

Como já mencionado, os linfócitos Th1 parecem ter papel essencial para uma resposta imune celular efetiva contra os fungos causadores de micose sistêmica importantes. Observa-se então que a resistência de certas linhagens de camundongos pode estar associada a uma manutenção dos níveis de interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ durante todo o curso da infecção (CALICH; KASHINO, 1998). O IFN- γ age ativando os macrófagos (principal célula efetora da imunidade celular) a um estado microbicida ótimo, em sinergia com o TNF- α , além de induzir a produção das subclasses de imunoglobulinas IgG2a e IgG3, as quais contribuem para imunidade antifúngica por meio de suas atividades acentuadas de fixação de complemento e opsonização. O papel da IL-2 é de contribuir na estimulação da proliferação de células T CD8⁺ (MURRAY, 1990; 1994; BEAMAN, 1991; AGUIRRE et al., 1995;

CANO et al. 1998; 2000; KAWAKAMI et al., 1996; ALLENDOERFER et al., 1997; LAVIGNE et al., 1998).

A susceptibilidade em camundongos parece estar mais relacionada com a ativação preferencial dos linfócitos Th2 que produzem citocinas controladoras da ativação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (células secretoras de anticorpos); demonstrando a sua importância na indução da resposta imune humoral. A IL-4 controla a troca de classe de imunoglobulina para IgE, tendo assim um papel central na defesa contra helmintos e na regulação da resposta alérgica. Estimula também produção de subclasses de IgG (IgG1 em camundongo) que neutralizam, porém não opsonizam antígenos (SOUTO et al., 2003; SINGER-VERMES et al., 1993; CACERE et al., 2002). Outros estudos mostraram que camundongos susceptíveis são precocemente imunossuprimidos após infecção intraperitoneal (i.p.) com o Pb18. Essa imunossupressão observada parece resultar de uma resposta imune mediada pelos clones de linfócitos Th2. Estudos onde é induzida a imunomodulação Th1-Th2 da resposta murina contra *P. brasiliensis* demonstram que o aumento de isótipos do tipo Th1 (IgG2a) contribui para a sobrevivência dos camundongos (AMARAL et al., 2005), além disso, camundongos nocaute para IL-4 mostraram-se mais resistentes à progressão da infecção (PINA et al., 2004) e camundongos geneticamente alterados são capazes de eliminar *P. brasiliensis*, quando tem a produção de IL-4 inibida (PINTO et al., 2006). No entanto, a IL-4 pode ter um papel paradoxal protegendo ou estimulando a doença em camundongos de linhagens diferentes, o que demonstra a importância do *background* genético na PCM experimental (ARRUDA et al., 2004). Esse fato aliado aos resultados de Calich e Kashino, (1998) e Kashino e colaboradores (2000), que observaram uma ausência de produção inicial de IL-4 nos camundongos susceptíveis, mostram que o modelo Th1 e Th2 não explica todo o mecanismo de resistência e susceptibilidade na PCM. De forma semelhante, níveis de IL-4 em pacientes com candidíase mucocutânea crônica, apesar da produção não efetiva de citocinas do tipo 1, geralmente não se apresentam aumentados (LILIC, 2002).

Foi observado também, que camundongos da linhagem Balb/c apresentam resposta imune intermediária entre a susceptibilidade e a resistência (CALICH et al., 1985).

Em suma, evidências clínicas e dados dos estudos experimentais mostram que a imunidade celular com desenvolvimento de resposta Th1 é o principal mecanismo de defesa do hospedeiro ao *P. brasiliensis*. Entretanto, inúmeras variáveis podem ainda influenciar no mecanismo de resistência/susceptibilidade da PCM, como mecanismos da imunidade inata, fatores de virulência do *P. brasiliensis* e a interação parasita-hospedeiro. O melhor entendimento de algumas dessas variáveis pode se tornar subsídio para terapias alternativas aos tratamentos convencionais da PCM.

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

A virulência fúngica é descrita como um evento altamente complexo, resultante da expressão de múltiplos genes em diferentes estágios da infecção e cuja consequência poderia estar fortemente associada ao estabelecimento da patogênese. Estima-se que haja aproximadamente 150.000 espécies de fungos com apenas 270 descritas como sendo capazes de causar doença em humanos. Mecanismos envolvidos na adesão e a sobrevivência do patógeno no interior do hospedeiro mostram-se essenciais no estabelecimento da patogênese e estão entre os principais alvos de estudos pelos pesquisadores.

O teste ideal para avaliação de um fator de virulência é comparar as respostas biológicas em fungos com e sem tal fator. Para isso, o protocolo padrão utilizado na identificação desses potenciais fatores de virulência é a mutagenese sítio-dirigida, que permite o estudo de cepas mutantes específicas, e a correspondente cepa reconstituída, em modelo de infecção animal. Baseando-se no “Postulado molecular de Koch”, Falkow (1998; 2004) definiu que para um gene ser considerado de virulência, a infecção ou patogênese causada pelo mutante deve ser atenuada quando comparada à infecção causada pelo tipo selvagem e pela cepa reconstituída. Esse conceito ficou conhecido como “Postulado de Falkow”.

Atualmente, ferramentas de biologia molecular, como seqüenciamento do genoma do *P. brasiliensis*, e sistemas de transformação e nocaute gênico eficientes vêm fornecendo ferramentas importantes para o

entendimento da patogênese fúngica (KWON-CHUNG, 1998; LORENZ, 2002; MAGEE et al., 2003; RAPPLEYE; GOLDMAN, 2006).

Nesse contexto, alguns grupos de pesquisa têm se esforçado em evidenciar possíveis genes relacionados com fatores de virulência de *P. brasiliensis*. O Projeto Genoma Funcional e Diferencial de *P. brasiliensis* permitiu a identificação de genes descritos para outros fungos patogênicos causadores de micoses sistêmicas como importantes no processo de infecção, virulência, resistência a drogas e dimorfismo, termotolerância, moléculas de adesão celular, produção de enzimas extracelulares entre outros. O objetivo principal desses projetos é a geração de uma biblioteca das seqüências expressas nas formas leveduriforme e miceliana de *P. brasiliensis*, visando ao mapeamento de seu transcriptoma na condição de cultivo *in vitro*, bem como a identificação dentro desse genoma de prováveis fatores de virulência (FELIPE et al., 2003; 2005; GOLDMAN et al., 2003; TAVARES et al., 2005).

Findado o projeto do genoma do *P. brasiliensis*, trabalhos vieram sendo desenvolvidos no sentido de organizar essas importantes informações obtidas. Fernandes e colaboradores (2005) descreveram algumas vias de sinalização utilizada pelo *P. brasiliensis* envolvidas na morfogênese e virulência, através de informações vindas de outras espécies fúngicas como *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Esse estudo permitiu a evidenciação de importantes vias de sinalização presentes no *P. brasiliensis*, como por exemplo, a via do Cálcio-Camodulina-Calcineurina (responsável por manter a integridade das células frente a um estresse); mostrando que esse microorganismo poderia utilizar dessa maquinaria para sobreviver no ambiente hostil do hospedeiro. Simultaneamente, Amaral e colaboradores (2005), utilizando a mesma metodologia, destacaram com base em informações do transcriptoma o *P. brasiliensis* e de outros trabalhos alguns possíveis alvos terapêuticos alternativos ao tratamento convencional da PCM. Essa análise destacou também a via da calcineurina como importante para o *P. brasiliensis*, tendo em vista resultados promissores obtidos em modelos com outras espécies de fungos patogênicos.

Apesar de recentes esforços ainda há uma carência no principal meio de investigação dos fatores de virulência que é o sistema de transformação e

nocautes gênicos, sendo um importante fator que dificulta o conhecimento sobre a virulência molecular na PCM. Para suprir essa carência o uso de bloqueadores farmacológicos para determinadas vias importantes nos mecanismos de virulência tem se tornado uma alternativa de estudo importante e muito utilizada.

1.4 DESENVOLVIMENTO A 37°C

A associação entre morfogênese e virulência em fungos dimórficos tem sido relatada extensivamente na literatura. Alguns isolados mutantes desses fungos não possuem a habilidade de transitar entre as formas micelial e leveduriforme, sendo avirulentos em modelos experimentais (MEDOFF et al., 1986; FRANCO et al., 1993; GOW et al., 2002; ROONEY; KLEIN, 2002). Dessa maneira, esse processo de transformação, como já mencionado, é essencial para o estabelecimento da infecção e desenvolvimento da doença, provavelmente por refletir mudanças adaptativas as quais permitem a sobrevivência desses fungos no novo ambiente do hospedeiro.

Esse fenômeno conhecido como termotolerância distingue, por exemplo, *C. neoformans* var. *gatii* da var. *neoformans*. O primeiro não cresce eficientemente a 37 °C e não é capaz de causar infecção letal em camundongos, ao passo que o segundo cresce facilmente a essa temperatura com conseqüente estabelecimento e desenvolvimento de doença (RHODES, 1988).

Muito mais do que a habilidade de transitar entre as formas micelial e leveduriforme, esses microorganismos realizam inúmeras mudanças em sua maquinaria celular que os permite sobreviver a uma série de estressores que o hospedeiro certamente proporcionará. Combinadas essas características, somadas a outras igualmente importantes, tornam viável a sobrevivência e multiplicação da célula fúngica no interior do hospedeiro.

Fernandes e colaboradores (2005) identificaram uma variedade de genes possivelmente associados ao desenvolvimento a 37°C em *P. brasiliensis*, bem como alguns envolvidos na transição. Muitos desses genes são responsivos a

determinadas vias de sinalização intracelulares bem estabelecidas em outros modelos, e como já mencionada, a via de sinalização do cálcio é uma delas.

Importante em numerosos processos celulares dos eucariotos, o cálcio está envolvido em processos de alteração da expressão gênica em resposta a estímulos externos, sendo crucial para a viabilidade celular em situações que exijam adaptações às mudanças no ambiente.

A via Cálcio-Calmodulina-Calcineurina é descrita como importante na transformação da forma micelial para leveduriforme e manutenção da homeostase celular sob condições de estresse em fungos patogênicos (KRAUS; HEITMAN, 2003).

A calmodulina (CaM) está presente em todas as células eucarióticas, incluindo *P. brasiliensis*. No citoplasma, a Calmodulina medeia processos de regulação de proteínas quinases, proteínas fosfatases, fatores de transcrição, proteínas motoras e citoesqueleto. A CaM normalmente é geneticamente representada por um exemplar único gene que varia de 1 a 15 kb (DE CARVALHO et al., 2003; KRAUS; HEITMAN, 2003) e inibidores da sua via são capazes de prejudicar a transição de micélio para levedura em *P. brasiliensis* (DE CARVALHO et al., 2003).

A calcineurina (CaN), uma fosfatase serina/treonina dependente de Ca^{2+} /calmodulina, também é descrita como tendo um papel importante na transição de micélio para levedura, crescimento a 37 °C e resposta ao estresse e integridade celular em leveduras (ODOM et al., 1997a, FOX et al., 2001; KRAUS et al., 2003).

Estudos utilizando diversos fungos patogênicos para humanos revelam que CaN é essencial para a virulência, sendo que o mecanismo de ação possa talvez ser distinto para cada espécie fúngica. Estas diferenças de função podem refletir as necessidades de cada patógeno de sobreviver no interior do hospedeiro (KRAUS; HEITMAN, 2003), e serão detalhadamente descritas mais adiante.

1.5 CALCINEURINA

A Calcineurina (CaN) também conhecida como proteína fosfatase 2B, ou PP2B, é a única enzima serina/treonina fosfatase com ativação dependente do complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Extremamente conservada em eucariotos, a CaN um heterodímero que apresenta uma subunidade catalítica (CaNA) que tem cerca de 58-64 kDa e uma subunidade regulatória (CaNB) que possui 19 kDa. A CaNA é constituída de quatro domínios: o domínio com atividade fosfatase, o que se liga a subunidade CaNB, um domínio com afinidade por $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, e um segmento auto-inibitório. Já a subunidade CaNB possui quatro regiões ligantes de Ca^{2+} quando estimuladas promovem um aumento da atividade fosfatase. Esta atividade é estritamente dependente da presença da subunidade regulatória CaNB e da ligação de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Não foi observada atividade fosfatase da CaN na presença de CaM livre de Ca^{2+} (SHIBASAKI et al., 2002; XIANG et al., 2003).

De maneira geral a CaN desempenha um papel crucial nas células eucarióticas; tendo importante participação desde regulação da homeostase da leveduras sob condições de estresses até a ativação de linfócitos nos humanos, entre outras funções (CLIPSTONE; CRABTREE, 1992; ARAMBURU et al., 2004).

Nos linfócitos, a calcineurina é ativada pelo aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático, que ocorre logo após a estimulação das células T quanto encontram o antígeno. O sinal gerado pelo contato com o antígeno ativa uma série de tirosina proteína cinases que fosforilam e ativam a coenzima fosfolipase C, iniciando a hidrólise de fosfatidilinositol-4,5 bifosfato, com geração de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol, e resultando na mobilização de cálcio intracelular, que se liga a calmodulina. Como já descrito o complexo cálcio-calmodulina ativa a calcineurina. A calcineurina ativada desfosforila a forma citoplasmática do fator de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas), permitindo então seu deslocamento para o núcleo, onde se liga à região promotora dos genes da interleucina 2 (IL2), interleucina 4 (IL4) e interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$), causando a transcrição dos mesmos e a secreção das referidas citocinas (figura 3) (CLIPSTONE; CRABTREE, 1992; BAKSH; BURAKOFF, 2000).

