



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
MÉDICA**

ANA CAROLINA MATIAS DINELLY PINTO

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO SISTÊMICO E
IMUNOMODULADOR DE UM EXTRATO DE *Coccidioides posadasii*
EM ARTRITE EXPERIMENTAL**

FORTALEZA

2012

ANA CAROLINA MATIAS DINELLY PINTO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO SISTÊMICO E
IMUNOMODULADOR DE UM EXTRATO DE *Coccidioides posadasii*
EM ARTRITE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de Concentração: Microbiologia humana e animal.

Linha de Pesquisa: Resposta inflamatória de bioprodutos de microorganismos patogênicos.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha.

FORTALEZA

2012

ANA CAROLINA MATIAS DINELLY PINTO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO SISTÊMICO E
IMUNOMODULADOR DE UM EXTRATO DE *Coccidioides posadasii*
EM ARTRITE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
- Graduação em Microbiologia Médica da
Universidade Federal Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Médica.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Prof.^a Dr.^a Ana Karine Rocha de Melo Leite
Faculdades INTA
Examinador

Prof.^a Dr.^a Lília Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará
Examinador

Prof.^a Dr.^a Maria Fátima da Silva Texeira
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

Dedico esse trabalho aos meus pais, aos meus irmãos, ao meu noivo, ao meu orientador e aos meus amigos do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias – LIO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará - UFC e ao Programa de Pós - Graduação em Microbiologia Médica que propiciou a realização do projeto.

Ao Centro de Especializado em Micologia Médica – CEMM, pela colaboração na execução desse trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro tornando capaz a realização desse projeto

Ao Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmacologia da Universidade de São Paulo – USP - Ribeirão Preto, pela colaboração na execução de projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me deu força nos momentos mais difíceis.

À minha mãe Heloisa Dinelly (*in memoriam*) pelo exemplo de mulher e que sempre esteve ao meu lado como um anjo da guarda.

Ao meu pai Raul Dinelly por seu incansável apoio e incentivo sendo ele o responsável pela pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos David Dinelly, Erika Dinelly e Juan Dinelly, pelo apoio e carinho.

À minha prima Karina Pinto Vasconcelos, pelo exemplo de luta.

Ao meu noivo Vinícius Martins Gomes, pelo imenso companheirismo, amor e paciência.

Aos meus sogros Carlos Gomes e Anita Gomes, que me acolheram como filha.

Às minhas primas amigas, que sempre estiveram comigo trazendo alegria, independente do momento.

Ao meu orientador Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelas lições e orientações ensinadas e por ter acreditado em mim.

À minha amiga Ana Caroline Leite, que sempre me acalmou e me apoiou em toda essa jornada, obrigada por sua constante orientação.

À Dra. Virgínia Claudia Girão, pela ajuda nas avaliações histopatológicas.

À Dra. Ana Lourdes Camurça Fernandes Vasconcelos, que esteve comigo passando coragem para iniciar o mestrado.

Ao professor Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pelo incentivo inicial.

Aos meus amigos do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias (LIO), Aline Alves, Natália Gomes, Rodolfo Melo, Aryana Feitosa, Fernando Alencar, Tânia Valeska, Lucas Melo, pelo apoio e aprendizado.

À professora Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro pelas orientações e constante disponibilidade.

Aos professores Dr. Júlio Sidrim e Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pelos ensinamentos recebidos.

À Kharla Rabelo que participou prontamente na execução do projeto e me ajudou durante todo o curso.

A todos os professores do programa, por terem compartilhado seus conhecimentos e pela colaboração na minha formação científica.

Aos integrantes do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), pelo auxílio na parte micológica do projeto.

À Carolina Vilma Soares de Oliveira, secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pela prontidão prestada.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, pela gentileza na doação dos animais para a execução desse trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração desta dissertação.

RESUMO

Peptídeos bioativos naturais são substâncias encontradas em diversas espécies que podem alterar a resposta imune contra patógenos, seja de forma prejudicial ou proteção para o hospedeiro. Há um crescente interesse na utilização de produtos naturais para a modulação de processos inflamatórios, alguns deles derivados de fungos não patogênicos. Fungos patogênicos, no entanto, também apresentam componentes imunomoduladores. Estudos prévios mostraram que extratos obtidos de nematódeos modularam a resposta imune em modelo experimental. Seguindo a mesma linha de pesquisa, foi investigado o efeito de um extrato obtido do fungo *Coccidioides posadasii* em modelo de artrite induzida por zymosan (AZy). Ratos e camundongos receberam 1 mg e 0,1 mg de zymosan intra-articular (i.a.), respectivamente. Grupos receberam o extrato de *C. posadasii* por via oral (v.o.) ou intraperitoneal (i.p.) 30 min antes do zymosan i.a. Grupos-controle receberam apenas solução salina. A hipernocicepção foi medida utilizando o teste de incapacitação articular e o von Frey eletrônico. O influxo celular agudo e crônico, bem como os níveis de nitrito e citocinas, foram avaliados no exudato sinovial. A sinóvia foi utilizada para exame histopatológico. O dano na cartilagem foi avaliado mediante determinação de conteúdo de glicosaminoglicanos (GAG). O pré-tratamento com o extrato de *C. posadasii*, seja i.p. ou v.o., inibiu significativamente e de forma dose-dependente, o influxo de células tanto na fase aguda como na fase crônica, bem como a hipernocicepção, acompanhada por uma ligeira redução na perda de GAG e uma melhora significativa da sinovite crônica. Redução e alquilação do extrato reverteram os efeitos protetores observados anteriormente. A administração do extrato de *C. posadasii* não alterou os níveis i.a. de NO, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-17 em ratos e camundongos submetidos à AZy, enquanto níveis de IL-10 foram significativamente reduzidos. Os dados revelam que um extrato de *C. posadasii* reduz a expressão de iNOS, que está associado com a inibição da apoptose sinovial e diminuição dos níveis de IL-10 liberados. Esses dados mostram um papel anti-inflamatório sistêmico e imunomodulador para o extrato de *C. posadasii* em AZy. Uma abordagem preliminar, utilizando técnicas eletroforéticas, para caracterizar componentes ativos excluiu carboidratos carregados enquanto aponta para frações proteicas ou polipeptídeo como responsáveis pela atividade biológica. O efeito do extrato de *C. posadasii* é espécie-independente. Caracterização adicional dos componentes ativos no extrato pode revelar mecanismos relevantes para compreender a resposta do hospedeiro contra os componentes fúngicos. Além disso, o efeito anti-inflamatório do extrato ilustra a importância da realização de estudos, uma vez que a atividade oral pode também ser relevante para o tratamento de doenças inflamatórias.

Palavra-chave: *Coccidioides*; Citocinas; Interleucina-10; Óxido nítrico; Fungo, apoptose.

ABSTRACT

Bioactive Natural Peptides are substances found in diverse species and may alter the immune response against pathogens, being either protective or harmful to the host. There is a growing interest in using natural products for the modulation of inflammatory processes, some of them derived from non-pathogenic fungi. However, pathogenic fungi also have immunomodulatory components. Previous studies showed that extracts of nematodes modulate the immune response in experimental model. Following the same line of research, it was investigated the effect of a protein-rich extract from *Coccidioides posadasii* in model of zymosan-induced arthritis (ZYA). Rats and mice received 1 mg and 0.1 mg zymosan intra-articularly (i.a.), respectively. Test groups received *C. posadasii* extract either *per os* or intraperitoneally (i.p.) 30 min prior to zymosan i.a. Controls received saline. Hypernociception was measured using the articular incapacitation test and the von Frey electronic test. Cell influx, nitrite, and cytokines levels were assessed in joint exudates. The synovia was used for histopathology. Cartilage damage was assessed through determining glycosaminoglycan (GAG) content. Pretreatment with the *C. posadasii* extract, either i.p. or *per os*, significantly and dose-dependently inhibited both acute and chronic cell influx as well as hypernociception, with a mild reduction of GAG loss and significant amelioration of the chronic synovitis. Reduction and alkylation of the extract abrogated protector effects seen previously. Administration of the *C. posadasii* extract did not alter i.a. levels of NO, IL-1 β , and TNF- α in rats subjected to ZYA, whereas intra-articularly levels of IL-10 were significantly reduced. Data reveal that a *C. posadasii* extract reduces iNOS expression that is associated to inhibition of synovial apoptosis and decrease of IL-10 levels released into zymosan-inflamed joints. These data show a systemic anti-inflammatory and immunomodulatory role for the *C. posadasii* extract in ZYA. A preliminary approach, using electrophoresis, to characterize active components excluded the presence of carbohydrates while pointing to a protein or polypeptide present in extract as responsible for the biological activity. The protective effect of the *C. posadasii* extract is species-independent. Further characterization of the active components in this extract may unravel mechanistic effects relevant to understand the host response against fungal components. In addition, the anti-inflammatory effect of the extract illustrates the relevance of pursuing studies, since the oral activity may also be of relevance to the treatment of inflammatory diseases.

Key-words: *Coccidioides*. Cytokines. Interleukin-10, Nitric oxide, Fungus, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Distribuição geográfica da coccidioomicose. Áreas demarcadas de amarelo-claro correspondem às zonas endêmicas da coccidioomicose. Áreas mostradas em amarelo-escuro correspondem às zonas com menor foco endêmico. Figura modificada de Hector, 2005.

Figura 2. Ciclo biológico de *Coccidioides* spp., indicando as fases filamentosa e parasitária. Figura modificada de Ruddy et al.; 2011.

Figura 3. Migração leucocitária. A migração celular é iniciada pela captura e rolamentos mediado por selectinas, seguidas da ativação por quimiocinas. As integrinas promovem a adesão ao epitélio, incentivando a transmigração transcelular ou paracelular. Moléculas-chave envolvidas em cada passo são indicadas em caixas. PSGL1 - glicoproteína ligante de P-selectina; VLA4 – molécula de adesão de reconhecimento tardio; ICAM - moléculas de adesão intercelular; VCAM1 - molécula de adesão celular vascular-1; MADCAM1 - molécula de adesão celular adressina das mucosas. Figura modificada de Ley et al., 2007.

Capítulo I

Fig. 1 Effect of the parenteral and oral administration of the *C. posadasii* (*C.p.*) extract on the cell influx in acute and chronic zymosan-induced arthritis (ZYA) in rats and mice. Rats (a, b) and mice (c, d, e) received the *C.p.* extract or saline (-) either i.p. or p.o. 30 min prior to 1 mg or 0.1 mg zymosan i.a, respectively. (e) Mice received the reduced / alkylated *C.p.* extract (R/A) i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive rats or mice received saline i.a. or saline i.a. plus *C.p.* extract i.p. Cell infiltration into joint cavities was assessed 6 h (a, c, e) or 7 days (b, d) after injection of zymosan. Results show means \pm SEM of total leukocytes (n= 6 animals for each group); ¹*P* < 0.05 compared to naive.**P* < 0.05 compared to control (-) rats and mice; #*P* < 0.05 compared to *C.p.* 30 μ g

Fig. 2 Effect of the parenteral and oral administration of the *C.p.* extract on the hypernociception in acute (a) or chronic (b) ZYA in rats. (a) Rats received the *C.p.* extract or saline (-) either i.p. or p.o. 30 min prior to 1 mg zymosan. Naive rats received saline i.a. Articular incapacitation was measured hourly over 4 h as the increase in PET using the rat knee joint incapacitation test. Results show means \pm SEM of maximal PET between 3 and 4 h of arthritis. n= 6 animals for each group; ¹*P* < 0.05 compared to naive rats;**P* < 0.05 compared to control (-) rats; (b) Rats received the *C.p.* extract or saline (Zy) i.p 30 min prior to 1 mg zymosan. Naive rats received saline i.a. The flexion - elicited hypernociception withdrawal threshold (g) was evaluated 3 h, 5 h and then daily for 7 days after injection of the zymosan. Results show means \pm SEM of nociceptive threshold; n= 6 animals for each group. **P* < 0.05 compared to control (Zy) rats

Fig. 3 Representative illustration of the synovial histopathology of mice subjected to ZYA and treated with the *C.p.* extract. Mice received 30 μ g of *C.p.* extract (c) or saline (b) given i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice (a) received saline i.a. All animals

were sacrificed at 7 days. The synovia of animals that received just the zymosan display intense and diffuse mononuclear cell infiltration (b) that is clearly reduced in the mice that received the *C.p.* extract prior to zymosan (c). H & E staining. (Original magnification x 400)

Fig. 4 Representative illustration of the effect of *C.p.* extract on cell death in the zymosan-inflamed synovial detected by TUNEL method. Mice received 30 µg of *C.p.* extract (c) or saline (b) given i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice (a) received saline i.a. All animals were sacrificed at 6 hours. The results are expressed as the average number of TUNEL- positive cells. $P < 0.05$ when compared to zymosan.

Fig. 5 Representative illustration of the immunoexpression of iNOS in the synovia. Mice received 30 µg of *C.p.* extract (d) or saline (c) given i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice (b) received saline i.a.; negative control (a). All animals were sacrificed at 6 hours. There is a marked reduction of iNOS staining in the group that received *C.p.* extract (d) as compared to the group treated with saline (c). (Original magnification x 400).

Fig. 6 Effect of the administration of *C.p.* extract on the release of inflammatory mediators in ZYA. Mice received 30 µg of the *C.p.* extract or saline (-) i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice received saline i.a. IL-1β (a), TNF-α (b), γ-IFN (c), IL-17 (d), and IL-10 (e) levels were assessed using ELISA (see text for details). Results represent means ± SEM, measured at 6 h ($n = 6$ animals for each group); ¹ $P < 0.05$ compared to naive mice; * $P < 0.05$ compared to control (-) mice

Fig. 7 Effect of the administration of *C.p.* extract on the release of inflammatory mediators in ZYA. Rats received 100 µg of the *C.p.* extract or saline (-) i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive rats received saline i.a. (a) IL-1β, (b) TNF-α and (c) IL-10 levels were assessed using ELISA (see text for details). Results represent means ± SEM, measured at 6

h (n = 6 animals for each group); ¹P < 0.05 compared to naive rats; *P < 0.05 compared to control (-) rats

Fig. 8 Partial identification of proteins and carbohydrates present in *C.p.* extract. Silver-stained 12 % polyacrylamide electrophoresis gel of *C.p.* extract (a) and a toluidine blue-stained 6 % polyacrylamide electrophoresis gel for carbohydrate staining (b). (a) Lane 1, (Bio-rad™ standards), lane 2; 8µg *C.p.* extract; (b) Lane 1, chondroitin-4-sulfate; lane 2, chondroitin-6-sulfate; lane 3, 8µg *C.p.* extract

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Table 1. Effect of the *C. posadasii* extract on joint damage by histopathology in ZYA.

Mice received 30 µg of *C.p.* extract (Zy + *C.p.*), a reduced/alkylated (R/A) *C.p.* extract or saline given i.p. (Zy), 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice received saline i.a. All animals were sacrificed at 7 days. Results represent medians of synovial histopathology scores. * $P < 0.05$ compared to control (Zy) mice ($n = 6$ animals for each group).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AZy	Artrite induzida por zymosan
BSA	Albumina sérica bovina
CAM	Moléculas de adesão celular
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
ConA	Concavalina A
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FIPs	Proteínas fungicas imunomoduladoras
FIP-fve	Proteína isolada do fungo <i>Flammulina velutipes</i>
GAG	Glicosaminoglicano
gp43	Glicoproteína isolada a partir de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
H&E	Hematoxilina e Eosina
HTA	Hipersensibilidade do tipo tardia
i.a.	Intra-articular
IA	Incapacitação articular
ICAM	Moléculas de adesão intercelular
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon-gama
i.p.	Intraperitoneal
JAM	Molécula de adesão juncional
kDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolissacarídeos
MADCAM-1	Molécula de adesão celular adressina das mucosas
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF- κ B	Fator nuclear-kappa B
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato

NK	Célula natural killer
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PET	Tempo de suspensão da pata (paw elevation time)
PMN	Células polimorfonucleares
PN	Peroxinitrito
PSGL-1	Glicoproteína ligante de P-selectina
rGel1	Proteína recombinante isolada a partir de <i>Coccidioides</i>
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
spp.	Espécies indeterminadas; o conjunto de formas em estudo comporta representantes de várias espécies que, por qualquer razão não se considerou necessário explicitá-las.
TGF- β	Fator de transformação do crescimento
TLRs	Receptores Toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alfa
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VLA4	Molécula de adesão de reconhecimento tardio
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA	18
1. <i>Coccidioides</i> spp.	18
1.1. Caracterização do microorganismo	18
1.2. Patogenia	20
1.3. Fatores de virulência	22
1.4. Resposta imunológica	22
2. Imunomodulação por bioprodutos	25
3. Processo inflamatório	27
3.1. Migração celular	28
3.2. Mediadores inflamatórios	31
3.3. Dor inflamatória	33
4. Modelo experimental	34
4.1. Artrite induzida por zymosan (AZy)	34
4.2. Mecanismos envolvidos na AZy	34
JUSTIFICATIVA	38
HIPÓTESE CIENTÍFICA	39
OBJETIVOS	40
Objetivos Gerais	40
Objetivos Específicos	40
CAPÍTULO I	41
CONCLUSÕES	73
PERSPECTIVAS	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

REVISÃO DE LITERATURA

1. *Coccidioides* spp.

