RITA DE CÁSSIA VALENTE FERREIRA

**TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO IFN- γ , DA IL-12,
DOS LEUCÓCITOS PMN E DAS CÉLULAS NK NA IMUNIDADE
NATURAL AO *P. brasiliensis* UTILIZANDO HOSPEDEIROS NORMAIS E
DEFICIENTES DE CÉLULAS T.**

RITA DE CÁSSIA VALENTE FERREIRA

**TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO IFN- γ , DA IL-12,
DOS LEUCÓCITOS PMN E DAS CÉLULAS NK NA IMUNIDADE
NATURAL AO *P. brasiliensis* UTILIZANDO HOSPEDEIROS NORMAIS E
DEFICIENTES DE CÉLULAS T.**

RITA DE CÁSSIA VALENTE FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO IFN- γ , DA IL-12, DOS
LEUCÓCITOS PMN E DAS CÉLULAS NK NA IMUNIDADE NATURAL
AO *P. brasiliensis* UTILIZANDO HOSPEDEIROS NORMAIS E
DEFICIENTES DE CÉLULAS T**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de
doutor em Ciências (Imunologia)**

São Paulo

2005

RITA DE CÁSSIA VALENTE FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO IFN- γ , DA IL-12, DOS
LEUCÓCITOS PMN E DAS CÉLULAS NK NA IMUNIDADE NATURAL
AO *P. brasiliensis* UTILIZANDO HOSPEDEIROS NORMAIS E
DEFICIENTES DE CÉLULAS T**

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de
doutor**

**Área de concentração:
Imunologia**

**Orientador:
Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich**

**São Paulo
2005**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Valente-Ferreira, Rita de Cássia.

Caracterização da importância do IFN- γ , da IL-12, dos leucócitos PMN e das células NK na imunidade natural ao *P. brasiliensis* utilizando hospedeiros normais e deficientes de células T / Rita de Cássia Valente-Ferreira. -- São Paulo, 2005.

Orientador: Vera Lucia Garcia Calich.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia das micoses.

Versão do título para o inglês: The role of IFN- γ , IL-12, PMN leukocytes and NK cells in the natural immunity against *P. brasiliensis* infection using normal and T cell deficient hosts.

Descritores: 1. Micose 2. Imunologia celular 3. Paracoccidioidomicose 4. *Paracoccidioides brasiliensis* 5. Citocinas 6. Imunidade natural I. Calich, Vera Lucia Garcia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB047/2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rita de Cássia Valente-Ferreira.

Tese: Caracterização da importância do IFN-g, da IL-12, dos leucócitos PMN e das células NK na imunidade natural ao *P. brasiliensis* utilizando hospedeiros normais e deficientes de células T.

Orientador: Vera Lucia Garcia Calich.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 22 / 03 / 05, considerou

☒ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a) Assinatura
Nome SANDAO ROGERIO DE ALMEIDA
Instituição FCF / USP

Examinador(a) Assinatura
Nome ADELAIDE JOSE VAZ
Instituição FCF / USP

Examinador(a) Assinatura
Nome VALDE REZ GAMBARE
Instituição ICB / USP

Examinador(a) Assinatura
Nome CARLOS PELLESCI TABORDA
Instituição ICB / USP

Presidente Assinatura
Nome VERA LUCIA GARCIA CALICH
Instituição ICB / USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3813-0900 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 162/2001, sobre o projeto intitulado “**Paracoccidioidomicose pulmonar: Avaliação da importância da IL-12, IFN-g e dos leucócitos polimorfonucleares na imunidade inata de camundongos atímicos e eutímicos**”, sob a responsabilidade de Rita de Cássia Valente Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de 21/02/2002.

(We certify that the protocol nº 162/2001 about “*Effect at in vivo depletion of IL-12, gamma IFN and leukocytes PMN in natural immunity of athymic and euthymic mice infected with P.brasiliensis*” agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 21/02/2002 meeting.)

São Paulo, 21 de fevereiro de 2002.

Prof. Dra. Maria Inês Nogueira
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, exemplos de vida e dedicação!
Seu amor incondicional e a presença constante
em minha vida foi essencial para essa conquista.*

*Às minhas queridas filhas Giovana, Gisele
e Giuliana pelo sorriso e o abraço sempre presentes!
Saibam que vocês foram o “combustível” para essa caminhada.*

*Ao meu marido, José Olvadias, por sempre estar ao meu lado e
não me deixar fraquejar nos momentos difíceis.*

Obrigado vocês existirem!

Amo muito vocês.

Conseguimos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me ajudar a conduzir minha vida com sabedoria e por me dar à serenidade necessária para que eu pudesse concluir mais essa etapa. Ter enfrentado esse desafio, sentir sua presença junto a mim e a minha família me deu a segurança necessária para a dedicação a esse trabalho.

À minha família (pais, sogros, irmão), pois de nada adiantaria a vontade “de ser” sem a possibilidade “do fazer”. Vocês me proporcionaram as condições para mais essa vitória. Assumindo, por vezes, tarefas de grande responsabilidade, sempre com o maior entusiasmo e dedicação. Obrigado por cuidarem das minhas filhas com tanto carinho e por confiarem na minha capacidade e competência. Se há algum mérito nesse trabalho, com certeza ele também é de vocês!

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio financeiro e ao Instituto de Ciências Biomédicas pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia que primou pela competência, seriedade e postura dos docentes deste departamento.

Ao prof. Antonio Desidério Barbosa, amigo e companheiro. Seu exemplo profissional e de caráter são constantes em minha vida. A sua dedicação, capacidade, respeito para com o aluno e a competência como professor me serviu de estímulo para seguir a carreira docente. Sua ética humana e profissional é modelo e me mostrou que o sucesso e o reconhecimento podem vir sem a necessidade de manipulações e constrangimentos. Ter sido sua aluna e sua assistente por tantos anos será para mim sempre uma honra!

*Às amigas: Adriana Pina, Andressa de Paiva Chiarella, Celina Arruda, Flávio Vieira Lour
Laura Raquel Rios Ribeiro, Tânia Alves da Costa, Simone Bernardino. Grandes amigas e
companheiras de laboratório. Aprendi muito com vocês, nossa convivência por todos esses anos
lapidou arestas importantes da minha personalidade e do meu caráter e me fizeram certamente
uma pessoa melhor. Muito obrigado!*

*Às queridas: Cláudia Silva Cunha (Claudinha) por nossos longos papos ao café, por seu alto
astral e carinho constante, Marlene Bernardes que é um exemplo pela sua alegria de viver,
Ângela Nishikako por sua persistência e tolerância que me serviram de modelo. Conviver com
vocês foi um grande presente!*

*À profa Dra Eva Burger pela convivência sempre prazerosa e agradável e pela oportunidade de
ser sua auxiliar no ensino da Imunologia.*

*À profa Dra Celidéia A. C. Vaz por sua presença sempre animada e amiga. Grande exemplo de
como é estar de bem com a vida!*

*A todos os professores do departamento pelo convívio sempre agradável e amigável. A cada um
de vocês devo um pouco do que sou agora.*

*Aos professores que ministraram os cursos para a obtenção dos créditos. Todos foram muito
importantes na construção dessa tese. Em especial agradeço à profa Dra Adele Caterino Araújo
(Instituto Adolpho Lutz) pelo exemplo de dedicação, responsabilidade, compromisso e
competência com que faz ciência.*

Às amigas e secretárias do departamento Valéria e Jotelma, pela paciência e a constante preocupação com nossos prazos, matrículas e tudo o mais... Não sei o que seríamos sem vocês!

Aos amigos e colegas do departamento que participaram ou não deste projeto. Nomes, impossível citar todos, são muitos e todos serão sempre muitos queridos e lembrados.

A Sílvia M. G. Massironi pela presença sempre gentil e amiga, pela dedicação e responsabilidade na manutenção do Biotério de Experimentação. Aos funcionários Dirce, Joelma e Roberto pelo cuidado com os animais e pela gentileza com que sempre nos atenderam.

A amiga Thais Marques pela atenção e cuidado com que mantém o Biotério de criação e pelo tratamento sempre educado e disponível quando dela precisamos.

Ao amigo Paulo Albe pela presteza e dedicação com que recebeu meu material para a confecção e coloração das lâminas para a análise histopatológica.

A atenção prestada por todos os funcionários da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas.

Aos sempre atenciosos e amigos: Milton, Otacílio, Moisés, por me receberem sempre tão bem e estarem sempre dispostos a ajudar ou a uma boa conversa!

A Talita (serviços de xerocópias) pela atenção e presteza com que sempre nos atendeu.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa Dra Vera Lúcia Garcia Calich pela confiança ao dar a mim a responsabilidade por projeto de tamanha importância. Pelos momentos onde recebi provas de compreensão e respeito e que me fizeram comprovar uma teoria pessoal; a de que a ciência pode ser mais humana, e que a formação de uma equipe produtiva e feliz depende diretamente da relação de entrega, envolvimento e cumplicidade entre seus membros. Agradeço por todos os momentos do nosso convívio, pelos exemplos de coerência entre o dizer e o fazer e pelo modelo ética, de competência e responsabilidade.

FIGURAS

Depleção de leucócitos PMN

Figura 1. Avaliação da efetividade da depleção de leucócitos PMN	042
Figura 2. Avaliação do Grau de Infecção e Reação de HTT	044
Figura 3. Avaliação do tempo de sobrevivência	046
Figura 4. Resposta imune humoral específica	048
Figura 5. Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão	050
Figura 6. Caracterização da celularidade do lavado bronco-alveolar (L.B.A.)	052
Figura 7. Quantificação de NO no homogenato de pulmão	054

Neutralização de IL-12

Figura 8. Avaliação do Grau de Infecção e Reação de HTT	058
Figura 9. Avaliação do tempo de sobrevivência	060
Figura 10. Resposta imune humoral específica	062
Figura 11. Determinação de IgE total	064
Figura 12. Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão	066
Figura 13. Quantificação de citocinas no sobrenadante de fígado e baço	068
Figura 14. Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço	070
Figura 15. Caracterização da celularidade do lavado bronco-alveolar (L.B.A.)	072
Figura 16. Análise das células do baço por citometria de fluxo	074
Figura 17. Análise das células do LBA citometria de fluxo	076
Figura 18. Quantificação de NO no homogenato de pulmão	078

Neutralização de IFN- γ

Figura 19. Avaliação do Grau de Infecção e Reação de HTT	083
Figura 20. Avaliação do tempo de sobrevida	085
Figura 21. Resposta imune humoral específica	087
Figura 22. Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão	089
Figura 23. Quantificação de citocinas no sobrenadante de fígado e baço	091
Figura 24. Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço	093
Figura 25. Caracterização da celularidade do lavado bronco-alveolar (L.B.A.)	095
Figura 26. Análise das células do baço por citometria de fluxo	097
Figura 27. Análise das células do LBA citometria de fluxo	099
Figura 28. Quantificação de NO no homogenato de pulmão	101

Depleção de células NK

Figura 29. Avaliação do Grau de Infecção e Reação de HTT	106
Figura 30. Avaliação do tempo de sobrevida	108
Figura 31. Resposta imune humoral específica	110
Figura 32. Determinação de IgE total	112
Figura 33. Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão	114
Figura 34. Quantificação de citocinas no sobrenadante de fígado e baço	116
Figura 35. Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço	118
Figura 36. Caracterização da celularidade do lavado bronco-alveolar (L.B.A.)	120
Figura 37. Quantificação de NO no homogenato de pulmão	122

ABREVIATURAS E SIGLAS

AcM	Anticorpo monoclonal
Ac	Anticorpo (s)
Ag	Antígeno
AgFN	Antígeno de Fava Netto
ANOVA	Análise de variância
a.l.d.	Abaixo do limite de detecção
BCA	Ácido bicinconínico
BHI	Infusão de cérebro e coração
BSA	Albumina Sérica Bovina
CFA	“Cell Free Antigen”
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
DMSO	Dimetil sulfóxido
D.O.	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EP	Erro padrão
E ₂	17-β-estradiol
gp43	glicoproteína de 43kDa do <i>P.brasiliensis</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina

IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratraqueal
L	Fase leveduriforme (levedura)
LBA	Lavado-bronco-alveolar
M	Fase miceliana (micélio)
MPO	Mieloperoxidase
NO	óxido nítrico
OPD	ortofenilenodiamina
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PbAg	Antígeno solúvel de <i>P.brasiliensis</i> (“cell free antigen”)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2
PCM	Paracoccidioidomicose
RPMI	Meio de Cultura (Roswell Park Memorial Institute)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
SPF	“Specific Patogens Free”
TCB	Tampão carbono-bicarbonato, pH 9,5

RESUMO

VALENTE-FERREIRA R. C. Caracterização da importância do IFN- γ , da IL-12, dos leucócitos PMN e das células NK na imunidade natural ao *P. brasiliensis* utilizando hospedeiros normais e deficientes de células T. 2005. 179 f. Tese (doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que tem como agente etiológico o *P. brasiliensis* e afeta os pulmões, áreas mucocutâneas e o sistema mononuclear-fagocítico. Trabalhos anteriores usando camundongos BALB/c atímicos e eutímicos demonstraram que os animais deficientes de células T são mais suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* e indicaram que tanto a imunidade natural como a mediada por células T são fundamentais para promover a resistência à infecção e o controle da doença. Com base nestes dados, nosso trabalho teve por objetivo demonstrar a importância de alguns mediadores da resposta imune natural na PCM murina. Utilizamos como abordagem experimental a depleção de IFN- γ , IL-12, leucócitos PMN e células NK em camundongos BALB/c atímicos e eutímicos infectados por via intratraqueal com um milhão de leveduras de *P. brasiliensis*. Verificamos que a depleção de leucócitos PMN não alterou a gravidade da doença, entretanto, essas células parecem exercer importante papel na modulação da síntese de citocinas em animais atímicos. A IL-12, por sua vez, demonstrou ter ação relevante na proteção ao *P. brasiliensis* em animais deficientes de células T, pois a sua neutralização levou ao aumento do número de leveduras viáveis recuperadas nos órgãos de disseminação (fígado e baço). Os animais eutímicos que foram tratados com AcM anti IL-12 apresentaram exacerbação da doença pulmonar e esplênica, mas em ambas as linhagens não encontramos quaisquer alterações nas reações de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) e no

tempo de sobrevivência. O nosso trabalho confirmou o papel fundamental do IFN- γ no controle da doença, tanto nos animais eutímicos que apresentaram redução das reações de HTT e exacerbação da doença, como também nos deficientes de células T que demonstraram, além do aumento da gravidade da infecção, redução do tempo de sobrevivência. Analisamos também a participação da célula NK na PCM por serem consideradas fontes expressivas da síntese de IFN- γ . Observamos a exacerbação da doença pulmonar e a disseminação do fungo para o fígado e baço nos animais atímicos. A depleção de células NK em animais eutímicos induziu somente o agravamento da infecção pulmonar, sem maior comprometimento de outros órgãos. As reações de HTT e a taxa de mortalidade não sofreram alterações em ambas as linhagens. Demonstramos que as células NK atuam como moduladoras da síntese de imunoglobulinas em animais atímicos e de citocinas em eutímicos e também participam no controle da migração de leucócitos PMN para os pulmões nos períodos iniciais da PCM. Em conclusão, usando um modelo experimental homogêneo (cepa infectante e linhagens de hospedeiros definidos) pudemos, pela primeira vez, demonstrar que o IFN- γ é o mais importante mediador da imunidade natural na imunoproteção ao *P. brasiliensis*. Verificamos também a contribuição relativa da IL-12 e dos leucócitos PMN na proteção à PCM pulmonar. Além disso, também pela primeira vez, foi caracterizada *in vivo* a importância das células NK no controle da infecção pelo *P. brasiliensis*.