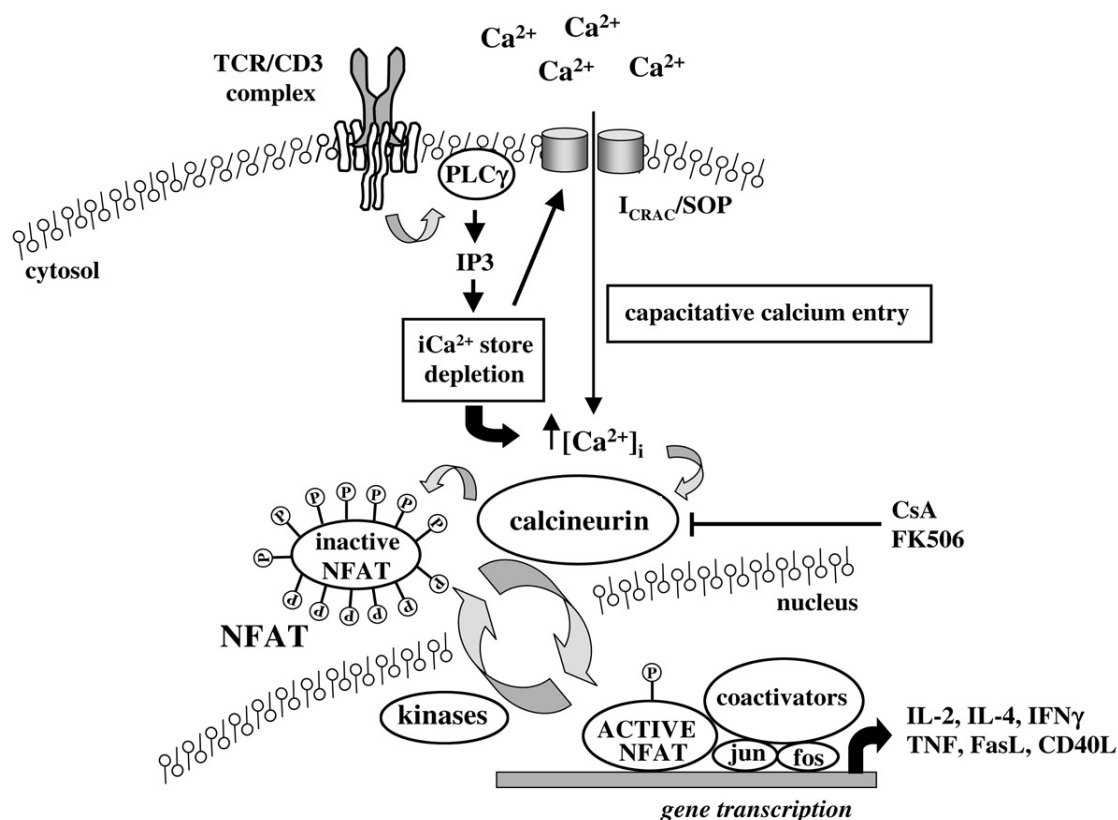


Figura 3 - Mecanismo de ativação de linfócitos e mecanismo de ação dos inibidores da calcineurina
 Fonte: Cope (2002).

Apesar desse papel da calcineurina estar bem estabelecido na resposta imunitária, recentes trabalhos têm apontado um importante envolvimento dela na promoção da virulência de fungos patogênicos para humanos (STEINBACH et al., 2007a).

A ativação da via do Ca^{2+} /CaM/CaN é descrita em fungos como indutora de um controle adequado dos parâmetros bioquímicos, genéticos e de alterações morfológicas em situações em que são exigidas adaptações às condições estressantes.

Diversos estudos têm mostrado a importância da calcineurina em modelos de fungos patogênicos onde, dependendo da espécie do fungo, ela aparece ligada à regulação de funções que incluem crescimento, germinação e extensão hifas, desenvolvimento, sobrevivência e crescimento sob condições

normais e principalmente sob condições estressantes (KRAUS et al., 2003; STIE; FOX, 2008).

Quando a célula fúngica é obrigada a sobreviver sob condições de desfavoráveis de temperatura (ODOM et al., 1997; PEITER et al., 2005), pH (BLANKENSHIP et al., 2003), íons (LIU, et al., 2006) ou na presença de antifúngicos (ONYEWU et al., 2003) ocorre um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, que por sua vez liga-se a calmodulina, ativando a calcineurina (FERNANDES et al., 2005). Uma vez ativada a calcineurina ativa o fator transcricional Crz1/Tcn1 - homólogo ao fator de transcrição NFAT de mamífero - que ao entrar no núcleo ativa um conjunto de genes responsivos a calcineurina.

Estudos com *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que a ativação da CaN e conseqüentemente do fator de transcrição Crz1/Tcn1 induz a transcrição de genes envolvidos na homeostase e sobrevivência da célula (CYERT, 2003), concluindo-se que o fator de transcrição Crz1/Tcn1 parece regular a maioria das respostas impulsionada pela ativação da calcineurina sob condições de estresse (VILADEVALL et al., 2004).

A associação entre a virulência do patógeno e a calcineurina é descrita em *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. albicans* e *P. brasiliensis* (Figura 4).

Em *C. neoformans*, a calcineurina é exigida para crescimento em temperatura elevada, uma vez que mutantes nulos desse fungo para ela são viáveis a 24°C, mas não a 37°C. Além disso, esses mutantes têm o crescimento de suas hifas afetado, impedindo-as de acasalar. Como consequência esses mutantes tornam-se não são patogênicos quando analisados por infecção em modelo experimental criptococose, podendo ainda ter a sua dispersão afetada pela não produção de esporos (ODOM et al., 1997a; FOX et al., 2001; CRUZ et al., 2001).

De forma semelhante, cepas de *A. fumigatus* mutantes para inativação da calcineurina apresentam defeito no processo de extensão de suas hifas. Isso mostra papel fundamental da CaN no desenvolvimento celular e morfologia de *A. fumigatus*. A infecção com esses mutantes, em modelo animal, leva a uma significativa diminuição na patogenicidade quando comparado com a cepa selvagem, como acontece no modelo de criptococose (STEINBACH et al., 2006; FERREIRA et al., 2007)

A deleção de qualquer uma das subunidades da CaN também possui um efeito sobre as células da *C. albicans*. Trabalhos mostraram que essas células ficam mais sensíveis a diversas condições de estresse, gerando cepas de virulência atenuada em modelo murino de candidíase sistêmica (BADER *et al.*, 2003; SANGLARD *et al.*, 2003; BADER *et al.*, 2006). Essa atenuação da virulência pela inativação da calcineurina é resultado da impossibilidade do fungo crescer na presença de soro, o que não acontece com a cepa selvagem (BLANKENSHIP *et al.*, 2003; BLANKENSHIP; HEITMAN, 2005). Isso mostra também que embora a calcineurina seja essencial para a virulência tanto para *C. neoformans* e *A. fumigatus* quanto para *C. albicans* os mecanismos pelos quais isso acontece parecem ser diferentes.

Com relação a estudos com o *P. brasiliensis*, resultados de análises da expressão gênica por *Microarray* feitas durante a transição da fase micelial para leveduriforme mostraram uma alta expressão da subunidade B da CaN nessa condição (NUNES *et al.*, 2005). Recentes trabalhos ainda, evidenciam que esse fungo poderia também utilizar o mecanismo de ativação da CaN para se proteger contra o ambiente hostil do hospedeiro (CAMPOS *et al.*, 2008).

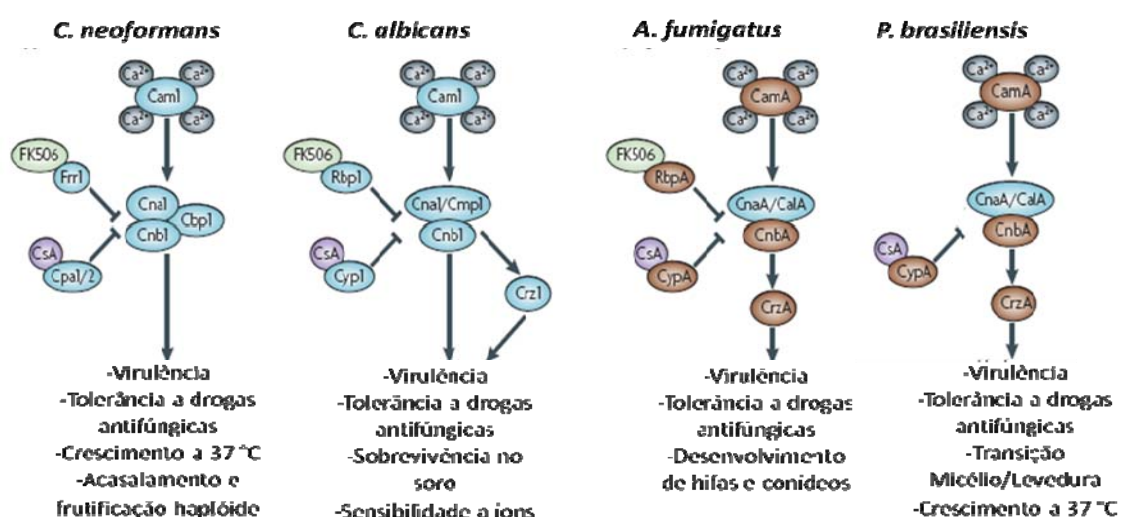


Figura 4 - O papel da via da calcineurina em *C. neoformans*, *C. albicans*, *A. fumigatus* e *P. brasiliensis*

Fonte: Adaptado de Steinbach *et al.* (2007a).

1.6 INIBIDORES DA CALCINEURINA

Muitas estratégias foram desenvolvidas para bloquear a atividade fosfatase da CaN em vários modelos de estudo. A utilização da ciclosporina A (CsA) e da tacrolimus (FK506) proporcionou um grande avanço no que diz respeito aos papéis funcionais da calcineurina nos vários sistemas em que ela está presente. Estas drogas foram as primeiras a serem utilizadas com a finalidade de bloquear a atividade biológica da CaN. Elas bloqueiam a CaN através da ligação a receptores endógenos conhecidos como imunofilinas e formando complexos que bloqueiam sua atividade fosfatase (FRIEDMAN; WEISSMAN, 1991; LIU et al., 1991).

De modo geral o complexo formado pela droga com as imunofilinas - CsA com a ciclofilina A (CyPA) e FK506 com a FK506-*binding protein* (FKBP) - liga-se à subunidade catalítica da calcineurina, inibindo sua atividade (Liu et al., 1991). Devido a esse mecanismo, as concentrações de imunofilinas (CyPA A ou FKBP) são determinantes para um bloqueio mais ou menos efetivo da CaN (WANG; HEITMAN, 2005; DERKX; MADRID, 2001).

A CsA é um polipeptídeo cíclico hidrofóbico composto de 11 aminoácidos, com fórmula $C_{62}H_{111}O_{12}$ e peso molecular 1.202,6 kDa (Figura 5). A CsA utilizada comercialmente é produzida a partir da cultura do fungo *Tolypocladium inflatum* (BOREL et al., 1976). Os efeitos biológicos da CsA no homem - imunossupressão e ausência de citotoxicidade - foram descobertos durante um programa de pesquisa no qual muitos cientistas da empresa Sandoz estavam envolvidos, dentre os quais, os Drs. J. Borel e H. Stahelin (HEUSLER; PLETSCHER, 2001). O isolamento de CsA a partir de culturas do fungo *Tolypocladium inflatum* e a subsequente elucidação de suas propriedades imunossupressoras por Borel e colaboradores (1976) teve grande impacto clínico.

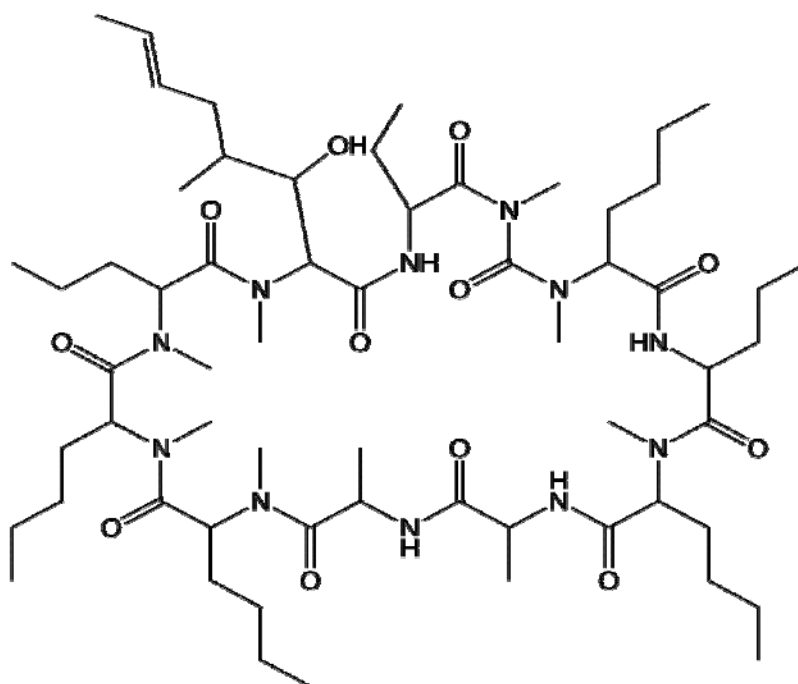


Figura 5 - Estrutura molecular da Ciclosporina A
 Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ciclosporin>

Sucintamente, pode-se dizer que a CsA bloqueia a ativação e replicação dos linfócitos T ao inibir reversivelmente a transcrição de linfocinas por meio de fatores citoplasmáticos de transcrição gênica; ou seja, o bloqueio da CaN e conseqüentemente do NFAT impede a célula se tornar ativa. O linfócito terá então seu ciclo celular bloqueado em G0 ou em G1, resultando em um bloqueio da resposta imune mediada pelos linfócitos T auxiliares e citotóxicos (Figura 3) (SCHREIBER; CRABTREE, 1992; HEMENWAY; HEITMAN, 1999).

O fato de a CsA agir predominantemente nos linfócitos CD4 (auxiliar) e CD8 (citotóxico), difere dos outros imunossuppressores convencionais pelo fato de ser seletiva e não apresentar influência significativa sobre as funções hematopoiética, fagocítica e neoplástica. Estudos *in vitro* afirmam que a droga possui um efeito mínimo ou nulo sobre linfócitos supressores - também um linfócito CD8 -, assim como sobre linfócitos B e plasmócitos, contudo a inibição das células de Langerhans e mastócitos já foi demonstrada (KAHAN, 1989; DUPUY et al., 1991; FRUMAN et al., 1992; FAIRLEY, 1990).

A FK506 age de maneira semelhante, apesar da diferença de estruturas químicas (FK-506 é um macrolídeo e a CsA peptídeo cíclico), e por esse

motivo as duas drogas são classificadas como inibidores da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T (HO et al., 1996).

Em humanos a CsA pode ser administrada na forma oral, intramuscular e intravenosa, sendo a primeira a forma mais comumente usada. Já em modelo animal, Wassef e colaboradores (1985) descreveram em ratos que a injeção pela via subcutânea -que não requer anestesia- é mais tolerada pelo animal e permite que a droga atinja níveis plasmáticos adequados e uniformes. As concentrações terapêuticas ideais de CsA ainda não estão bem determinadas. Segundo Towpic e colaboradores (1985), a dose tem que ser ajustada individualmente. Vários estudos experimentais relatam o uso de doses entre 5 e 25mg/Kg de peso corporal/dia.

O fato de a incidência e gravidade das micoses ter crescido a níveis alarmantes em todo o mundo, aliados ao surgimento de cada vez mais cepas resistentes aos tratamentos convencionais de micoses sistêmicas geram a necessidade da descoberta de novos alvos para intervenção terapêutica dessas doenças (ODOM et al., 1997b).

Atualmente, as drogas de escolha são os derivados imidazólicos e triazólicos (principalmente itraconazol, cetoconazol e fluconazol), já que as sulfonamidas e a anfotericina B tem baixa taxa de aderência ao tratamento pelos pacientes devido aos efeitos colaterais mais exacerbados (HAHN; HAMDAN, 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2002; 2006).

Os antifúngicos azólicos inibem as enzimas da via biossintética do ergosterol, alterando a permeabilidade da membrana celular do fungo. Apesar de essas drogas apresentarem uma ação terapêutica de efeito fungistático cessando a progressão da PCM, a seqüela fibrótica resultante persiste constituindo uma potencial fonte de fungo, a qual pode levar a reativação da doença após o término do tratamento.