1.1. Caracterização do microorganismo

A taxonomia do patógeno *Coccidioides* spp. inclui o reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales e família Onygenaceae. Há décadas, estudos mostram uma variabilidade morfológica do fungo, o que acarretou uma divisão do fungo *Coccidioides immitis* em duas espécies geneticamente diferentes, *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii* (FISHER et al., 2002). Além da diferença no genótipo, foram encontradas pequenas diferenças em sequências de aminoácidos de proteínas (KOUFOPANOU et al.; 1997, PENG et al.; 1999) e, além disso, *C. posadasii* exibe uma cinética de crescimento mais lenta que *C. immitis* em meios contendo elevadas concentrações de sal (FISHER et al., 2002). Embora as diferenças nas taxas de crescimento sejam significativas, diferenças fenotípicas não são notáveis, bem como a morfologia, virulência e antigenicidade entre os grupos. Por este motivo, alguns autores questionam a separação das espécies, utilizando o argumento de que ambas demonstram processos infecciosos e quadro clínico semelhantes, além da ausência de estudos que indiquem relevância biológica e variabilidade genética convincente.

C. immitis e *C. posadasii* são fungos dimórficos térmicos, agentes etiológicos da coccidioidomicose, uma micose sistêmica caracterizada por uma infecção respiratória iniciada pela inalação de estruturas infecciosas denominadas artroconídeos. A infecção pode mostrar-se em diversas formas clínicas, variando da forma assintomática a uma micose disseminada. A coccidioidomicose é uma doença infecciosa, mas não contagiosa. Foi considerada uma doença reemergente em virtude do aumento dramático no número de casos (COX & MAGEE, 2004; DICAUDO, 2006). É importante ressaltar que ambas as espécies são classificadas como agentes de bioterrorismo, sendo necessária a utilização de normas rígidas de biossegurança, transporte e estocagem para a manipulação segura de suas culturas (SUTTON, 2007; WARNOCK, 2007).

Embora a coccidioidomicose ocorra em muitos países, *Coccidioides* spp. expressa uma evidente distribuição geográfica. Considerando que a prevalência *C. immitis* é limitado a uma região da Califórnia conhecida como Vale de São Joaquim. *C. posadasii*

tem uma distribuição mais ampla, estando associada à coccidioomicose em outras áreas dos Estados Unidos, bem como no México, América Central e América do Sul (Figura 1). No Brasil, *C. posadasii* está limitado a regiões do Nordeste, como Piauí, Bahia, Ceará e Maranhão, onde a prática desprotegida de caça a tatus (*Dasypus novemcinctus* e *Euphractus sexcinctus*) expõe seres humanos e cães à infecção por *C. posadasii*, pela facilidade de dispersão da artoconídios presentes no solo (CORDEIRO et al.; 2010).



FIGURA 1. Distribuição geográfica da coccidioomicose. Áreas demarcadas de amarelo-claro correspondem às zonas endêmicas da coccidioomicose. Áreas mostradas em amarelo-escuro correspondem às zonas com menor foco endêmico. Figura modificada de Hector, 2005.

1.2. Patogenia

C. immitis e *C. posadasii* são encontrados no solo de regiões semiáridas quando não estão infectando o hospedeiro. O micélio fúngico encontra-se no solo em fase saprofítica na sua forma filamentosa, composto por hifas hialinas, septadas, formadas por arthroconídeos intercalados por células desprovidas de material citoplasmático, denominadas de células disjuntoras, as quais facilitam a desarticulação da hifa com a consequente dispersão das estruturas infecciosas no ar - os arthroconídeos. Após a inalação, é iniciada a infecção. Os arthroconídeos apresentam um crescimento isotrópico e são convertidos em esférulas, que se diferenciam e produzem endósporos em seu interior, caracterizando a fase parasitária do fungo. Estas esférulas, após o amadurecimento, são rompidas, liberando em torno de 800 endósporos, que, por sua vez, são capazes de se desenvolver, originando uma nova geração de esférulas, atingindo uma reprodução exponencial. Endosporos são capazes de propagar e reiniciar o ciclo de esporulação no hospedeiro com formação de granuloma (figura 2) (COX & MAGEE, 2004).

O quadro clínico de coccidioidomicose pode evoluir tanto para um curso relativamente benigno de uma infecção pulmonar limitada, ou de uma doença grave sistêmica, eventualmente fatal, que afeta os tecidos extrapulmonares (COX & MAGEE, 2004; BIALEK et al. 2004; DICAUDO, 2006). Na ausência de uma resposta do hospedeiro bem-sucedida, a infecção crônica pode persistir por pelo menos 12 anos, embora a doença em humanos possa evoluir para a morte em um período mais curto (SHARPTON et al. 2009).

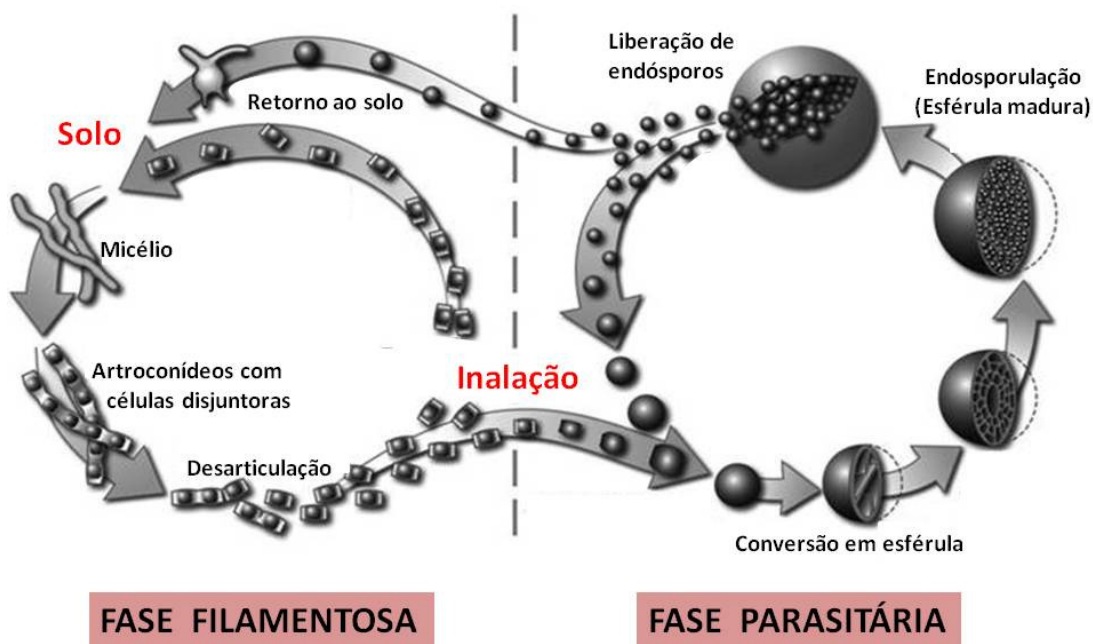


FIGURA 2. Ciclo biológico de *Coccidioides* spp., indicando as fases filamentosa e parasitária. Figura modificada de Ruddy et al. 2011.

A fase filamentosa desse fungo, quando semeado em Agar-Sabouraud e incubado a 25°C, tem um aspecto macroscópico caracterizado por colônias membranosas, de coloração branca ou creme, quase glabras ou aveludadas, com o desenvolvimento de um discreto micélio aéreo. O fungo atinge um crescimento ideal em cultura em um período aproximado de cinco a dez dias. A obtenção *in vitro* da fase parasitária é mais difícil, pois outros fatores, além da temperatura, devem ser considerados, como aeração, por exemplo, para a obtenção da cultura em fase parasitária, o fungo deve ser incubado em microaerofilia, sob uma atmosfera de 20% de CO₂ a uma temperatura de 40°C e o desenvolvimento da colônia pode ser observada em um período de três a cinco dias. A reversão da fase filamentosa para a parasitária pode ser utilizada como confirmação da espécie fúngica (PAIXÃO, 2004; CORDEIRO et al. 2006).

1.3. Fatores de virulência

Os fungos *C. posadasii* e *C. immitis* são altamente virulentos, porém, pouco se sabe sobre os mecanismos de virulência. Com avanços em projetos de sequenciamento do genoma de *Coccidioides* spp., no entanto, contribui para a descoberta de um conjunto de genes que expressam os fatores de virulência e a determinação precisa da função biológica no curso da doença (HUNG et al., 2007).

No crescimento isotrópico da esférula, uma camada membranosa, composta por polissacarídeos, lipídeos e proteínas, é depositada na superfície da célula. Foi mostrado que, em cultura, produtos da parede externa de esférulas são liberados para o meio, na fase de crescimento esferular, e que esses produtos são caracterizados por demonstrarem altos níveis de imunorreatividade em ensaios, envolvendo imunidade celular e humoral (COLE et al., 1988-A; COLE et al., 1988-B). O componente responsável por essa imunorreatividade é uma glicoproteína denominada SOWgp, atuando como antígeno imunodominante provocando ambas as respostas imune celular e mediada por anticorpos em pacientes com coccidioidomicose (HUNG et al., 2000). Hung e colaboradores (2007) demonstraram que títulos elevados de anticorpo anti-SOWgp contribui para o aumento da opsonização, fagocitose e lise das células. Além disso, SOWgp estimula uma resposta proliferativa de células T CD4⁺ *in vitro*, sugerindo que esse antígeno pode estimular células Th2 a secretar citocinas que induzem as células B a produzir anticorpos.

1.4. Resposta Imunológica

Ante a infecção por *Coccidioides* spp., células PMN compreendem o primeiro influxo celular, atribuído em parte por componentes do sistema complemento, com atividade quimiotática, liberados pelo fungo. Estas células fagocitam menos de 20% dos artroconídeos inalados e, à medida que ocorre a conversão em esférulas há uma diminuição progressiva da fagocitose por PMN, em parte decorrente do aumento de tamanho da esférula, que pode atingir diâmetro maior do que 100µm. Monócitos e macrófagos são capazes de fagocitar artroconídeos, endósporos e esférulas jovens, embora muitas vezes o fungo consiga sobreviver intracelularmente, talvez pelo mecanismo de inibição da fusão lisossomo-fagossomo, estratégia utilizada por muitos patógenos intracelulares para escapar dos efeitos antimicrobianos de fagócitos. Mecanismos precisos da interação de macrófagos

com esférulas e endósporos, porém, ainda não estão bem esclarecidos (BORCHERS, 2010).

Estudos são realizados para desvendar receptores envolvidos no reconhecimento de *Coccidioides* spp. Foi mostrado que o receptor de manose promove a ligação de alguns elementos fúngicos a monócitos e células dendríticas (AMPEL et al. 2005; DIONNE et al. 2006). Em macrófagos peritoneais, os receptores Toll-like do tipo 2 (TLR-2) e dectin-1 mostraram-se necessários para a produção de citocinas e quimiocinas quando em contato com esférulas (VIRIYAKOSOL et al.; 2005).

Na década de 1940, Smith et al. (1948) desenvolveram um antígeno denominado coccidioidina, um filtrado obtido com base no micélio de *Coccidioides*, utilizado para realizar o teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardia (HTA). Uma vez que métodos de cultura da fase parasitária foram desenvolvidos, um lisado de esférulas, denominado esferulina, mostrou-se mais sensível na detecção de reatividade cutânea (AMPEL et al.; 2002). Aproximadamente 80% dos pacientes com coccidioidomicose não disseminada manifestam reatividade no teste cutâneo para antígenos coccidióidico. Quando a reatividade ao teste é baixa ou ausente, o prognóstico é frequentemente ruim, enquanto que reações positivas no teste de HTA estão associadas com a recuperação. Uma vez que as reações de HTA constituem uma medida da imunidade celular, a correlação observada entre a presença de uma forte reação cutânea com antígenos coccidióidicos e um prognóstico favorável sugere que a imunidade celular desempenha papel central na defesa do hospedeiro.

Preparações antigênicas a partir de esférulas ou do micélio são usadas no estudo da imunidade celular *in vitro*. Foi observado como resposta a várias preparações o envolvimento de várias citocinas, como, o aumento significativo dos níveis de interferon- γ (IFN- γ), interleucina (IL)-2, IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF- α), bem como, baixos níveis de IL-10 e IL-4 em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis (BORCHERS, 2010).

A imunidade adaptativa para *Coccidioides* spp. é extensivamente estudada. Nas tentativas de desenvolvimento de vacinas para tratar a coccidioidomicose, preparações antigênicas são fracionadas para identificação de antígenos específicos de células T e desvendaram propriedades imunomoduladoras implicadas na resposta do hospedeiro contra

este patógeno. A este respeito, células mononucleares do sangue periférico humano foram capazes de liberar TNF- α , em resposta à estimulação *in vitro* com artroconídeos e esférulas de *C. immitis* (AMPEL, 1994). TNF- α é uma citocina produzida por uma grande variedade de células, necessária para o controle da infecção aguda e formação de granulomas, por outro lado, é implicada como um importante componente no hospedeiro, contribuindo com a destruição do tecido pulmonar (COX & MAGEE, 2004).

Nos últimos anos, houve maior esforço na identificação de proteínas antigênicas como candidatas para vacinas contra coccidiodomicose. Dada a importância da imunidade mediada por células na defesa do hospedeiro contra a infecção por *Coccidioides* spp., o foco é em antígenos para células T, capazes de induzir uma resposta Th1. Xue et al. (2005) estudaram o comportamento de uma proteína recombinante (rGel1) isolada de *C. posadasii* na proteção contra coccidiodomicose e observou o aumento da produção de citocinas Th1, IL-12 e IFN- γ , e a redução da liberação de IL-5 e IL-10 (Th2) em camundongos. Considerando que a persistência de elevados níveis de IL-10 contribui para a disseminação da coccidiodomicose, o estudo concluiu que a proteção foi obtida com envolvimento de citocinas Th1.

Ocorre também estreita associação entre títulos de anticorpos e a gravidade da doença, sugerindo que a imunidade humoral na coccidiodomicose é benéfica. Os efeitos benéficos podem incluir a opsonização, lise mediada pelo complemento, aumento da imunidade mediada por células e modulação da resposta mediada por citocinas. Estudos sugerem que células B também podem indicar um papel importante na proteção contra coccidiodomicose, no entanto, poucos antígenos de células B humanas foram isolados, clonados e sequenciados. A identificação de anticorpos potencialmente protetores em coccidiodomicose humana é dificultada pela falta de informação sobre a identidade de antígenos de células B, o desenvolvimento do perfil de anticorpos ao longo do tempo, bem como a associação entre o anticorpo específico e várias manifestações da doença (BORCHERS, 2010).

2. Imunomodulação por bioprodutos

Níveis moderados de mediadores inflamatórios são importantes para a sobrevivência do hospedeiro ante uma infecção e necessários para a reparação de lesões dos tecidos. No entanto, o desequilíbrio, com a consequente superprodução desses mediadores inflamatórios, está envolvido no desenvolvimento de uma variedade de doenças inflamatórias e autoimunes, como artrite reumatoide e doença de Crohn (RAO, 2007).

Há um crescente interesse na utilização de produtos naturais para modular respostas imunes e neutralizar processos inflamatórios (NAM, 2006). Vários estudos demonstraram o potencial anti-inflamatório e imunomodulador de componentes fúngicos, como polissacarídeos, proteínas, lipídeos, bem como metabólitos secundários, descritos como moléculas com propriedades imunomoduladoras (LULL et al., 2005). Embora o mecanismo exato de ação dos componentes bioativos de fungos ainda seja desconhecido, uma via comum envolve a ativação dos linfócitos T e macrófagos, alterando assim o repertório de citocinas liberado na resposta inflamatória (WASSER, 2002).

Com o interesse de utilização de extratos fúngicos em modular processos inflamatórios, KO et al. (1995) relatam a atividade biológica de uma proteína fúngica imunomoduladora isolada de *Flammulina velutipes* (FIP-fve), um cogumelo comestível popular na Ásia. FIPs são grupos de proteínas fúngicas definidas por indicarem uma similaridade na sequência de aminoácidos e em suas ações imunomoduladoras. Nesse estudo, o tratamento sistêmico com essa proteína foi capaz de suprimir completamente a anafilaxia promovida por albumina sérica bovina (BSA) e reduzir edema de pata em camundongos, quando comparado com grupo-controle. Em um estudo mais recente, utilizando extratos de *F. velutipes* compostos basicamente de FIPs e lectinas, foi observada uma atividade imunomoduladora *in vitro*, mediante a redução na produção de citocinas como IL-4 e IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico estimuladas com concavalina A (ConA), uma lectina indutora de mitose e produção de IFN- γ (JEURINK et al.; 2008).

Extratos dos fungos *Antrodia camphorata* e *Cordyceps sinensis*, já utilizados na medicina popular chinesa como anti-inflamatórios, inibiram *in vitro* a secreção de TNF- α

e IL-12, bem como a produção de NO por macrófagos peritoneais estimulados com LPS ou IFN- γ . Embora os mecanismos responsáveis pela inibição das respostas pró-inflamatórias não tenham sido elucidados, muitas vias importantes foram identificadas e uma dessas é o fator de transcrição NF- κ B, que, por sua vez, controla a expressão de genes pró-inflamatórios (RAO, 2007).