ABSTRACT

VALENTE-FERREIRA, R. C. The role of IFN- γ , IL-12, PMN leukocytes and NK cells in the natural immunity against *P. brasiliensis* infection using normal and T cell deficient hosts. 2005. 179 f. Thesis (Ph. D. Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by *P. brasiliensis* and affects the lungs, mucocutaneous areas and the mononuclear-phagocytic system. Previous works using athymic and euthymic BALB/c mice demonstrated that T cell deficient animals are more susceptible to PCM and indicated that natural and cellular immunity are essential to promote resistance to infection and disease control. Based in these data, the objective of our work was to demonstrate the importance of some mediators of natural immunity in pulmonary PCM. Systemic depletion of IFN- γ , IL-12, PMN leukocytes or NK cells by monoclonal antibodies was used as experimental approach using athymic and euthymic BALB/c mice infected by the intratracheal route with one million *P. brasiliensis* yeasts. Our results demonstrated that in both mouse strains PMN leukocytes depletion did not alter the severity of infection; however, in athymic mice these cells were shown to exert an important regulatory function in cytokines synthesis. IL-12 neutralization led to increased number of viable yeasts recovered from liver and spleen of T cell-deficient mice and induced increased fungal loads in the lungs and spleen of euthymic animals. In both mouse strains anti-IL-12 treatment did not alter DTH reactions or survival times. We were also able to confirm the fundamental role of IFN- γ in the control of murine PCM of euthymic mice, which showed decreased DTH reactions and disease exacerbation. Increased fungal loads and decreased survival times were observed in IFN- γ -depleted athymic mice. We have also

analyzed the participation of NK cells in pulmonary PCM due to their important function as IFN- γ producers. In athymic mice, NK cell depletion augmented fungal burdens of lungs, liver and spleen. In T cell-sufficient mice NK cell depletion induced a more severe pulmonary infection although other organs were not affected. In both mouse strains anti-NK cells treatment did not change DTH reactions and mortality patterns. We could also verify in athymic and euthymic mice the regulatory role of NK cells in the synthesis of immunoglobulins and cytokines, respectively. In addition, NK cells were shown to control the PMN leukocytes influx to the lungs of infected mice. In conclusion, using a homogeneous experimental model (defined strains of infectious agent and hosts) we could demonstrate that among others mediators of natural immunity, IFN- γ is the most important immunoprotective factor. We also verified the relative contribution of IL-12 and PMN leukocytes in the control of pulmonary PCM. Moreover, we could also characterize, for the first time *in vivo*, the importance of NK cells in hosts' resistance to *P. brasiliensis* infection.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. Introdução	001
2. Objetivos	020
3. Material e métodos	022
3.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	022
3.1.1. <i>Recuperação da virulência</i>	022
3.1.2. <i>Preparo do inóculo</i>	023
3.2. <i>Infecção Intratraqueal</i>	023
3.3. <i>Animais</i>	024
3.4. <i>Produção e Purificação de anticorpos monoclonais (AcM)</i>	024
3.4.1. <i>Hibridomas</i>	024
3.4.2. <i>Expansão dos hibridomas in vitro</i>	025
3.4.3. <i>Expansão dos hibridomas in vivo</i>	025
3.4.4. <i>Precipitação e purificação os AcM</i>	026
3.4.5. <i>Purificação de γ-globulina normal de rato</i>	026
3.4.6. <i>Dosagem de Proteínas (Método do Ácido Bicinconínico, BCA)</i>	027
3.4.7. <i>Análise do grau de pureza das amostras por SDS-PAGE</i>	027
3.4.8. <i>Determinação de contaminação por LPS</i>	027

3.5.	<i>Anticorpo anti-Asialo GM₁</i>	028
3.6.	<i>Protocolos de tratamento</i>	028
3.6.1.	<i>Depleção de leucócitos PMN</i>	028
3.6.2.	<i>Depleção de IL-12 e IFN-γ</i>	028
3.6.3.	<i>Depleção de células NK</i>	029
3.7.	<i>Avaliação do grau de infecção</i>	029
3.8.	<i>Avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT)</i>	029
3.9.	<i>Avaliação do tempo de sobrevivência</i>	030
3.10.	<i>Determinação do título dos anticorpos específicos</i>	030
3.10.1.	<i>Antígeno</i>	030
3.10.2.	<i>Anti-soros</i>	031
3.10.3.	<i>Ensaio imunoenzimático</i>	031
3.11.	<i>Caracterização da IgE total</i>	032
3.12.	<i>Quantificação das citocinas por ELISA de captura</i>	033
3.13.	<i>Quantificação da IL-18</i>	034
3.14.	<i>Dosagem de óxido nítrico (NO)</i>	035
3.15.	<i>Caracterização das células do lavado-bronco-alveolar (LBA)</i>	036
3.16.	<i>Análise das células do LBA e do Baço por citometria de fluxo</i>	036
3.17.	<i>Análise estatística</i>	037
4.	<i>Resultados da depleção de leucócitos PMN</i>	041
4.1.	<i>Produção e purificação do AcM anti leucócitos PMN</i>	041
4.2.	<i>Avaliação da depleção pelo AcM</i>	041
4.3.	<i>Avaliação do grau de infecção e HTT</i>	043

4.4.	<i>Avaliação do tempo de sobrevida</i>	045
4.5.	<i>Determinação da resposta imune humoral específica</i>	047
4.6.	<i>Quantificação de citocinas pulmonares</i>	049
4.7.	<i>Caracterização da celularidade do LBA</i>	051
4.8.	<i>Dosagem de óxido nítrico no homogenato de pulmão</i>	053
4.9.	<i>Conclusões parciais</i>	055
5.	<i>Resultados da depleção de IL-12</i>	057
5.1.	<i>Produção e purificação do AcM anti IL-12</i>	057
5.2.	<i>Avaliação do grau de infecção e HTT</i>	057
5.3.	<i>Avaliação do tempo de sobrevida</i>	059
5.4.	<i>Determinação da resposta imune humoral específica</i>	061
5.5.	<i>Determinação da IgE total</i>	063
5.6.	<i>Quantificação de citocinas</i>	065
5.6.1.	<i>Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão</i>	065
5.6.2.	<i>Quantificação de citocinas no sobrenadante de fígado e baço</i>	067
5.6.3.	<i>Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço</i>	069
5.7.	<i>Caracterização da celularidade do LBA</i>	071
5.8.	<i>Análise das células do baço por citometria de fluxo</i>	073
5.9.	<i>Análise das células do LBA por citometria de fluxo</i>	075
5.10.	<i>Dosagem de óxido nítrico no homogenato de pulmão</i>	077
5.11.	<i>Conclusões parciais</i>	079
6.	<i>Resultados da depleção de IFN-γ</i>	081
6.1.	<i>Produção e purificação do AcM anti IFN-γ</i>	081

6.2.	<i>Avaliação do grau de infecção e HTT</i>	081
6.3.	<i>Avaliação do tempo de sobrevida</i>	084
6.4.	<i>Determinação da resposta imune humoral específica</i>	086
6.5.	<i>Quantificação de citocinas</i>	088
6.5.1.	<i>Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão</i>	088
6.5.2.	<i>Quantificação de citocinas no sobrenadante de fígado e baço</i>	090
6.5.3.	<i>Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço</i>	092
6.6.	<i>Caracterização da celularidade do LBA</i>	094
6.7.	<i>Análise das células do baço por citometria de fluxo</i>	096
6.8.	<i>Análise das células do LBA por citometria de fluxo</i>	098
6.9.	<i>Dosagem de óxido nítrico no homogenato de pulmão</i>	100
6.10.	<i>Conclusões parciais</i>	102
7.	<i>Resultados da depleção das células NK</i>	104
7.1.	<i>Ac policlonal anti Asialo-GM₁</i>	104
7.2.	<i>Avaliação do grau de infecção e HTT</i>	104
7.3.	<i>Avaliação do tempo de sobrevida</i>	107
7.4.	<i>Determinação da resposta imune humoral específica</i>	109
7.5.	<i>Determinação da IgE total</i>	111
7.6.	<i>Quantificação de citocinas</i>	113
7.6.1.	<i>Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão</i>	113
7.6.2.	<i>Quantificação de citocinas no sobrenadante de fígado e baço</i>	115
7.6.3.	<i>Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço</i>	117
7.7.	<i>Caracterização da celularidade do LBA</i>	119

7.8. Dosagem de óxido nítrico no homogenato de pulmão	121
7.9. Conclusões parciais	123
8. Discussão	125
9. Conclusões	150
10. Referências bibliográficas	153
Anexos	

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose endêmica presente em áreas tropicais e subtropicais da América Latina, com alta incidência no Brasil. Descrita inicialmente por Adolfo Lutz em 1908 é caracterizada por ser uma micose sistêmica que frequentemente envolve os pulmões, o sistema monuclear-fagocítico e áreas mucocutâneas (Franco et al., 1987).

O agente etiológico desta infecção é o *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) um fungo dimórfico que apresenta a forma de levedura no tecido do hospedeiro ou quando cultivado à 35°C e a forma de micélio à temperatura ambiente. A partir das características ecológicas das áreas endêmicas e de dados laboratoriais, acredita-se que o habitat do fungo deve estar localizado em ambientes úmidos, onde a temperatura média gira ao redor de 18 a 24°C e cujos índices pluviométricos anuais sejam elevados (Restrepo et al., 1985).

Dados relacionados com a PCM infantil têm ajudado, em parte, no esclarecimento deste fator de importância relevante no estudo da ecologia do fungo (Cruz et al., 1991; Terra et al., 1991). A pesquisa orientada em lares onde existem casos de PCM infantil indica que provavelmente a altitude, a temperatura e as condições do solo estão envolvidas com a permanência do fungo e permitem a contaminação humana (Cadavid et al., 1993; Restrepo et al., 2001).

A infecção pode ocorrer por inalação de propágulos da forma miceliana (M) do fungo; depois de inalados, a infecção instala-se primeiramente nos pulmões, podendo se disseminar por via sanguínea ou linfática para outros órgãos (Restrepo et al., 1985). Estes pequenos propágulos (com tamanho de aproximadamente 4 μ m) alcançam porções distais do pulmão, produzindo

infecção pulmonar em praticamente todos os animais, como foi demonstrado em experimentos por McEWEN et al., 1984.

Nos animais assim infectados, 12 horas após a inalação, os conídios presentes nos alvéolos transformam-se rapidamente em células leveduriformes (L), condição necessária para a instalação da infecção. Estas formas crescem então no parênquima pulmonar, produzindo uma doença progressiva que posteriormente irá se disseminar para outros órgãos (McEwen et al., 1987).

Assim como na PCM, muitos fungos patogênicos podem sofrer transformações morfológicas durante a invasão no hospedeiro. Entretanto, a significância desta transformação na patogênese fúngica ainda não está completamente esclarecida (San-Blas et al., 2000; Gow et al., 2002). Gow et al. (2002) em revisão sobre o assunto consideraram importante a ação da morfogênese na infecção fúngica e julgam necessários estudos mais direcionados e abrangentes a fim de serem entendidos os reais efeitos da alteração morfológica durante o estabelecimento da doença fúngica.

Normalmente os indivíduos que apresentam a PCM são trabalhadores rurais, do sexo masculino que apresentam baixo nível sócio-econômico e que por vezes exibem um alto grau de desnutrição e alcoolismo crônico. Além desses fatores, o tabagismo também é considerado como uma condição de risco para a aquisição da doença.

Santos et al. (2003) realizaram estudo de casos-controle e observaram a influência do tabagismo e do alcoolismo no desenvolvimento da PCM. Foram obtidos dados sobre a profissão, moradia e hábitos de vida de 70 pacientes e 180 controles e foi observado que os indivíduos doentes fumavam e bebiam mais do que os controles. Os dados encontrados indicaram também que a chance de desenvolver a doença era 14 vezes maior em fumantes e 3,6 vezes maior entre os que bebiam acima de 50mL/ dia de álcool levando, portanto, a conclusão de que o tabagismo

constitui um fator de risco para o desenvolvimento da PCM e que a ingestão de bebidas alcoólicas pode atuar como co-fator à doença.