Neste contexto, a busca de terapias alternativas e do desenvolvimento de drogas antifúngicas mais eficazes e específicas tem se tornado alvo de estudos de muitos pesquisadores. Algumas estratégias têm sido empregadas para desenvolver drogas antifúngicas, sendo que na era da genômica, tem ganhado força estratégias que usam ferramentas de bioinformática para conduzir à descoberta de novos alvos.

Diversos autores têm sugerido, que o efeito de inibidores da calcineurina sobre fungos causadores de micoses sistêmicas possui um provável potencial terapêutico, principalmente se combinados com drogas antifúngicas convencionais (STEINBACH et al., 2007a). A ação antifúngica da CsA, bem como a da FK506, está relacionada com o papel da calcineurina e sua relação com a virulência desses fungos.

Nos últimos anos, trabalhos vêm descrevendo a ação antifúngica dos inibidores da calcineurina contra patógenos humanos como *C. neoformans*, *C. albicans*, *A. fumigatus* e *P. brasiliensis* (Figura 4).

Em modelo murino de criptococose, a CsA é capaz de reduzir a carga fúngica em quase todos os tecidos, exceto o cérebro, onde a distribuição da droga pode estar comprometida (MODY et al., 1988; 1989).

Da mesma forma como a que acontece nos mutantes nulos para a calcineurina, estudos mostram o efeito tanto da CsA quanto da FK506 na capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de *C. neoformans* a 37°C; sem influenciar no crescimento a 24°C (ODOM et al., 1997a). Esse efeito antifúngico é dependente da complexação das CsA e FK506 com suas respectivas imunofilinas, inativando a calcineurina (CRUZ et al., 2000), por isso, comprovadamente nem todos os análogos da CsA e da FK506 são capazes de apresentarem esse efeito (ODOM et al., 1997b). Cepas geneticamente modificadas para ter deficiência em imunofilinas passam a não apresentar mais susceptibilidade a CsA e a FK506, ratificando o papel delas no bloqueio da calcineurina (DERKX; MADRID, 2001; CYERT, 2003).

Resultados semelhantes foram observados em *A. fumigatus*, onde estudos demonstraram um efeito antifúngico *in vitro* da CsA e FK506 sobre esse fungo (HIGH, 1994; BELL et al., 1999; STEINBACH et al., 2004; STEINBACH et al., 2007b).

Os estudos com *C. albicans* têm focado o efeito sinérgico do tratamento com antifúngicos convencionais, como o fluconazol, e os inibidores da calcineurina, mostrando que isso pode melhorar significativamente a eficácia da terapia antifúngica (ONYEWU et al., 2003; MARCHETTI et al., 2000a; 2000b).

O fluconazol, como mencionado, possui um efeito fungistático, ou seja, é capaz de inibir o crescimento do fungo, mas não de matar. A terapia combinada de fluconazol com os inibidores da calcineurina sugerem que essa

medicação passe de um efeito fungistático a um potente fungicida, uma vez que estudos comprovam o sinergismo entre as drogas e o aumento da eficácia do tratamento (STEINBACH et al., 2007a)

No início do processo de dimorfismo ocorre um aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} no *P. brasiliensis*, e conseqüente ativação da calcineurina. Um recente estudo mostrou que *in vitro*, a CsA, foi efetivamente capaz de deter a transformação da fase micelial para leveduriforme, além de diminuir o crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* (CAMPOS et al., 2008). Inesperadamente, a FK506 não apresentou o mesmo efeito, provavelmente devido a uma diferença na proporção CyPA/FKBP, que é descrita no *P. brasiliensis* como de 20:1 (NICOLA et al., 2005)

Alguns outros estudos têm evidenciado na prática clínica que pacientes transplantados que receberam inibidores da calcineurina são menos freqüentemente afetados por micoses sistêmicas (SINGH et al., 2003; IACONO et al., 2006).

Portanto, todos esses resultados sugerem um potencial terapêutico dos inibidores da calcineurina no tratamento de infecções fúngicas invasivas, principalmente se combinadas com antifúngicos convencionais. (STEINBACH et al., 2007a).

Baseados nos fatos até aqui mencionados, consideramos oportuno e relevante o estudo dos efeitos da Ciclosporina A sobre a patogenicidade do *P. brasiliensis* em modelo de infecção experimental murina, bem como também o efeito desse tratamento sobre a resposta imune do hospedeiro.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da Ciclosporina A (CsA) sobre imunopatologia e a imunidade específica de camundongos experimentalmente infectados com *P. brasiliensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a carga fúngica de *P. brasiliensis* nos pulmões dos camundongos infectados (CFU);
- b) Determinar os níveis de gp43 solúveis no soro dos camundongos;
- c) Avaliar o perfil histopatológico do pulmão, fígado, baço e cérebro dos camundongos;
- d) Analisar a resposta imune celular por teste de hipersensibilidade tardia;
- e) Analisar a resposta proliferativa de linfócitos do baço estimulados com antígeno do *P. brasiliensis*;
- f) Avaliar os níveis das citocinas IL-4, IL-10, INF- γ e TNF- α no soro dos camundongos;
- g) Determinar níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2a específicos para o antígeno de *P. brasiliensis*

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, K. et al. Role of tumor necrosis factor and gamma interferon in acquired resistance to *Cryptococcus neoformans* in the central nervous system of mice. *Infect Immun.*, v.63, p.1725-1731, 1995.
- ALLENDOERFER, R.; DEEPE JR., G. S. Intrapulmonary response to *Histoplasma capsulatum* in gamma interferon knockout mice. *Infect. Immun.*, v.65, p.2564-2569, 1997.
- AMARAL, A. C. et al. Therapeutic targets in *Paracoccidioides brasiliensis*: post-transcriptome perspectives. *Genet Mol Res.*, v.4, n.2, p.430-49, 2005.
- AMARAL, C. C. et al. Adjuvant Effect of Synthetic Oligodeoxyribonucleotides (CpG-ODN) from the *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene on the Th2–Th1 Immunomodulation of Experimental Paracoccidioidomycosis. *Scand J Immun.*, v.62, p.325–333, 2005.
- ARAMBURU, J.; HEITMAN, J.; CRABTREE, G. R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep.*, v.5, n.4, p.343-8, 2004.
- ARRUDA, C. et al. Dual role of Interleukin-4 (IL-4) in Pulmonary Paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induce Protection or Exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. *Infect Immun.*, v.72, p.3932-3940, 2004.
- BADER, T. et al. Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, v.71, p.5344–5354, 2003.
- BADER, T. et al. Role of calcineurin in stress resistance, morphogenesis, and virulence of a *Candida albicans* wild-type strain. *Infect. Immun.*, v.74, p.4366–4369, 2006.
- BAKSH, S.; BURAKOFF, S. J. The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin Immunol.* v.12, n.4, p.405-15, 2000.
- BEAMAN, L. Effects of recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor on in vitro interactions of human mononuclear phagocytes with *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.*, v.59, p.4227-4239, 1991.

BELL, N. P. et al. Effects of methylprednisolone and cyclosporine A on fungal growth *in vitro*. *Cornea*, v.18, p.306–313, 1999.

BENARD, G. et al. Responses of T and B lymphocytes to a *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall extract in healthy sensitized and nonsensitized subjects. *Am J Trop Med Hyg.*, v.53, n.2, p.189-94, 1995.

BERNARD, G.; HONG, M. A.; DEL NEGRO, G. M. B. Antigen specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am. J. Med. Hyg.*, v.54, n.1, p.7-12, 1996.

BERNARD G. et al. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, v.13, p.248–252, 2001.

BLANKENSHIP, J. R. et al. Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryot. Cell.*, v.2, p.422–430, 2003.

BLANKENSHIP, J. R.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for *Candida albicans* to survive calcium stress in serum. *Infect. Immun.*, v.73, p.5767–5774, 2005.

BOREL, J. F.; FEURER, C.; GUBLER, H. V. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Action.*, v.6, p.468-75, 1976.

BOTTEON, F. A. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Med Mycol.*, v.40, n.4, p.387-91, 2002.

BOZZA, S. et al. Dendritic cells transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus. *J. Immunol.*, v.168, p.1362-1371, 2002.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microb*, v.6, p.89–117, 1993.

CACERE, C. R. et al. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol.*, v.105, n.2, p.215-222, 2002.

CALICH, V. L. G. et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol*, v.66, n.5, p.585-594, 1985.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Br J Med Biol Res*, v.31, p.615-623, 1998.

CAMPOS, C. B. et al. Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell*, v.7, n.10, p.1856-64, 2008.

CANO, L. E. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun.*, v.63, n.5, p.1777-1783, May. 1995.

CANO, L. E. et al. Protective role of γ -interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.*, v.66, p.800–806, 1998.

CANO, L. E. et al. Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infection and Immunity*, v.68, n.1, p.352-9, 2000.

CLIPSTONE, N. A.; CRABTREE, G. R. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, v.357, p.695–697, 1992.

COPE, A. P. Studies of T-cell activation in chronic inflammation. *Arthritis Res.*; v.4, Supl. 3, p.S197-211, 2002.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*, v.18, n.5, p.1441-54, 2002.

CRUZ, M. C. et al. Immunosuppressive and nonimmunosuppressive cyclosporine analogs are toxic to the opportunistic fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* via cyclophilin-dependent inhibition of calcineurin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.143–149, 2000.

CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.*, v.20, p.1020–1032, 2001.

CYERT, M. S. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.311, p.1143–1150, 2003.

D'OSTIANI, C. F. et al. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.*, v.191, p.1661-1674, 2000.

DE BRITO, T.; FRANCO, M. F. Granulomatous inflammation. *Rev. Inst. Med. Trop., Sao Paulo*, v.36, p.185-192, 1994.

DE CARVALHO, M. J. A. et al. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.*, v.39, p.204–210, 2003.

DERKX, P. M.; MADRID, S. M. The *Aspergillus niger* cypA gene encodes a cyclophilin that mediates sensitivity to the immunosuppressant cyclosporin A. *Mol Genet Genomics.*, v.266, n.4, p.527-36, 2001.

DIXON, D. M. et al. Development of vaccines and their use in the prevention of fungal infections. *Med Mycol.*, v.1, p.57-67, 1998.

DUPUY, P. et al. Cyclosporin A inhibits the antigen-presenting functions of freshly isolated human Langerhans cells in vitro. *J Invest Dermatol.*, v.96, n.4, p.408-13, 1991.

FAIRLEY, J. A. Intracellular targets of cyclosporine. *J Am Acad Dermatol.*, v.23 (6 Pt 2), p.1329-32; discussion 1332-4, 1990.

FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev. Infect. Dis. Suppl.*, v.2, p.S274-276, 1988.

FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity—a personal recollection 15 years later. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.2, p.67-72, 2004.

FELIPE, M. S. et al. PbGenome Network. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. *J. Biol. Chem.*, v.280, p.24706-24714, 2005.

FELIPE, M. S. et al. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast.*, v.20, p.263-271, 2003.

FERNANDES, L. et al. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*-inferred from comparisons with other fungi. *Genet Mol Res.*, v.4, n.2, p.216-31, 2005.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. *Scand. J. Immunol.*, v.58, p.290-297, 2003

FERREIRA, M. E. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal Genet. Biol.*, v.44, p.219-230, 2007.

FOX, D. S. et al. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.*, v.39, p.835-849, 2001.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis, a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.20, p.129-132, 1987.

FRANCO, M. et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.*, v.5, p.115- 149, 1993.

FRANCO, M. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* antigen batches from the same isolate show immunological and biochemical differences. *Mycopathologia*, v.135, n.1, p.13-9, 1996.

FRIEDMAN, J.; WEISSMAN, I. Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell*, v.66, p.799-806, 1991.

FRUMAN, D. A. et al. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.89, n.9, p.3686-90, 1992.

GOLDMAN, G. H. et al. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukar. Cell.*, v.2, p.34–48, 2003.

GOW, N.; BROWN, A.A.J.; ODDS, F.C. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.5, p.366-371, 2002.

HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycoses.*, v.43, v.11-12, p.403-7, 2000.

HEMENWAY, C. S.; HEITMAN, J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem. Biophys.*, v.30, p.115–151, 1999.

HEMENWAY, C. S.; HEITMAN, J. Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem Biophys.*, v.30, n.1, p.115-51, 1999.

HEUSLER, K.; PLETSCHER, A. The controversial early history of cyclosporin. *Swiss Med Wkly.*, v.131, n.21-22, p.299-302, 2001.

HIGH, K. P. The antimicrobial activities of cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Transplantation*, v.57, p.1689–1700, 1994.

HO, S. et al. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin Immunol Immunopathol.*, v.80, n.3 Pt 2, p.S40-5, 1996.

HUFFNAGLE, G. B.; DEEPE, G. S. Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, p.6, p.344-350, 2003.

IACONO, A. T. et al. A randomized trial of inhaled cyclosporine in lung-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.*, v.354, p.141–150, 2006.

KAHAN, B. D. Cyclosporine. *N Engl J Med.*, v.321, n.25, p.1725-38, 1989.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res*, v.20, p.89-97, 2000.

KAWAKAMI, K. et al. Contribution of interferon-gamma in protecting mice during pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v.13, p.123-130, 1996.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.*, v.8, p.223-246, 2003.

KRAUS, P. R. et al. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol. Microbiol.*, v.48, p.1377–1387, 2003.

KRAUS, P.R.; HEITMAN, J. Coping with stress: calmodulin and calcineurin in model and pathogenic fungi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.311, p.1151-1157, 2003.

KUCHROO, V. K. et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules active differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. v.80, p.707–718, 1995.

KURITA, N. et al. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*, v.37, p.19-24, 1999.

KWON-CHUNG, K. Gene disruption to evaluate the role of fungal candidate virulence genes. *Curr. Opin, Microbiol.*, v.1, p.381-389, 1998.

LACAZ, C. L. *Paracoccidioides brasiliensis* Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during saprophytic life; Biology, Virulence, Taxonomy. In: FRANCO, M. et al. (ed.) *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.109-120.

LAVIGNE, L. M. et al. The role of recombinant murine IL-12 and IFN-gamma in the pathogenesis of a murine systemic *Candida albicans* infection. *J. Immunol.*, v.160, p.284-292, 1998.

LILIC D. New perspectives on the immunology of chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.15, p.143-147, 2002.

LIU, J. et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, v.66, p.807–815, 1991.

LIU, M. et al. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. *Eukaryot. Cell*, v.5, p.1788–1796, 2006.

LORENZ, M. C. Genomic approaches to fungal pathogenicity. *Curr. Opinion Microbiology*, v.5, p.372–378, 2002.

MAGEE, P. T. et al. Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. *Infect. Immun.*, v.71, p.2299-2309, 2003.

MALDONADO-LOPEZ, R.; MOSER, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin. Immunol.*, v.13, p.275-282, 2001.

MAMONI, R. L. et al. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.*, v.65, n.3, p.237-41, 2001.

MAMONI, R. L. et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.*, v.40, n.2, p.153-9, 2002.