Em 2011, Hanaoka e colaboradores estudaram o efeito anti-inflamatório de produtos do fungo *Gonoderma lucidum* em modelo de colite, com o objetivo de buscar opções terapêuticas para a doença de Crohn, uma patologia inflamatória caracterizada por ciclos de inflamação aguda, ulceração e sangramento da mucosa intestinal. *Gonoderma lucidum* é utilizado tradicionalmente como alimento na China e Japão e contém várias substâncias bioativas como polissacarídeos, proteínas, nucleotídeos, ácidos graxos e terpenoides. Nesse estudo, foi observado que polissacarídeos de *Gonoderma lucidum*, administrados oralmente, diminuem, de maneira dose-dependente, a inflamação em modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico em camundongos. O efeito anti-inflamatório foi observado por intermédio da redução da intensidade da colite em parâmetros histopatológicos, e, *in vitro*, observou a redução da liberação de IFN- γ por linfócitos. Estudos anteriores relatam atividade antitumoral de *Gonoderma lucidum* atribuída a β -glucanos, relacionadas principalmente com seus efeitos sobre células imunológicas efetoras, como macrófagos e neutrófilos. (OKA, 2010). Dessa forma, acredita-se que a atividade anti-inflamatória de polissacarídeos de *Gonoderma lucidum* também seja atribuída a partir de moléculas como β -glucanos.

Diferentemente dos estudos supracitados, que relatam atividade biológica de fungos não patogênicos, um grupo de pesquisadores brasileiros estuda a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora de produtos de *Paracoccidioides brasiliensis*, um fungo patogênico. Trata-se de um fungo dimórfico térmico, pertencente à mesma família do *C. posadasii*, agente causador da paracoccidioidomicose, uma doença granulomatosa sistêmica prevalente na América Latina, adquirida pela inalação de propágulos fúngicos que, uma vez nos pulmões, converte-se em formas de levedura patogênicas, tal como observado na coccidioidomicose. Foi isolada e definida como principal componente antigênico deste fungo uma glicoproteína rica em manose de 43 kDa, denominada de gp43, que desempenha diferentes funções na patogênese do *P. brasiliensis*, como inibição da fagocitose e morte celular. A gp43 é o principal antígeno de diagnóstico de

paracoccidiodomicose, sendo reconhecida por 100% de soros de pacientes infectados (PUCCIA, 1991).

Foi observado que peptídeos derivados da molécula gp43 apresentaram atividade anti-inflamatória, inibindo significativamente o edema de pata promovido por injeção de *Micobacterium bovis*, tanto em camundongos como em ratos, mantendo o efeito durante sete dias de avaliação. *In vitro*, peptídeos inibiram a produção de NO por macrófagos estimulados com zymosan, bem como aumentaram a expressão de IL-10. Com efeito, notaram que peptídeos, componentes da molécula gp43 de *P. brasiliensis*, é capaz de modular a produção de importantes mediadores inflamatórios e esse efeito biológico parece estar relacionado com a interação com TLRs (KONNO et al.; 2009; KONNO et al.; 2012).

3. Processo Inflamatório

A resposta inflamatória é a primeira linha de defesa do organismo ao dano tecidual, um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares e celulares, bem como uma variedade de substâncias solúveis, exprimindo características como eritema, calor, edema, dor e incapacidade funcional. A resposta inflamatória acarreta uma cascata de eventos, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação do sistema complemento, aumento do influxo celular, produção de mediadores inflamatórios, ativação da cascata de coagulação, fibrinólise e alterações nos parâmetros hemodinâmicos e permeabilidade vascular (MOORE et al., 2001; CRUVINEL et al., 2010).

Ante uma inflamação ou infecção, os neutrófilos são células que fornecem respostas imediatas a lesões teciduais ou infecção, sensíveis a agentes quimiotáticos como produtos da clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e IL-8. Em uma inflamação aguda, os neutrófilos migram para o local em poucos minutos e permanecem por horas como a célula de defesa mais abundante. Suas principais funções são reconhecer, conter e matar patógenos invasores, bem como remover células danificadas, liberando produtos citotóxicos. Em resposta aos estímulos ambientais, neutrófilos aderem e migram através do revestimento endotelial por áreas permissivas da camada basal de vasos sanguíneos que alimentam a área afetada. Por estas razões, a capacidade dos neutrófilos de migrar para o

local da infecção ou lesão do tecido é essencial para uma resposta eficaz do sistema imune inato. Dessa forma, uma deficiência no processo de migração celular poderá acarretar infecções graves, muitas vezes letais. Componentes importantes para o desenvolvimento da imunidade inata são também os monócitos, que constituem 3-8% de leucócitos circulantes e dão origem a macrófagos. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos podem permanecer no tecido durante meses ou anos, atuando como verdadeiros sentinelas. Além de ter um papel na imunidade inata, os macrófagos processam e exibem antígenos, estimulando a resposta mediada por linfócitos T (SCHMIDT et al., 2011).

Outro evento importante presente no processo inflamatório é a ativação do sistema complemento, constituído por uma família de cerca de 20 glicoproteínas plasmáticas e cada componente ativado adquire atividade proteolítica, ativando os próximos elementos em cascata. Ao longo do processo, existe a produção de vários mediadores que alteram a permeabilidade vascular e contribuem para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Existem três formas de ativação do sistema complemento, pela via clássica, via alternativa e pela via da lectina, e a ativação destas vias contribuem para a interação de mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa (CRUVINEL et al., 2010).

3.1. Migração celular

A migração de células é dirigida pelo gradiente de substâncias quimiotáticas no sítio inflamatório. Quando estas células estão presentes no tecido, promovem a fagocitose de patógeno, permitindo a reparação (CRUVINEL et al., 2010). Na inflamação aguda, as principais células envolvidas são os neutrófilos e macrófagos; já a inflamação crônica é caracterizada por um infiltrado composto principalmente de células mononucleares como monócitos e linfócitos. Em decorrência da vasodilatação promovida pela inflamação, a velocidade do fluxo de sangue diminui e as células circulantes colidem com maior frequência com as células endoteliais, que, por sua vez, expressam moléculas de superfície capazes de se ligar a leucócitos, promovendo a migração celular, como visto na figura 3 (SCHMIDT et al., 2011).

Acredita-se que a migração de leucócitos envolve interações de L, E e P-selectinas com glicoproteína ligante de P-selectina (PSGL-1) e uma integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA4 – molécula de adesão de reconhecimento tardio) expressas pelo endotélio. As selectinas

ligam-se a moléculas glicosiladas, promovendo a adesão de baixa afinidade entre os leucócitos e células endoteliais. Estas ligações têm rápida dissociação, o que promove o rolamento na parede do vaso impulsionado pelo fluxo de sangue, expondo os leucócitos a fatores quimiotáticos. Portanto, o rolamento está relacionado com a capacidade de captura das selectinas e formação de ligações antes que as antigas sejam quebradas. Se o leucócito não for ativado, se desprende do endotélio e retorna à circulação venosa. A PSGL-1 é expressa em quase todos os leucócitos e tem papel dominante, atuando como ligante para as três selectinas (LEY et al., 2007; CHOI et al., 2010; CRUVINEL et al., 2010).

Em virtude da redução da velocidade de rolamento dos leucócitos, as quimiocinas, um grupo de pequenas citocinas, promovem uma ligação com seu receptor específico presente no leucócito, bem como a ligação com o grupo de carboidratos, como heparan sulfato, condroitin sulfato e ácido hialurônico, ativando a célula. Os receptores de quimiocinas são seletivamente expressos em determinadas populações de leucócitos e o perfil destes receptores depende do tipo de célula e seu estado de diferenciação. O endotélio ativado é capaz de liberar quimiocinas que atraem outras células, como a ativação de monócitos que, por sua vez, liberam IL-8, induzindo a quimiotaxia de neutrófilos e basófilos. Desta mesma forma, a ativação de macrófagos aumenta a liberação de leucotrieno B₄, outro agente quimiotático para neutrófilos (CRUVINEL et al., 2010).

As quimiocinas induzem mudanças em outro conjunto de adesinas, as integrinas, presente na superfície de muitas células, inclusive leucócitos. Integrinas são moléculas de adesão compostas por subunidades α e β , ambas com função de adesão e sinalização. A maioria dos leucócitos circulantes mantem suas integrinas em estado de afinidade muito baixa para moléculas de adesão celular (CAMs) no endotélio, no entanto, durante o processo inflamatório, as integrinas são moduladas para desenvolver uma ligação de alta avidéz, promovendo a imobilização dos leucócitos e aderência na parede do vaso. As CAMs são membros da família das imunoglobulinas, e incluem as moléculas de adesão intercelular (ICAM), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão celular adressina das mucosas (MADCAM-1) (ROSE, 2007).

Após a fixação no endotélio, os leucócitos podem migrar do espaço vascular, usando rota paracelular ou transcelular. Para a migração paracelular, o neutrófilo rasteja ao longo da superfície da célula endotelial onde se estende, interrompendo as junções intercelulares, o que promove a translocação da célula inteira por meio das junções entre as

células endoteliais. Para a migração transcelular, os leucócitos projetam estruturas de adesão ricas em actina, fazendo com que células endoteliais formem o “copo migratório”, que são projeções que envolvem a célula migratória. Em seguida, a célula endotelial forma uma cúpula em volta do leucócito, promovendo a transmigração. A seleção do modelo de transmigração leucocitária é dependente da exibição de moléculas específicas expressas na superfície de células endoteliais servindo de sinalização para indicar a rota de transmigração mais eficiente para o tipo específico de leucócito naquelas condições. Depois de atravessar o endotélio, a célula é capaz de responder a um novo conjunto de quimiocinas que medeiam a migração através do tecido (SCHMIDT et al., 2011).

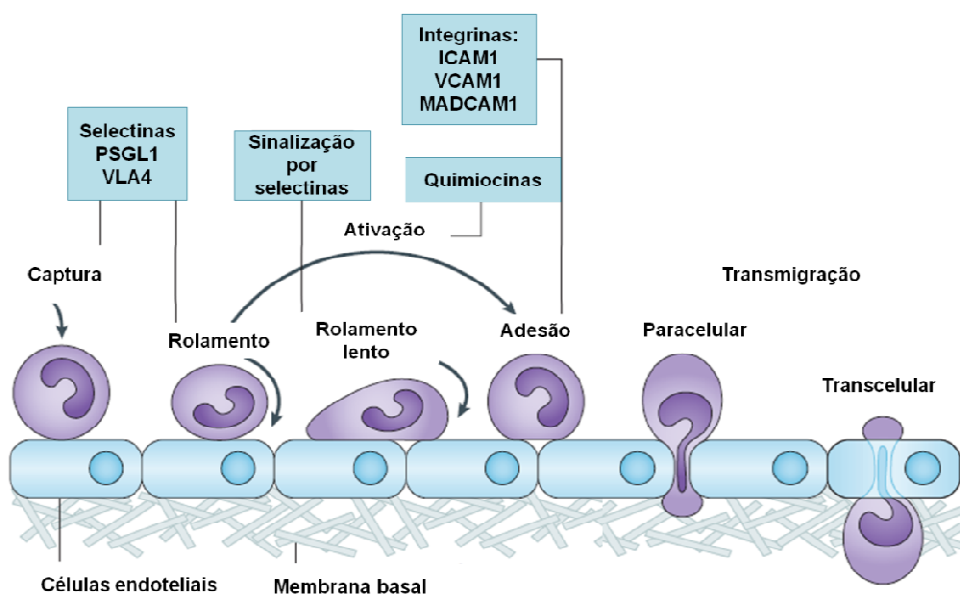


FIGURA 3. Migração leucocitária. A migração celular é iniciada pela captura e rolamentos mediado por selectinas, seguidas da ativação por quimiocinas. As integrinas promovem a adesão ao epitélio, incentivando a transmigração transcelular ou paracelular. Moléculas-chave envolvidas em cada passo são indicadas em caixas. PSGL1 - glicoproteína ligante de P-selectina; VLA4 – molécula de adesão de reconhecimento tardio; ICAM - moléculas de adesão intercelular; VCAM1 - molécula de adesão celular vascular-1; MADCAM1 - molécula de adesão celular adressina das mucosas. Figura modificada de Ley et al., 2007.

3.2. Mediadores inflamatórios

Mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, fragmentos de clivagem do sistema complemento, prostaglandinas, leucotrienos etc, estão envolvidos na resposta inflamatória. Estudos mostram que uma cascata de citocinas é liberada antes do envolvimento desses mediadores inflamatórios (CUNHA et al., 2005).

Citocinas são pequenas proteínas reguladoras liberadas diante de um estímulo inflamatório, com suporte em uma grande variedade de células que modulam a interação célula-célula, participando de processos como reconhecimento imunológico, sinalização local ou sistêmica da inflamação, bem como na diferenciação, crescimento e metabolismo das células. As citocinas podem desencadear uma grande variedade de respostas celulares, que dependem do tipo de célula, do momento e do ambiente molecular em que se encontram. Podem se ligar a receptores presentes nas células em que foram produzidas (efeito autócrino), bem como em receptores de outras células (efeito parácrino). Muitas vezes, são classificadas de acordo com a sua capacidade funcional de contribuição para a inflamação em citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-18 e IFN- γ ou anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13 e fator de transformação do crescimento (TGF- β) (CUNHA et al., 2005; VERRI JR. et al., 2006).

Diferentes tipos de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, células B e células T ativadas, produzem IL-1 β , que, por sua vez, induz a produção de outros mediadores inflamatórios. Demonstra-se que a IL-1 β está envolvida em várias características de inflamação, tais como o recrutamento de células brancas do sangue, febre, aumento da permeabilidade de vasos sanguíneos e estimulação da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e a posterior liberação dos seus produtos, como prostaglandinas (VERRI JR. et al., 2006). Em conjunto com a IL-1 β , a citocina TNF- α desempenha papel central na iniciação e propagação dos eventos inflamatórios. TNF- α é uma citocina potente que exerce efeitos diversos, estimulando uma variedade de células, produzida principalmente por monócitos e macrófagos, mas também por células B, células T e fibroblastos. A ação mais estudada desta citocina é a capacidade de promover inflamação como estimulador de outras citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e IL-8. Esta citocina também contribui para a inflamação, estimulando fibroblastos a expressar moléculas de adesão, que, por sua vez, interagem com seus respectivos ligantes na superfície de leucócitos, aumentando o transporte de leucócitos em locais de inflamação (CHOY, 2001).

Outro mediador importante para o desenvolvimento da resposta imune é o IFN- γ , agindo contra microorganismos intracelulares e parasitas. Essa citocina é liberada em resposta a um agente patogênico associado a um padrão molecular e age promovendo respostas imunes celulares, ativando células *natural killer* (NK) e macrófagos, aumentando a expressão de moléculas MHC e promovendo a migração de leucócitos. Essa citocina é característica da resposta imunológica do tipo Th1 (GEORGE et al., 2012).

Mais recentemente, estudos mostram o envolvimento da IL-17 como citocina pró-inflamatória. É sintetizada por células Th17, caracterizando uma nova população de células T *helper* que se distingue das populações de células Th1 e Th2, expressando um padrão único de expressão de citocinas (KARMAKAR, 2010). A IL-17 tem papel regulador na inflamação, estimulando a secreção de citocinas como IL-6 e IL-8, fatores de crescimento associados com inflamação e aumento da expressão de proteínas do complemento, contribuindo para a patogênese de várias doenças inflamatórias, incluindo a artrite reumatoide (YAO et al., 1995; KATZ et al., 2000).

Enquanto muitas citocinas promovem a inflamação, outras inibem esse processo. Uma das principais citocinas anti-inflamatórias descritas é a IL-10, produzida por monócitos, macrófagos, células T e B. Tem a capacidade de inibir a produção de várias citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , e regulam negativamente a expressão de IL-17 e IL-22 em macrófagos e células T, o que torna crucial para sua atividade anti-inflamatória. Além de inibir a produção desses efetores da inflamação, a IL-10 também aumenta a expressão de seus antagonistas naturais, como, por exemplo, o antagonista do receptor de IL-1 β e TNF- α por monócitos ativados (CHOY, 2001; GU et al., 2008).

3.3. Dor Inflamatória

Um sinal clássico de inflamação é a dor, alvo terapêutico para o tratamento de patologias inflamatórias. A dor pode ser definida como uma percepção desagradável de uma sensação nociceptiva e envolve dois componentes - nocicepção e percepção. A dor perceptiva é uma função modulada por motivos emocionais, condições psicológicas e histórico. Já a nocicepção resulta da ativação de determinados neurônios sensitivos

primários, que transmitem a informação nociceptiva para a medula espinhal de onde é transmitida para níveis supraespinhais (JULIUS, 2001).

Em seres humanos, a sensibilização dos nociceptores pode ser definida em duas categorias - hiperalgesia, definida como uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo previamente doloroso, e alodínia, dor provocada por um estímulo que normalmente não resulta em dor. Estas características de alterações patológicas das vias de sensação dolorosa não podem ser observadas em modelos experimentais de nociceção animal. Por esse motivo, o termo hipernociceção é usado mais adequadamente quando estudos em animais se referem à sensibilização neuronal presente em modelos de inflamação (VERRI JR. et al., 2006).

Com o objetivo de elucidar mecanismos celulares subjacentes à dor inflamatória, estuda-se o envolvimento de estímulos inflamatórios na promoção da dor. Cunha et al. (2005) demonstraram que os estímulos inflamatórios não induzem diretamente a liberação de prostaglandinas e aminas simpáticas e que a liberação de mediadores hipernociceptivos finais é precedida por uma cascata de citocinas e quimiocinas, que, por sua vez, é modulada pela liberação paralela de citocinas anti-inflamatórias.

Células residentes, incluindo as células dendríticas, macrófagos, linfócitos e mastócitos, após o reconhecimento de estímulos inflamatórios, liberam uma cascata de citocinas, que desempenham papel essencial no desenvolvimento da dor inflamatória. As primeiras citocinas envolvidas no desenvolvimento da dor inflamatória ou neuropática descritas foram IL-1 β , TNF- α , e as quimiocinas IL-8 e quimiocinas derivadas de queratinócitos (VERRI JR. et al., 2006).