Outro estudo dirigido por Martinez et al. em 1992 indicou que 50% dos doentes ingeriam álcool (60mL/dia), já sendo conhecida a predisposição de alcoólatras em adquirir outras micoses profundas como a criptococose, aspergilose, esporotricose e candidíase. O alcoolismo além de estar relacionado à desnutrição também leva à redução da imunidade celular, da atividade mucociliar e produção de surfactantes que são fatores importantes para a imunidade pulmonar.

Em recente inquérito epidemiológico sobre a doença no Brasil, Coutinho et al. (2002) relata 3181 óbitos pela PCM no Brasil de 1980-1995 e taxa de mortalidade média anual de 1,45/milhão de habitantes. A região Sul foi a que apresentou a maior taxa de mortalidade regional seguida pelo Centro-Oeste. O Sudeste mostrou a taxa mais baixa e com tendência à queda. Foram também descritos dados que indicam a prevalência como endemia em áreas não metropolitana sendo a mortalidade pela PCM predominante no sexo masculino em uma proporção de 562 homens/ 100 mulheres sendo a faixa etária mais atingida a de 30-59 anos.

Apesar do contato com o fungo ser essencialmente o mesmo para ambos os sexos a incidência da PCM, como apresentado anteriormente, é de 13 a 87 vezes maior em homens do que em mulheres (Franco et al., 1987). Muchmore et al. (1974) acreditando que esta diferença poderia ser hormonal demonstrou que o estradiol, um dos componentes dos hormônios sexuais femininos, inibe o crescimento das células leveduriformes.

Posteriormente, verificou-se que o 17- β -estradiol (E_2) reconhecia uma proteína receptora, localizada na porção citosólica do fungo (Loose et al., 1983) e que o E_2 , em concentrações próximas às fisiológicas, bloqueava a transição da forma M para L (Restrepo et al., 1984), assim como de conídio à forma L (Salazar et al., 1988). Outros hormônios (testosterona e

corticosterona) também foram estudados; entretanto, não inibiram a ligação específica com a proteína do fungo.

Aristizabal et al. (2002) analisaram o curso clínico da doença em camundongos machos e fêmeas com diferentes condições hormonais. Animais machos castrados que receberam o 17 β -estradiol inicialmente conseguiram restringir a progressão da doença enquanto que fêmeas que receberam testosterona foram incapazes de controlar a doença.

Características tanto do homem (patrimônio genético, sexo, idade, higidez, integridade do sistema imunológico) como do fungo (grau de virulência, isolado, composição antigênica), assim como da interação homem-fungo (número de partículas infectantes e via de infecção) são determinantes da evolução da infecção paracoccidiodomicótica (revisto por Montenegro & Franco, 1994).

Foi demonstrado por Calich et al. (1987) que a resistência ao *Pb* é controlada pelo gene dominante chamado de *Pbr* e não é relacionado ao locus H-2, pois tanto os camundongos B10. A (suscetível) como A/Sn (resistente) possuem o mesmo haplótipo H-2 e apresentam perfis diferentes de resposta ao fungo.

Destacando o modelo murino, Cano et al. em 1995 usando a rota intratraqueal de infecção observaram que a linhagem A/J é resistente e que a linhagem B10. A é susceptível à PCM. Estes estudos demonstraram que camundongos A/J desenvolvem doença pulmonar benigna crônica associada com baixa mortalidade e presença positiva e persistente da reação de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT). Em contraste, camundongos B10.A desenvolveram uma doença disseminada progressiva resultando em alta mortalidade e discreta reação de HTT ou anergia.

Xidieh et al. (1999) também analisaram animais B10.A (suscetíveis) e A/Sn (resistentes) durante a PCM e observaram através da análise histopatológica comparativa, que a evolução das

lesões de disseminação em camundongos B10.A não é controlada, indicando a ativação deficiente da imunidade celular; por outro lado, foi observada em camundongos resistentes uma eficiente ativação celular marcada pela destruição do fungo, ativação dos neutrófilos e delimitação granulomatosa da lesão, o que levou à confirmação de que existem padrões genéticos determinantes das diferenças encontradas.

Levin et al. (2000) em importante revisão sobre a influência do padrão genético no destino de uma infecção, descreveram a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e destacaram o fato de que um terço da população mundial encontra-se infectada e somente 10% dos indivíduos adoecem, sendo uma evidência epidemiológica substancial que indica a existência de fatores genéticos que influenciam diretamente na suscetibilidade ou não à doença.

Para o controle de uma infecção é necessária a interação entre o sistema imune inato e o adaptativo e como em outras infecções, na PCM pulmonar após a invasão, ocorre a interação de antígenos do patógeno com o sistema imune, o qual irá definir o destino da infecção e a sobrevivência ou não do hospedeiro.

Análises quanto à estrutura fúngica indicaram que o sobrenadante de cultura do *P. brasiliensis* apresenta glicoproteínas (gp) de peso molecular entre 13-148 KDa e a gp43 foi identificada como sendo o principal antígeno secretado pelo *Pb*. A gp43 é um componente altamente imunogênico e tem sido usada no sorodiagnóstico da PCM, entretanto a sua ação na indução da doença não é completamente conhecida (Travassos et al., 1995; Camargo et al., 2000). Outra glicoproteína também identificada como importante componente do fungo é a gp70. Observação feita por microscopia confocal, utilizando anticorpos monoclonais anti gp70, indicam que essa glicoproteína encontra-se no compartimento intracelular do fungo, podendo ser também detectada do sobrenadante de cultura (Puccia et al., 1986).

Logo na porta de entrada, os mecanismos primários de defesa contra o fungo são ativados (sistema imune inato) e se o microrganismo persistir, respostas imunológicas específicas (sistema imune adaptativo) serão requisitadas a fim de controlar o crescimento do patógeno.

A imunidade inata é considerada tradicionalmente como a primeira linha de defesa contra infecções, mas recentemente tem recebido atenção renovada porque, a despeito de apresentar certa inespecificidade, efetivamente essa resposta distingue o “próprio” do “não próprio” ativando os mecanismos imunes adaptativos através de uma série de sinais específicos.

A imunidade inata antifúngica é mediada por inúmeras células, receptores celulares e vários fatores humorais, servindo a dois propósitos: a ação direta contra o fungo que deverá ser destruído através da fagocitose e secreção de compostos contra elementos fúngicos ou através de uma ação instrutiva sobre as células do sistema imune adaptativo que irá produzir mediadores pró-inflamatórios e induzir a atividade co-estimulatória de células fagocitárias (Romani, 2004).

Como em outras micoses profundas e em infecções por agentes intracelulares, na PCM a imunidade celular é crucial para a resistência frente à infecção pelo *Pb*; existem, entretanto, várias evidências que levam a crer que este fungo possui mecanismos de evasão eficientes para a inibição da resposta imune celular e a sua instalação no organismo.

Popi et al. (2002) analisaram a influência da gp43 na interação de macrófagos peritoneais de animais suscetíveis (B10.A), resistentes (A/Sn) e o fungo e observaram que a adição de diferentes concentrações de gp43 ao meio de cultura inibiu de maneira dose-dependente a fagocitose do *Pb* vivo ou morto pelo calor. Demonstrando assim, que a gp43 pode fazer parte de um importante mecanismo de evasão do fungo.

A influência da gp70 na atividade fagocitária de macrófagos peritoneais também foi analisada e os resultados indicaram que essa molécula tem a capacidade de inibir a atividade dos macrófagos através da utilização de receptores de manose e Fc associada à síntese de NO e H₂O₂

in vitro. Esses dados podem indicar a sua participação em associação à gp43 como mecanismo de escape do fungo (Mattos et al., 2003).

Os mecanismos iniciais de interação patógeno-hospedeiro necessitam de melhor esclarecimento, mas sabe-se que além da conversão dos conídeos para a forma leveduriforme, que é passo fundamental para o sucesso e o estabelecimento da infecção, a modificação do padrão de resposta de Th1 para Th2 pode alterar o padrão de suscetibilidade do hospedeiro (Calich et al., 1993; Murphy et al., 1998; Gow et al., 2002).

Explorando esses padrões de resposta, Kashino et al. (2000) demonstraram que a resistência ao *Pb* é relacionada a uma resposta preferencial Th1, enquanto que a suscetibilidade à doença decorre da ausência de IFN- γ . Neste trabalho foi demonstrado que os animais resistentes mantinham elevada síntese de IFN- γ e IL-2 além da secreção predominante de IgG2a. Os animais suscetíveis produziam baixos níveis de IFN- γ , altas concentrações de IL-5 e IL-10, eosinofilia e uma preferencial secreção de IgG2b e IgA.

Como já observado, a PCM apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas e patológicas que pode variar de uma forma benigna e localizada a uma grave e disseminada. Esta heterogeneidade clínica está correlacionada com mudanças nos parâmetros imunológicos, no qual temos em um dos pólos um paciente anérgico com doença disseminada e marcante desequilíbrio imunológico e do outro lado um paciente com doença localizada e imunidade preservada (Franco et al., 1987).

É conhecido o fato de que pacientes com resposta linfoproliferativa deficiente e reduzida síntese de IFN- γ e IL-12 são relacionados aos quadros graves. A possibilidade de reversão da anergia linfocitária através da terapia com citocinas foi demonstrada *in vitro* por Romano et al. (2002) com o tratamento de células mononucleares de pacientes graves com IL-12 e anti IL-10.

Esse tratamento induziu ao aumento na secreção de IFN- γ que atingiu níveis próximos aos observados em pacientes não doentes; contudo a resposta linfoproliferativa não sofreu alteração.

Outro trabalho recente indicando a possibilidade de alteração no perfil de suscetibilidade do hospedeiro ao *Pb* foi realizado por Arruda et al. (2002). Ao analisar o efeito imunoterapêutico da administração exógena de IL-12 observou-se que o tratamento levou a menor disseminação fúngica, ao aumento da síntese de IFN- γ e de células mononucleares inflamatórias no pulmão.

Existem duas formas clinicamente distintas de PCM: a aguda ou juvenil e a crônica ou adulta. Mamoni et al. (2002) detectaram subclasses específicas de IgG, IgA e IgE anti- gp43 em pacientes com diferentes formas da doença e mostraram que indivíduos com a forma juvenil apresentaram altos títulos de IgE que foram correlacionados à presença de IgG4, IgA e eosinofilia.

Baida et al. (1999) também investigaram a relação entre a produção de imunoglobulinas em resposta à gp43 do *Pb* nas formas juvenil e adulta da doença e observaram que pacientes com a forma juvenil apresentaram altos títulos de IgG4 e baixos níveis de IgG2 em comparação com os pacientes com a forma adulta, onde foi detectado o aumento do isótipo IgG2 regulado pela presença de IFN- γ . O isótipo IgA foi predominante na forma adulta sendo relacionado à gravidade da doença.

Análise do soro de pacientes com PCM mostram uma elevada síntese de anticorpos que podem ter ação na defesa contra o fungo atuando na opsonização e na atividade de fagócitos; contudo, a elevada produção de anticorpos é relacionada à gravidade da doença e suscetibilidade do hospedeiro (Brummer et al., 1993).

Na PCM podemos considerar escassas as pesquisas quanto ao potencial protetor dos diferentes isótipos de anticorpos produzidos, entretanto em outras infecções como, por exemplo,

na criptococose tais efeitos são observados (Taborda et al., 2001; Feldmesser et al., 2002; Lendvai et al., 2000).

Como anteriormente descrito, a integridade da resposta imune celular é fundamental para estabelecer os mecanismos de resistência à infecção pelo *Pb*. Pesquisas com camundongos atímicos BALB/c (*nu/nu*) e seus heterozigotos (*nu/+*) revelaram que a susceptibilidade à infecção ao *Pb* é exacerbada nos animais deficientes de células T (Burger et al., 1996).

Como discutimos anteriormente, durante PCM a gravidade da doença está relacionada com a virulência do agente infectante e a imunidade celular usualmente se encontra deprimida durante a doença ativa. O fenótipo Th1 foi associado com a resposta linfoproliferativa preservada e forte reação de hipersensibilidade do tipo tardio, enquanto que o padrão Th2 estava associado à produção de IgE (e IgG1 em camundongos ou IgG4 em humanos) e relacionado com a susceptibilidade à infecção (Baida et al., 1999; Mamoni et al., 2002; Kashino et al., 2000).

Fatos como estes indicam que a detecção de citocinas características de um padrão de resposta Th1 como IFN- γ e de citocinas Th2 como IL-4 poderia ser interpretada como indício de resistência ou susceptibilidade do hospedeiro.

O estabelecimento ou não de uma micose sistêmica depende de vários fatores, como a virulência e adaptação do fungo e a ativação de células como macrófagos, linfócitos T, células “Natural Killer” (NK) e leucócitos PMN (Lloyd et al., 1992; Cassatela et al., 1995, Mansour *et al.*, 2002). Entretanto, sabemos que esta visão é simplista e incompleta, pois múltiplos fatores do hospedeiro e do agente infectante interagem controlando o destino do processo infeccioso.

As células dendríticas, por exemplo, têm atraído a atenção de vários pesquisadores nos últimos anos. Pesquisas recentes na PCM experimental têm demonstrado que células dendríticas

imaturas capturam antígenos intactos em lisossomas, os processam e os convertem a peptídeos complexos sendo sua atividade comparada ao efeito dos adjuvantes (Almeida et al., 2001).

O papel dos leucócitos PMN tem sido estudado durante a resposta imune contra infecções em modelos *in vivo*. Foi observado que camundongos BALB/c foram incapazes de expressar imunidade mediada por células frente à infecção por *Listeria monocytogenes* quando depletados de granulócitos (Appelberg et al., 1994). O aumento de susceptibilidade de camundongos depletados de leucócitos PMN na infecção sistêmica por *Candida albicans*, também foi observado por Jensen et al. (1993), Conlan et al. (1997) e Vonk et al. (2002).