MANNS, B. J.; BAYLIS, B. W.; URBANSKI, S. J.; GIBB, A. P.; RABIN, H. R. Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin Infect Dis.* v.23, n.5, p.1026-32, 1996.

MARCHETTI, O. et al. Fluconazole plus cyclosporine: a fungicidal combination effective against experimental endocarditis due to *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.2932–2938, 2000a.

MARCHETTI, O. et al. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.2373–2381, 2000b.

MCEWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.*, v.26, p.305-306, 1995.

MEDOFF, G. et al. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. *Science.*, v.231, p.476-479, 1986.

MODY, C. H.; TOEWS, G. B.; LIPSCOMB, M. F. Cyclosporin A inhibits the growth of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *Infect. Immun.*, v.56, p.7–12, 1988.

MODY, C. H.; TOEWS, G. B.; LIPSCOMB, M. F. Treatment of murine cryptococcosis with cyclosporin-A in normal and athymic mice. *Am. Rev. Resp. Dis.*, v.139, p.8–13, 1989.

MONTENEGRO, M. R. Clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.*, v.28, n.3, p.203-4, 1986.

MOTA, N. G. et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, v.79, n.6, p.765-72, 1985.

MURPHY, J. W. et al. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. *Med Mycol.*, v.36, Suppl 1, p.109-18, 1998.

MURRAY, H. W. Gamma interferon, cytokine-induced macrophage activation, and antimicrobial host defense. *In vitro*, in animal models, and in humans. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.13, p.411-421, 1990.

MURRAY, H. W. Interferon-gamma and host antimicrobial defense: current and future clinical applications. *Am. J. Med.*, v.97, p.459-467, 1994.

NICOLA, A. M.; ANDRADE, R. V.; SILVA-PEREIRA, I. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol. Res.*, v.4, p.346–357, 2005.

NUNES, L. R. et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot. Cell*, v.4, p.2115–2128, 2005.

ODDS, F. C.; GOW, N. A.; BROWN, A. J. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.*, v.2, REVIEWS1009, 2001.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.*, v.16, p.2576–2589, 1997a.

ODOM, A. et al. The immunosuppressant FK506 and its nonimmunosuppressive analog L-685, 818 are toxic to *Cryptococcus neoformans* by inhibition of a common target protein. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.41, p.156–161, 1997b.

ONYEWU, C. et al. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.47, p.956–964, 2003.

PEITER, E. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Ca²⁺ channel Cch1p/Mid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Lett.*, v.579, p.5697–5703, 2005.

PINA, A. et al. Absence of Interleukin-4 determines less severe pulmonary Paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. *Infect Immun*, v.72, p.2369-2378, 2004.

PINTO, J.G. et al. Cytokine production in lungs and adrenal glands of high and low antibody producing mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*, v.44, p.505-514, 2006.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.60, p.281-303, 2006.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* a puzzle still unsolved. *Saboraudia*, v.23, n.5, p.323-334, 1985.

RESTREPO, A.; McEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.*, v.39, n.3, p.233-241, 2001.

RHODES, J. C. Virulence factors in fungal pathogens. *Microbiol Sci.*, v.5, n.8, p.252-4, 1988.

ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol.*, v.9, p.484-490, 1997.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, v.4, p.1-23, 2004.

ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.*, v.4, p.127-137, 2002.

SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: FRANCO, M. et al. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRS Press, 1994. Chapter 4, p.49-66.

SAN-BLAS, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall glucans, pathogenicity, and dimorphism. *Curr Top Med Mycol.*, v.1, p.235-57, 1985.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORILLO, A. M.; Paracoccidioidomicose - blastomicose sul-americana.. São Paulo: Sarvier-EDUSP, 1982. p.5-58.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: CHILAR, R. L.; CALDERONE, R. A. (Ed.). *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications*. New York: Marcel Dekker, 2001. p.205-226.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.*, v.31, n.2, p.99-113, 1993.

SAN-BLAS, G., NIÑO-VEGA, G., ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.*, v.40, n.3, p.225-42, 2002.

SANGLARD, D. et al. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol. Microbiol.*, v.48, p.959–976, 2003.

SCHREIBER, S. L.; CRABTREE, G. R. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today.*, v.13, n.4, p.136-42, 1992.

SHIBASAKI, F.; HALLIN, U.; UCHINO, H. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J Biochem.*, v.131, n.1, p.1-15, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Randomized trial with itraconazole, ketoconazole and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.*, v.40, n.4, p.411-7, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.39, n.3, p.297-310, 2006.

SINGER-VERMES, L. M. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin. Exp. Immunol.*, v.94, n.1, p.75-79, 1993.

SINGH, N. et al. Trends in risk profiles for and mortality associated with invasive aspergillosis among liver transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.*, v.36, p.46–52, 2003.

SOUTO, J. T. et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol*, v.156, p.1811–1820, 2000.

SOUTO, J. T. et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol.*, v.163, n.2, p.583-590, 2003.

STEINBACH, W. J. et al. *In vitro* interactions between antifungals and immunosuppressants against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.48, p.1664–1669, 2004.

STEINBACH, W. J. et al. Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot. Cell*, v.5, p.1091–1103, 2006.

STEINBACH, W. J. et al. Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.5, p.418–430, 2007a.

STEINBACH, W. J. et al. Calcineurin inhibition or mutation enhances cell wall inhibitors against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.51, p.2979–2981, 2007b.

STIE, J.; FOX, D. Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryot. Cell.*, v.7, p.177–186, 2008.

TAVARES, A. H. et al. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol. Res.*, v.4, p.372-389, 2005.

TOWPIK, E. et al. Cyclosporine and experimental skin allografts. Indefinite survival and development of specific immunologic unresponsiveness. *Transplantation.*, v.40, n.6, p.714-8, 1985.

VILADEVALL, L. et al. Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, v.15; p. 43614-43624, 2004.

WANG, P.; HEITMAN, J. The cyclophilins. *Genome Biol.*, v.6, p.226, 2005.

WANKE, B.; LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidiomycosis infection. In: FRANCO, M. et al. (Ed.). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRS Press, 1994. p.109-120.

WASSEF, R.; COHEN, Z.; LANGER, B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. *Transplantation.*, v.40, n.5, p.489-93, 1985.

XIANG, B. Q. et al. The role of loop 7 in mediating calcineurin regulation. *Protein Eng.*, v.16, n.11, p.795-8, 2003.

1 ARTIGO A: EFEITO PROTETOR DA CICLOSPORINA A EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM *Paracoccidioides brasiliensis*

Resumo

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico causador da paracoccidioidomicose (PCM), uma das mais prevalentes micoses sistêmicas da América Latina. A Ciclosporina A (CsA), um inibidor farmacológico da calcineurina, tem sido descrita como uma droga com potencial antifúngico em modelos *in vitro* com fungos dimórficos. O Objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito protetor da CsA na PCM experimental em camundongos. Os resultados demonstraram que a CsA possui um efeito protetor no modelo de PCM experimental, uma vez que animais infectados ($Pb18, 1 \times 10^6$ leveduras, i.v.) e tratados tem uma redução significativa na antigenemia (ELISA) e na carga fúngica nos órgãos (CFU e histopatológico) quando comparados com os camundongos Balb/c apenas infectados. Concordando com os dados da literatura a droga CsA induz diminuição da resposta imune celular (resposta linfoproliferativa, DTH) e humoral específicas (IgG total, IgG2a, IgG2b por ELISA) bem como nos níveis de citocinas INF- γ , TNF- α e IL-4. Concluímos pelo trabalho que embora a CsA induza depressão da resposta imune específica do hospedeiro, a mesma induz proteção na PCM experimental em camundongos e portanto apresenta um efeito protetor.

Palavras-chave: Imunossupressão. Paracoccidioidomicose. Calcineurina. Ciclosporina A. Citocinas. Resposta linfoproliferativa. DTH.

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungus that causes paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis prevalent in Latin America. The calcineurin inhibitor cyclosporine A (CsA) has been described as a potential antifungal drug in models with dimorphic fungi *in vitro*. Therefore, the aim of this work was to evaluate the protector effect of CsA in experimental murine PCM. The protective effect of CsA was demonstrated by lower levels in antigenemia (ELISA) and the fungal load in organs (CFU and Histopathology) of infected (PB18, 1×10^6 yeast, iv) and treated (30 days, 10mg/kg) animals when compared with the infected ones alone. In agreement with previously findings, CsA induced decrease in cellular immune response (lymphocyte proliferation, DTH) and specific humoral (IgG, IgG2a, IgG2b by ELISA) as well as plasma levels of cytokines INF- γ , TNF- α and IL-4. We conclude that although the CsA induces depression of host specific immune response, it provides protection against experimental PCM in mice and therefore has a protector effect

Keywords: Immunosuppression. Paracoccidioidomycosis. Calcineurin. Cyclosporin A. Cytokines. lymphoproliferative response. DTH.

1.1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença de natureza granulomatosa sistêmica e evolução predominantemente crônica que tem como agente etiológico o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Considerada uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina (SAN-BLAS, 1993; LACAZ, 1994).

A PCM é na maioria dos casos assintomática, podendo levar à doença cerca de 2% dos indivíduos infectados (MCEWEN et al, 1995). Clinicamente podem apresentar duas formas da doença: a forma aguda ou subaguda (ou forma juvenil) e forma crônica (tipo adulto) (FRANCO et al., 1987).

O processo de transição dimórfica do *P. brasiliensis*, *in vitro*, é dependente da mudança de temperatura; sugerindo que de alguma forma o fungo percebe e responde, via sinalização celular, a esse sinal. À temperatura ambiente (25°C), *P. brasiliensis* se apresenta na forma de micélio, diferenciando-se para a forma de levedura, quando submetido à temperatura de 37°C (*in vitro*) ou a partir da invasão de tecidos do hospedeiro (SAN-BLAS; SAN-BLAS, 1982; BRUMMER et al, 1993).

Acredita-se que a infecção por *P. brasiliensis* ocorra através da inalação de microconídios da forma micelial presentes no ambiente; que inalados atingiriam os pulmões, onde sofreriam a transição para a forma de levedura (forma patogênica). Tal como acontece com os outros fungos dimórficos patogênicos, o processo de transição da forma micelial para leveduriforme é considerado fundamental para o estabelecimento da infecção, uma vez que cepas que não possuem essa habilidade são avirulentas em modelos experimentais (MEDOFF, 1986; FRANCO, 1987; FRANCO, 1993; GOW, et al., 2002; ROONEY; KLEIN, 2002). Além da habilidade de transitar entre as formas micelial e leveduriforme, esses microorganismos realizam inúmeras mudanças em sua maquinaria celular para tornar viável a sobrevivência e multiplicação de suas células no interior do hospedeiro.

Atualmente, alguns protocolos de terapia antifúngica para a PCM são utilizados, variando de acordo com a forma e gravidade da doença e idade do paciente. Os protocolos validados e apresentados no Consenso Brasileiro em PCM

indicam o itraconazol para formas leves e moderadas e anfotericina B para formas graves. Contudo efeitos colaterais e o longo tempo de tratamento fazem com que muitas vezes o paciente abandone-o antes de estar totalmente curado (HAHN; HAMDAN, 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2002; 2006). Assim, busca de terapias alternativas e do desenvolvimento de drogas antifúngicas mais eficazes e específicas ou a combinação de drogas poderiam encurtar o tempo de tratamento.

Nesse contexto, vários trabalhos têm mostrado resultados promissores da intervenção na via da calcineurina (CaN) para o tratamento de infecções fúngica invasivas.

A CaN é a única enzima serina/treonina fosfatase com ativação dependente do complexo Ca^{2+} /Calmodulina (CaM). Extremamente conservada em eucariotos, a CaN um heterodímero que apresenta uma subunidade catalítica (CaNA) que tem cerca de 58-64 kDa e uma subunidade regulatória (CaNB) que possui 19 kDa. (SHIBASAKI et al., 2002; XIANG et al., 2003).

De maneira geral a CaN desempenha um papel crucial nas células eucarióticas; tendo importante participação desde regulação da homeostase da leveduras sob condições de estresses até a ativação de linfócitos nos humanos, entre outras funções (CLIPSTONE; CRABTREE, 1992; ARAMBURU et al., 2004). Apesar do papel da CaN estar bem estabelecido na resposta imunitária, recentes trabalhos têm apontado um importante envolvimento dela na promoção da virulência de fungos patogênicos para o homem (STEINBACH et al., 2007a).

A ativação da via do Ca^{2+} /CaM/CaN é descrita em fungos como indutora de um controle adequado dos parâmetros bioquímicos, genéticos e de alterações morfológicas, regulando funções que incluem crescimento, germinação e extensão de hifas, desenvolvimento, sobrevivência e crescimento sob condições normais e principalmente sob condições estressantes (KRAUS et al., 2003; STIE; FOX, 2008). Quando a célula fúngica se encontra obrigada a sobreviver sob condições de desfavoráveis de temperatura (ODOM et al., 1997; PEITER et al., 2005), pH (BLANKENSHIP et al., 2003), íons (LIU, et al., 2006) ou na presença de antifúngicos (ONYEWU et al., 2003) ocorre um aumento dos níveis intracelulares de cálcio, que por sua vez liga-se a CaM, ativando a CaN (FERNANDES et al., 2005). Uma vez ativada a CaN ativa o fator transcricional Crz1/Tcn1 - homólogo ao fator de transcrição NFAT de mamífero - que ao entrar no núcleo ativa um conjunto de genes

envolvidos com a sobrevivência da célula e a homeostase do cálcio. (CYERT, 2003; VILADEVALL et al., 2004).

Em *C. neoformans*, a CaN é exigida para crescimento a elevada temperatura, crescimento de hifas e para a virulência, uma vez que mutantes nulos para a CaN são não patogênicos quando analisados por infecção em modelo experimental de criptococose (ODOM et al., 1997; FOX et al., 2001; CRUZ et al., 2001).

De forma semelhante, a CaN apresenta um papel fundamental no desenvolvimento celular, morfologia e virulência de *A. fumigatus*, já que a infecção com esses mutantes em modelo animal leva a uma significativa diminuição na patogenicidade quando comparado com a cepa selvagem, como acontece no modelo de criptococose (STEINBACH et al., 2006; FERREIRA et al., 2007)

Em *C. albicans* a CaN não é necessária para o crescimento a 37°C, contudo trabalhos mostraram que ela é exigida em diversas condições de estresse, já que cepas mutantes para a CaN têm a virulência atenuada em modelo murino de candidíase sistêmica (BADER et al., 2003; SANGLARD et al., 2003; BADER et al., 2006), principalmente devido à dificuldade de o fungo crescer na presença de soro (BLANKENSHIP et al., 2003; BLANKENSHIP; HEITMAN, 2005).

Com relação a estudos com o *P. brasiliensis*, resultados de análises de *microarray* feitas durante a transição da fase micelial para leveduriforme mostraram que ocorreu uma alta expressão da subunidade B da CaN nessa condição (NUNES et al., 2005).