A participação de IL-1 β na indução da hipernociceção inflamatória, mediada por prostanoídes foi demonstrada em modelos de inflamação, como a administração local de carragenina ou lipopolissacarídeo (LPS), a qual foi inibida parcialmente pela administração de anticorpo contra IL-1 β em camundongos (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1992; CUNHA et al., 2005). A participação de TNF- α na hipernociceção foi observada quando camundongos deficientes de receptores para TNF- α exibiram uma redução da hipernociceção inflamatória induzida por carragenina ou por TNF- α (CUNHA et al., 2005). Estudo semelhante, realizado pelo mesmo grupo, demonstrou a participação de

quimiocinas no desenvolvimento da hipernocicepção mecânica induzida por carragenina, com a inibição parcial da dor após administração de anti-IL-8 (CUNHA et al., 1991).

Posteriormente foi relatada a participação das citocinas IL-17, IL-18 e IL-12 na hipernocicepção inflamatória. Foi demonstrado que a injeção intraplantar de IL-12 induz hipernocicepção em ratos, via endotelina. Outro estudo, mostrou a participação da IL-17 em artrite induzida por antígeno, onde a concentração dessa citocina foi elevada nas articulações que receberam o estímulo, e o tratamento com o anticorpo anti-IL-17 inibiu a hipernocicepção e a migração de neutrófilos (VERRI JR. et al. 2005; VERRI JR. et al., 2006; PINTO et al., 2010).

4. Modelo experimental

4.1. Artrite induzida por zymosan (AZy) em murino.

O zymosan é um polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, e é muito utilizado como agente inflamatório (GADÓ, 1991). A administração intra-articular das partículas de zymosan é capaz de promover intensa reação inflamatória com aumento do influxo celular, edema e distúrbios na marcha (ROCHA, 1999).

Este modelo foi descrito pela primeira vez, em 1977, por Keystone et al. Nesse estudo, foi observada uma artrite inflamatória crônica com infiltração de células mononucleares, hipertrofia sinovial e transformação da membrana sinovial em um tecido inflamatório com propriedades invasivas, definido como *pannus*. Este quadro é observado com sete dias após a injeção de zymosan intra-articular (i.a.), comparando com partículas de látex, que por sua vez, produziu apenas leves e transitórias reações inflamatórias.

4.2. Mecanismos envolvidos na AZy

A administração de partículas de zymosan é capaz de induzir a liberação de enzimas lisossomais com origem em macrófagos e ativam o sistema complemento por meio da via alternativa, promovendo reação inflamatória aguda, caracterizada

principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular e infiltração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos). Na AZy, a migração de neutrófilos demonstra um pico de seis horas e persiste por até três dias. Estas células são predominantes em várias artropatias inflamatórias e, além de propriedades fagocíticas, liberam mediadores inflamatórios como eicosanoides, citocinas, metaloproteinases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SCHORLEMMER, 1977; HAMPTON, 1998). Posteriormente, ocorre uma sinovite progressiva crônica, com infiltração de células mononucleares, havendo formação de células gigantes, neoformação vascular e proliferação de fibroblastos, acompanhada da perda de proteoglicanos com suporte na matriz da cartilagem e invasão do osso subcondral, assemelhando-se ao *pannus* reumatoide (ROCHA et al., 1999).

Estudos anteriores sugerem que os fatores responsáveis pela hipernocicepção em modelos experimentais podem ser diferentes daqueles envolvidos em fenômenos inflamatórios, tais como alteração na permeabilidade vascular e influxo de células (OTTERNESS, 1993). Originalmente, descrito em outro modelo de artrite, a incapacitação articular (IA), que corresponde à alteração da marcha dos animais, mostrou-se reprodutível na AZy. A IA é um fenômeno tipicamente agudo, que declina após quatro horas de artrite, cessando após 12 horas (ROCHA et al., 2003). A hipernocicepção observada na AZy aguda não está relacionada com a migração de neutrófilos para o exsudato sinovial, originando-se da sensibilização aguda de nociceptores locais no tecido periarticular (ROCHA, 1999, SILVA JR. 2006). Neutrófilos, no entanto, também têm a capacidade de liberar prostaglandinas com pico de seis horas, que, por sua vez, são compostos hiperalgésicos, bem como a liberação de outros mediadores envolvidos na dor inflamatória como leucotrieno B₄ (BEZERRA et al., 2007).

Dentro de articulações inflamadas, uma variedade de células, além dos neutrófilos, é fonte potencial desses mediadores, incluindo sinoviócitos, condrócitos, mastócitos e monócitos. A resposta inflamatória desencadeada por zymosan está ligada a um conjunto de receptores, entre eles, o receptor dectin-1, receptor de membrana expresso em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos e medeia a ligação de antígenos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Cândida albicans* de uma forma β -glucano-dependente mostrando função pró-inflamatória (BROWN et al., 2003). Em 2005, Frasnelli et al. relatam que TLRs representam uma das principais vias de sinalização pró-inflamatória para AZy, necessária para o desenvolvimento de uma resposta imune específica para o

zymosan. A ativação desses receptores, por sua vez, induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α e TNF- β .

Durante condições inflamatórias, grandes quantidades de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido (O²⁻) são produzidos, levando à formação de forte produto oxidante, o peroxinitrito (PN), o qual foi associado com efeitos lesivos decorrentes da nitrosilação de proteínas, promovendo a desestabilização de membranas e quebras de DNA (BEZERRA et al., 2007). Na AZy, a liberação de NO no líquido sinovial e a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é máxima na 6^a hora após a injeção do estímulo, e estão diretamente relacionadas com a migração de neutrófilos (ROCHA et al., 1999). Os níveis de nitrito total permanecem elevados no exsudato sinovial durante três semanas, embora o níveis mais elevados sejam observados durante a fase aguda do modelo (BEZERRA et al., 2004).

Ensaio que aborda o papel dual do NO na inflamação por zymosan demonstrou que inibidores de óxido nítrico sintase (NOS) promovem redução do influxo celular e antinocicepção, quando administrado antes da indução da artrite. Em contraste, a administração de doadores de NO, como nitroprussiato de sódio, exibe analgesia em dor contínua de forma dose-dependente. Ainda, a depleção de PN por ácido úrico inibiu a lesão da cartilagem articular (ROCHA et al., 2003).

Na lesão da cartilagem encontrada em AZy, há um envolvimento de múltiplos mecanismos, além da liberação de PN. Condrócitos, osteoclastos e fibroblastos liberam metaloproteinases, promovendo a degradação de componentes da matriz cartilaginosa, como, por exemplo, a colagenase, que promove a clivagem de colágeno do tipo II, tornando a cartilagem mais susceptível à degradação, bem como as condroitinases, que degradam condroitin-sulfato (STOOP et al., 1999). A quantificação de glicosaminoglicanos (GAG) no exsudado articular é utilizada como um indicador da lesão articular na artrite (ISHIMARU et al., 2001). Utilizando o modelo de AZy, Bezerra et al. (2004) demonstraram uma cinética da perda de GAG induzida nesse modelo. Danos na cartilagem não foram observados nos primeiros quatro dias após a administração de zymosan, no entanto, ao longo de 17 dias, foi observada significativa perda de matriz cartilaginosa. Em 2002, Rocha et al. associou a gravidade da sinovite na AZy com a redução na quantidade de GAG na matriz da cartilagem, de tal forma que a partir do sétimo

dia após a indução da artrite, essa quantidade foi significativamente menor, em comparação aos valores basais, persistindo até o 21º dia de artrite.

JUSTIFICATIVA

Vários estudos mostram o potencial anti-inflamatório e imunomodulador de componentes derivados de fungos. A busca pela atividade anti-inflamatória dos constituintes fúngicos geralmente se concentra em espécies não patogênicas. A imunomodulação, no entanto, é também uma estratégia empregada por patógenos para escapar das defesas do hospedeiro como observado no *Coccidioides* spp., um fungo causador da coccidioidomicose e altamente virulento que secretam um antígeno imunodominante capaz de modular o sistema imune via Th2 (HUNG et al., 2007). *Coccidioides* spp. podem, no entanto, também secretar antígenos que estimulam ou suprimem a imunidade mediada por células, dependendo do método de preparação de antígeno (BRASS et al., 1982). Como citado há pouco, componentes de fungos patogênicos e/ou seus produtos liberados podem provocar mudanças imunológicas no hospedeiro. Dessa forma, houve interesse em investigar se a administração sistêmica de um extrato proveniente de uma cepa de *C. posadasii*, isolada por nosso grupo, altera e modula a resposta inflamatória induzida pela injeção de zymosan nas articulações de ratos e camundongos.

HIPÓTESE CIENTÍFICA

O extrato originado de *Coccidioides posadasii* desenvolve uma resposta anti-inflamatória e imunomoduladora em processos inflamatórios, agudo e crônico, em artrite induzida por zymosan, independente da espécie.

OBJETIVO

Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora de um extrato de *Coccidioides posadasii* em um modelo experimental animal de artrite induzida por zymosan.

Objetivos específicos

- Realizar a caracterização preliminar por meio do perfil eletroforético de proteínas e carboidratos carregados do extrato de *C. posadasii*.
- Realizar uma curva dose-resposta, de acordo com a concentração proteica do extrato de *C. posadasii*, em ratos e camundongos.
- Determinar o influxo celular em ratos e camundongos com artrite induzida por zymosan, na fase aguda e crônica, pré-tratados com o extrato de *C. posadasii*, administrados via intraperitoneal e oral.
- Analisar a hipernocicepção em ratos com artrite induzida por zymosan, na fase aguda e crônica, pré-tratados com o extrato de *C. posadasii* por via intraperitoneal e oral.
- Analisar o dano na cartilagem articular de ratos com artrite induzida por zymosan, pré-tratados com o extrato de *C. posadasii*.
- Avaliar as alterações histopatológicas sinoviais em camundongos com artrite induzida por zymosan, pré-tratados com o extrato de *C. posadasii*.
- Avaliar a proteção contra a morte celular em camundongos com artrite induzida por zymosan, pré-tratados com o extrato de *C. posadasii*.
- Determinar o envolvimento da iNOS em camundongos com artrite induzida por zymosan, pré-tratados com o extrato de *C. posadasii*.
- Determinar os níveis intra-articular das citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-10, no lavado articular, em camundongos submetidos à artrite por zymosan, pré-tratados com extrato de *C. posadasii*.

CAPÍTULO I

Efeito anti-inflamatório sistêmico e imunomodulador de um extrato de *Coccidioides posadasii* em artrite experimental

Systemic anti - inflammatory and immunomodulatory effect of an extract of *Coccidioides posadasii* in experimental arthritis

Periódico: *Mycopathologia* (Aceito em janeiro de 2013)

Nº do manuscrito: MYCO-D-12-02148R2

RESUMO

Tentando superar as defesas do hospedeiro, infecções fúngicas alterar a resposta imune. Componentes presentes em fungos patogênicos apresentam efeitos terapêuticos como atividades anti-inflamatória e imunomoduladora. Este estudo revela que as proteínas presentes no extrato de *Coccidioides posadasii* proporcionam benefícios anti-inflamatórios na artrite experimental. Zymosan foi dado intra-articular em ratos e camundongos e grupos foram pré-tratados com extrato de *C. posadasii* intraperitoneal ou per se. Os controles receberam o veículo. Hipernocicepção aguda foi avaliada através incapacitação articular e método de von Frey. Influxo celular e níveis de citocinas foram avaliados em exsudatos sinovial. Dano articular foi avaliada por histopatologia e pela determinação do teor de glicosaminoglicanos da cartilagem. Sinóvias foram avaliadas para a morte celular e expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), utilizando TUNEL e imunohistoquímica, respectivamente. Pré-tratamento com o extrato de *C. posadasii* inibiu significativamente o influxo celular na fase aguda e crônica, e a hipernocicepção e provocou redução de perda de glicosaminoglicanos, reduziu a sinovite crônica, morte celular e expressão iNOS. Redução / alquilação do extrato de *C. posadasii* revogada esses efeitos. A administração de *C. posadasii* não alterou os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-17 e de interferon- γ enquanto que os níveis de IL-10 foi significativamente reduzida. Os dados revelam que um extrato de *C. posadasii* reduz a expressão de iNOS que está associado com a inibição da apoptose sinovial e diminuição dos níveis de IL-10 articulações inflamadas por zymosan. Caracterização dos componentes ativos excluiu carboidratos carregados, enquanto que aponta para uma proteína como responsável por estes efeitos. Em resumo, a administração sistêmica de componentes a partir de um fungo patogênico proporciona efeitos anti-inflamatórios, sendo independente da espécie, permanecendo ativo quando administrado por via oral. Além de colaborar o entendimento sobre a resposta do hospedeiro contra os fungos, os resultados podem levar a implicações terapêuticas.

Palavras-chave: *Coccidioides*, citocinas, interleucina-10, óxido nítrico; fungos; apoptose.

Abstract

Trying to surpass host defences, fungal infections alter the immune response. Components from nonpathogenic fungi present therapeutic anti-inflammatory and immunomodulating activities. This study reveals that proteins present in a *Coccidioides posadasii* extract provide antiinflammatory benefit in experimental arthritis. Zymosan was given intra-articularly to rats and mice and groups were pretreated with *C. posadasii* extract either *per os* or intraperitoneally. Controls received the vehicle. Acute hypernociception was evaluated using articular incapacitation and von Frey methods. Cell influx and cytokines levels were assessed in joint exudates. Joint damage was evaluated by histopathology and determination of glycosaminoglycan content of the cartilage. Synovia were evaluated for cell death and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression using TUNEL and immunohistochemistry, respectively. Pretreatment with *C. posadasii* extract significantly inhibited acute and chronic cell influx, hypernociception and provoked reduction of glycosaminoglycan loss while reducing chronic synovitis, cell death, and iNOS expression. Reduction/alkylation of *C. posadasii* extract abrogated these effects. *C. posadasii* administration did not alter TNF- α , IL-1 β , IL-17, and γ -interferon levels whereas IL-10 levels were significantly reduced. Data reveal that a *C. posadasii* extract reduces iNOS expression that is associated to inhibition of synovial apoptosis and decrease of IL-10 levels released into zymosan-inflamed joints. Characterization of active components excluded charged carbohydrates while pointing to a protein as responsible for these effects. In summary, systemic administration of components from a pathogenic fungus provide antiinflammatory effects, being species-independent and orally active. Besides adding to understand host response against fungi, the results may lead to therapeutic implications.

Key words: *Coccidioides*; cytokines; interleukin-10; nitric oxide; fungus; apoptosis.

Antiinflammatory and immunomodulatory effect of an extract of *Coccidioides posadasii* in experimental arthritis

Ana Carolina Matias Dinelly Pinto^a, Rossana de Aguiar Cordeiro^b, José Julio Costa Sidrim^b, Ana Karine Rocha de Melo Leite^a, Ana Caroline Rocha de Melo Leite^a, Virgínia Cláudia Carneiro Girão^c, Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante^b, Marcos Fábio Gadelha Rocha^b, Fernando de Queiroz Cunha^d, Francisco Airton Castro Rocha^{a*}.

^aDepartment of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

^bSpecialized Medical Mycology Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

^cDepartment of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

^dDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author:

Francisco Airton Castro Rocha

Rua Doutor José Lourenço 1930, 60115-281, Fortaleza, CE, Brasil.

Phone: +55 85 3366 8243; FAX: +55 85 3244 6215.

E-mail address: arocha@ufc.br (F.A.C. Rocha)

Introduction

Several studies have shown the antiinflammatory and immunomodulating potential of fungal components. Polysaccharides, proteins, lipids, as well as secondary metabolites, such as triterpenes and phenols, have been described as molecules with immunomodulatory properties [1]. While displaying diverse structure, most fungal polysaccharides belong to β -glucans, which can be chemically modified in order to improve their biological potency. Though the exact mechanism of action of bioactive fungal components is unknown a common pathway involves the activation of T-lymphocytes and macrophages, thus altering the cytokine repertoire released in the inflammatory response [2].

Differences in the prevalence of allergic and autoimmune diseases between highly industrialized countries and underdeveloped nations have been associated with a lower prevalence of infections [3]. Less exposure to house dust, high ingestion of industrialized food, diminished breast-feeding, and increased vaccination would decrease stimulation to “real-life” germs [4]. In keeping with this assumption, we have demonstrated that the administration of a nematode (*Ascaris suum*) extract was protective in arthritis models, provoking a decrease in the hypernociceptive response, cell migration, structural damage, and histological changes. These effects were coupled to an alteration in the release of cytokines into the joint exudates [5].

Attempts to demonstrate antiinflammatory activity of fungi constituents or released products usually focus on non-pathogenic species. However, immunomodulation is also a strategy employed by pathogens to escape host defenses. The highly virulent fungi *Coccidioides immitis* / *C. posadasii* are the etiological agents of coccidioidomycosis, a severe disease that occurs in both humans and animals. *Coccidioides* species secrete an immunodominant antigen which is able to modulate host immunity in a Th2-biased manner [6]. However, *Coccidioides* can also secrete endosporulation antigens that stimulate or suppress cell-mediated immunity, depending on the antigen preparation method [7].

Our group is based in Ceará state (northeast of Brazil) and we have identified and characterized a *C. posadasii* strain isolated both from the bronchoalveolar lavage of affected patients as well as from the soil. In our region, the unprotected practice of

armadillo (*Dasypus novemcinctus* and *Euphractus sexcinctus*) hunting exposes both humans and dogs to large amounts of dispersed *Coccidioides* spp. arthroconidia [8].