Huffnagle et al. (2000) estudaram animais infectados com *Cryptococcus neoformans* e seus resultados indicaram a importância do recrutamento de leucócitos para o sítio da infecção a fim de que o fungo seja eliminado. Demonstraram a participação das quimiocinas MCP-1 e MIP-1 α como mediadores deste recrutamento.

Trabalhos anteriores a esse (1996) e também coordenados por Huffnagle, demonstraram que a neutralização de TNF- α faz com que ocorra a diminuição de MCP-1 e MIP-1 α levando à subsequente redução (80%) no recrutamento de leucócitos.

A associação entre os mecanismos de imunidade natural mediados por leucócitos PMN e a imunidade adaptativa estabelecida em modelos que utilizam camundongos resistentes e susceptíveis foi demonstrado por Romani et al. em 1997. Neste trabalho, foi observado que os neutrófilos, além de possuírem atividade fagocitária, também apresentam a capacidade de secretar várias substâncias imunomoduladoras, desempenhando um papel de importância fundamental na qualidade da resposta imune adaptativa ao agente infeccioso (Romani et al., 1997; Bliss et al., 2001).

Através de infecção intraperitoneal com *Toxoplasma gondii*, Bliss et al. (2000) observaram o aumento do afluxo de leucócitos acompanhado do aumento de IL-12; a análise por citometria de fluxo e microscopia fluorescente confocal demonstrou que aproximadamente 80% dos leucócitos eram IL-12⁺.

Estudos clínicos e laboratoriais indicam que os leucócitos PMN têm importante ação no controle da candidíase sistêmica e oral. Farah et al. (2001) ao depletarem camundongos BALB/c e CBA/CaH de leucócitos PMN pelo anticorpo monoclonal RB6-8C5 demonstraram o aumento da gravidade da candidíase oral nestes animais mesmo com o aumento detectado nos níveis de IFN- γ , IL-6 e TNF- α .

Na PCM humana foi demonstrado por Restrepo et al. (1975) que leucócitos PMN de pacientes podiam matar as leveduras de *Pb in vitro*; contudo, Gohman-Yahr et al. (1985) demonstraram a incapacidade digestiva dos leucócitos PMN periféricos apesar de apresentarem fagocitose normal.

Outros autores também descreveram a importância do sistema H₂O₂-MPO-haleta que mobilizado por neutrófilos ativados, tem atividade microbica (Brummer et al., 1993; McEwen et al., 1984 e 1987; Meloni-Bruneri et al., 1996; Kurita et al., 1991). No entanto, estudos prévios demonstram que macrófagos ativados por IFN- γ exercem um efeito fungicida em formas leveduriformes e conídios de *Pb*; esta ação ocorre através de um mecanismo independente de oxigênio sendo mediada pela presença de óxido nítrico (NO) (Cano et al., 1998; Gonzalez et al., 2000).

Em modelo de infecção pulmonar, usando camundongos isogênicos (Cano et al., 1995) observaram que a infecção por *Pb* por via intratraqueal induzia na fase aguda da infecção a um

maior afluxo de leucócitos PMN para os pulmões de camundongos susceptíveis do que em camundongos resistentes.

Souto et al. (2003) avaliaram a expressão de quimiocinas, seus receptores e sua regulação pela presença de IFN- γ e associaram o aumento da síntese de MIP-1 α (CCL3) e KC com o infiltrado de neutrófilos encontrado nos pulmões de camundongos deficientes de IFN- γ durante a fase aguda da infecção pelo *Pb*. Concluíram assim, que as quimiocinas e os receptores relacionados têm ação no recrutamento de células durante a PCM sendo essa resposta modulada pela presença de IFN- γ .

Como relatamos anteriormente, a resposta imune natural envolve outras vias efetoras sendo estas mediadas por células ou mediadores solúveis. Dentre esses mediadores, um de importância fundamental na resposta imune natural é a IL-12. Esta citocina é uma proteína heterodimérica de 70-kDa composta de 2 subunidades (p35 e p40); juntas, elas formam a IL-12 biologicamente ativa que é produzida por células fagocitárias e apresentadoras de Ag e inicialmente descrita por sua atividade na maturação de linfócitos T citotóxicos e na ativação de células NK para a produção de IFN- γ (Trinchieri et al., 1993; Matsumoto et al., 1997). Estudos recentes a colocam, como um fator chave na indução de uma resposta Th1 (Trinchieri et al., 1993), atuando também na ativação de células Th1 pré-existent (Rogge; Sinaglia, 1998).

Lammas et al. (2000) analisaram pacientes com alterações na produção de IL-12 e de IFN- γ e notaram o aumento na suscetibilidade seletiva a infecções por microrganismos intracelulares. Ottenhoff et al. (2000) pesquisaram deficiências de receptores para citocinas Th1 e comprovaram a ação essencial destes mediadores na imunidade do hospedeiro contra patógenos intracelulares, demonstrando que esses pacientes são incapazes de produzir e/ou responder ao IFN- γ .

Por outro lado, apesar da importante função na regulação da resposta imune, a IL-12 também pode aumentar os processos inflamatórios e agudos, podendo levar o hospedeiro a uma resposta inflamatória sistêmica e fatal principalmente quando associada à IL-18 (Nakamura et al. 2000; Carson et al., 2000; Okamoto et al., 2002; Sugawara et al., 2000).

Em concordância, citamos o trabalho de Arruda et al. 2002 que ao analisarem o efeito imunomodulador da IL-12 recombinante em animais infectados pelo *Pb*, observaram o grande aumento do infiltrado inflamatório pulmonar nesses animais.

Em outro modelo, Nolt et al. (2004) observaram que camundongos $CD4^{-/-}$ infectados por *M. tuberculosis* e tratados com IL-12 recombinante por 8 semanas, apresentaram aumento da sobrevida, diminuição no número de bactérias nos pulmões e aumento na secreção de IFN- γ .

Esses resultados podem ser decorrentes da presença aumentada de IL-18. Esta citocina foi originalmente descrita como fator indutor de IFN- γ , é secretada por macrófagos e células de Kupffer e a sua maior função está relacionada à indução da produção do IFN- γ por células Th1, células T, células B e NK, especialmente quando em associação com a IL-12. É um novo membro da família IL-1, produzido como um precursor biologicamente inativo (pró IL-18) que se apresenta sob a forma ativa secretada após clivagem pela caspase-1 ou outras caspases. A IL-18 murina apresenta 12% de homologia com o receptor IL-1 α e 19% com o receptor IL-1 β , entretanto a função da IL-18 não está relacionada à IL-1. A IL-18 apresenta propriedades biológicas semelhantes à IL-12, contudo estruturalmente estas citocinas não estão relacionadas (Yoshimoto et al., 1997; Tominaga et al., 2000; Carson et al., 2000; Dinarello et al., 1999; Akira et al., 2000; Nakanishi et al., 2001).

Kawakami et al. (2000) demonstraram que a IL-18 contribui para a resistência contra o *C. neoformans* em camundongos deficientes de IL-12 através da ativação de células NK para a

síntese de IFN- γ . Resultados similares foram obtidos por Cai et al. (2000) que demonstraram que a presença da IL-18 aumenta a resistência frente ao *T. gondii*, sendo essa resistência dependente da IL-12, IFN- γ e células NK.

Além da função ativadora da síntese de IFN- γ quando em associação a IL-12 e conseqüentemente da indução resposta Th1, isoladamente a IL-18 pode estimular a produção de IL-4 e induzir a síntese de IL-8 por eosinófilos sendo, portanto, em situações especiais, consideradas como indutora da resposta Th2.

Deve-se salientar que um padrão totalmente polarizado de imunidade celular existe somente em raras situações experimentais; na verdade, há uma inter-relação ou uma inter-regulação entre as expressões de linfócitos e citocinas Th1 e Th2. Em algumas situações onde se observam respostas imunes a agressões naturais ou experimentalmente induzidas podem ser claramente detectadas as dominâncias de padrões Th1 ou Th2, entretanto esta polarização torna-se mais nítida com a cronicidade da infecção (Reiner et al., 1995).

Estudos realizados em animais susceptíveis e resistentes à infecção i.t. pelo *Pb* demonstraram que o seu tratamento com o AcM anti IFN- γ induz a disseminação do fungo para o fígado e baço tomando indistinguível a carga fúngica pulmonar de camundongos susceptíveis e resistentes; além disso, ocorre a alteração do padrão de formação da lesão pulmonar que se torna desorganizada tanto em animais A/J como B10.A: o que se observa é uma reação inflamatória difusa intensa contendo um grande número de fungos em brotamento ativo (Cano et al., 1998).

De acordo com Souto et al. (2000) a disseminação do fungo não é controlada adequadamente por animais com deficiência de IFN- γ (IFN- γ KO) e do receptor de TNF- α (TNFR- α KO); estes autores sugerem que a ausência destes mediadores induz à diminuição da imunidade celular, baixa ativação de macrófagos, organização de granulomas prejudicada e

produção de NO diminuída. A presença de IFN- γ também é necessária para a síntese de TNF- α pelos macrófagos, que é indispensável para o acúmulo dessas células e a sua posterior diferenciação em células epitelióides; é ainda responsável pela formação e manutenção do granuloma auxiliando assim no controle da disseminação do fungo.

Na resposta imune frente a infecções provocadas por patógenos intracelulares a presença de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF- α) é prioritária para os fenômenos de imunoproteção. Neste caso, o IFN- γ tem uma multiplicidade de funções tais como; promover a fagocitose e a morte do microrganismo e induzir a síntese de IgG2a que é um fator opsonizante mais eficiente do que IgG1.

Os macrófagos ativados por IFN- γ exercem um efeito fungicida em formas leveduriformes e conídios de *Pb*; esta ação fagocitária ocorre através de um mecanismo independente de oxigênio sendo mediada pela presença de óxido nítrico (NO) (Cano et al., 1998; Gonzalez et al., 2000).

O NO é uma pequena molécula lipofílica enzimaticamente gerada pela clivagem do grupamento amino-guanidino terminal da L-arginina e toma parte em vários eventos biológicos. Existem isoformas das enzimas indutoras de NO; as NO-sintases ou NOS. Existe a NOS induzida (iNOS) e as NOS constitutivas (neuronal ou nNOS e endotelial ou eNOS) diferindo na sua estrutura e mecanismos regulatórios. Todas as isoformas convertem a L-arginina para citrulina e NO e requerem NADPH como cofator. As isoformas constitutivas de NOS produzem pequenas quantidades de NO, mas a produção induzida por citocinas ou inflamação é mantida independentemente da elevação de Ca^{++} intracelular.

A resposta mediada por células é o mecanismo clássico de ação mediada por NO, em particular a citotoxicidade mediada por macrófagos como primeira etapa na defesa contra

patógenos invasores (Lirk et al., 2002; Bogdan et al., 2000^a e 2000^b; Stefano et al., 2001; Coleman, 2002).

O NO é um mediador central da defesa não específica e está envolvido em várias respostas contra infecções e dano tecidual. Muitos mecanismos mediados pelo NO dependem da produção de IFN- γ e de IL-12; por exemplo, a resposta do tipo Th1 ativa macrófagos e os mesmos aumentam a secreção de NO (Brunet, 2001).

Recentes evidências sugerem que certas espécies de fungos podem evadir-se da ação óxido-nítrico; exemplos dessa resistência são observados em infecções por *C. neoformans* e *C. albicans* (Lirk et al., 2002; Elahi et al., 2001).

Como descrito anteriormente, a produção de IFN- γ é essencial em diferentes estágios da resposta imune e as células NK são uma das principais fontes desta citocina. Estas células são componentes fundamentais do sistema imune inato e têm ação nos estágios iniciais da resposta imune contra células tumorais, invasão por vírus e outros agente intracelulares (Long et al., 1999; Lanier et al., 2001).

Além de ser fonte importante de IFN- γ , estudos *in vitro* demonstraram que as células NK murinas limitam o crescimento do *P. brasiliensis* sugerindo que esta célula pode exercer uma ação defensiva no início da infecção. Outras investigações demonstraram que o granuloma formado durante a infecção pelo *Pb* mostra um número variável de células NK e eosinófilos, que poderiam participar da eliminação do fungo (Wagner et al., 1998; Camargo et al., 2000).

As células NK murinas são fenotipicamente caracterizadas por diferentes marcadores de superfície tais como os antígenos NK1.1 e asialo-GM₁ (Trinchieri, 1989). A expressão do antígeno de membrana NK1.1 foi observado em animais C57BL/6 com 8 semanas de idade e foi verificado que uma pequena fração de células T CD4⁺CD8⁻ (1-3%) apresentam o marcador

NK1.1. Entretanto, este antígeno está presente em uma grande proporção de timócitos TCD4⁺CD8⁻TCRαβ⁺ (50%) e TCD4⁻CD8⁻TCRγδ⁺ (10-15%). Em outras palavras, cerca de 70 % das células NK são CD4⁺CD8⁻ (Vicari et al., 1996).

As células NK podem ser depletadas através de anticorpos monoclonais contra o antígeno NK1.1 e contra o componente asialo-GM₁, desde que o antígeno seja encontrado na superfície dessas células. Animais C57BL/6 expressam o antígeno NK1.1 enquanto que os animais BALB/c não os têm expresso em suas células NK, porém apresentam o marcador asialo-GM₁. (Karlhofer et al., 1991; Bendelac et al., 1995).

Trabalho desenvolvido por Cardillo et al., em 2002 sugerem que as células NK têm importante ação imunoregulatória em animais C57BL/6 eutímicos, mas essa ação não foi bem expressa em animais timectomizados e infectados pelo *Trypanossoma cruzi*. No efeito imunorregulatório exercido pelas células NK estão incluídas a geração de células efectoras e células T de memória ou ativadas. A administração crônica de AcM anti-células NK provocou o aumento da mortalidade e da parasitemia, mas esses efeitos não foram notados em animais timectomizados.