Duas conhecidas drogas imunossupressoras, ciclosporina A (CsA) e tacrolimus (FK506), são descritas como inibidores da atividade da calcineurina. De modo geral o complexo formado pela droga com as imunofilinas - CsA com a ciclofilina A (CyPA) e FK506 com a FK506-*binding protein* (FKBP) - liga-se à subunidade catalítica da calcineurina, inibindo sua atividade (LIU et al., 1991; DERKX; MADRID, 2001). Devido a esse mecanismo, as concentrações de imunofilinas (CyPA A ou FKBP) são determinantes para um bloqueio mais ou menos efetivo da CaN (WANG; HEITMAN, 2005.).

Em modelo murino de criptococose, a CsA é capaz de reduzir a carga fúngica em quase todos os tecidos, exceto o cérebro, onde a distribuição da droga pode estar comprometida (MODY et al., 1988; 1989). Da mesma forma como

a que acontece nos mutantes nulos para a calcineurina, estudos mostram o efeito tanto da CsA quanto da FK506 inibição do crescimento *in vitro* de *C. neoformans* a 37°C, sem influenciar no crescimento a 24°C (ODOM et al., 1997). Resultados semelhantes foram observados em *A. fumigatus*, onde estudos também demonstraram um efeito antifúngico da CsA e FK506 (HIGH, 1994; BELL et al., 1999; STEINBACH et al., 2004; STEINBACH et al., 2007b).

Os estudos com *C. albicans* têm focado no efeito sinérgico do tratamento com antifúngicos convencionais, como o fluconazol, e os inibidores da calcineurina, mostrando que isso pode melhorar significativamente a eficácia da terapia antifúngica (ONYEWU et al., 2003; MARCHETTI et al., 2000a; 2000b), sugerindo que esse sinergismo leve o tratamento de efeito fungistático a um potente fungicida (STEINBACH et al., 2007a).

No *P. brasiliensis* foi demonstrado um aumento dos níveis de Ca^{2+} no início do processo de dimorfismo e um importante papel da CaM nesse processo, uma vez que o seu bloqueio farmacológico impede a transição (DE CARVALHO et al., 2006). *In vitro*, a CsA, também é capaz de deter a transformação de micélio para levedura, bem como de diminuir o crescimento de leveduras de *P. brasiliensis* (CAMPOS et al., 2008). A FK506 não apresentou o mesmo efeito, provavelmente devido a uma diferença na proporção CyPA/FKBP, que é descrita no *P. brasiliensis* como de 20:1 (NICOLA et al., 2005).

Todos esses resultados sugerem um potencial terapêutico dos inibidores da calcineurina no tratamento de infecções fúngicas invasivas, principalmente se combinados com antifúngicos convencionais. Esse trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da Ciclosporina A sobre a patogenicidade do *P. brasiliensis* em modelo de infecção experimental murina, bem como também o efeito desse tratamento sobre a resposta imune do hospedeiro.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/c, com idade entre seis a oito semanas (25 a 30g), alojados no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina-UEL. Os animais foram mantidos separadamente em gaiolas com tamanho aproximado de 40 cm² (máximo 5 animais por gaiolas), em salas isoladas, ambiente climatizado com alimentação e água a vontade e iluminação controlada.

O presente estudo contou com a aprovação do comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Estadual de Londrina, registrado no CEEA sob o nº 67/08.

1.2.2 Manutenção do Fungo *P. Brasiliensis*

O fungo *P. brasiliensis* da cepa de referência 18 (Pb18), foi mantido a 35°C, cultivado em ágar sabouraud 4% (Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, Michigan) e repicado a cada cinco dias.

1.2.3 Protocolo Experimental

Os camundongos Balb/c foram divididos em quatro grupos contendo 6 camundongos por grupo: 1-Control: Não Tratado e Não Infectado; 2-CsA: Tratado com CsA e Não Infectado; 3-Pb: Não Tratado e Infectado; 4-Pb/CsA: Tratado com CsA e Infectado.

1.2.3.1 Infecção dos animais

Culturas de Pb 18 com 5 dias de crescimento, foram coletadas em solução salina estéril, filtrada em gaze e algodão. Os animais foram infectados pela via endovenosa com 100µL contendo 1×10^6 leveduras viáveis de Pb18. Os animais não infectados receberam apenas PBS.

1.2.3.2 Tratamento dos animais

Os animais grupos “Tratados” receberam 100µl de Ciclosporina A na dose de 10mg/kg (SANDIMMUN[®], 50mg/ml, Novartis Farma - Produtos Farmacêuticos, S.A.) pela via subcutânea (sc) em dias alternados por todo o período do experimento. Já os “Não Tratados” receberam apenas 100µl de PBS.

Após 30 dias de infecção os camundongos foram eutanasiados e o sangue e os órgãos (pulmão, fígado e baço) devidamente coletados e armazenados para as análises: do nível de antígenos solúveis no soro (antigenemia), do nível de anticorpos específicos (classes e subclasses), da proliferação de linfócitos, do perfil de citocinas no soro, das unidades formadoras de colônia (CFU), além da análise histopatológica.

1.2.4 Obtenção de Exoantígeno de *P. Brasiliensis*

Amostras de exoantígeno foram obtidas de acordo com Camargo *et al*, 1988. *P. brasiliensis* B-339 foi cultivado em meio TOM por 7 dias, sob agitação a 37°C, após inativação do cultivo com timerosal, o sobrenadante foi filtrado, dialisado contra água destilada e liofilizado. A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), aliquotadas e armazenadas em freezer a -80°C.

1.2.5 Purificação de gp43

Amostras de CFA foram submetidas à cromatografia em coluna Affigel-10 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) contendo IgG monoclonal anti-gp43, gentilmente cedido pelo Dr. Zoilo Pires Camargo (Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil). A gp43 foi eluída com glicina-HCl (0,1mol/l), pH 2,8 e imediatamente neutralizada com tris (2mol/l) pH 8,6. Frações de 1 ml foram coletadas e avaliadas em espectrofotômetro à 280nm. As frações com alta absorvância foram misturadas, dializadas contra água destilada, liofilizadas e analisadas quanto à concentração de proteínas pelo método de Lowry. A gp43 foi então utilizada para análise da imunidade humoral específica e como padrão para a análise de antígeno solúvel no soro.

1.2.6 ELISA de Inibição para Detecção de gp43 Solúveis no Soro

O ensaio de ELISA de inibição para detecção de gp43 solúvel foi realizado como descrito por Marques Da Silva e colaboradores (2003). Inicialmente uma curva padrão de inibição foi construída adicionando-se diferentes (de 1ng até 30µg/ml) concentrações de gp43 à 100µl de soro de camundongos normais (pool) em 100 µl de uma concentração padronizada de anticorpo monoclonal(MAb) anti-gp43 (10 µg/ml). Simultaneamente, amostras de soro dos grupos “Infectados” - Pb/Csa e Pb – também foram incubadas com 100µl do MAb anti-gp43 na mesma concentração.

Imunoplaquetas (Corning Costar Co., Corning, USA) foram sensibilizadas com 100 µL/orifícios de gp43 (500ng/ml) em tampão carbonato (pH9,6) por 18hrs a 4°C. Após o bloqueio e lavagens, 100µL da curva de inibição, amostras e controles foram adicionados a placa e incubadas por 2hrs a 37 °C. Depois de novas lavagens, 100 µL/orifícios de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Sigma Co., USA, A2984) foram adicionado a placa que foi incubada por mais 1h a 37 °C. Após nova lavagem, a reação foi revelada pela adição do substrato contendo tampão citrato, cromógeno OPD (Abbot Laboratories, Abbot

Park, IL, USA) e água oxigenada. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico (Merck) 4N e a leitura feita em leitor de ELISA Multiskan EX (Labsystems, Helsinki, Finland) à 492nm. As concentrações de gp43 no soro dos animais foram calculadas com base na curva padrão de concentrações conhecidas de gp43.

1.2.7 Unidades Formadoras de Colônia-CFU

Após terem sido sacrificados, o pulmão direito de cada camundongo foi retirado, macerado e homogeneizado em PBS estéril (0,2g de órgão/mL). Em seguida, 100µl do homogenato foram submetidos à determinação do CFU, sendo que cada amostra foi distribuída em placas de Petri com meio de isolamento para *P. brasiliensis* (BHI-ágar enriquecido com 4% de soro bovino fetal, 5% do filtrado de cultura de Pb-339). As placas foram incubadas em estufa de 35°C por 15 dias. Ao término do período de incubação, o número de unidades formadoras de colônia (CFU) de *P. brasiliensis* foi contado visualmente.

1.2.8 Histopatologia

Para avaliação histopatológica, o pulmão esquerdo, parte do fígado, baço e cérebro, foram removidos dos animais dos diferentes grupos e fixados em solução de formalina tamponada (0,05M NaH₂PO₄, 0,05M Na₂HPO₄, água destilada e 10% de formol 37%, pH 7.0). Após fixação por 24 horas foram submetidos a procedimentos rotineiros para inclusão em parafina e cortes de 5µm de espessura (semi-seriados), que foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para as análises estruturais e de resposta inflamatória. Algumas secções de 5µm, fixadas em lâminas de microscopia foram coradas também pela técnica de Grocott (methenamina) para evidenciação das células fúngicas no tecido. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas a 40X, 100X e 400X de aumento.

1.2.9 Proliferação de Linfócitos

Após 30 dias de infecção, os camundongos foram sacrificados, e os baços retirados assepticamente e macerados. As células dos baços foram ressuspensas em uma solução hemolítica (tris[hidroximetil aminometano]-tris-base 0,206%; cloreto de amônio 0,77%). Após esse procedimento as células foram centrifugadas e lavadas com PBS, e ressuspensas em meio RPMI (Sigma Co., USA) completo e ajustadas a concentração de 1×10^6 células/ml. Em seguida, 100 μ L de suspensão celular/orifício foram cultivadas por 116 horas a 37C e 5% CO₂ com 100 μ L de Exoantígeno (50 μ g/ml), antígeno de *P. brasiliensis* ou apenas 100 μ L de meio de cultura. A proliferação foi avaliada pelo metabolismo de enzimas mitocondriais segundo o Método do MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Mosmann, 1983). Após o período de cultivo, as placas contendo as células foram centrifugadas e adicionada a solução de MTT (Sigma, M2128) -5mg/ml em PBS- diluído em meio RPMI com soro fetal bovino na concentração final de 500 μ g/ml e incubado por mais 4hrs a 37C e 5% CO₂. Após nova centrifugação foram adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido - DMSO - (Amresco, Ohio) por orifício e a leitura a 550nm realizada em Multiskan EX (Labsystems, Helsinki, Finland).

1.2.10 Reação de Hipersensibilidade Cutânea (DTH)

Para determinar a DTH, 24hrs antes de serem sacrificados, os camundongos receberam uma inoculação subcutânea com 50 μ L de Exoantígeno (Pavanelli *et al.*, 2007) (10 μ g/mL) no coxim da pata traseira esquerda e PBS estéril na pata direita (controle). A espessura das patas foi avaliada utilizando paquímetro (Mitotoyo, draper 0-25mm Micrometer, Tokyo, Japan) e a média de edema expressa em mm - foi calculada subtraindo o resultado das medidas das patas teste (traseira esquerda) com o resultados das medidas das patas controle (traseira direita).

1.2.11 ELISA para IgG Total Anti-gp43

Imunoplasmas (Corning Costar Co., Corning, USA) foram sensibilizadas com 100 μ l de gp43 (2,5 μ g/ml) em tampão carbonato pH 9,6, e incubadas por 1h a 37°C e 18hrs a 4°C. Após esse procedimento as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-Tween 20 (PBST) em lavador automático de placas (ImmunoWash[®]1575, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), e em seguida bloqueadas com tampão de bloqueio (PBST + 5% Leite), por 1h a temperatura ambiente. Após novas lavagens, foram adicionadas 100 μ L/orifícios das amostras de soros dos camundongos diluídos 1:10, e incubadas por 2hs a 37°C. Em seguida foram feitas novas lavagens com PBST e adicionado o conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (Sigma Co., USA, A2984), diluído 1:4000 em tampão de diluição (PBS + 0,5% Leite), e incubado por 1:30h a 37°C. Novas lavagens foram realizadas e a reação revelada pela adição do substrato contendo tampão citrato, cromógeno OPD (Abbot Laboratories, Abbot Park, IL, USA) e água oxigenada. A reação foi bloqueada após 30 minutos, com ácido sulfúrico (Merck) 4N e a leitura efetuada em leitor de ELISA Multiskan EX (Labsystems, Helsinki, Finland) a 492 nm.

1.2.12 ELISA para Detecção de IgG1 e IgG2a Anti-gp43

Imunoplasmas (Corning Costar Co., Corning, USA) foram sensibilizadas com gp43 (2,5 μ g/ml) em tampão carbonato (pH 9,6), incubada por 1h a 37°C e 18hrs a 4°C. Depois de lavadas com PBST em lavador automático de placas (ImmunoWash[®]1575, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e bloqueadas com tampão de bloqueio (PBST + 5% Leite), por 1h, as placas foram novamente lavadas com PBST e, em seguida, adicionado as amostras de soros diluídos 1:10. As placas foram novamente incubadas por 2hrs a 37°C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas e adicionados os anticorpos de coelho anti-IgG1e anti-IgG2a de camundongo (ZIMED, Califórnia, USA) e novamente incubadas por mais 2hrs a 37°C. Após nova lavagem foi adicionado o conjugado peroxidase anti-IgG de coelho (Sigma Co., USA, A1949), seguida do

mesmo procedimento descrito anteriormente (3.2.11). Os níveis dos anticorpos específicos foram expressos em densidade ótica (D.O) a 492nm.

1.2.13 Determinação do Nível de Citocinas

Para avaliar o perfil de citocinas na resposta inflamatória, as concentrações de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 foram determinadas a partir do soro dos camundongos no 30º dia após infecção. Todas as análises foram avaliadas através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando-se “kit” comercial, seguindo as recomendações do fabricante (Biosource INVITROGEN).

Resumidamente, placas de ELISA foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, diluídos em tampão carbonato (pH 9,6), segundo as normas do fabricante, e incubadas por 18h a 4°C. Após este período os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-Tween 20 (PBST) + 1% BSA, por 1 hora. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes em PBST e adicionadas as curvas-padrão para as respectivas citocinas, diluídas na razão de 1:2. Nos poços seguintes as amostras dos soros foram distribuídas e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Terminada a incubação as placas foram lavadas e o anticorpo biotinilado e logo em seguida a streptavidina-peroxidase foram adicionadas e incubadas a temperatura ambiente por 2 hrs e 45 min, respectivamente. Após novas lavagens a reação foi revelada pela adição do substrato contendo tampão acetato, TMB (Zymed, Califórnia, USA) e água oxigenada. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N e a leitura feita em leitor de ELISA ELX-800 Universal microplate reader (Bio-tek instruments, INC) à 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações das citocinas recombinantes.