Zymosan is derived from *Saccharomyces cerevisiae*. When injected into joints, zymosan promotes a severe and chronic arthritis that resembles rheumatoid arthritis [9, 10]. Coupling to toll – like receptors, Dectin-1 receptors and also mannose binding lectins are involved in zymosan inflammation [11], thus opening the possibility of studying both innate and adaptive *in vivo* immune mechanisms in this arthritis model.

As said above, components from pathogenic fungi and/or their released products may provoke immunomodulatory changes as they encounter the host immune system. The objective of the present study was to investigate whether the systemic administration of an extract from our *C. posadasii* strain modifies the inflammatory response induced by injection of zymosan into rat and mouse joints.

Materials and Methods

Animals

All animal procedures and experimental protocols were approved by the local ethics committee on animal experimentation at the Faculty of Medicine of the Federal University of Ceará, Brazil (protocol number – 90/07). All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used. The animals were housed in temperature-controlled rooms with 12 h light / dark cycles and free access to water and food. Surgical procedure and animal treatments were conducted in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health Publication).

Induction of the zymosan arthritis (ZYA)

Male Wistar rats (180 - 200 g) or Swiss mice (25 - 30 g) (n = 6 per group) from our own animal facilities were used throughout the experiments. Rats or mice received an intra-articular (i.a.) injection of either 1 mg (0.05 ml total volume) or 0.1 mg (0.025 ml total volume) zymosan (Sigma, St. Louis, MO, USA), respectively, dissolved in sterile saline, into their right knee joints. Control groups received only saline i.a. [5].

Evaluation of joint hypernociception

We used the rat knee joint incapacitation test, as described previously, as one of the measures of the inflammatory joint hypernociception [9]. Briefly, after zymosan injection, rats were put to walk on a steel rotary drum (30 cm wide x 50 cm diameter) that rotates at 3 rpm. Specially designed metal gaiters were wrapped around both hind paws. After placement of the gaiters, the animals were allowed to walk freely for habituation. The right paw was then connected via a simple circuit to a microcomputer data input / output port. The paw elevation time (PET) is the time for which, over a 60 s period, the inflamed hind paw is not in contact with the cylinder. This is directly proportional to the articular incapacitation. The PET was measured at baseline and then hourly, until sacrifice, at 6 h. Results (s / 1 min) are reported as the maximal PET that occurs between 3 and 4 h after injection of the zymosan.

For evaluation of joint hypernociception by the electronic von Frey method, rats were placed in acrylic cages (12 x 10 x 17 cm high) with a wire grid floor 20 - 30 min before testing. During this adaptation period, the paws were poked 2 - 3 times. Before right paw stimulation, the animals were quiet, without exploratory movements or defecation and not resting on their paws. In these experiments, we used a pressure-meter which consisted of a hand-held force transducer fitted with a 0.5 mm² polypropylene tip (Electronic von Frey anesthesiometer, Insight Equipamentos Científicos Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). The investigator, blinded to the treatment protocol (see below) was trained to apply the polypropylene tip perpendicularly to the central area of the hind paw with a gradual increase in pressure. The test consisted of poking the right hind paw to provoke a flexion reflex followed by a clear flinch response after paw withdrawal. In the electronic pressure-meter test the intensity of the stimulus was automatically recorded when the paw was withdrawn. The stimulation of the paw was repeated until the animal presented three similar measurements. Results are expressed as the mean of the mechanical threshold (g) after 3 stimulations (pokes) at each time-point [12].

Collection of synovial exudates and analysis of cell influx, cytokines, and nitric oxide (NO) levels in the joint exudates

At 6 h (acute phase) or 7 days (chronic phase) after injection of the zymosan, the animals were anesthetized with chloral hydrate (400 mg / kg intra-peritoneal -i.p.), killed by cervical dislocation, and exsanguinated. The synovial cavity of the knee joints was then washed twice with 0.2 ml (rats) or 0.05 ml (mice) saline containing 10 mM EDTA. The synovial exudates were collected by aspiration and total cell counts were performed using a Neubauer chamber. After centrifugation (500 g / 10 min), the supernatants were stored at - 80 °C and used for determination of cytokine release. The concentrations of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)- 1 β , IL-10, IL-17, and γ -interferon (γ -IFN) were measured in the synovial exudates obtained 6 h after zymosan injection in rats and mice, using a commercially available ELISA kit (R&D Systems, São Paulo, SP, Brasil).

Synovial histopathology

After sacrifice, the synovia were excised, fixed in 10 % buffered formaldehyde, and processed for routine hematoxylin - eosin (HE) staining. Semi quantitative histopathological grading was performed by one independent pathologist blinded to group allocation according to the presence of edema, synovial proliferation, cell infiltration, proliferation of blood vessels, fibrosis and stage of the disease, ranging from 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate; 3, severe) for each parameter. The maximal total score was 18. Results are expressed as the median (variation) value for each group of six animals [5].

Immunohistochemistry for inducible nitric oxide synthase (iNOS) detection

The synovial samples were used to assess the expression of the iNOS enzyme, using a commercially available rabbit anti-NOS2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Briefly, after deparaffinization, the tissues were incubated with hydrogen peroxide and washed. After incubation in citrate buffer, specimens were subjected to slight heating in a microwave oven. After overnight unspecific blocking with rabbit serum, the samples were incubated with the rabbit anti-NOS2 antibody (diluted 1:200 in PBS plus 1% of BSA, 2 h). After rinsing, the sections were incubated with a secondary biotinylated anti-rabbit IgG antibody. The reaction product was detected using Envision™ System-HRP (AEC) complex (DAKO, Carpinteria, CA, USA), and the color of the reaction was developed with diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAKO,

Carpinteria, CA, USA). The slides were counterstained with Mayer's Hematoxylin. The intensity of the staining was analyzed under light microscopy, by counting the number of positive cells / 10 randomly selected fields and were scored as follows: 0 = no staining; 1 = low intensity staining in < 50 % of the cells; 2 = intense staining in < 50 % of the cells; 3 = intense staining in > 50% of the cells. Results are expressed as the median (variation) value for each group of six animals.

Evaluation of cell death *in vivo*

We used the ApopTag Plus Peroxidase In Situ Detection Kit (Serologicals Corp., Norcross, GA, USA) for TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) in order to detect apoptosis in the synovial specimens. The ApopTag Plus Peroxidase In Situ Detection Kit distinguishes apoptosis from necrosis by specifically detecting DNA cleavage and chromatin condensation associated with apoptosis. However, cells that morphologically appear to be necrotic may stain lightly. In addition, DNA fragmentation can be absent or incomplete in induced apoptosis. Therefore, the results were presented as TUNEL positive cells [13]. Paraffin-embedded synovial samples sections were hydrated and incubated with 20 µg / ml of proteinase K (Sigma, Brasil) for 15 minutes at room temperature (RT). Endogenous peroxidase was blocked by treatment with 3 % (wt / vol) hydrogen peroxide in PBS for 5 minutes at RT. Slides were then washed with PBS and sections were incubated in a humidified chamber at 37 °C for 1 h with TdT buffer containing TdT enzyme and reaction buffer. Samples were then incubated for 10 min at RT with a stop / wash buffer and then incubated in a humidified chamber for 30 min with anti-digoxigenin-peroxidase conjugate at RT. Following washing several times in PBS, the slides were covered with peroxidase substrate to develop color and then washed in three changes of distilled H₂O and counterstained in 0.5% (vol / vol) methyl green for 10 minutes at RT. Cell apoptosis was measured by counting the number of TUNEL positive cells in 10 randomly selected fields from each sample, under light microscopy. Thus, TUNEL positive cells represent apoptotic cells and possibly some necrotic cells. Data are presented as the means ± s.e.m. of stained cells / group.

Assessment of articular cartilage damage

The glycosaminoglycan (GAG) content of the articular cartilage was determined as follows: the cartilage of the distal femoral extremities was excised. The samples were

weighed after drying overnight at 80 °C. The material was subjected to proteolysis using Prolav 750 (Prozyn, São Paulo, SP, Brazil) and further precipitation in absolute ethanol, followed by dilution in distilled water. This material was separated on a 0.6 % agarose gel-electrophoresis. After staining with 0.1 % toluidine blue, quantitation was made by densitometry (525 nm). For comparison, standards of chondroitin 4 - sulfate and chondroitin 6 - sulfate were subjected to the same protocol. Data were expressed as µg GAG / mg of dried cartilage [14].

Preparation of the *C. posadasii* extract

The antigenic extract was prepared with a *C. posadasii* strain (CEMM 01-6-085) isolated in Ceará State (Brazil) from a clinical source. The isolate belongs to the Specialized Medical Mycology Center (CEMM) culture collection and was identified by mycological analysis. In brief, cultures of the mycelia phase were grown in a 2 % glucose / 1 % yeast extract broth for approximately 30 days at 30 °C. Each culture was killed with 0.2 g thimerosal / l (ethylmercurithosalicylic acid sodium salt; Synth, São Paulo, SP, Brasil) and the supernatant was collected by paper filtration. Protein was precipitated with solid ammonium sulfate (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) until the filtrate reached 90 % saturation. The mixture was kept at 4 °C for 24 h, and then the precipitated proteins were recovered by centrifugation and dialysed exhaustively against a 10 x volume of distilled water using a dialysis membrane with a 10 kD molecular mass cut - off [15]. As a separate step to denature proteins present in the extract, a sample of the dialysate was subjected to a reducing process, by incubating with 45 mM dithiothreitol (DTT) for 1 h, at 56 °C, followed by alkylation with 100 mM iodoacetamide for 3 h, at room temperature. The dialysates were stored at - 20 °C until use [16].

Characterization of components in the *C. posadasii* extract

As an initial attempt to identify proteins present in the *C. posadasii* extract it was run on a silver-stained polyacrylamide gel (12 %) electrophoresis in glycine buffer. The presence of charged carbohydrates was investigated by separating the *C. posadasii* extract in a 6 % (wt / vol) polyacrylamide gel electrophoresis in diamminopropane acetate buffer (50 mM [pH 9.0]). This gel was stained with a 0.1 % (wt / vol) toluidine blue solution. For comparison, high - and low - molecular - weight standards (Bio-rad, São Paulo, SP, Brasil)

as well as standard chondroitin 4 - sulfate and chondroitin 6 - sulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA) were subjected to the same protocols, as indicated.

Treatments

Test groups received the *C. posadasii* extract, dissolved in sterile saline, either i.p. or *per os* (p.o.) 30 min prior to the i.a. injection of zymosan. The amount of extract to be administered was based on protein content, using the Bradford method [17]. After obtaining a dose - response curve (10 - 100 µg) in mice or rats, groups of animals received the reduced / alkylated extract in order to test for the activity of protein components, as follows: to reduce disulfide bonds, 100 mM DTT was added to a final concentration of 10 mM in the protein solutions and incubated for 1 h at 56°C in the dark. Free thiol (-SH) groups were subsequently alkylated with iodoacetamide (50 mM final concentration) for 45 minutes at room temperature. In order to rule out the effect of an irrelevant protein, a group of animals subjected to ZYA received 100 µg bovine serum albumin (BSA), either i.p. or p.o.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM) or medians (range), as appropriate. Differences between means and medians were analyzed using one - way analysis of variance followed by Tukey's test or Kruskal-Wallis test, respectively. $P < 0.05$ was considered significant.

Results

C. posadasii extract reduced cell influx in acute and chronic ZYA in rats and mice.

Administration of zymosan into the joints of rats and mice induced cell influx into the joint cavity that was most intense at 6 h, with predominance (> 85 %) of polymorphonuclear cells. At 7 days, cell counts in joint exudates were less pronounced, with mononuclear cells being predominant [9]. Figure 1 shows that administration of the *C. posadasii* extract, either i.p. or p.o., significantly and dose - dependently reduced cell

influx in the acute and chronic phase of ZYA in both species, as compared to vehicle - treated animals. Moreover, the isolated administration of the *C. posadasii* extract to naïve animals did not alter cell counts. In order to exclude endotoxin contamination, we should stress that both the extract as well as BSA solution were prepared under sterile conditions and filtered before administration. Additionally, incubation of *C. posadasii* extract with polymyxin did not modify its effects on acute cell influx (data not shown). Also, the fact that the extract was effective after being given orally *per se* excludes the possibility of endotoxin contamination as responsible for the effects observed. In an attempt to demonstrate that a protein component is responsible for the effect observed with the *C. posadasii* extract, we subjected the extract to a reducing / alkylating process, a step that denatures proteins containing disulfide bridges. As shown in Fig. 1e, administration of the extract following this protein - denaturing process led to a significant reduction of the effect observed with the crude extract. The administration of a 100 µg BSA solution given as an irrelevant protein either p.o. or i.p. did not alter hypernociception or cell influx (data not shown).

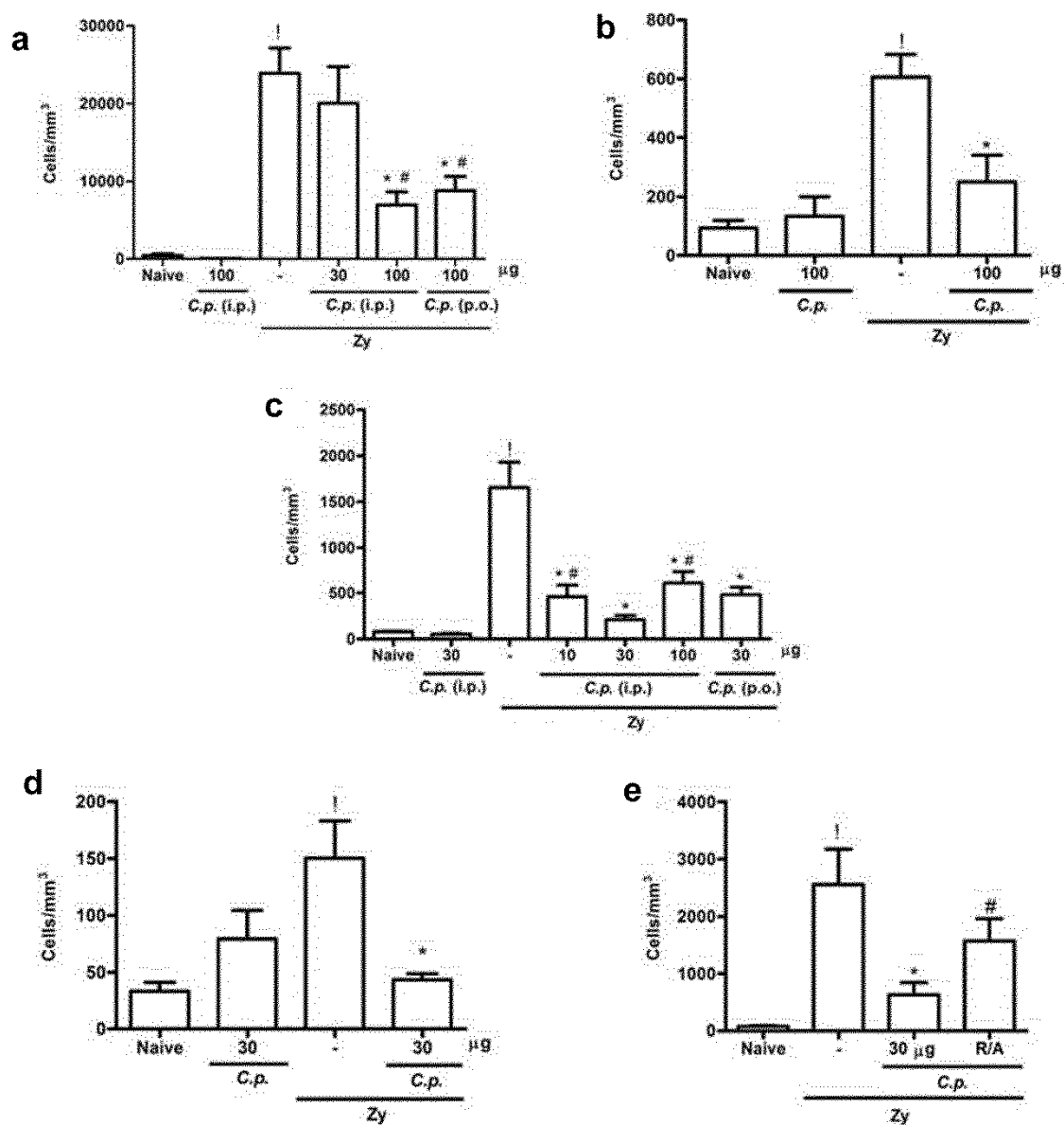


Fig. 1 Effect of the parenteral and oral administration of the *C. posadasii* (*C.p.*) extract on the cell influx in acute and chronic zymosan-induced arthritis (ZYA) in rats and mice. Rats (a, b) and mice (c, d, e) received the *C.p.* extract or saline (-) either i.p. or p.o. 30 min prior to 1 mg or 0.1 mg zymosan i.a., respectively. (e) Mice received the reduced / alkylated *C.p.* extract (R/A) i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive rats or mice received saline i.a. or saline i.a. plus *C.p.* extract i.p. Cell infiltration into joint cavities was assessed 6 h (a, c, e) or 7 days (b, d) after injection of zymosan. Results show means \pm SEM of total leukocytes (n= 6 animals for each group); [†] $P < 0.05$ compared to naive.* $P < 0.05$ compared to control (-) rats and mice; # $P < 0.05$ compared to *C.p.* 30 μ g

C. posadasii extract reduced hypernociception in ZYA in rats

Rats subjected to ZYA displayed an intense hypernociceptive response measured using both the articular incapacitation test and the von Frey methods, as shown in Fig. 2a and Fig. 2b, respectively. Similar to what happened with the cell influx, pretreatment of the animals with the *C. posadasii* extract, regardless of using i.p. and p.o. routes, significantly reduced the acute hypernociception measured with the articular incapacitation test (Fig. 2a) as well as the persistent chronic hypernociceptive response measured from 3 hours until 7 days after injection of the zymosan, using the electronic von Frey method (Fig. 2b), as compared to vehicle - treated animals. Administration of the *C. posadasii* extract to naïve animals did not alter the hypernociceptive response.