Resultados obtidos no nosso laboratório mostraram claramente a importância de IL-12 no controle da PCM murina (Arruda et al., 2002). Para muitos patógenos intracelulares como por exemplo, *Listeria monocytogenes* a rápida produção de citocinas pró-inflamatórias e ativadoras de macrófagos por células NK é um fator essencial para a defesa do hospedeiro contra a infecção. A ativação das células NK para a produção de IFN-γ envolve a ação sinérgica da IL-12 e do TNF-α, sendo a IL-18 um potente indutor de IFN-γ atuando em sinergia com a IL-12.

Estudos com *Burkholderia pseudomallei* (primariamente denominada *Pseudomonas pseudomallei* e agente etiológico da melioidose) indicaram que as células NK e células TCD8⁺

são as principais fontes iniciais de IFN- γ sendo que células NK-IFN- γ^+ foram detectadas 5 horas após a infecção enquanto que as CD8 $^+$ -IFN- γ^+ foram encontradas somente após 15 horas, indicando assim que as células NK são a principal fonte desta citocina nas primeiras horas da infecção (Lertmemongkolchai et al., 2001).

Outros trabalhos também relatam a importância da célula NK na produção de IFN- γ e que quando ativadas pela IL-12, IL-12-IL-18 ou somente pela presença da IL-18 sintetizam grandes concentrações desta citocina (Okamoto et al., 2002; Biet et al., 2002; Wang et al., 1998; Quershi et al., 1999; Zhang et al., 1997; Thornton et al., 2001; Kawakami et al., 2000; Liberman et al., 2002).

Além destas, outras citocinas como; a IL-2, que é reconhecida como um potente indutor da resposta imune mediada por células e a IL-15 que é produzida por células não T, também pode ativar as células NK quando administradas a camundongos, aumentando a síntese de IFN- γ (Kawakami et al., 2000; Zhang et al., 1997; Quershi et al., 1999; Okamoto et al. 2002; Biet et al., 2002).

Tendo em vista a importância e a alta ocorrência desta micose sistêmica em nosso país e a complexa relação entre a resistência e a suscetibilidade do hospedeiro com o sistema imune nós nos propusemos a examinar os efeitos modulatórios da depleção sistêmica de IFN- γ , IL-12, de leucócitos PMN e das células NK em animais atímicos e eutímicos infectados por via intratraqueal com o *Pb*.

Analizamos a gravidade da doença através da quantificação da carga fúngica nos pulmões, no fígado e baço, determinação da reação de hipersensibilidade do tipo tardio, quantificação dos anticorpos específicos e dos níveis das citocinas produzidas nesse período. Além disso, foram

analisadas algumas das populações celulares presentes no LBA e no baço desses animais por citometria de fluxo (FACS) assim como a síntese de NO nos órgãos afetados.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O propósito desse trabalho foi avaliar a importância dos leucócitos PMN, da IL-12, do IFN- γ e das células NK nos mecanismos de imunidade natural ao *P. brasiliensis*.

Os estudos foram realizados *in vivo*, utilizando como abordagem experimental a depleção seletiva sistêmica de leucócitos PMN, células NK e a neutralização das citocinas IL-12 e IFN- γ .

A realização dos experimentos paralelamente em animais BALB/c atímicos, eutímicos permitiram a comparação dos efeitos destes mediadores em hospedeiros deficientes e suficientes de células T auxiliando assim o melhor entendimento da influência desses mediadores na imunidade adquirida desenvolvida após a infecção fúngica.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Paracoccidioides brasiliensis

Foi utilizada a cepa virulenta Pb 18 do *P. brasiliensis*. Isolados do fungo foram avaliados quanto à sua virulência e concluiu-se que o isolado Pb 18 é altamente virulento para camundongos susceptíveis (Kashino et al., 1985). O fungo foi mantido na sua fase L em meio de cultura Fava Netto com repiques semanais e incubação a 36°C (Fava Netto, 1955). O isolado Pb18 foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Celeste Fava Netto e originalmente obtido da Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da USP, tendo sido inicialmente isolado por Floriano Almeida em 1929, de pus ganglionar de paciente com 3 anos de idade na cidade de São Paulo, Brasil.

3.1.1. *Recuperação da virulência*

San-Blas e Vernet (1977) perceberam que a linhagem Pb18 perde a sua virulência quando mantida *in vitro* por períodos prolongados e em condições de subcultivo. Com base neste dado Kashino et al. (1990) verificaram que a reinoculação deste isolado em camundongos possibilita o restabelecimento da virulência.

A manutenção da virulência do fungo foi garantida através do reisolamento semestral de amostras isoladas de camundongos B10.A em fase crônica de infecção, período quando ocorre a disseminação para fígado e baço.

As amostras obtidas do pulmão, fígado e baço foram cultivadas por 10 dias em meio sólido BHI (DIFCO®) suplementado com 5% de fator de crescimento do fungo e 4 % de soro equino (Singer-Vermes et al., 1992). As células fúngicas recuperadas dos vários órgãos foram

reunidas e cultivadas em meio Fava-Netto por três repiques consecutivos e então utilizadas nos experimentos.

3.1.2. Preparo do inóculo

O fungo na sua forma leveduriforme foi retirado do tubo de cultivo e lavado 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,2). Depois da última lavagem, o sedimento foi ressuspenso em um volume de 30mL de PBS, deixando-se decantar as partículas maiores. A suspensão mais leve, que contém células isoladas ou com poucos brotamentos, foi coletada. A contagem do número de células foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer e a viabilidade das leveduras foi determinada pela técnica descrita por Berliner e Reca (1966), utilizando a coloração vital de Janus Green B.

3.2. Infecção intratraqueal (i.t.)

Os animais foram infectados por injeção intratraqueal (i.t) de 1×10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em 50µl de PBS. O procedimento foi realizado com os animais sob anestesia seguindo o esquema: 1) administração de 10 mL/kg de peso de solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino) 5,6 dihidro – 4 H – 1,3 –tiazina (ROMPUN, Bayer®) a 0,4% pela via i.p. (0,2 mL de ROMPUN); 2) após 10 min., administração de 10 mL/kg de peso de hidrato de cloral (Reagen ®) a 2,5% pela via i.p. (0,2 mL de Hidrato de Cloral).

Quando o animal apresentava insensibilidade à dor (após 10 min.), uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço foi feita e a traquéia foi exposta. O fungo foi administrado em um volume total de 50µl. Após a inoculação, a incisão foi suturada e os animais colocados sob uma fonte moderada de calor para controlar a hipotermia transitória produzida pela anestesia até

acordarem. Todos os procedimentos cirúrgicos executados nos experimentos foram realizados com suspensão fúngica com viabilidade entre 90 e 95%.

3.3. Animais

Para a infecção intratraqueal foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c *nu/nu* (atímicos), BALB/c *nu/-* (eutímicos) com idade média de 8 – 12 semanas. Os animais foram criados em condições livres de patógenos (SPF) no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB-USP.

Trabalhos prévios em nosso laboratório demonstraram que os animais atímicos são mais susceptíveis a paracoccidiodomicose que seus controles eutímicos (Burger et al., 1996 a, b). Os camundongos atímicos foram também utilizados para a expansão *in vivo* dos hibridomas secretores de anticorpos monoclonais (AcM) que foram utilizados na depleção de leucócitos PMN (RB6-8C5), neutralização de IL-12 (C17. 8) e IFN- γ (XMG 1.2).

3.4. Produção e Purificação de anticorpos monoclonais (AcM)

3.4.1. Hibridomas

Foram utilizados os hibridomas RB6-8C5 (secretor de IgG2b de rato contra o antígeno Gr-1 de granulócitos maduros), XMG 1.2 (secretor de IgG1 de rato anti IFN- γ) e C17. 8 (secretor de IgG1 de rato anti-cadeia p40 de IL-12 de camundongo).

3.4.2. Expansão dos hibridomas *in vitro*

As células de cada hibridoma foram cultivadas *in vitro* em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, glutamina 2mM, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL, e mantidas à 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e repicadas a cada 48 h.

As células foram ressuspensas em meio fresco, tendo antes sido determinado seu número total e sua viabilidade pela contagem em câmara de Neubauer, após a adição de 20 µl da suspensão celular com 180 µl de Azul de Trypan (0,4%). Obtido o número e a viabilidade celular adequado, parte destas células foi colocada em meio RPMI 1640 contendo 20% soro fetal bovino e 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO), rapidamente congelada à - 70°C (48 h) e estocada em nitrogênio líquido.

3.4.3. Expansão dos hibridomas *in vivo*

Os hibridomas desenvolvem-se muito bem na cavidade peritoneal de animais BALB/c geneticamente atímicos (*nu/nu*). Sendo assim, os animais foram pré-tratados (dia -1) com 1mL de 2, 6, 10,14-Tetra-Methyl-Pentadecane (Pristane, Sigma® T-7640) pela via i.p. Após 24 h esses animais receberam por via i.p. 1×10^7 células viáveis do hibridoma e desenvolveram ascite evidente antes do décimo quinto dia quando então foram sacrificados.

A cavidade peritoneal foi aberta, a ascite foi recolhida e centrifugada à 270 x g, à 4°C por 10 min. e o sobrenadante (com os AcM) foi estocado à -20°C para posterior purificação dos anticorpos.

3.4.4. Precipitação e purificação dos anticorpos monoclonais

Após a expansão dos hibridomas (*in vivo*) e coleta da ascite contendo os AcM estes foram precipitados utilizando o método descrito por McKinney e Parkison (1987). O material ascítico foi diluído 1:5 em tampão acetato 60 mM, pH 4,0; o pH da solução final foi ajustado para 4,5 com NaOH 1N.

Posteriormente foram adicionados, gota a gota, 25 μ L de ácido caprílico para cada mL de solução; a mistura foi deixada em repouso por 30 min. e posteriormente centrifugada a 10000 x g, a 4 °C, por 30 min.; foi coletado o sobrenadante e determinado o volume obtido; em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão PBS/EDTA 2 mM (10x) para cada 10 mL do sobrenadante e o pH ajustado para 7,4 com NaOH 1N. A solução foi resfriada à 4 °C e adicionado sulfato de amônio até obter-se 45% de saturação; prosseguiu-se com a agitação por 30 min. A preparação foi centrifugada à 10000 x g, à 4 °C/30 min., separando-se o precipitado (o sobrenadante foi reservado até a comprovação de que os anticorpos estavam no precipitado) que foi dissolvido em pequeno volume de tampão PBS/EDTA.

A solução foi dializada contra PBS durante 72 h. (com três trocas diárias); foi depois aquecida à 50-55 °C por 20 min. e centrifugada à 5000 x g/ 20 min. O sobrenadante foi coletado, seu volume foi determinado, assim como também a concentração de proteínas (método do ácido bicinonínico-BCA). Todo material foi filtrado em membrana Millipore® (0,22 μ) aliquoteado e estocado a -20°C.

3.4.5. Purificação de γ -globulina normal de rato

A IgG controle foi purificada a partir da mistura de soros obtidos de ratos Wistar adultos (cedidos pelo Biotério de Criação ICB-II, USP). O sangue foi obtido por punção cardíaca e

posteriormente coletado o soro, o qual foi então submetido aos procedimentos de precipitação da IgG, dosagem de proteínas e SDS-PAGE e pesquisa de contaminação por LPS.

3.4.6. Dosagem de Proteínas (Método do Ácido Bicinconínico, BCA)

A dosagem de proteínas totais presentes nas preparações de AcM foi realizada pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (Pierce®, N/C 23225, BCA protein assay reagent), segundo as instruções do fabricante.

3.4.7. Análise do grau de pureza das amostras por SDS-PAGE

Para verificar o grau de pureza dos AcM foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% com posterior coloração pela prata, utilizando a metodologia automatizada do Phast-System TM (Pharmacia® LKB Biotechnology). Foram utilizados, como proteínas de referência, padrões protéicos de baixo peso molecular (Low Molecular Weight, LMW) fornecidos pela Pharmacia®.

3.4.8. Determinação de contaminação por LPS

Os AcM e a imunoglobulina controle foram analisadas quanto à presença de LPS como contaminante. Os ensaios foram realizados utilizando-se o kit de detecção *Limulus amoebocyte*. Foram analisados os anticorpos monoclonais XMG1.2, C17.8, RB6-8C5 e a imunoglobulina normal de rato. Os AcM XMG1.2 e C17.8 e a IgG de rato apresentaram valores menores que 0,015 UE/mL. O AcM RB6-8C5 apresentou contaminação por LPS de 0,025 EU/mL.

3.5. Anticorpo anti-Asialo GM₁

O antígeno asialo-GM₁ (glicolípido gânglio-N-tetraosilceramida) é encontrado sobre macrófagos ativados, células T citotóxicas e em células NK. Para os experimentos com os animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* foi adquirido o anticorpo policlonal (IgG, IgM e IgA) anti-asialo GM₁ (Wako®) que foi utilizado na diluição indicada pelo fornecedor que é de 1:50 para a eliminação de 100% de células NK (segundo informações do fabricante essa concentração inibiu 100% da atividade citolítica das células NK quando em contato com células alvo YAC).

3.6. Protocolos de tratamento

3.6.1. Depleção de leucócitos PMN

Camundongos BALB/c eutímicos e atímicos foram depletados de granulócitos através da administração do anticorpo monoclonal purificado (250 µg/ camundongo) por via i.p., 24 h antes da inoculação i.t. de leveduras virulentas de *P. brasiliensis* e este tratamento foi repetido nos dias 2 e 5 após a infecção.

3.6.2. Depleção de IL-12 e IFN-γ

Para as depleções de citocinas foi utilizado o seguinte protocolo: 1 mg do anticorpo monoclonal (XMG 1.2 ou C17. 8) foi administrado pela via i.p. 4 h antes, 3 e 7 dias após a inoculação i.t. do fungo. Todos os animais tratados, assim como os seus controles normais tratados com gamaglobulina normal e infectados por via i.t. foram analisados 15 após a infecção pulmonar.