1.2.14 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para comparação entre os quatro grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA one-

way) seguida do pós-teste de Tukey-Kramer, sendo significativos os resultados com $p < 0,05$. Já para comparação entre dois grupos (Pb/Csa X Pb) foi utilizado o teste-t de Student, também sendo considerado valores de $p < 0,05$ como significativamente diferentes. Esses testes foram realizados com ajuda do programas estatísticos GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

2 RESULTADOS

2.1 NÍVEIS DE GP43 NO SORO (ANTIGENEMIA)

Para detecção dos níveis de antígeno solúvel (gp43) no soro dos animais, foi utilizada a técnica de ELISA de inibição. Os resultados expressos em μg de gp43/ml de soro mostraram uma diminuição significativa da antigenemia ($p < 0,05$) no grupo tratado com CsA ($14,06 \pm 1,65$), quando comparado com o grupo somente infectado ($22,26 \pm 4,15$) (Figura 1).

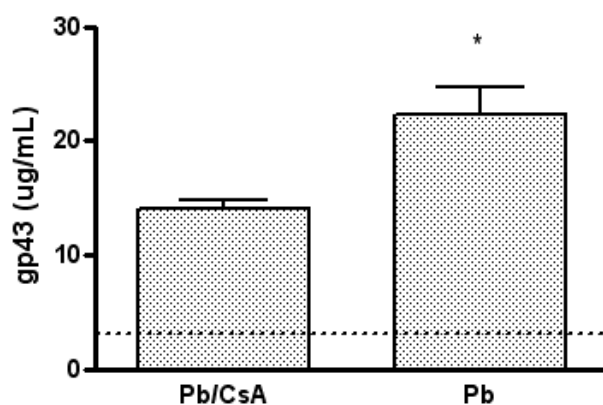


Figura 1 - Nível de gp43 no soro (antigenemia) em camundongos infectados e tratados com CsA (Pb/CsA), ou somente infectados (Pb) após 30 dias de infecção. (* $p < 0,05$). A linha representa a média dos controles sem infecção ($3,15 \mu\text{g/ml}$).

2.2 CFU

O número de unidades formadoras de colônias recuperadas (expresso em escala logarítmica) mostra uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de colônias viáveis no pulmão dos camundongos tratados com CsA quando comparados com os animais somente infectados (Figura 2).

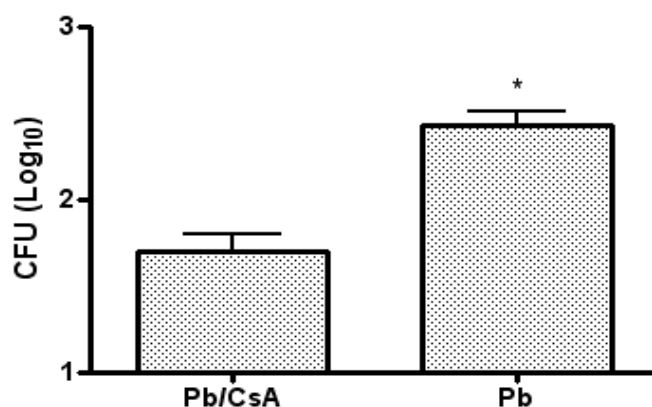


Figura 2 - Unidades formadoras de colônias (CFU) do pulmão dos camundongos infectados e tratados com CsA (Pb/CsA), ou somente infectados (Pb) após 30 dias de infecção. (* $p < 0,05$).

2.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

O exame histopatológico do pulmão dos animais apenas infectados após 30 dias (corados em HE) mostra um grande número de granulomas, com extensas áreas de destruição tecidual nos animais infectados (Figura 3a e 3b). Por outro lado os animais infectados e tratados com CsA não apresentam qualquer indicio de resposta inflamatória ou de granulomas (Figura 3c e 3d). A coloração de Grocott evidencia um grande número de células fúngicas viáveis no interior dos granulomas nos animais infectados (Figura 4a e 4b). Na mesma coloração é possível evidenciar que o tratamento com CsA diminui visivelmente o número de leveduras no pulmão, sendo que as poucas células existentes não se apresentam no interior de granulomas (figura 4c e 4d).

No fígado os resultados são semelhantes, com a presença de granulomas nos animais infectados (Figura 5a e 5 b), com grande quantidade de leveduras em seu interior (Figura 6a e 6b) e ausência total de resposta inflamatória

nos animais infectados e tratados com CsA (Figura 5c e 5d), com poucas células fúngicas no parênquima tecidual (Figura 6c e 6d).

Com relação ao baço foi observada a presença de leveduras na maioria dos animais infectados, enquanto nos animais tratados poucas células fúngicas foram evidenciadas (dados não mostrados). A tabela 1 resume os dados das análises histopatológicas, com a média de granulomas no pulmão e fígado (média \pm desvio padrão) de animais infectados e a presença de leveduras nos órgãos analisados em todos os animais.

Tabela 1 - Análise histopatológica dos animais infectados e tratados com CsA (Pb/CsA) esomente infectados (Pb) após 30 dias de infecção.

Órgão		Granulomas		Presença de Pb		
		Pulmão	Fígado	Pulmão	Fígado	Baço
Grupos	Pb	29.2 (\pm 9.5)	4.4 (\pm 2.3)	(6/6)	(6/6)	(4/6)
	Pb/CsA	0	0	(5/6)	(4/6)	(3/6)

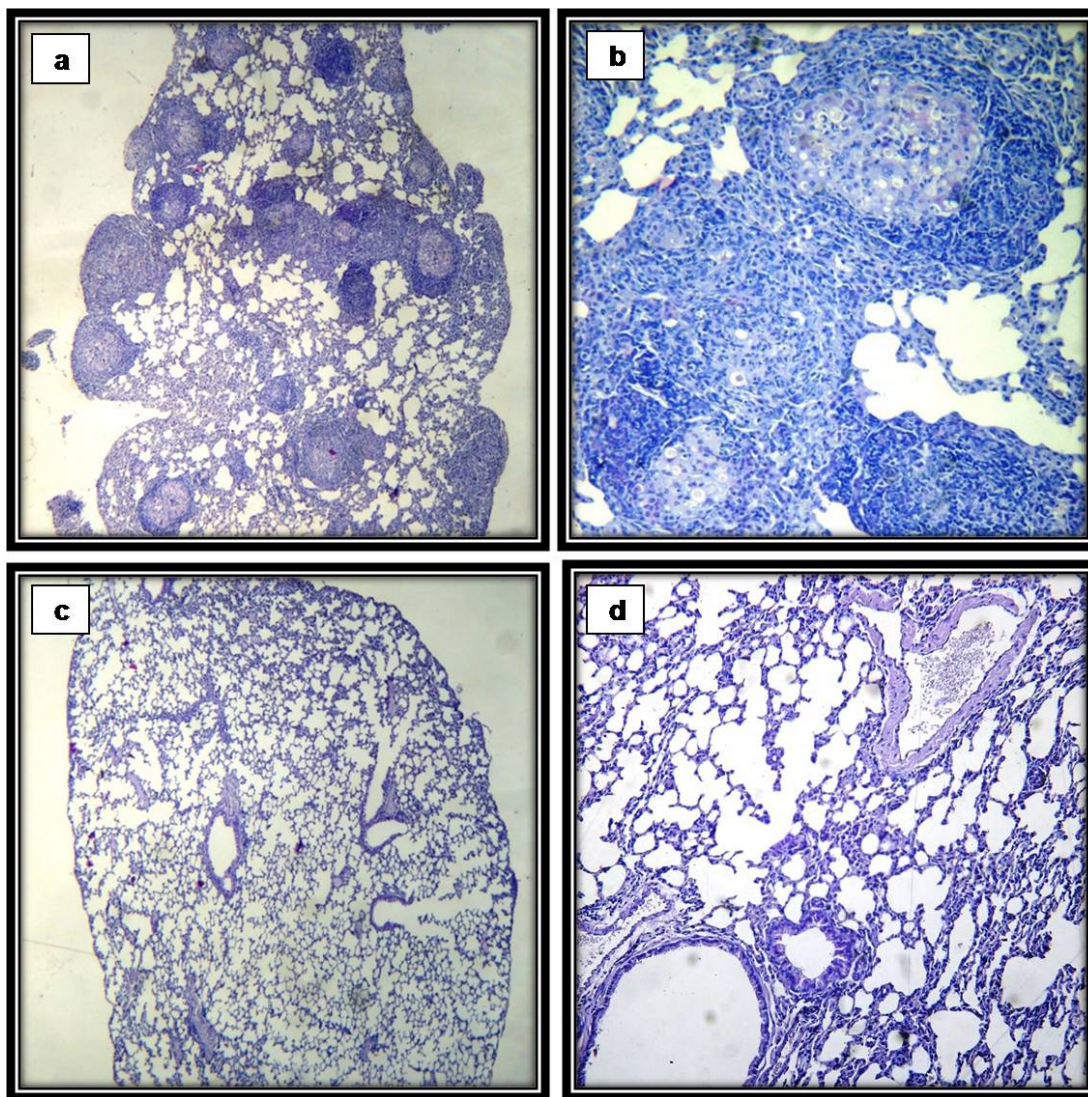


Figura 3 - Análise histopatológica do pulmão de camundongos infectados (a-40X e b-100X), ou infectados e tratados com CsA (c-40X e d-100X) após 30 dias de infecção. Coloração HE.

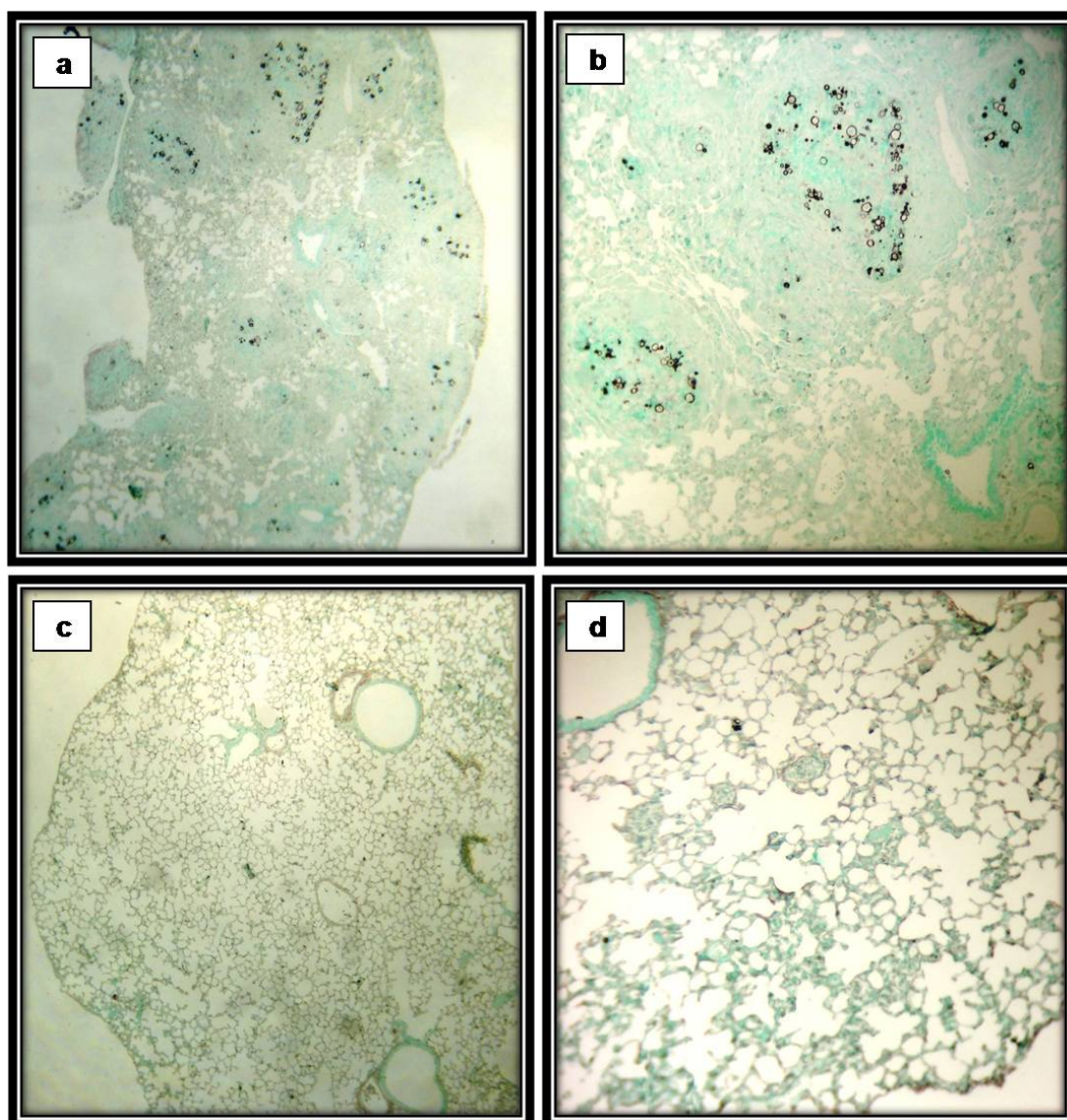


Figura 4 - Análise histopatológica do pulmão de camundongos infectados (a-40X e b-100X), ou infectados e tratados com CsA (c-40X e d-100X) após 30 dias de infecção. Coloração Grocott.