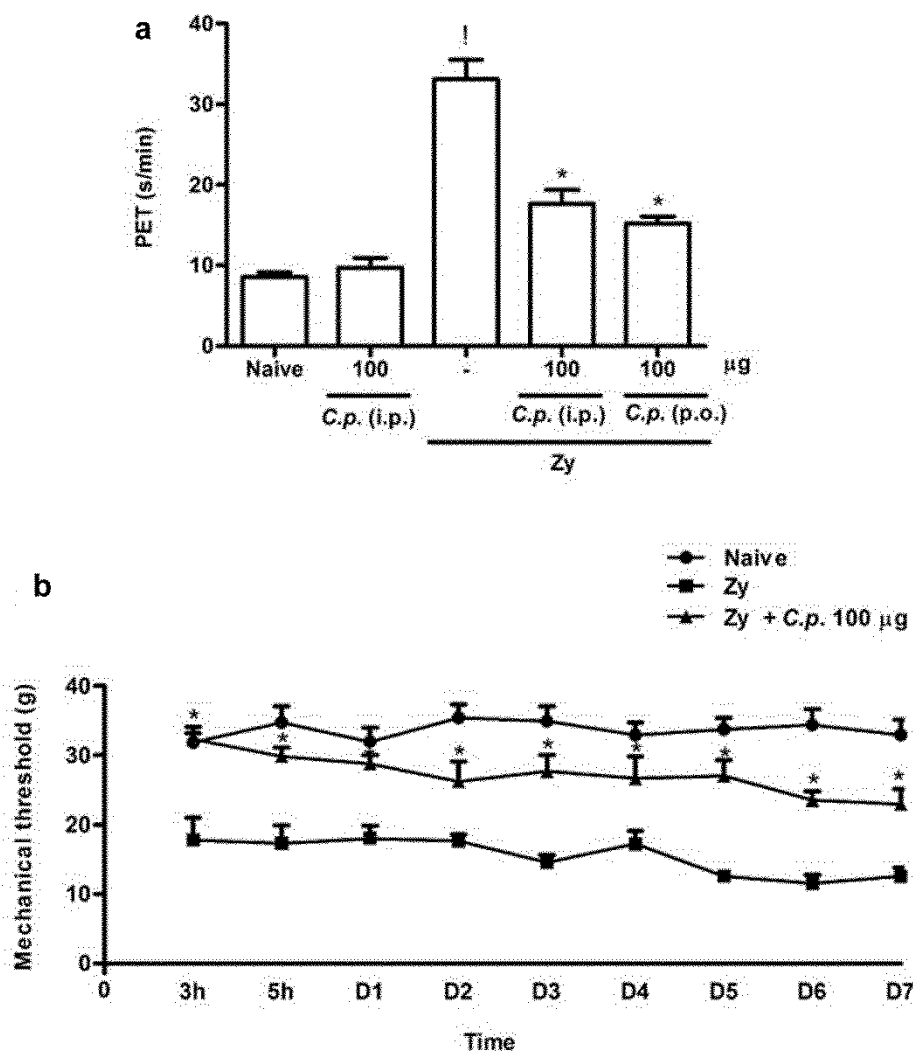


Fig. 2 Effect of the parenteral and oral administration of the *C.p.* extract on the hypernociception in acute (a) or chronic (b) ZYA in rats. (a) Rats received the *C.p.* extract or saline (-) either i.p. or p.o. 30 min prior to 1 mg zymosan. Naive rats received saline i.a. Articular incapacitation was measured hourly over 4 h as the increase in PET using the rat knee joint incapacitation test. Results show means \pm SEM of maximal PET between 3 and 4 h of arthritis. $n=6$ animals for each group; $^1P < 0.05$ compared to naive rats; $*P < 0.05$ compared to control (-) rats; (b) Rats received the *C.p.* extract or saline (Zy) i.p. 30 min prior to 1 mg zymosan. Naive rats received saline i.a. The flexion - elicited hypernociception withdrawal threshold (g) was evaluated 3 h, 5 h and then daily for 7 days after injection of the zymosan. Results show means \pm SEM of nociceptive threshold; $n=6$ animals for each group. $*P < 0.05$ compared to control (Zy) rats

C. posadasii extract effect on cartilage damage in ZYA in rats

The GAG loss in the articular cartilage measured after 7 days of ZYA can be used as an index of structural joint damage in this model. As compared to naïve animals, those

that received i.a zymosan displayed a significant reduction of the GAG content [18]. The administration of the *C. posadasii* extract provoked a partial, though not reaching statistical significance, reversion of the decrease in the GAG content of the cartilage, as compared to vehicle - treated rats, as follows: Naïve ($44.1 \pm 7.05 \mu\text{g} / \text{mg}$); Zymosan ($31.2 \pm 4.92 \mu\text{g} / \text{mg}$); *C. posadasii* + Zymosan ($36.7 \pm 3.65 \mu\text{g} / \text{mg}$).

C. posadasii extract reduced the histopathology changes of the synovia in ZYA in mice

Figure 3 illustrates the histopathological appearance of the synovia of mice subjected to ZYA. It can be seen that pretreatment with the *C. posadasii* extract (Fig. 3c) almost completely abrogated the synovitis, provoking a marked decrease in the number of infiltrating cells. A synovial sample of a naïve mouse is shown for comparison (Fig. 3a), as well as the sample from an animal subjected to ZYA treated with the vehicle (Fig. 3b). The administration of the extract also provoked a decrease in synovial cell hyperplasia, neovascular formation and fibrosis, as shown in Table 1.

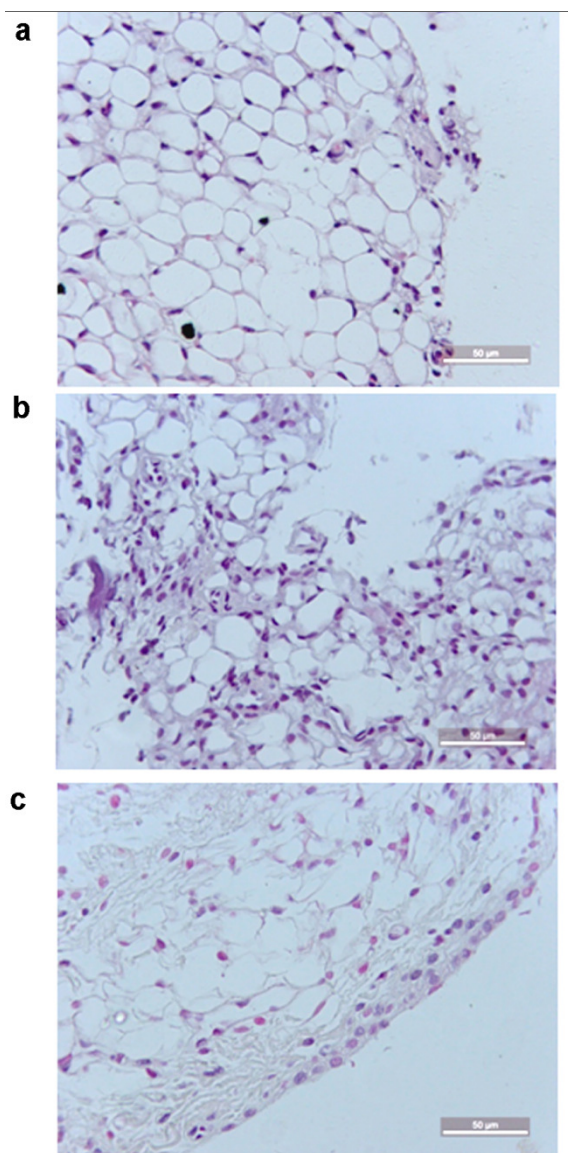


Fig. 3 Representative illustration of the synovial histopathology of mice subjected to ZYA and treated with the *C.p.* extract. Mice received 30 µg of *C.p.* extract (c) or saline (b) given i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice (a) received saline i.a. All animals were sacrificed at 7 days. The synovia of animals that received just the zymosan display intense and diffuse mononuclear cell infiltration (b) that is clearly reduced in the mice that received the *C.p.* extract prior to zymosan (c). H & E staining. (Original magnification x 400)

Table 1. Effect of the *C. posadasii* extract on joint damage by histopathology in ZYA

Group	Cell Infiltration	Stage of the disease	Synovial proliferation	Proliferation of blood vessels	Fibrosis	Edema	Scores Total
Naive	0 (0-1.0)	0 (0-1.0)	0 (0-1.0)	0 (0-1.0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-2.0)
Zy	2.0 (1.0-3.0)	2.0 (1.0-2.0)	1.0 (0-3.0)	1.0 (1.0-2.0)	2.0 (1.0-2.0)	1.0 (0-2.0)	9.5 (6.0-3.0)
Zy + <i>C.p.</i>	0* (0-1.0)	1.0* (0-2.0)	0* (0-1.0)	0* (0-1.0)	0* (0-2.0)	1.0 (0-2.0)	3.0* (0-8.0)
R/A	2.0 (2.0-3.0)	2.5 (2.0-3.0)	1.5 (0-2.0)	1.0 (1.0-1.0)	0.5* (0-1.0)	0.5 (0-1.0)	8.0 (7.0-9.0)

Mice received 30 µg of *C.p.* extract (Zy + *C.p.*), a reduced/alkylated (R/A) *C.p.* extract or saline given i.p. (Zy), 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice received saline i.a. All animals were sacrificed at 7 days. Results represent medians of synovial histopathology scores. * $P < 0.05$ compared to control (Zy) mice ($n = 6$ animals for each group).

C. posadasii extract reduces cell death in the synovial layer

Injection of the zymosan significantly increased the number of TUNEL positive cells (apoptosis and possibly necrosis) as compared to synovial samples from naïve animals, which display no staining (Fig. 4). The number of TUNEL positive cells was significantly reduced in the samples from the animals that were treated with the *C. posadasii* extract, as compared to those that received zymosan and the vehicle (cell death is indicated by the brown staining of the cells detected by the TUNEL method).

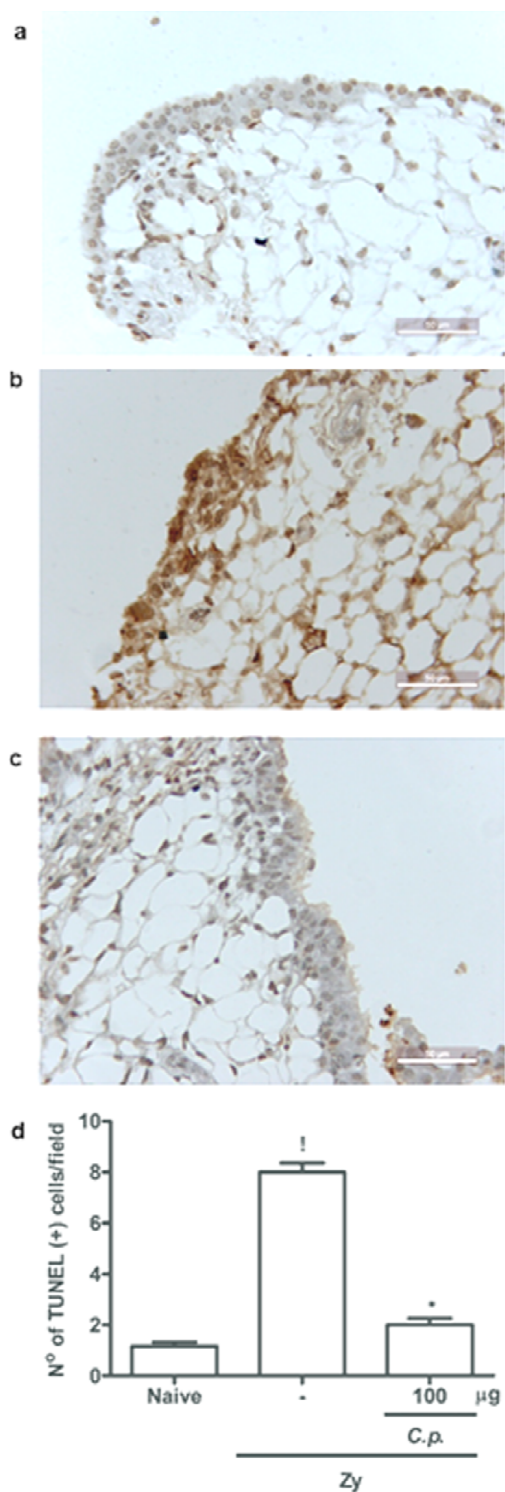


Fig. 4 Representative illustration of the effect of *C.p.* extract on cell death in the zymosan-inflamed synovial detected by TUNEL method. Mice received 30 µg of *C.p.* extract (c) or saline (b) given i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice (a) received saline i.a. All animals were sacrificed at 6 hours. The results are expressed as the average number of TUNEL- positive cells. $P < 0.05$ when compared to zymosan.

C. posadasii extract decreases iNOS activation in the synovia

Figures 5a-5c illustrate photomicrographs of the immunostaining for iNOS activity in the synovia obtained from negative control (5a), naïve (5b), zymosan (5c), and 30 µg C.p. + zymosan (5d) groups. There is a clear and significant ($P < 0.02$) reduction of the immunostaining in the samples of animals that received C.p. extract (median score = 1; range 0-2), as compared to those that received zymosan and the vehicle (median score = 2; range 1-3).

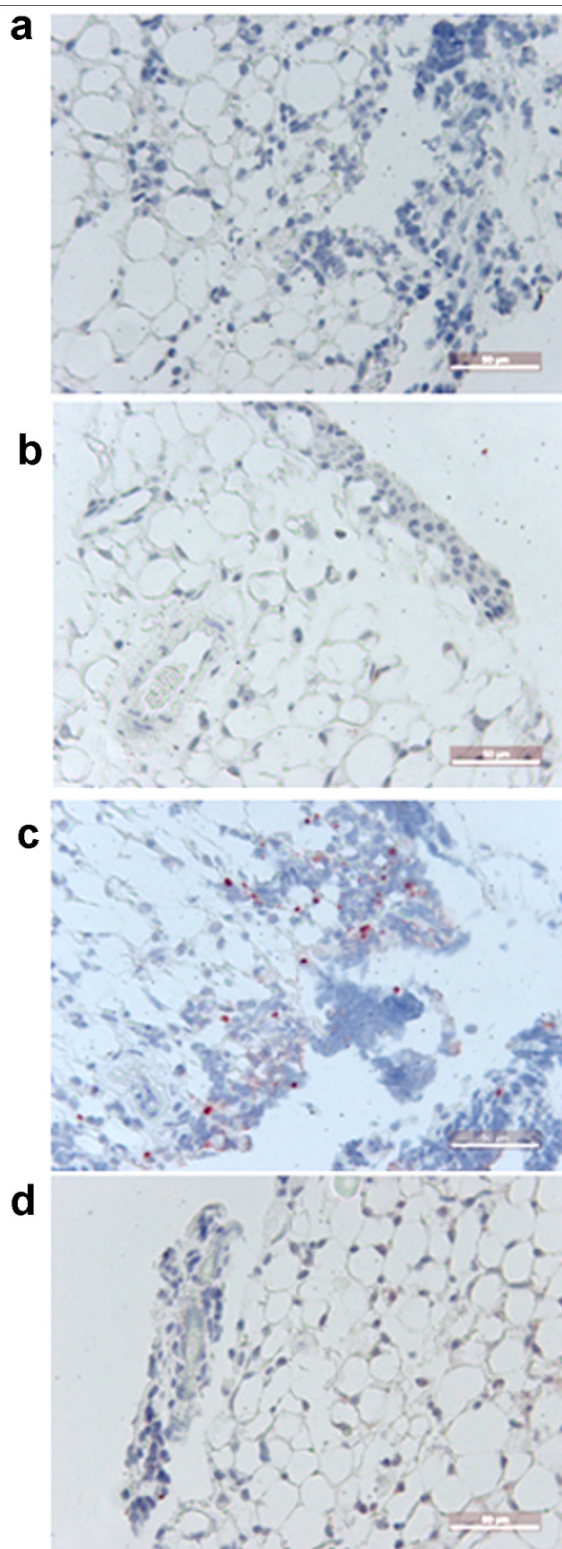


Fig. 5 Representative illustration of the immunoeexpression of iNOS in the synovia. Mice received 30 µg of *C.p.* extract (d) or saline (c) given i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice (b) received saline i.a.; negative control (a). All animals were sacrificed at 6 hours. There is a marked reduction of iNOS staining in the group that received *C.p.* extract (d) as compared to the group treated with saline (c). (Original magnification x 400).

Effect of the C. posadasii extract on the release of inflammatory mediators in acute ZYA

The *C. posadasii* extract did not alter the release of IL-1 β , TNF- α , γ -IFN and IL-17 into the joints of mice subjected to ZYA (Fig. 6a, 6b, 6c, and 6d, respectively). The levels of these cytokines were measured at 6 h of arthritis in the joint exudates. On the other hand, Fig. 6e shows that IL-10 joint levels, also measured at 6 h, were significantly reduced, as compared to saline - treated animals.