3.6.3. Depleção de células NK

Para a depleção de células NK de animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* o anticorpo anti asialo-GM₁ foi diluído a 1:50 conforme instruções do fabricante e administrados 200µL por via i.p. nos dias -6, -3 e +3 após infecção. Os animais controle receberam IgG normal de rato. Todos os animais tratados assim, como os animais controle foram infectados por via i.t. e analisados 15 dias após a infecção pulmonar (Algarra et al., 2002).

3.7. Avaliação do grau de infecção

O grau de infecção foi avaliado em animais depletados e seus respectivos controles através da recuperação de fungos viáveis do pulmão, fígado e baço, após 15 dias de infecção.

Os órgãos foram macerados e semeados em meio BHI (Brain Heart Infusion – Difco ®) suplementado com soro equino e o fator de crescimento caracterizado pelo filtrado de cultura do isolado 192 do *P. brasiliensis* (Castañeda et al., 1988; Singer-Vermes et al., 1992). Após aproximadamente 5 dias da semeadura as colônias foram contadas diariamente até ausência de crescimento fúngico. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi então dividido pelo peso do órgão (UFC/g) e transformado em unidade logarítmica de base 10.

3.8. Avaliação da resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT)

Grupos de animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* infectados foram avaliados quanto à resposta de HTT específica para o fungo, realizando-se o teste do coxim plantar de acordo com as condições descritas por Fazioli et al. (1994). O estudo foi feito no 15º dia após infecção. Assim, 24 h antes do teste a pata esquerda do animal foi medida com o auxílio de um espessímetro (Mitutoyo®),

Japão), e em seguida, foi injetado subcutâneamente no coxim plantar esquerdo 25µl de antígeno fúngico.

As medidas do volume da pata foram feitas após 24 h com o mesmo espessímetro e os resultados obtidos foram expressos como a diferença, em mm, entre as medidas feitas antes e 24 h após a inoculação do antígeno.

3.9. Avaliação do tempo de sobrevida

Grupos de 8-12 animais infectados com *P. brasiliensis* pela via i.t. foram tratados por via i.p. com o AcM e seus controles com IgG normal de rato e foram acompanhados quanto ao tempo de sobrevida.

3.10. Determinação do título de anticorpos específicos

Para determinar a resposta imune humoral dos animais infectados por via i.t. com leveduras viáveis de *P. brasiliensis*, amostras de sangue foram obtidas nos diversos tratamentos de depleção por via i.p. de IL-12, IFN-γ, leucócitos PMN e células NK. Os anticorpos totais específicos anti-*P. brasiliensis* e seus isótipos IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram detectados pelo método imunoenzimático (ELISA) previamente preconizado para este sistema antígeno-anticorpo por Mendes-Giannini et al. (1984) e modificado por Vaz et al. (1988).

3.10.1. Antígeno

Foi utilizado o exoantígeno ou CFA (Cell-Free-Antigen) descrito por Camargo et al. (1991), constituído da mistura de antígenos individuais obtidos de 6 isolados distintos do *P.*

brasiliensis (Pb 339, Pb 265, Pb 18 REL, Pb 18 BIREI e Pb18 TRIREI). Para a obtenção do antígeno, as células foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2.

3.10.2. Anti-soros

Foram utilizados anti-soros contra imunoglobulinas murinas produzidos em cabra não marcados (anti-Ig total, anti-IgM, anti-IgA, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3) e anti-IgG de cabra marcada com peroxidase (Shouthern Biotecnologies®).

Cada anti-soro foi utilizado de acordo com titulação previamente estabelecida e padronizada em nosso laboratório.

3.10.3. Ensaio imunoenzimático

O ensaio consistiu na sensibilização de microplacas de 96 poços de fundo chato (COSTAR®) com 100µL do antígeno CFA diluído em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) 0,1 M (pH 9,5) por poço para uma concentração de 39,3 µg/mL de proteína (3,93 µg/poço). As placas foram incubadas por 1 h à 37° C e mantidas 24 h à 4° C.

Após a incubação foram feitas 3 lavagens com uma solução de PBS/T20 à 0,05% (200µL/poço) processo este repetido a cada etapa. Os sítios livres foram bloqueados com 200µL de gelatina à 0,5% em TCB e as placas foram novamente incubadas à 37° C/1 h. Os controles positivos, negativos e as amostras foram adicionados à placa em diluições iniciais de 1/40 em PBS/T20 e foram diluídas sequencialmente na base 2 em volume de 100µL e incubadas por 1 h à 37° C.

Após a lavagem das placas, foram adicionados os anti-soros marcados em diluições adequadas determinadas por titulações prévias e novamente as placas foram mantidas sob

incubação por 1h à 37° C. Após nova lavagem, o anti-soro conjugado à peroxidase foi adicionado à placa que foi novamente incubada. A reação com o substrato foi realizada com a adição de 25mL de tampão citrato de sódio pH 5,0 (0,1M) na presença de OPD (10mg de ortofenilenodiamina) e 10 μ L de H₂O₂ (30%) em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 min.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4,0 N. A leitura das placas foi feita em leitor automático (Dynatec MR 5000) no comprimento de onda de 490nm. O “cut-off” da reação foi determinado em cada placa, pela média das densidades ópticas obtidas para uma mistura de soros controles negativos dosados em quadruplicata. As DOs de cada diluição dos soros experimentais foram comparadas frente ao respectivo “cut-off”, determinando assim que o título de cada amostra fosse expresso como a recíproca da maior diluição do soro experimental apresentando DO superior à leitura do soro negativo. Para cada tratamento foram determinadas as médias ($\log_2$) $\pm$ erro padrão dos títulos individuais.

3.11. Caracterização de IgE total

A dosagem de IgE sérica total foi desenvolvida a partir de OptEIA™ Set Mouse IgE contendo: Anticorpo de captura anti- IgE de camundongo (1:250); anticorpo biotilado anti-IgE de camundongo (1:250); conjugado avidina-peroxidase (1:250); IgE recombinante de camundongo.

As placas de fundo chato (COSTAR®) foram sensibilizadas com o AcM primário diluído em tampão carbonato (0,1 M, pH 9,5) e incubadas por 24 h à 4° C. Após a lavagem (3X), as placas foram bloqueadas com PBS + 10% de soro e incubadas por 1 h à temperatura ambiente.

Os padrões foram adicionados à placa em duplicata e em diluições seriadas. No restante dos poços foram adicionadas as amostras e as placas foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente. O anticorpo biotinilado diluído em PBS + 10% de soro foi adicionado às placas após a lavagem (5 X) e foram novamente incubadas por 1 h à temperatura ambiente.

Após o período determinado para a incubação, as placas foram lavadas (7X) e foi adicionado 100µL de TMB (tetrametilbenzidina) por poço. Incubação por 30 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N. Após 30 min. as placas foram lidas em 450nm em leitora automática sendo o resultado expresso em pg/mL.

3.12. Quantificação de citocinas por ELISA de Captura

A presença de citocinas nos homogenatos de pulmão, fígado e baço obtido nas diversas condições experimentais, foi analisada por ELISA de captura utilizando-se pares de AcM para cada citocina murina (Pharmingen®). As concentrações para cada um dos AcM primário e secundário no ELISA foram previamente determinadas em nosso laboratório.

As placas de fundo chato (COSTAR®) foram sensibilizadas com o AcM primário diluído em solução de bicarbonato de sódio pH 5,0 (0,1M) na concentração indicada e incubadas à 4°C por 24 h.

Os sítios livres foram bloqueados com gelatina diluída à 1% em PBS (pH 7,0) e incubadas por 2 h à temperatura ambiente. A citocina recombinante foi adicionada para a obtenção da curva-padrão seguindo uma diluição seriada em DEMEM com 10% de SFB e as amostras em duplicata nos demais poços.

Após 1 h de incubação à 4°C o AcM secundário biotilado diluído previamente em PBS com 10% de SFB foi adicionado às placas na concentração desejada e incubado por 45 min. à temperatura ambiente.

O complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase (Amersham®) foi diluído em tampão PBS/T20 adicionado às placas previamente lavadas. A reação com o substrato (5µL de H₂O₂ a 30% diluído em solução (2,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,2M, 2,2 mL de ácido cítrico 0,1M, pH 5,0 e de 10mL de H₂O) adicionado de 10mg do revelador ortofenilenodiamina (OPD) (Merck ®) foi obtida após incubação das placas por 45 min. ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N.

A leitura das placas foi realizada em leitor automático em comprimento de onda de 490nm. As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear feita para a curva padrão obtida com o padrão adequado de citocina recombinante e expressa em pg/mL.

3.13. Quantificação de IL-18

A presença de IL-18 nos homogenatos de pulmão, fígado e baço obtido nas diversas condições experimentais e foi analisado por ELISA de captura (RD®). As concentrações para cada um dos AcM primário e secundário foram previamente determinadas em nosso laboratório. As placas de fundo chato (COSTAR®) foram sensibilizadas com o AcM primário diluído em solução de PBS 0,2 µM em pH 7,4 na concentração indicada e incubada por 24 h à temperatura ambiente.

Os sítios livres foram bloqueados com tampão PBS acrescido de 1% BSA, 5% de sacarose, 0,05% de N_aN₃ e incubadas por 1 h à temperatura ambiente. A citocina recombinante

seguir a diluição seriada em PBS-BSA (1%) para a obtenção da curva-padrão e as amostras foram adicionadas à placa nos demais poços em duplicata.

As placas foram incubadas por 2 h à temperatura ambiente e após esse período foram lavadas por 3 vezes e foi adicionado o anticorpo biotinilado diluído em PBS-BSA 1% na concentração adequada.

Após a incubação por 2 h à temperatura ambiente e a lavagem das placas, foi adicionada a estreptoavidina-HRP (R&D®) diluída 1:200 em PBS-BSA 1% e incubadas por 30 min. ao abrigo da luz. A solução substrato (reagente A - peróxido de hidrogênio e Reagente B - tetrametilbenzidina) foi adicionada às placas que foram incubadas por 30 min. ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4 2N.

A leitura das placas foi realizada em leitor automático em comprimento de onda de 450 nm. As concentrações da citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear feita para a curva padrão obtida com o padrão adequado de citocina recombinante. Os valores foram expressos em pg/mL.

3.14 Dosagem de Óxido nítrico (NO)

A concentração de nitritos no homogenato de pulmão foi usada como indicador de síntese de NO e detectada através do Reativo de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% naftiletlenodiamina, 2,5% H_3PO_4). Volume de 50 μL do sobrenadante de pulmão foi adicionado em microplacas com igual volume de Reativo de Griess e incubadas a temperatura ambiente por 10 min.. As placas foram submetidas à leitura em leitor automático (540nm). A concentração de NO_2 foi determinada utilizando nitrito de sódio como padrão e expressa em μM . O parâmetro utilizado

para a síntese normal de NO foram os sobrenadantes de pulmão de animais não infectados e mantidos nas mesmas condições de estoque dos animais experimentais infectados tratados.

3.15 Caracterização das células do lavado- bronco- alveolar (LBA)

Os animais foram submetidos aos diferentes tratamentos (i.p.) e infectados por via i.t. Após 48 h da infecção os camundongos foram letalmente anestesiados, a traquéia foi exposta e canulada. O lavado-bronco-alveolar foi obtido com 2 lavagens sucessivas com PBS e recolhido em volume total de 2mL e centrifugado à 1200 rpm por 10 min.. O sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspenso em 1000 μ L. A contagem global de células foi feita após a diluição (1:10) com solução de Turk e o número de células corrigido para 2×10^5 células /mL e 200 μ L foram centrifugados a 600 rpm por 4 min. (Cytospin). As lâminas foram coradas e os diferentes tipos celulares foram caracterizados morfolologicamente após a contagem de 200 células.

3.16 Análise das células do baço e do lavado-bronco-alveolar por citometria de fluxo

Os camundongos dos grupos controle e tratados tiveram o seu baço removido, macerado e suas células contadas em Câmara de Neubauer. A concentração de células foi ajustada para 2×10^6 céls/poço na placa de fundo “U”. Para o lavado-bronco-alveolar as células foram obtidas após lavagem dos pulmões dos camundongos com 1 mL de sol. de PBS-Azida (01%) + soro fetal bovino (SFB 5%). As células foram centrifugadas, contadas em Câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de 2×10^5 cels/poço.

As placas foram centrifugadas (LBA ou baço) a 2000 rpm por 10 segundos (centrifuga refrigerada Sorval à 4° C). O sobrenadante foi dispensado e foi adicionado então o Ac marcado (20µL no título adequado). A placa foi incubada por 20 min. em geladeira.

As placas foram lavadas com PBS-azida-soro fetal bovino completando o volume de 20µL do anticorpo marcado já na placa para um volume final de 200µL. A lavagem foi repetida 2 a 3 vezes. O sobrenadante foi dispensado e as células foram ajustadas para um volume final de 500µL em PBS-azida nos tubos para a leitura do FACS. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo e protegidas da luz. As células marcadas foram submetidas à leitura de 10000 eventos para as células de baço e 5000 para o LBA em citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton-Dickinson®).

A análise foi feita por histogramas com o auxílio do software livre WinMDI 2.8 adquirido na URL : <http://facs.scripps.edu/software.html>.

Anticorpos marcados (BD Biociences - Pharmingen®):

R- Phycoerythrin (R-PE) conjugated hamster anti mouse CD11c

R- Phycoerythrin (R-PE) conjugated hamster anti mouse $\gamma\delta$ -Tcell receptor monoclonal antibody.