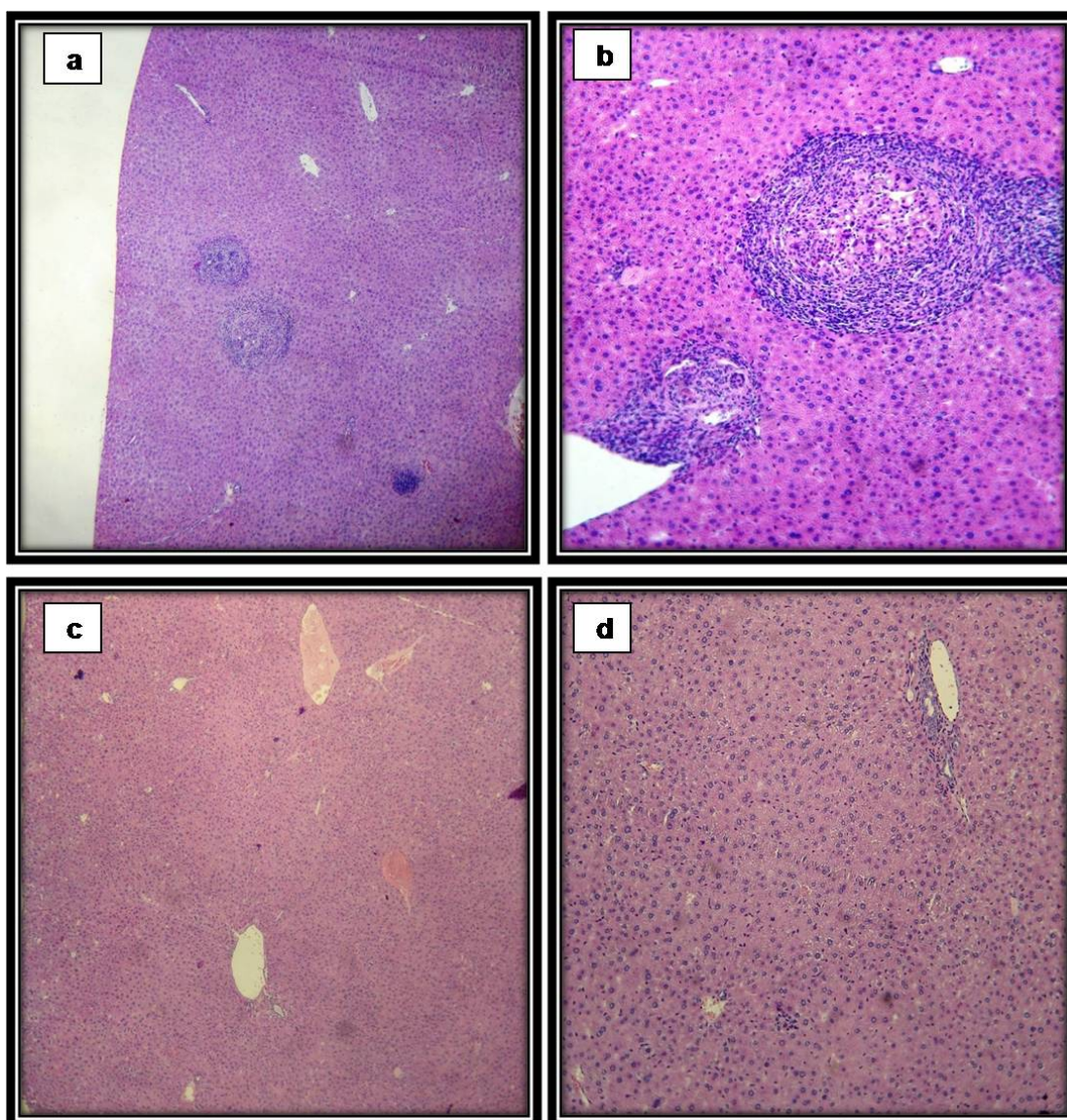


Figura 5 - Análise histopatológica do fígado de camundongos infectados (a-40X e b-100X), ou infectados e tratados com CsA (c-40X e d-100X) após 30 dias de infecção. Coloração HE.

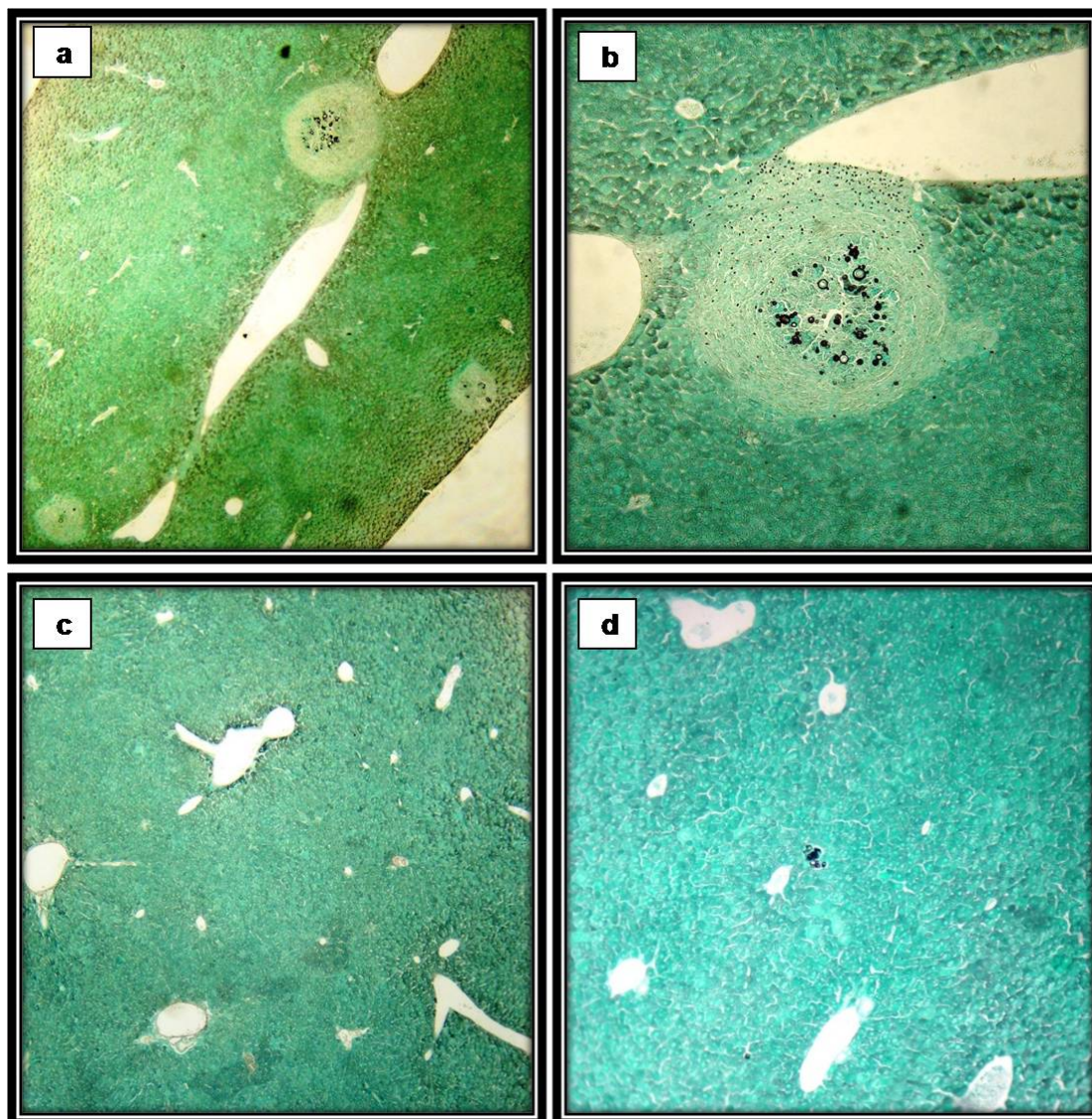


Figura 6 - Análise histopatológica do fígado de camundongos infectados (a-40X e b-100X), ou infectados e tratados com CsA (c-40X e d-100X) após 30 dias de infecção. Coloração Grocott.

2.4 PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

A Figura 7 mostra uma elevação no índice de proliferação (58,6%) com exoantígeno nos animais somente infectados com Pb ($p < 0,05$) quando comparado com os demais grupos, mostrando que o tratamento com CsA nos animais infectados reduz o índice de proliferação dos linfócitos frente ao exoantígeno a níveis semelhantes aos controles.

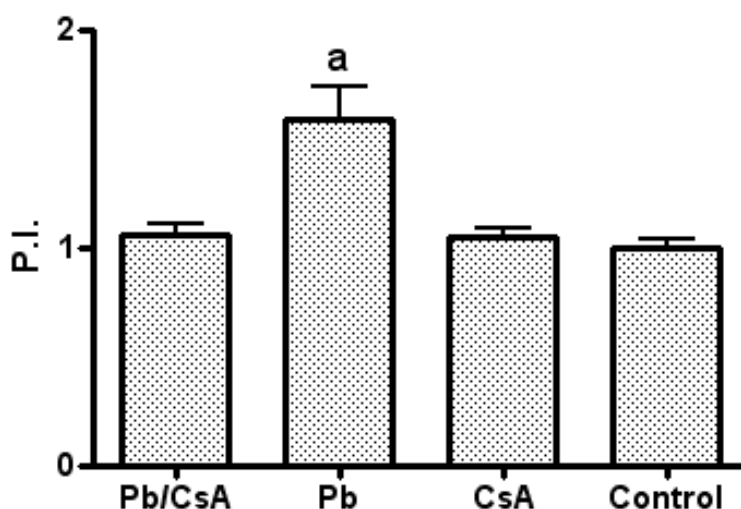


Figura 7 – Índice de proliferação de linfócitos com exoantígeno dos camundongos infectados e tratados (Pb/CsA), somente infectados (Pb) e controles (CsA e Control). (a: $p < 0,05$ em comparação a todos os outros grupos).

2.5 TESTE DE DTH

O teste de DTH feito através da diferença das áreas de secção transversal das patas inoculadas com Exoantígeno e das patas controle mostrou que o tratamento com CsA nos animais infectados (Pb/CsA) reduziu a resposta inflamatória frente a esse antígeno quando comparado com os animais infectados (Pb) ($p < 0,05$), a níveis semelhantes a resposta inflamatória dos animais controle (CsA e Control). Os resultados foram expressos com a média do inchaço da pata de cada grupo, sendo que o inchaço da pata foi a diferença entre a pata inoculada com antígeno e a pata inoculada com PBS.

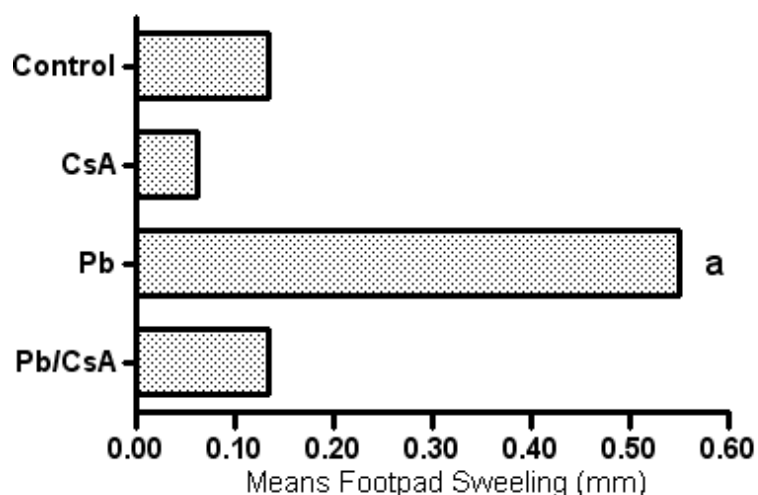


Figura 8 - Teste de DTH (Media de inchaço da pata) dos camundongos infectados e tratados (Pb/CsA), somente infectados (Pb) e controles (CsA e Control). (a: $p < 0,05$ em comparação a todos os outros grupos).

2.6 NÍVEIS DE IGG TOTAL, IGG1 E IGG2A ANTI-GP43

Os resultados de ELISA para detecção dos níveis de IgG total anti-gp43, expressos em densidade óptica (O.D.), foram significativamente maiores nos grupos infectados (Pb/CsA: $0,355 \pm 0,077$; Pb: $0,494 \pm 0,107$) quando comparados com os controles (CsA: $0,046 \pm 0,006$; Control: $0,044 \pm 0,004$), sendo que os animais infectados e tratados com CsA apresentaram níveis menores quando comparados com os animais apenas infectados ($p < 0,05$) (Figura 9a). Quanto aos resultados do ELISA para detecção de IgG1, apenas o grupo infectado (Pb: $0,450 \pm 0,211$) teve níveis aumentados ($p < 0,05$), sendo que os infectados e tratados com CsA tiveram níveis compatíveis aos controles (Pb/CsA: $0,224 \pm 0,09$; CsA: $0,160 \pm 0,045$; Control: $0,189 \pm 0,043$) (Figura 9b). Já o ELISA para detecção de IgG2a mostra níveis maiores nos grupos infectados (Pb/CsA: $0,484 \pm 0,140$; Pb: $0,704 \pm 0,186$; CsA: $0,091 \pm 0,010$; Control: $0,147 \pm 0,060$), com redução significativa no grupo infectado e tratado com CsA quando comparado com o apenas infectado ($p < 0,05$) (Figura 9c).

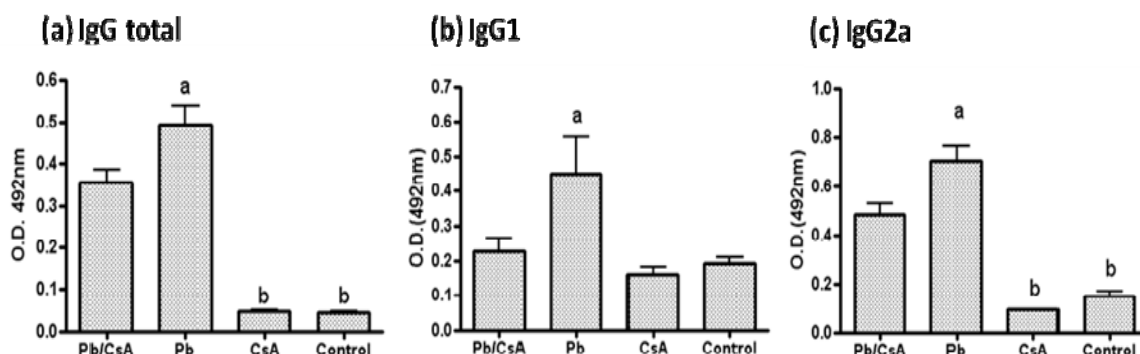


Figura 9 - Níveis de IgG total, IgG1 e IgG2a anti-gp43 no soro de camundongos infectados e tratados com CsA (Pb/CsA), somente infectados (Pb) e controles (CsA e Control) após 30 dias de infecção. O.D. (Densidade óptica a 492nm). (a: $p < 0,05$ para Pb/CsA vs Pb, b: $p < 0,05$ para CsA e Control vs Pb/CsA e Pb).

2.7 PERFIL DE CITOCINAS

O perfil de citocinas no soro dos animais mostra que o tratamento com CsA nos animais infectados reduz significativamente os níveis de INF- γ (Pb/CsA: 8083 ± 350 ; Pb: 9953 ± 661), IL-4 (Pb/CsA: 235 ± 44 ; Pb: 761 ± 131) e TNF- α (Pb/CsA: 1712 ± 14 ; Pb: 1959 ± 31) quando comparados com os animais somente infectados ($p < 0,05$). Os níveis de IL-10 (Pb/CsA: 1418 ± 30 ; Pb: 1309 ± 42) não apresentaram diferenças significativas entre dois grupos. Resultados foram expressos em pg/ml.

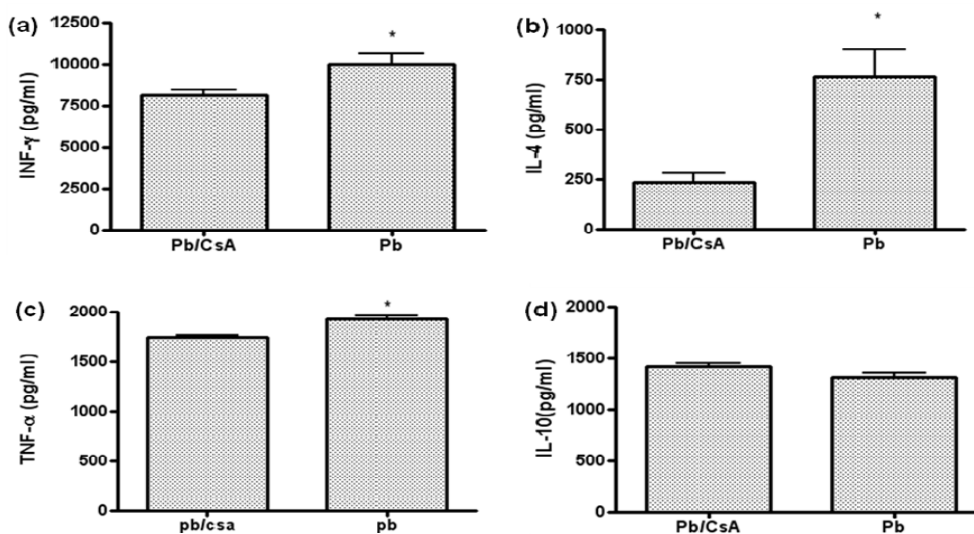


Figura 10 - Perfil de citocinas (INF- γ , IL-4, TNF- α e IL-10) no soro de camundongos infectados e tratados com CsA (Pb/CsA) ou somente infectados (Pb) após 30 dias de infecção. (* $p < 0,05$).