Analogous to what was observed in mice, the *C. posadasii* extract did not alter the release of IL-1 β , TNF- α into the joints of rats subjected to ZYA (Fig. 7a, and 7b, respectively). The levels of these cytokines were measured at 6 h of arthritis in the joint exudates. On the other hand, Fig. 7c shows that IL-10 joint levels, also measured at 6 h, were significantly reduced, as compared to saline - treated animals.

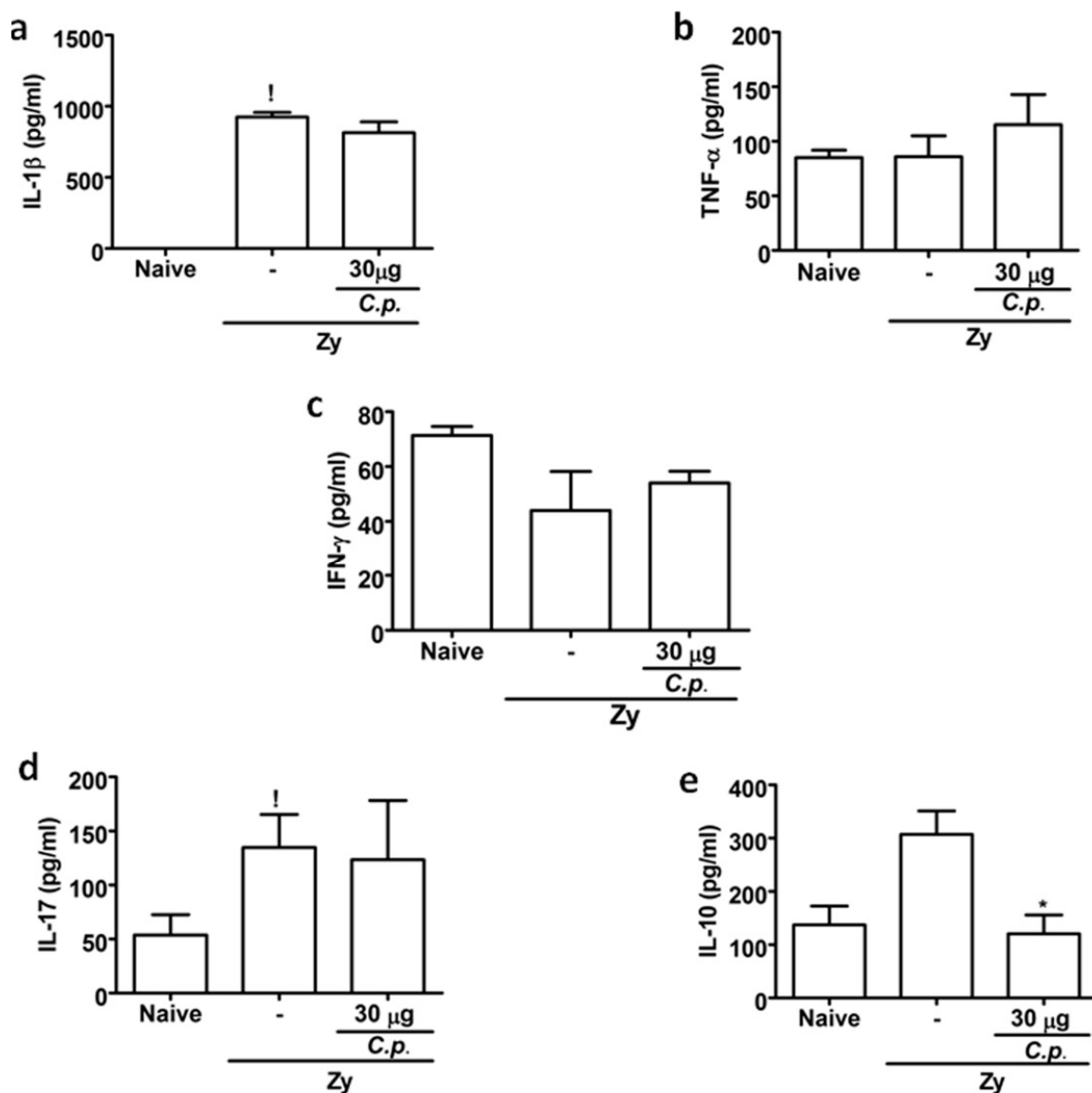


Fig. 6 Effect of the administration of *C.p.* extract on the release of inflammatory mediators in ZYA. Mice received 30 µg of the *C.p.* extract or saline (-) i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive mice received saline i.a. IL-1β (a), TNF-α (b), γ-IFN (c), IL-17 (d), and IL-10 (e) levels were assessed using ELISA (see text for details). Results represent means ± SEM, measured at 6 h ($n = 6$ animals for each group); [!] $P < 0.05$ compared to naive mice; * $P < 0.05$ compared to control (-) mice

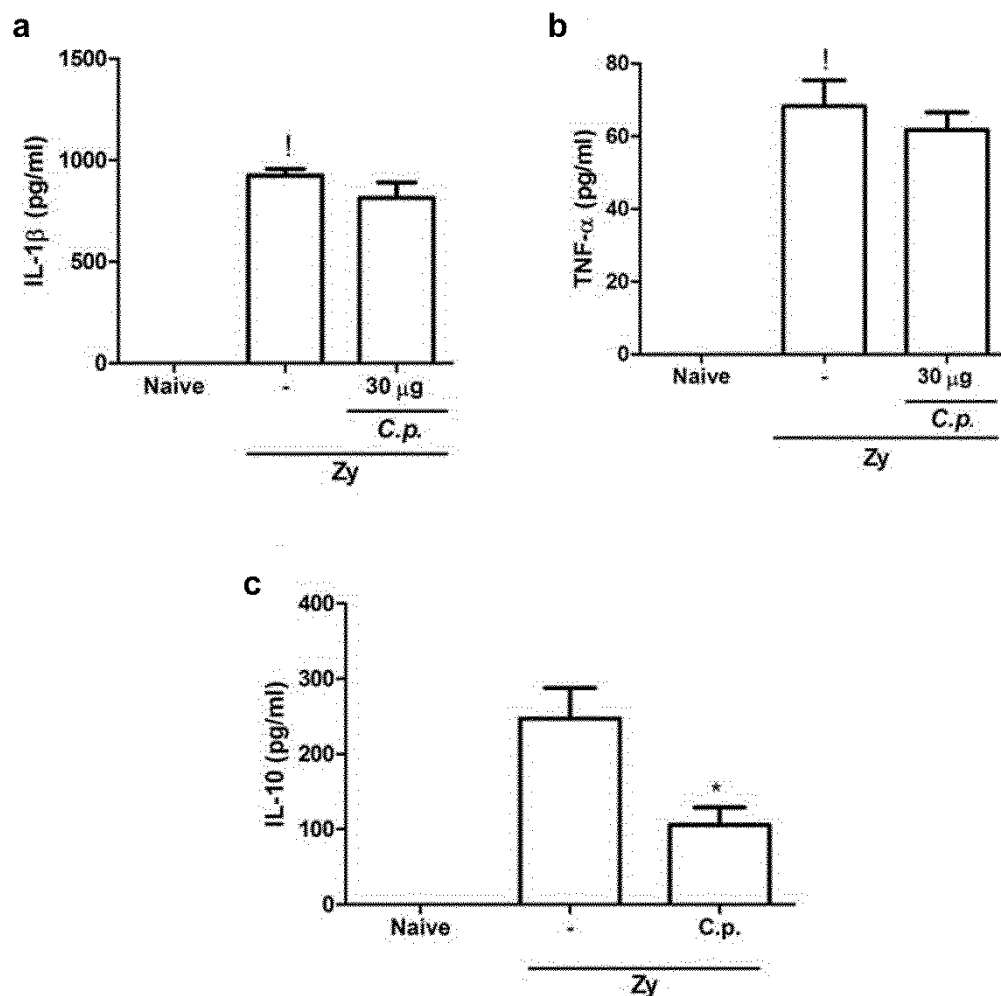


Fig. 7 Effect of the administration of *C.p.* extract on the release of inflammatory mediators in ZYA. Rats received 100 µg of the *C.p.* extract or saline (-) i.p. 30 min prior to 0.1 mg zymosan i.a. Naive rats received saline i.a. (a) IL-1β, (b) TNF-α and (c) IL-10 levels were assessed using ELISA (see text for details). Results represent means ± SEM, measured at 6 h (n = 6 animals for each group); [†]P < 0.05 compared to naive rats; *P < 0.05 compared to control (-) rats

Preliminary characterization of components in the C. posadasii extract

Figures 8a and 8b illustrate a silver-stained 12 % polyacrylamide electrophoresis gel of the *C. posadasii* extract to identify proteins and a toluidine blue stained 6 % agarose gel electrophoresis aimed to identify charged carbohydrates, respectively. Analysis of the proteins run on lane 2 was done using E-Capt™ (12.7 version for Windows) software aiming to estimate the Mw comparing to the Bio-rad™ standards run on parallel. Twelve bands were identified, ranging from 4 – 172 kD. There is a wide range of both low and

high molecular weight proteins shown in the silver - stained gel. Additional purification is needed in order to try to identify active components implicated in the protective effects of the *C. posadasii* extract. On the other hand, the absence of charged carbohydrates, as shown on lane 3 of Fig. 8b, virtually excludes such components as responsible for the results achieved.

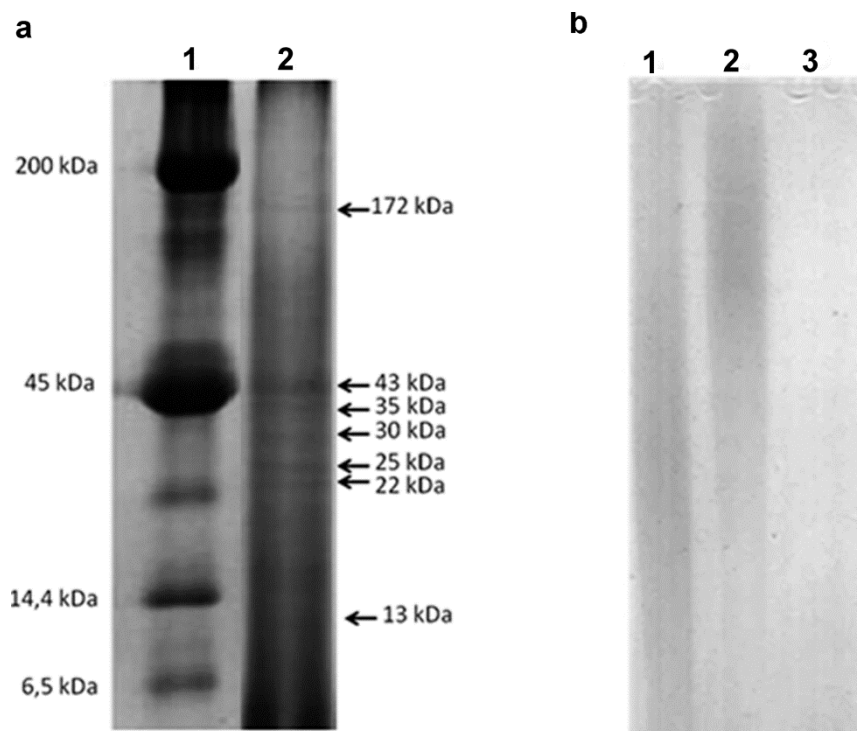


Fig. 8 Partial identification of proteins and carbohydrates present in *C.p.* extract. Silver-stained 12 % polyacrylamide electrophoresis gel of *C.p.* extract (a) and a toluidine blue-stained 6 % polyacrylamide electrophoresis gel for carbohydrate staining (b). (a) Lane 1, (Bio-rad™ standards), lane 2; 8µg *C.p.* extract; (b) Lane 1, chondroitin-4-sulfate; lane 2, chondroitin-6-sulfate; lane 3, 8µg *C.p.* extract

Discussion

The present study demonstrates that a *C. posadasii* extract, administered either parenterally or *per os*, has dose - dependent *in vivo* antiinflammatory properties by inhibiting joint hypernociception and acute neutrophils migration into the inflamed joints as well as the increase in mononuclear cell counts in the chronic phase – 7 days – of zymosan arthritis. At histopathology, neovascular formation, fibrosis, lymphocyte, and mononuclear cells proliferation together with hyperplasia of the synovial - lining cells were

also significantly reduced by the pre - administration of a single dose of the *C. posadasii* extract. In keeping with the pathogenetic relevance of the present results, joint damage, assessed by measuring the glycosaminoglycan content of the cartilage, was reduced, though not significantly, in animals that received the fungal extract, as compared to vehicle-treated rats. The demonstration of efficacy in different species, dose - dependence, and activity in the acute and chronic phases both orally and parenterally clearly adds to the bulk of important antiinflammatory and immunomodulating properties described with other fungal products [19].

Synovial resident cells, macrophages, and neutrophils present in the inflamed synovia are main sources of reactive oxygen species during synovitis. Zymosan - induced arthritis is characterized by an acute influx of polymorphonuclear cells that is more prominent at 6 hours, while mononuclear cells (mostly lymphocytes and monocytes) predominate after the first day. At 7 days, there is an intense chronic synovitis with synovial hyperplasia and mononuclear cells proliferation, together with angiogenesis, fibrosis and, eventually, giant cell formation [9]. As a result, inflammatory mediators, particularly cytokines, can be directly assessed in the joint exudates, thus allowing the study of mechanisms involved in synovitis development.

We have demonstrated that neutrophils contribute to the formation of both nitric oxide (NO) and peroxynitrite in zymosan arthritis [20]. In the present study, administration of the *C. posadasii* extract markedly decreased the expression of iNOS in the inflamed synovia. Release of NO by macrophages has been proposed to be a protective mechanism linked to innate immunity that prevents disease development in subjects exposed to other fungi, e.g *Paracoccidioides brasiliensis* [21] However, we are not aware of *in vivo* data showing that fungi components given systemically alter NO release either locally or systemically. Mice injected intra-peritoneally with viable *C. immitis* display increased urine nitrate levels, thus reflecting augmented NO production following coccidiomycosis development [22]. On the other hand, macrophages stimulated with zymosan particles *in vitro* show a decreased release of NO when in the presence of *P. brasiliensis* derived peptides [21]. Our *in vivo* data suggest that administration of the *C. posadasii* extract provoked a decrease of iNOS activation, predominantly in synoviocytes, thereby reducing the generation of reactive oxygen species in the joint.

Joint damage, pain, as well as cell infiltration observed in zymosan arthritis are closely related to the increase in the production of proinflammatory mediators such as TNF- α and IL-1 β locally [23, 24]. Other cytokines, including IL-10 and IL-17, have been described to participate in the pathogenesis of fungi reactions as well as in arthritis. While the former may display antiinflammatory properties [25], the latter has been implicated in the acute hypernociception in experimental arthritis, as we have shown recently [26]. Measuring the level of these mediators in the synovial fluid rather than in serum or using *ex-vivo* strategies may more appropriately reflect what is happening inside the joint. Our results showed no difference between the group that received the *C. posadasii* extract and control groups regarding the release of IL-1 β , TNF- α , γ -IFN, and IL-17 into the joints. We have to stress that although TNF- α joint levels significantly rise in rats at 6 hours of zymosan arthritis, the levels of this cytokine are not significantly elevated in mice joints, possibly due to species variation [5]. Given that the administration of the *C. posadasii* extract did not alter γ -IFN, IL-1 β , TNF- α , and IL-17 joint levels, our data argue against a participation of Th1 cytokines as well as these proinflammatory cytokines to explain the *in vivo* anti-inflammatory and immunomodulatory effects of the *C. posadasii* extract in zymosan arthritis.

Interestingly, our results show that IL-10 levels in the joints were significantly reduced in both rats and mice that received the *C. posadasii* extract. It was shown that experimental coccidiomycosis in susceptible mice is associated with increased levels of IL-10 in the lungs. The same group later reported that *in vitro* stimulation of macrophages isolated from a *C. immitis* susceptible mouse strain led to increased production of IL-10 and reduced levels of TNF- α , as compared to a resistant coccidiomycosis mouse strain. These effects were reduced by an antibody against Dectin-1 [22]. In summary, those data led to a proposal that genetic ablation of the Dectin-1 gene severely impairs IL-10 production [27]. To our knowledge, there are no reports showing alteration of cytokine release following systemic administration of *Coccidioides sp.* components. Our data add to these previous *in vitro* results since we measured *in vivo* production directly released into inflamed joints. Thus, we speculate that protein components of our *C. posadasii* extract, either isolated or linked to fungal polysaccharides, interfered with zymosan coupling to Dectin-1 receptors thereby leading to decreased IL-10 production.

Our present results also revealed that apoptosis, predominantly of synovial lining cells, was markedly reduced in the group treated with the *C. posadasii* extract. NO is able

to promote apoptosis of various cell types, including macrophages, neutrophils, and synoviocytes [28]. It has also been shown that stimulation of monocyte-derived cells with zymosan in the presence of apoptotic cells enhances IL-10 production [29]. As a possible mechanism to explain the reduced IL-10 levels promoted by the *C. posadasii* extract, we propose that the blockade of iNOS activation leads to a reduction of NO levels locally that in turn decreases the number of apoptotic cells thus reducing IL-10 production by macrophage-like synoviocytes in the zymosan-inflamed joints.