Isothiocianato de fluoresceína (FITC) conjugated hamster anti mouse CD3

Isothiocianato de fluoresceína (FITC) goat anti-mouse Ig (H+L)

3.17. Análise estatística

Os números de UFC / g de tecido foram transformados em unidades logarítmicas ($\log_{10}$) antes da análise estatística e expressos em média $\pm$ erro padrão. Os animais tratados e controle de um mesmo grupo (atímico ou eutímico) foram analisados pelo teste T de Student, método não pareado.

Os grupos de animais atímicos e eutímicos tratados por AcM e seus controles foram analisados por ANOVA seguido de método de múltiplas comparações de acordo com Tukey (Graphpad Prism ®– Software version 2.01).

Os resultados da dosagem de anticorpo por ELISA foram transformados em unidades logarítmicas na base 2 e expressos em título médio $\pm$ erro padrão. Os dados referentes as citocinas (pg/mL) e NO₂ (μ M) foram apresentados em média $\pm$ erro padrão.

O tempo de sobrevida dos animais foi analisado pelo Teste de Log-rank.

Todos os experimentos foram repetidos ao mínimo de 2 vezes.

Resultados de $p < 0,05$ (significante *), $p < 0,01$ (muito significante **), $p < 0,0001$ (extremamente significante ***).

Todos os resultados obtidos estão inseridos em tabelas e podem ser observados no item ANEXOS.

RESULTADOS

DEPLEÇÃO SISTÊMICA DE LEUCÓCITOS-PMN

4. DEPLEÇÃO SISTÊMICA DE LEUCÓCITOS PMN

4.1. Produção e Purificação do Anticorpo Monoclonal anti leucócitos PMN

Camundongos BALB/c atímicos (*nu/nu*) foram inoculados com 1×10^7 células do hibridoma RB6-8C5 por via i.p.. Cerca de 10-15 dias após inoculação, o líquido ascítico foi coletado e purificado com ácido caprílico e sulfato de amônio, utilizando o método de McKinney & Parkison (1987), as proteínas totais foram dosadas pelo método do ácido bicinonínico (Pierce, N/C 23225) e a pureza foi verificada em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Obtivemos anticorpo purificado, com concentração de 8,12 mg/ml. Na análise eletroforética (SDS-PAGE) observamos 2 bandas protéicas de peso molecular de cerca de 25 e 50 kDa.

4.2. Avaliação da depleção de leucócitos PMN pelo AcM

A depleção de leucócitos PMN dos animais em experimentação foi avaliada pela coleta de sangue da cauda dos camundongos nos dias -1, no dia 0 e logo após a sequência de tratamento (6º dia) e imediatamente antes do sacrifício dos animais (14º dia).

Na figura 1 apresentamos a queda no número total de leucócitos circulantes, redução esta que foi anteriormente observada em nosso laboratório através de pesquisa com animais B.10A e A/J (Pina, A. 2001). A redução de leucócitos PMN no nosso experimento foi de 89 - 90% sendo que em alguns animais após a segunda doses do AcM não foram encontrados leucócitos PMN circulantes.

Figura 1 - Efeito da depleção de leucócitos PMN em camundongos atímicos e eutímicos tratados pelo AcM RB6-8C5 (-1, +2, +5 com dose de 250 μ g/ camundongo) e IgG normal de rato por via i.p. e infectados com 1×10^8 leveduras do *P. brasiliensis* por via i.t. A contagem global de leucócitos PMN circulantes foi feita imediatamente antes da primeira dose do AcM, no dia 0 (dia da infecção i.t com *P. brasiliensis*), no dia +6 (término das depleções) e no dia 14, logo antes dos experimentos para a avaliação do grau de infecção induzido pelo tratamento.

4.3. Avaliação do Grau de Infecção e Resposta de Hipersensibilidade do Tipo

Tardio (HTT)

Os resultados abaixo representam os experimentos realizados com o tratamento com o AcM RB6-8C5 utilizado para a depleção seletiva de leucócitos PMN. Grupos de animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* tratados com o anticorpo monoclonal (AcM) anti leucócitos PMN ou IgG normal de rato e infectados i.t. com leveduras do *P. brasiliensis* foram sacrificados após 15 dias de infecção. Seus órgãos foram retirados, pesados, macerados e plaqueados em ágar BHI suplementado e após contagem valores foram expressos em UFC/g de tecido ($\log_{10}$).

Nossos resultados demonstraram que a depleção de leucócitos PMN pelo AcM não alterou os números de UFC de *P. brasiliensis* no pulmão e fígado de camundongos atímicos e eutímicos; a única alteração significativa encontrada foi relacionada ao grau de infecção no baço ($1,4 \pm 0,6 \log_{10}$ X $2,4 \pm 0,4 \log_{10}$) dos camundongos atímicos.

A análise comparativa do grau de infecção nos pulmões pelo método A-NOVA seguido de múltiplas comparações de acordo com o método de Tukey demonstra que o grau de infecção pulmonar de animais atímicos é significativamente maior do que dos animais eutímicos indicando que aos 15 dias de infecção o fungo já manifesta importante disseminação e confirma trabalhos anteriores que indicaram a importância das células T na resposta protetora frente ao fungo.

A análise dos testes de HTT entre os grupos não mostrou alterações significantes.

A figura 2 (A e B) mostra a média de UFC/g de tecido ($\log_{10}$) no pulmão, fígado e baço dos grupos controle e depletado, e a média dos valores obtidos no teste de HTT em mm, após 15 dias de infecção.

Figura 2. (A) Efeito da depleção sistêmica de leucócitos PMN no grau de infecção de animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* pelo *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados pela via i.p. com AcM RB6-8C5 (dias -1 e +2 e +5 com 250 µg/camundongo) ou IgG normal de rato e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via intratraqueal. O grau de infecção foi determinado após 15 dias de infecção pelo método de UFC. (B) Efeito do tratamento com AcM RB6-8C5 na HTT de camundongos BALB/c *nu/nu* e *nu/+* após 15 dias de infecção; a barra indicativa dos animais normais refere-se aos camundongos não infectados submetidos à reação de HTT com antígeno de Fava Netto.

4.4. Avaliação do tempo de sobrevida

Grupos de 8-10 camundongos BALB/c atímicos e eutímicos foram tratados por via i.p. com AcM (dias -1, +2 e +5 com 250 µg/ camundongo) ou IgG normal de rato e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. e mantidos sob observação para o estudo da mortalidade.

Observamos na figura 3, que os animais atímicos apresentam sobrevida menor do que os animais eutímicos; entretanto, não detectamos diferença significativa entre os grupos depletados de leucócitos e os tratados com IgG.

Nas fases iniciais da doença esse dado pode ser melhor observado, pois notamos que os animais atímicos sofrem com o agravamento da doença e tem seu tempo de sobrevida reduzido a menos de 100 dias, quando são observadas as primeiras mortes. Os animais eutímicos demonstraram ser mais resistentes à doença, pois os animais começam a morrer próximo aos 200 dias de infecção.

Figura 3. Efeito da depleção sistêmica de leucócitos PMN no tempo de sobrevivência de animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* após infecção i.t. pelo *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM anti-PMN (dias -1, +2 e +5 com 250 µg/camundongo) ou IgG normal de rato e infectados com 1x10⁶ leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. Teste de Log-rank onde p<0,05 é considerado significativo.

4.5. Resposta imune humoral específica

Os soros dos animais atímicos e eutímicos depletados por via i.p. foram submetidos ao ELISA para a detecção e quantificação de anticorpos específicos produzidos durante os experimentos (figura 4 (A e B)).

Os resultados observados com a depleção de leucócitos PMN indicaram que estas células exercem pouca influência na síntese de imunoglobulinas em animais eutímicos.

A dosagem dos isótipos de imunoglobulinas dos animais deficientes de células T depletados quanto comparados aos animais controle indicaram somente a alteração significativa da IgA ($2,7 \pm 0,5 \log_2$ X $5,5 \pm 0,2 \log_2$).

Figura 4. Quantificação dos isótipos de anticorpos específicos presentes no soro de animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* após 15 dias de infecção pelo *P. brasiliensis* e depletados ou não de leucócitos PMN. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM (dias -1, +2 e +5 com 250 µg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1x10⁶ leveduras do fungo pela via i.t. (n=5) . Valores de p<0,05 foram considerados significantes (A) BALB/c *nu/nu* e (B) BALB/c *nu/+* .

4.6. Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão

O sobrenadante de pulmão obtido durante o experimento de quantificação de UFC/g de tecido, conservado a -70°C foi utilizado para a pesquisa de citocinas (figura 5 (A e B)).

A quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão de animais atímicos depletados de leucócitos PMN indicou a redução significativa de IL-12 ($492 \pm 48\text{ pg/mL}$ X $328 \pm 32\text{ pg/mL}$) e de IL-5 ($236 \pm 38\text{ pg/mL}$ X $88 \pm 28\text{ pg/mL}$). Para as outras citocinas analisadas não foram detectadas quaisquer alterações significantes.

A análise dos sobrenadantes de pulmão dos camundongos eutímicos pudemos observar a redução de IL-2 ($3050 \pm 223\text{ pg/mL}$ X $2306 \pm 205\text{ pg/mL}$) e de IL-5 ($2465 \pm 274\text{ pg/mL}$ X $96 \pm 55\text{ pg/mL}$) e o aumento da síntese da IL-3 ($227 \pm 12\text{ pg/mL}$ X $295 \pm 24\text{ pg/mL}$) nos grupos depletados comparados aos seus controles. Notamos também que aparentemente os animais atímicos produzem mais IFN- γ e menos IL-5 (observar escala). Os resultados das dosagens podem ser observados no item Anexo.

Figura 5. Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante de pulmão de animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* após 15 dias de infecção e depletados ou não de leucócitos PMN. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM (nos dias -1, +2 e +5 com 250 μ g/ camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1x10⁶ leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. Valores de p<0,05 foram considerados significantes (A) BALB/c *nu/nu* e (B) BALB/c *nu/+*.

4.7. Caracterização da celularidade do Lavado-Bronco-Alveolar (LBA)

Camundongos BALB/c atímicos e eutímicos foram tratados por via i.p. com AcM anti-leucócitos PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato 1 dia antes da infecção i.t. com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis*. Após 48 horas da infecção, os animais foram sacrificados, a sua traquéia foi canulada e seus pulmões foram perfundidos com 1 mL de PBS estéril por 2 vezes e a celularidade foi analisada microscópicamente após coloração diferencial e contagem de 200 células.

A análise estatística (teste T de Student) quanto à presença de leucócitos PMN no LBA indicou uma redução extremamente significativa onde ($1,7 \pm 0,04$ cél. $\times 10^5$ $\times 1,2 \pm 0,04$ cél. $\times 10^5$) para os camundongos BALB/c *nu/nu* e para os animais *nu/+* ($1,6 \pm 0,05$ cél. $\times 10^5$ $\times 0,7 \pm 0,04$ cél. $\times 10^5$).

Nenhuma alteração significativa foi observada quanto à presença de linfócitos no LBA de ambas as linhagens analisadas. Quanto ao número de monócitos observamos o aumento significativo em animais *nu/nu* ($0,3 \pm 0,05$ cél. $\times 10^5$ $\times 0,6 \pm 0,12$ cél. $\times 10^5$) e em animais *nu/+* ($0,3 \pm 0,03$ cél. $\times 10^5$ $\times 1,01 \pm 0,06$ cél. $\times 10^5$). A contagem de eosinófilos revelou alteração significativa somente em animais eutímicos (a.l.d. $\times 0,13 \pm 0,04$ cél. $\times 10^5$). Os resultados podem ser analisados na figura 6.

Figura 6. Celularidade do lavado branco alveolar de animais BALB/c atímicos e eutímicos depletados de leucócitos PMN por via sistêmica com AcM anti-PMN 1 dia antes da infecção i.t. com 1×10^6 cels. de leveduras de *P. brasiliensis*. Os pulmões foram lavados, 48 h após a infecção, com PBS estéril. Após a serem centrifugadas as células foram coradas e analisadas quando à morfologia. (n=6-7)

4.8. Quantificação de NO no homogenato de pulmão

Analizamos a produção de NO do sobrenadante de pulmão dos animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* depletados por via sistêmica de leucócitos PMN e infectados por via i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis*.

O sobrenadante foi coletado após maceração e centrifugação do pulmão e mantido sob refrigeração à -70°C até o momento da dosagem. A análise comparativa entre os grupos foi feita pelo teste ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey.

A produção de NO do homogenato de pulmão de animais depletados por via i.p. de leucócitos PMN não apresentou nenhuma alteração significativa entre os grupos infectados. Há diferença, entretanto, entre os animais atímicos e eutímicos normais e os grupos infectados.

A figura 7 apresenta os resultados obtidos quanto à produção de NO durante a depleção de leucócitos PMN após 15 dias de infecção.

Figura 7. Quantificação de NO no homogenato de pulmão de animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* depletados de leucócitos PMN. Os animais foram tratados por via i.p. com AcM (nos dias -1, +2 e +5 com 250µg/camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1x10⁶ leveduras do *P. brasiliensis* pela via intratraqueal. Os homogenatos foram obtidos no 15º dia da infecção. Valores de p< 0,05 foram considerados significantes (n=6-8).

4.9. CONCLUSÕES PARCIAIS

1. Durante a depleção de leucócitos PMN observamos o aumento significativo nos números de fungos no baço de animais atímicos e em animais eutímicos nenhuma alteração foi detectada, indicando que provavelmente essas células exerceram pouca participação no curso da doença nos animais suficientes de células T e importância relativa na disseminação do fungo em animais atímicos.
2. A depleção de leucócitos PMN não induziu a nenhuma alteração na resposta de HTT sugerindo que essas células têm pouca participação na resposta imune celular desenvolvida nos primeiros 15 dias da infecção pelo *P. brasiliensis*.
3. A depleção de leucócitos PMN não alterou a sobrevivência dos grupos analisados.
4. Demonstramos também que a depleção de leucócitos PMN não exerceu influência na síntese de imunoglobulinas séricas induzindo somente ao aumento significativo de IgA nos animais atímicos.
5. Observamos que a depleção de leucócitos PMN exerce marcante influência na síntese citocinas pulmonares em camundongos atímicos e eutímicos.