2.8 DISCUSSÃO

Trabalho recente tem demonstrado que, *in vitro*, a CsA possui efeitos significantes sobre a morfologia e o crescimento do *P. brasiliensis*, principalmente sobre a forma de levedura (CAMPOS et al., 2008) e, o presente trabalho, investigou pela primeira vez o possível efeito protetor da CsA, inibidor da calcineurina, na PCM murina experimental.

O tratamento com CsA foi capaz de diminuir a carga fúngica (CFU) no pulmão dos camundongos Balb/c após 30 dias de infecção, bem como o nível de gp43 circulante no soro, que são parâmetros utilizados para avaliar a maior ou menor severidade da doença (MENDES-GIANNINI et al, 1989; SALINA et al, 1998; MIURA et al, 2001; RAMOS et al, 2005; DA SILVA et al., 2004). Adicionalmente, as análises histopatológicas evidenciaram que o tratamento com CsA diminuiu notavelmente o número de leveduras encontradas em todos os tecidos avaliados (pulmão, fígado e baço), ratificando os dados do CFU e antigenemia. Este efeito protetor de CsA no modelo murino de PCM é concordante com o de Mody e colaboradores (1988; 1989) que mostraram efeito semelhante da CsA em modelo murino de criptococose.

Como já é bem estabelecido na literatura, a CsA é uma droga com grande efeito imunossupressor, sendo utilizada na prática clínica no tratamento da rejeição de transplante. Seu mecanismo de ação é devido a ligação à receptores citoplasmáticos denominados Ciclofilina A –CyPA- (uma imunofilinas). Esse complexo CsA-CyPA liga-se a calcineurina, que nos linfócitos T é responsável de ativar o fator de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas), que por sua vez ativa inúmeros genes necessários para ativação do linfócito e sua produção de citocinas (CLIPSTONE; CRABTREE, 1992).

Devido a característica da droga e considerando que as principais células efetivas de defesa contra *P. brasiliensis* são os linfócitos T de padrão Th1 (CALICH et al., 1998; CANO et al., 1998), este trabalho também verificou o efeito da CsA sobre os parâmetros da resposta imune celular específica ao fungo. De acordo com os dados da literatura, foi observada diminuição significativa da resposta imune celular específica a antígenos do *P. brasiliensis*, mensurada pelo ensaio de linfoproliferação; além de inibir a resposta inflamatória *in vivo*, evidenciada pelo teste

de DTH. Essa inibição da resposta imune celular específica é devido a ação da CsA sobre a inibição da ativação das células T quando encontram o antígeno (CLIPSTONE; CRABTREE, 1992). As citocinas analisadas também foram significativamente inibidas pela CsA, devido ao seu mecanismo de ação já descrito, que bloqueia a atividade da calcineurina, inibindo então a transcrição dos genes da IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α e conseqüentemente a secreção das referidas citocinas (CLIPSTONE; CRABTREE, 1992; BAKSH; BURAKOFF, 2000). Os níveis de IL-10 permaneceram inalterados e tal resultado pode ser explicado pelo fato de a CsA não possuir efeito sobre linfócitos supressores, que são descritos como uma fonte importante dessa citocina.

De acordo com as alterações nas citocinas, a análise histopatológica demonstrou diferença significativa no número de granuloma entre camundongos infectados que receberam ou não a CsA. Enquanto os animais infectados apresentavam uma intensa resposta granulomatosa, com a formação de granulomas gigantes contendo inúmeras leveduras em seu interior, os animais que receberam CsA não apresentavam qualquer indício de resposta inflamatória sobre as poucas leveduras encontradas nos interior dos tecidos.

A formação de granuloma é considerada uma resposta protetora na PCM (ROMANI, 1997; BURGUER et al., 1996; CANO et al., 1995), mas mesmo na ausência de granuloma e de imunossupressão celular específica, portanto favorável ao fungo, a ação da CsA induz menor severidade da doença. Isto possivelmente se deve a uma melhor ação da CsA sobre o fungo *P. brasiliensis* que a resposta imune específica durante o período investigado.

Estudos demonstram que inibidores farmacológicos da calcineurina, como a CsA, possuem efeitos significantes sobre a morfologia, crescimento e sobrevivência de fungos patogênicos sob condições estressantes ou não (ODOM et al., 1997, HIGH, 1994; BELL et al., 1999; STEINBACH et al., 2004; STEINBACH et al., 2007b, STIE; FOX, 2008), bem como a calcineurina tem se mostrado importante na resposta ao estresse, diferenciação, proliferação em altas temperaturas, controle da homeostase do cálcio e em resposta a mudanças ambientais em muitos fungos patogênicos, incluindo o *P. brasiliensis* (CAMPOS et al., 2008).

A resposta imune humoral não é considerada protetora na PCM (BIAGIONI et al., 1984), todavia os níveis dos anticorpos IgG1 e IgG2a refletem a

ativação de uma resposta Th2 ou Th1 respectivamente. A subclasse IgG1 é responsiva à produção de IL-4, sendo associada a um perfil Th2, já a IgG2a, responsiva ao INF- γ reflete um padrão Th1 (FINKELMAN et al., 1990; CALICH et al., 1998; CANO et al., 1995; KASHINO et al., 2000). Nossos resultados mostram uma redução dos níveis de IgG1 e IgG2a anti-gp43, bem como os níveis de IgG total nos animais infectados e tratados com CsA. A redução de IgG1 foi mais significativa do que a de IgG2a, concordando com os dados do perfil de citocinas presentes no soro desses animais, onde os resultados mostram que o tratamento com a CsA reduz mais drasticamente os níveis de IL-4 do que de INF- γ . A capacidade da CsA em inibir a imunidade humoral devido principalmente ao bloqueio das citocinas chave na imunoregulação tem sido demonstrada por Zimecki e Wieczorek (2001) em camundongos desafiados com eritrócitos de carneiro.

Embora os mecanismos de ação da calcineurina devam ser mais investigados, nossos resultados sugerem que essa via seja importante para a sobrevivência e virulência de *P. brasiliensis* em modelo de PCM murina, uma vez que sua inibição pela CsA causa proteção nos animais, mesmo com o efeito imunossupressor da droga.

Assim, como já considerado por Steinbach et al., (2007a) que o papel da calcineurina em funções essenciais para o sucesso da infecção no ambiente do hospedeiro faz dela um potencial alvo terapêutico para o tratamento de várias micoses, o resultado do presente trabalho sugere um potencial terapêutico para os “inibidores da calcineurina” na PCM, principalmente em uma abordagem combinatória com drogas antifúngicas convencionais. Todavia, considerando o seu efeito imunossupressor, seria importante novos estudos no sentido de buscar ou estudar o efeito de análogos da CsA com diferenças estruturais para que mantenham a inibição do crescimento fúngico sem afetar o sistema imunológico do hospedeiro.

Concluimos pelo trabalho que embora a CsA induza depressão da resposta imune específica do hospedeiro, a mesma induz proteção na PCM experimental em camundongos.

REFERÊNCIAS

ARAMBURU, J.; HEITMAN, J.; CRABTREE, G. R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep.* v.5, n.4, p.343-8, 2004.

BADER, T.; BODENDORFER, B.; SCHROPPEL, K.; MORSCHHAUSER, J. Calcineurin is essential for virulence in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* v.71, p.5344–5354, 2003.

BADER, T. et al. Role of calcineurin in stress resistance, morphogenesis, and virulence of a *Candida albicans* wild-type strain. *Infect. Immun.* v.74, p.4366–4369, 2006.

BAKSH, S.; BURAKOFF, S. J. The role of calcineurin in lymphocyte activation. *Semin Immunol.* v.12, n.4, p.405-15, 2000.

BELL, N. P. et al. Effects of methylprednisolone and cyclosporine A on fungal growth *in vitro*. *Cornea*, v.18, p.306–313, 1999.

BIAGIONI, L. et al. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.78, p.617-621, 1984.

BLANKENSHIP, J. R.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for *Candida albicans* to survive calcium stress in serum. *Infect. Immun.* v.73, p.5767–5774, 2005.

BLANKENSHIP, J. R. et al. Calcineurin is essential for *Candida albicans* survival in serum and virulence. *Eukaryot. Cell*, v.2, p.422–430, 2003.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microb*, v.6, p.89–117, 1993.

BURGER, E. et al. Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. *Am J Trop Med Hyg.*, v.55, n.2, p.235-42, 1996.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Br J Med Biol Res*, v.31, p.615-623, 1998.

CAMARGO, Z. Et al. Production of paracoccidioides brasiliensis exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol*; v.26, p.2147-51, 1988.

CAMPOS, C. B. et al. Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell.*, v.7, n.10, p.1856-64, 2008.

CANO, L. E. et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun.*, v.63, n.5, p.1777-1783, 1995.

CANO, L. E. et al. Protective role of γ -interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* v.66, p.800–806, 1998.

CLIPSTONE, N. A.; CRABTREE, G. R. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, v.357, p.695–697, 1992.

CRUZ, M. C.; FOX, D. S.; HEITMAN, J. Calcineurin is required for hyphal elongation during mating and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.*, v.20, p.1020–1032, 2001.

CYERT, M. S. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.311, p.1143–1150, 2003.

DA SILVA, S. H. et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J Clin Microbiol.*, v.42, n.10, p.4480-6, 2004.

DE CARVALHO, M. J. A. et al. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet. Biol.*, v.39, p.204–210, 2003.

DERKX, P. M.; MADRID, S. M. The *Aspergillus niger* cypA gene encodes a cyclophilin that mediates sensitivity to the immunosuppressant cyclosporin A. *Mol Genet Genomics.*, v.266, n.4, p.527-36, 2001.

FERNANDES, L. et al. Cell signaling pathways in *Paracoccidioides brasiliensis*-inferred from comparisons with other fungi. *Genet Mol Res.*, v.4, n.2, p.216-31, 2005.

FERREIRA, M. E. et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal Genet. Biol.*, v.44, p.219–230, 2007.

FINKELMAN, F. D. et al. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol.*, v.8, p.303–33, 1990.

FOX, D. S. et al. Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.*, v.39, p.835–849, 2001.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis, a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.20, p.129-132, 1987.

FRANCO, M. et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr. Top. Med. Mycol.*, v.5, p.115-149, 1993.

GOW, N.; BROWN, A. A. J.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.5, p.366-371, 2002.

HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. In vitro susceptibilities of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form to antifungal drugs. *Mycoses.*, v.43, n.11-12, p.403-7, 2000.

HIGH, K. P. The antimicrobial activities of cyclosporine, FK506, and rapamycin. *Transplantation*, v.57, p.1689–1700, 1994.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res*, v.20, p.89-97, 2000.

KRAUS, P. R. et al. The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Mol. Microbiol.*, v.48, p.1377–1387, 2003.

LACAZ, C. L. *Paracoccidioides brasiliensis* Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during saprophytic life; Biology, Virulence, Taxonomy. In: FRANCO, M. et al. (Ed.) *Paracoccidioidomycosis*. Flórida: CRC Press Boca Raton, 1994. p.109-120.

LIU, J. et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, v.66, p.807–815, 1991.

LIU, M. et al. Cch1 mediates calcium entry in *Cryptococcus neoformans* and is essential in low-calcium environments. *Eukaryot. Cell*, v.5, p.1788–1796, 2006.

MARCHETTI, O. et al. Fluconazole plus cyclosporine: a fungicidal combination effective against experimental endocarditis due to *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.2932–2938, 2000a.

MARCHETTI, O. et al. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.2373–2381, 2000b.

MARQUES-DA-SILVA, S. H. et al. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* v.41, p.3675-3680, 2003.

MCEWEN, J. G. et al. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* v.26, p.305-306, 1995.

MEDOFF, G. et al. Irreversible block of the mycelial-to-yeast phase transition of *Histoplasma capsulatum*. *Science*, v.231, p.476-479, 1986.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Detection of 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera os patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.*, v.27, n.12; p.2842-2845, 1989.

MIURA, C. S. et al. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies, and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. *Med Mycol.* v.39, n.5, p.423-8, 2001.

MODY, C. H.; TOEWS, G. B.; LIPSCOMB, M. F. Treatment of murine cryptococcosis with cyclosporin-A in normal and athymic mice. *Am. Rev. Resp. Dis.* v.139, p.8–13, 1989.

MODY, C. H.; TOEWS, G. B.; LIPSCOMB, M. F. Treatment of murine cryptococcosis with cyclosporin-A in normal and athymic mice. *Am. Rev. Resp. Dis.* v.139, p. 8–13, 1989.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v.65, p.55-63, 1983.

NICOLA, A. M.; ANDRADE, R. V.; SILVA-PEREIRA, I. Molecular chaperones in the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. *Genet. Mol. Res.* v.4, p.346–357, 2005.

NUNES, L. R. et al. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot. Cell*, v.4, p.2115–2128, 2005.

ODOM, A. et al. Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J.* v.16, p.2576–2589, 1997.

ONYEWU, C. et al. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v.47, p.956–964, 2003.

PAVANELLI, W.R. et al. Protection induced in BALB/c mice by the high-molecular-mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, v.163, n.3, p.117-28, 2007.

PEITER, E. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* Ca²⁺ channel Cch1p/Mid1p is essential for tolerance to cold stress and iron toxicity. *FEBS Lett.*, v.579, p.5697–5703, 2005.

RAMOS, S. P. et al. Antigenuria and antigenaemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.*, v.43, n.7, p.631-6, 2005.

ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. *Curr Opin Immunol.* v.9, p.484-490, 1997.

ROONEY, P. J.; KLEIN, B. S. Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol.*, v.4, p.127-137, 2002.

SALINA, M. A. et al. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J Clin Microbiol.*, v.36,n.6, p.1723-8, 1998.

SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; FIORILLO, A. M. *Paracoccidioidomicose - blastomicose sul-americana ed.* Sarvier-EDUSP. São Paulo, 1982. p.35-58.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* v.31, n.2, p.99-113, 1993.

SANGLARD, D. et al. Calcineurin A of *Candida albicans*: involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol. Microbiol.* v.48, p.959-976, 2003.

ZIMECKI, M.; WIECZOREK, Z. Differential patterns of cyclosporine A-induced inhibition of humoral and cellular immune responses to sheep erythrocytes in mice. *Pol J Pharmacol.* v.53, n.5, p.495-500, 2001.