We are pursuing studies trying to isolate active component(s) present in the *C. posadasii* extract. Since the extract acted after being given orally, the possibility of lipopolysaccharide contamination to explain our data can be disregarded. The reducing / alkylating step applied to our *C. posadasii* extract abrogated the antiinflammatory/ immunomodulating effect thus indicating that a protein or a polypeptide containing disulfide bridges is responsible for its biological activity. We cannot exclude the possibility that isolated polysaccharides or protein / polypeptide components attached to them are responsible for the antiinflammatory results achieved. Notwithstanding the complexity of defining a specific active component, we have to stress that our data are an *in vivo* original demonstration that either isolated proteins or associated to other fungi components, obtained from a dimorphic pathogenic species, are capable of modifying remote *in vivo* inflammatory responses. Further characterization of the specific active components in this extract that we are currently undergoing may unravel mechanistic effects that can be of relevance to understand the host response against fungal components.

Acknowledgments

We thank Giuliana Bertozzi for the ELISA work. The work was partially supported by a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) (PRONEX n° 2155-06) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

- [1] Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm.* 2005;2:63–80.
- [2] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;60:258–274.
- [3] Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2002;347:911–920.
- [4] Rook GA, Stanford JL. Give us this day our daily germs. *Immunol Today.* 1998;19:113–116.
- [5] Rocha FAC, Leite AKRM, Pompeu MML, Cunha TM, Verri Jr. WA, Soares FM, Castro RR, Cunha FQ. Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models, *Infect Immun.* 2008;76:2736-2745.
- [6] Hung CY, Xue J, Cole GT. Virulence mechanisms of *Coccidioides*. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1111: 225-235.
- [7] Brass C, Levine HB, Stevens DA. Stimulation and suppression of cell-mediated immunity by endosporulation antigens of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* 1982;35:431-6.
- [8] Cordeiro RA, Brilhante RS, Rocha MF, Fechine MA, Camara LM, Camargo ZP, Sidrim JJ. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from northeast Brazil. *Med Mycol.* 2006;44:631-639.
- [9] Rocha FAC, Aragão Jr. AGM, Oliveira RC, Pompeu MML, Vale MR, Ribeiro RA. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm Res.* 1999;48:485–490.
- [10] Silva Jr. FS, Rocha FAC. Artrite induzida por zymosan em ratos – Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e na lise da cartilagem articular. *Acta Reum Port.* 2006;31:143-149.

- [11] Guerrero ATG, Cunha TM, Verri Jr. WA, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Cunha FQ, Ferreira SH. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF- α , IL-1 β and CXCL1/KC. *Eur J Pharmacol.* 2012;674:51–57.
- [12] Guerrero ATG, Verri Jr. WA, Cunha TM, Silva TA, Schivo IRS, Dal-Secco D, Canetti C, Rocha FAC, Parada CA, Cunha FQ, Ferreira SH. Involvement of LTB₄ in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE₂. *J. Leukoc. Biol.* 2008;83:122-130.
- [13] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
- [14] Silva Jr. FS, Yoshinari NH, Castro RR, Girão VCC, Pompeu MML, Feitosa JPA, Rocha FAC. Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. *Clin Rheumatol.* 2009;28:109-117.
- [15] Brilhante RSN, Cordeiro RA, Rocha MFG, Fechine MAB, Furtado FM, Nagao-Dias AT, Camargo ZP, Sidrim JJC. Coccidioidal pericarditis: a rapid presumptive diagnosis by an in-house antigen confirmed by mycological and molecular methods. *J Med Microbiol.* 2008;57:1288-1292.
- [16] Porto IM, Laure HJ, Tykot RH, Sousa FB, Rosa JC, Gerlach RF. Recovery and identification of mature enamel proteins in ancient teeth. *Eur J Oral Sci.* 2011;119:83–87.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
- [18] Bezerra MM, Brain SD, Greenacre S, Jerônimo SMB, Melo LB, Keeble J & Rocha FAC. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide

- inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol.* 2004;141:172–182.
- [19] Romani L. Cell mediated immunity to fungi: A reassessment. *Med Mycol.* 2008;46:515-529.
- [20] Bezerra MM, Brain SD, Girão VCC, Greenacre S, Keeble J, Rocha FAC. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2007;374:265-273.
- [21] Konno AYC, Maricato JT, Konno FTC, Mariano M, Lopes JD. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. *Microbes Infect.* 2009;11:92-99.
- [22] del Pilar Jiménez AM, Viriyakosol S, Walls L, Datta SK, Kirkland T, Heinsbroek SEM, Brown G, Fierer J. Susceptibility to *Coccidioides* species in C57BL/6 mice is associated with expression of a truncated splice variant of Dectin-1 (*Clec7a*). *Genes Immun.* 2008;9:338-348.
- [23] Leite ACRM, Cunha FQ, Dal-Secco D, Fukada SY, Girão VCC, Rocha FAC. Effects of nitric oxide on neutrophil influx depends on the tissue: Role of leukotriene B₄ and adhesion molecules. *Br J Pharmacol.* 2009;156:818-825.
- [24] Bombini G, Canetti C, Rocha FA, Cunha FQ. Tumour necrosis factor- α mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;496:197-204.
- [25] Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683–765.
- [26] Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Lemos HP, Verri Jr. WA, Cunha FQ, Ferreira SH. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain.* 2010;148:247-256.
- [27] Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, Haynes K, Steele C, Botto M, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat. Immunol.* 2007;8:31–38.

- [28] Chen Q, Casali B, Pattacini L, Boiardi L, Salvarani C. Tumor necrosis factor-alpha protects synovial cells from nitric oxide induced apoptosis through phosphoinositide 3-kinase Akt signal transduction. *J. Rheumatol.* 2006;33(6):1061-8.
- [29] Municio C, Hugo E, Alvarez Y, Alonso S, Blanco L, Fernández N, Sánchez Crespo M. Apoptotic cells enhance IL-10 and reduce IL-23 production in human dendritic cells treated with zymosan. *Mol. Immunol.* 2011;49: 97– 106.

CONCLUSÕES

- O extrato de *C. posadasii* reduziu o influxo celular agudo e crônico, independentemente da via de administração, de forma dose-dependente, em ratos e camundongos submetidos a AZy.
- O extrato de *C. posadasii* reduziu a hipernocicepção articular na fase aguda e crônica, em ratos submetidos a AZy.
- O extrato de *C. posadasii* tendeu a proteger do dano à cartilagem articular, em ratos submetidos a AZy.
- O extrato de *C. posadasii* protegeu contra a sinovite em camundongos submetidos a AZy.
- O extrato de *C. posadasii* reduziu a morte celular promovida pelo zymosan.
- O extrato de *C. posadasii* reduziu a marcação de iNOS na membrana sinovial.
- O extrato de *C. posadasii* não alterou os níveis de mediadores inflamatórios, como, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-17 no exsudato sinovial em ratos e camundongos submetidos à fase aguda da AZy.
- O extrato de *C. posadasii* promoveu uma redução significativa de IL-10 no exsudato sinovial em ratos e camundongos submetidos a AZy.
- Os efeitos anti-inflamatórios observados na administração do extrato de *C. posadasii* apontam para proteína (s) ou polipeptídeos contendo pontes dissulfeto como responsável pela atividade biológica, não excluindo a participação de polissacarídeos.
- A caracterização preliminar do extrato demonstrou a presença de proteínas de baixo e alto peso molecular e a ausência de carboidratos carregados.

PERSPECTIVAS

Este trabalho mostra de forma pioneira, que compostos obtidos a partir do fungo dimórfico patogênico *C. posadasii* exprime efeitos anti-inflamatórios sistêmicos relevantes, modificando, *in vivo*, a resposta inflamatória no modelo induzido por zymosan. Esses dados se assemelham aos relatados em outras espécies fúngicas.

A caracterização específica dos componentes ativos presente no extrato, como o isolamento da proteína, colabora para o desenvolvimento de compostos relevantes no controle de doenças inflamatórias crônicas. Além disso, a caracterização pode desvendar mecanismos que podem ser relevantes para compreender a resposta do hospedeiro contra componentes de *C. posadasii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPEL, N. M. *In vitro* production of tumor necrosis factor-alpha by adherent human peripheral blood mononuclear cells incubated with killed coccidioidal arthroconidia and spherules. *Cellular Immunology*, v. 153, n. 1, p. 248-55, 1994.

AMPEL, N. M. et al. *In vitro* whole-blood analysis of cellular immunity in patients with active coccidioidomycosis by using the antigen preparation T27K. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 5, p. 1039–1043, 2002.

AMPEL, N. M. et al. The mannose receptor mediates the cellular immune response in human coccidioidomycosis. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 4, p. 2554–2555, 2005.

BEZERRA, M. M. et al. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, v. 374, p. 265-273, 2007.

BEZERRA, M. M. et al. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *British Journal of Pharmacology*, v. 141, p. 172-182, 2004.

BIALEK, R. et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 778-783, 2004.

BORCHERS, A. T.; GERSHWIN, M. E. The immune response in Coccidioidomycosis. *Autoimmunity Reviews*, v. 10, p. 94–102, 2010.

BRASS, C.; LEVINE, H. B.; STEVENS, D. A. Stimulation and suppression of cell-mediated immunity by endosporulation antigens of *Coccidioides immitis*, v. 35, p. 431-6, 1982.

BROWN, G. D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 197, n. 9, p. 1119-1124, 2003.

CHO, J. H.; GREGERSEN, P.K. Genomics and the Multifactorial Nature of Human Autoimmune Disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 17, p. 1612-1623, 2011.

CHOI, E. Y.; SANTOSO, S.; CHAVAKIS, T. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Frontiers in Bioscience*, v. 14, p. 1596-1605, 2010.

CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.

COLE, G.T. et al. Isolation and morphology of an immunoreactive outer wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity*, v. 56, p. 2686–2694, 1988. (A)

COLE, G.T. et al. Immunoreactivity of a surface wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity*, v. 56, p. 2695–2701. (B)

CORDEIRO, R. A. et al. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. *Medical Mycoogyl*, v. 44, p. 631-639, 2006.

CORDEIRO, R. A. et al. Twelve years of coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: Epidemiologic and diagnostic aspects. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 66, p. 65-72, 2010.

COX, R. A.; MAGEE, D. M. Coccidioidomycosis: Host response and vaccine development, *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, p. 804-839, 2004.

CRUVINEL, W. M. et al. Immune system – Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Revista brasileira de reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUNHA, F. Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *British Journal of Pharmacology*, v. 104, n. 3, p. 765-767, 1991.

CUNHA, F. Q. et. al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUNHA, T. M. et. al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

DICAUDO, D. J. Coccidioidomycosis: a review and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 55, n. 6, p. 943-945, 2006.

DIONNE, S. O. et. al. Spherules derived from *Coccidioides posadasii* promote human dendritic cell maturation and activation. *Infection and Immunity*, v. 74, n. 4, p. 2415-2422, 2006.

FERREIRA, S. H. et al. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, v. 334, n. 6184, p. 698-700, 1998.

FISHER, M. C. et al. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*, v. 94, n. 1, p. 73-84, 2002.

FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. *Arthritis Research & Therapy*, v. 7, n. 2, p. 370-379, 2005.

GADÓ, K.L.; GIGLER, G. Zymosan inflammation: A new method suitable for evaluating new inflammatory drugs. *Agents Actions*. v. 32, p.119-21, 1991.

GEORGE, P. M. et al. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacology & Therapeutics*, 2012. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.03.006.

GU, Y. et al. Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *European Journal of Immunology*, v. 38, p. 1807-1813, 2008.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HANAOKA, R. et al. The Water-Soluble Extract from Cultured Medium of *Ganoderma lucidum* (Reishi) Mycelia (Designated as MAK) Ameliorates Murine Colitis Induced by Trinitrobenzene Sulphonic Acid . *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 74, p. 454-462, 2011.

HECTOR, R. F.; LANIADO-LABORIN, R. Coccidioidomycosis - a fungal disease of the Americas. *PLoS Medicine*, v. 2, n. 1-2, 2005.

HUNG, C. Y. et al. A major cell surface antigen of *Coccidioides immitis* which elicits both humoral and cellular immune responses. *Infection and Immunity*, v.68, p.584–593, 2000.

HUNG, C. Y.; XUE, J.; COLE, G. T. Virulence Mechanisms of *Coccidioides*. *New York Academy of Sciences*, v.1111, p.225–235, 2007.

ISHIMARU, J. I. et al. Quantitation of chondroitin-sulfates, disaccharides and hyaluronan in normal, early and advanced osteoarthritic sheep temporomandibular joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 9, p. 365-370, 2001.

JEURINKA, P. V. et al. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 1124–1133, 2008.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-210, 2001.

KARMAKAR, S.; KAY, J.; GRAVALLESE, E. M.; Bone Damage in rheumatoid arthritis – Mechanistic insights and approaches to prevention. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, v. 36, n. 2, p. 385-404, 2010.

KATZ, Y. et al. IL-17 regulates gene expression and protein synthesis of the complement system, C3 and factor B, in skin fibroblasts. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 120, n. 1, p. 22-99, 2000.

KEYSTONE, E. C. et al. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. *Arthritis & Rheumatism*, v. 20, n. 7, p. 1396-1401, 1977.

KO, J. L. et al. A new fungal immunomodulatory protein, *FIP-five* isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *European Journal of Biochemistry*, v. 228, p. 244-249, 1995.

KONNO, A. Y. C. et al. Peptides from *Paracoccidioides brasiliensis* GP43 inhibit macrophage functions and inflammatory response. *Microbes and Infection*, v. 11, p. 92-99, 2009.

KONNO, F. T. C. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* GP43-derived peptides are potent modulators of local and systemic inflammatory response. *Microbes and Infection*, v. 14 n. 6, p. 517-527, 2012.

KOUFOPANOU, V.; BURT, A.; TAYLOR, J. W. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, p. 5478-5482, 1997.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature*, v. 7, p. 678-689, 2007.

LULL, C.; WICHERS, H. J.; SAVELKOUL, H. F. J. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of inflammation*, v. 2, p. 63-80, 2005.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, v. 19, p. 683-765, 2001.

NAM, N.H. Naturally occurring NF- κ B inhibitors. *Mini Reviews of Medicinal Chemistry*, v.6, p. 945–951, 2006.

OKA, S. et al. A water-soluble extract from cultured medium of *Ganoderma lucidum* mycelia suppresses the development of colorectal adenomas. *Hiroshima journal of medical sciences*, v. 59, p. 1–6, 2010.

OTTERNESS, I. G.; MILICI, A. J.; BLIVEN, M. L. Some factors affecting inhibition and restoration of mobility after induction of an acute arthritis in the hamster. *Agents and Actions*, v. 40, n. 3-4, p. 224-227, 1993.

PAIXÃO, G. C.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C Coccidioidomicose e Blastomicose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p. 238-251.

PENG, T. et al. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *Journal of Infectious Diseases*, v. 172, n. 2, p. 518-521, 1999.

PINTO, L. G. et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *PAIN*, v. 148, p. 247-256, 2010

PUCCIA, R; TRAVASSO, L. R. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *Journal of clinical microbiology*, v. 29, p.1610e1615, 1991.

RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 78-85, 2007.

ROCHA, F. A. C. et al. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 43, n. 4, p. 206-217, 2003.

ROCHA, F. A. C. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflammation Research*, v. 48, p. 485-490, 1999.

ROCHA, J. C. S. et al. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. *British journal of pharmacology*, v. 136, p. 588-596, 2002.

ROSE, D. M.; ALON, R.; GINSBERG, M. H. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological Reviews*, v. 218, p. 126-134, 2007.

RUDDY, B. E. et al. Coccidioidomycosis in African Americans. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 86, n. 1, p. 63-69, 2011.

SCHMIDT, E. P. et al. On around and through: Neutrophil-endothelial interactions in innate immunity. *Physiology*, v. 26, p. 334-347, 2011.

SCHORLEMMER, H. U.; BITTER-SUERMAN, D.; ALLISON, A. C. Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. *Immunology*, v. 32, p. 929-940, 1977.

SHARPTON, T. J. et al. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Research*, v. 19, p. 1722-1731, 2009.

SILVA JR. S.; ROCHA, F. A. C. Artrite induzida por zymosan – Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e na lise da cartilagem articular. *Acta Reumatológica Portuguesa*, v. 31, p. 143-149, 2006.

SMITH, C. E. et al. The use of coccidioidin. *American review of tuberculosis*, v. 57, p. 330-360, 1948.

STOOP, R. et al. Desnaturation of type II collagen in articular cartilage in experimental murine arthritis: Evidence for collagen degradation in both reversible and irreversible cartilage damage. *Journal of Pathology*, v. 188, p. 329-337, 1999.

SUTTON, D. A. Diagnosis of coccidioidomycosis by culture: safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1111, p. 315-325, 2007.

VERRI JR. W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, p. 116-138, 2006.

VERRI JR. W. A. et al. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by Endothelin acting on ETB receptors in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 315, n. 2, p. 609-615, 2005.

VIRIYAKOSOL, S. et al. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-Like receptor 2 and Dectin-1. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 3, p. 1553-1560, 2005.

WARNOCK, D. W. *Coccidioides* species as potential agents of bioterrorism. *Future Microbiol.*, v. 2, n. 3, p. 277-283, 2007.

WASSER SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 60, p. 258-274, 2002.

XUE, J. et al. Immune response of vaccinated and non-vaccinated mice to *Coccidioides posadasii* infection. *Vaccine*, v. 23, n. 27, p. 3535-3544, 2005.

YAO, Z. et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *The Journal of Immunology*, v. 155, n. 12, p. 5483-5486, 1995.