DEPLEÇÃO SISTÊMICA DE IL-12

5. DEPLEÇÃO SISTÊMICA DE IL-12

5.1. Produção e purificação do anticorpo monoclonal anti IL-12

Camundongos BALB/c atímicos (*mu/mu*) foram inoculados com 1×10^7 células do hibridoma C17.8 por via i.p.. Obtivemos anticorpo purificado na concentração de 40,62 mg/ml. Na análise eletroforética (SDS-PAGE) observamos 2 bandas proteicas de peso molecular de cerca de 25 e 50 kDa compatível com as cadeias leves e pesadas da IgG.

5.2. Avaliação do grau de infecção e da resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT).

Grupos de animais BALB/c *mu/mu* e *mu/+* foram tratados com o anticorpo monoclonal (AcM) anti IL-12 ou IgG normal de rato e infectados por via i.t. com leveduras do *P. brasiliensis* e foram sacrificados após 15 dias de infecção. Seus órgãos foram retirados, pesados, macerados e plaqueados em ágar BHI suplementado. O número de UFC/g de tecido foi calculado e transformado em $\log_{10}$. Observamos com os resultados da neutralização de IL-12 pelo anticorpo monoclonal C17.8 que os animais atímicos tiveram um aumento significativo das UFC/g de tecido no baço ($1,1 \pm 0,5 \log_{10}$ X $2,4 \pm 0,6 \log_{10}$) e fígado ($1,6 \pm 0,7 \log_{10}$ X $3,4 \pm 0,5 \log_{10}$). Os animais BALB/c *mu/+* entretanto, apresentaram além do aumento da carga fúngica no pulmão ($5,5 \pm 0,2 \log_{10}$ X $5,9 \pm 0,1 \log_{10}$), números elevados de leveduras no baço ($0,2 \pm 0,2 \log_{10}$ X $0,6 \pm 0,4 \log_{10}$) e nenhuma alteração significativa no fígado. Quanto à reação de Hipersensibilidade do Tipo Tardio não foram encontrados resultados significantes entre os grupos tratados e não tratados.

Na figura 8 (A e B) apresentamos o resultado comparativo entre os animais BALB/c *mu/mu* e *mu/+* após o tratamento com AcM anti IL-12 após 15 dias de infecção i.t. com *P. brasiliensis* com relação ao número de UFC e ao teste de hipersensibilidade.

Figura 8. (A) Efeito da depleção i.p. de IL-12 no grau de infecção de animais BALB/c *nu/nu* (n=6-9) e *nu/+* (n=10-15) ao *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM C17. 8 (-4h, +3 e +7 com 1mg/camundongo) ou IgG normal de rato e infectados com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. O grau de infecção foi determinado após 15 dias de infecção pelo método de UFC. (B) Efeito do tratamento com AcM HTT de camundongos BALB/c *nu/nu* e *nu/+* após 15 dias de infecção; a barra de animais normais refere-se aos animais não infectados e submetidos ao ensaio de HTT com antígeno de Fava Netto

5.3. Avaliação do tempo de sobrevida

Grupos de 10-12 camundongos BALB/c atímicos e eutímicos foram tratados por via i.p. com AcM (-4h, +3 e +7 com 1 mg/camundongo) ou IgG normal de rato e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. e mantidos sob observação para o estudo da mortalidade.

Observamos que os camundongos BALB/c *mu/mu* apresentaram um tempo de sobrevida menor que os animais BALB/c *mu/+*, sendo esse resultado significativo, onde valor de $p < 0,0304$. A análise comparativa entre os animais atímicos controle e depletados não apresentou significância estatística assim como a análise entre os animais eutímicos. Os resultados obtidos são demonstrados na figura 9.

Figura 9. Efeito da depleção i.p. de IL-12 no tempo de sobrevivência de animais resistentes BALB/c nu/nu e nu/+ após infecção i.t. pelo *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM anti IL-12 (-4h, +3 e +7 com 1mg/camundongo) ou IgG de rato e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.

5.4. Resposta imune humoral específica

Os soros dos animais atímicos e eutímicos depletados de IL-12 por via i.p. foram submetidos ao ELISA para a detecção e quantificação de anticorpos específicos produzidos durante os experimentos. A quantificação sérica de isótipos específicos anti *P. brasiliensis* dos animais depletados de IL-12 demonstrou aumento significativo de Ig total ($7,3 \pm 0,3 \log_2$ X $9,1 \pm 0,4 \log_2$), IgA ($5,7 \pm 0,4 \log_2$ X $7,3 \pm 0 \log_2$), IgG1 ($6,1 \pm 0,5 \log_2$ X $8,1 \pm 0,4 \log_2$), IgG2a ($6,7 \pm 0,4 \log_2$ X $9,3 \pm 0,8 \log_2$) e IgG2b ($5,7 \pm 0,4 \log_2$ X $8,6 \pm 0,2 \log_2$) para camundongos eutímicos.

Em animais atímicos depletados de IL-12 por via sistêmica o ensaio imunoenzimático detectou somente o aumento nos níveis séricos de IgG3 ($5,3 \pm 0 \log_2$ X $6,9 \pm 0,5 \log_2$). Ao observar a síntese de anticorpos notamos que há nítida influencia da IL-12 na produção de anticorpos por animais eutímicos e pouca influencia nos animais atímicos apontando para o fato de que a maioria dos anticorpos produzidos na PCM são T - dependentes.

A IL-12 pode atuar na imunidade natural ativando fagócitos. Entretanto, no nosso modelo a sua ação mais marcante acontece nos camundongos suficientes de células T o que evidencia o papel desta citocina nos mecanismos de indução de imunidade celular mediados por linfócitos T. O resultado da quantificação dos níveis dos isótipos específicos em animais eutímicos pode ser observado na figura 10 (A e B) a seguir.

Figura 10. Quantificação dos isótipos específicos presentes no soro de animais BALB/c nu/nu e nu/+ após 15 infectados pelo *P. brasiliensis* e depletados ou não de IL-12. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM anti IL-12 (–4h, +3 e +7 dias com 1mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do fungo pela via i.t.. (A) BALB/c nu/nu e (B) BALB/c nu/+

5.5. Determinação de IgE total

A produção de IgE foi objeto de estudo devido aos resultados encontrados quando analisamos a celularidade do LBA de camundongos eutímicos neutralizados de IL-12 por via i.p.. Estes resultados indicaram aumento significativo no número de eosinófilos sugerindo provavelmente alguma alteração na produção da IgE.

As dosagens de IgE de animais suficientes de células T indicaram o aumento significativo (45 ± 7 pg/mL X 74 ± 4 pg/mL), concordando com os resultados anteriormente observados: o aumento de eosinófilos que foi observado quando analisamos a celularidade do LBA após 48 horas de infecção, aumento significativo do número de células B e CD3⁺ indicados pela análise por citometria de fluxo e a alteração expressiva de Ig Total, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgA.

Na figura 11 apresentamos os resultados da quantificação de IgE no soro dos animais BALB/c *nu/nu* e *nu/+* neutralizados de IL-12 por via i.p. e inoculados por via i.t. pelo *P. brasiliensis* após 15 dias de infecção

Figura 11. Quantificação de IgE total presentes no soro de animais BALB/c nu/nu e nu/+ após 15 infectados pelo *P. brasiliensis* e depletados ou não de IL-12. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM anti IL-12 (-4h, +3 e +7 dias com 1mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do fungo pela via i.t.. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. (n=5)

5.6. Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes de pulmão, fígado e baço foram obtidos durante os experimentos para a quantificação de UFC/g de tecido e mantidos à -70°C sendo utilizados para a pesquisa de citocinas. Foram utilizadas amostras de 5 animais para cada grupo experimental.

5.6.1. Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão

A depleção sistêmica de IL-12 induziu nos animais atímicos a uma redução da IL-5 ($165 \pm 14\text{ pg/mL}$ X $113 \pm 3\text{ pg/mL}$) e IFN- γ ($1983 \pm 164\text{ pg/mL}$ X $997 \pm 87\text{ pg/mL}$). Estes mesmos animais apresentaram elevação significativa dos níveis de IL-10 no sobrenadante de pulmão quando comparados aos animais controle (a.l.d. X $282 \pm 163\text{ pg/mL}$). Ao observarmos os resultados notamos que a síntese de IFN- γ nos animais *nu/nu* é IL-12 dependente e que a redução de IFN- γ permite o aumento de IL-10 que poderia estar induzindo a produção de um ambiente antiinflamatório no pulmão. Os animais eutímicos depletados de IL-12 apresentaram redução nos níveis de IL-10 ($441 \pm 63\text{ pg/mL}$ X a.l.d.). As citocinas que apresentaram aumento significativo foram: IL-2 ($1129 \pm 94\text{ pg/mL}$ X $1550 \pm 38\text{ pg/mL}$), IL-12 ($263 \pm 15\text{ pg/mL}$ X $347 \pm 20\text{ pg/mL}$) e IFN- γ ($981 \pm 120\text{ pg/mL}$ X $1573 \pm 185\text{ pg/mL}$). Em animais *nu/+* o aumento de IL-12, IL-2 e IFN- γ além da redução significativa de IL-10 sugerem a existência de fenômeno rebote já observado em outros experimentos de depleção de IL-12 realizados em nosso laboratório (dados ainda não publicados), onde após o término do tratamento com o anticorpo monoclonal ocorre uma elevação significativa na síntese desta e de outras citocinas. Notamos também que o efeito rebote somente foi detectado em animais eutímicos indicando assim que talvez as células T controlem esse fenômeno.

A síntese de citocinas pulmonares em animais atímicos e eutímicos depletados de IL-12 por via i.p. e infectados com *P. brasiliensis* são apresentadas na figura 12 (A e B).

Figura 12. Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante de pulmão de animais BALB/c nu/nu e nu/+ depletados ou não de IL-12 após 15 dias de infecção. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM anti IL-12 (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. (A) BALB/c nu/nu e (B) BALB/c nu/+. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. (n=5)

5.6.2. Quantificação de citocinas no sobrenadante de fígado e baço

A depleção i.p. de IL-12 induziu ao aumento significativo da síntese de IL-2 (810 ± 180 pg/mL X 1512 ± 212 pg/mL) e IL-10 (137 ± 71 X 839 ± 136 pg/mL) nos sobrenadantes de fígado de animais atímicos. Nos sobrenadantes de baço verificamos a redução de IFN- γ (267 ± 29 pg/mL X 61 ± 18 pg/mL).

Em camundongos BALB/c *mu*/+ detectamos a elevação significativa nos níveis de IL-3 (979 ± 159 pg/mL X 1920 ± 301 pg/mL) e IL-5 (2512 ± 368 X 10136 ± 1162 pg/mL) no fígado e nenhuma alteração nas dosagens dos macerados dos baços.

A quantificação das citocinas dos sobrenadantes de fígado e baço de BALB/c *mu*/*mu* e *mu*/+ depletados de IL-12 estão apresentadas na figura 13.

Figura 13. Quantificação de citocinas presentes no sobrenadante de fígado (figuras A e C) e de baço (figuras B e D) de animais BALB/c nu/nu (figuras A e B) e nu/+ (figuras C e D) após 15 dias de infecção e depletados ou não de IL-12. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM anti IL-12 (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.i. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. (n=5)

5.6.3. Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço

Pudemos verificar na figura 14 a redução significativa nos níveis de IL-18 pulmonar (5293 ± 377 pg/mL X 12057 ± 1008 pg/mL) somente nos animais BALB/c *mu/mu* que tiveram a IL-12 neutralizada.

Nenhuma alteração foi observada nas dosagens dos sobrenadantes de fígado dos grupos experimentais. A determinação de IL-18 nos sobrenadantes de baço indicou a elevação na produção desta citocina apenas no baço dos animais eutímicos.

Figura 14. Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão (A) fígado (B) e baço (C) de animais BALB/c nu/nu e nu/+ após 15 dias de infecção e depletados ou não de IL-12. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM C17.8 (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes

5.7. Caracterização da celularidade do lavado-bronco-alveolar (L.B.A.)

A contagem de leucócitos PMN e de monócitos do LBA de camundongos BALB/c atímicos e eutímicos não mostrou alteração significativa induzida pelo AcM. Pudemos observar a redução significativa no número de linfócitos em ambos os grupos, *mu/mu* ($0,05 \pm 0,01$ céls. $\times 10^5$ X a.l.d.) e *mu/+* ($0,1 \pm 0,01$ céls. $\times 10^5$ X $0,02 \pm 0,01$ céls. $\times 10^5$).

Observamos também o aumento significativo de eosinófilos em animais BALB/c *mu/+* ($0,03 \pm 0,01$ céls. $\times 10^5$ X $0,11 \pm 0,03$ céls. $\times 10^5$). Os animais atímicos não apresentaram alterações significantes desta população leucocitária.

Os resultados quanto ao número de leucócitos PMN, linfócitos, monócitos e eosinófilos podem ser vistos na figura 15.

Figura 15. Celularidade do lavado branco alveolar de animais BALB/c atímicos e eutímicos depletados de IL-12 por via i.p. com AcM anti IL-12, 4 horas antes da infecção i.t. com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis*. Os pulmões foram lavados 48 horas após a infecção com PBS estéril. Após citocentrifugação as células foram coradas e analisadas quando à morfologia.

5.8. Análise das células de baço por citometria de fluxo

As células de baço de camundongos atímicos e eutímicos foram submetidas a análise por citometria de fluxo para a pesquisa de populações celulares predominantes durante a PCM e que poderiam sofrer alterações em número devido ao tratamento realizado com os AcM anti IL-12.

Para isso, o baço desses animais foi retirado, macerado, suas células foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 2×10^6 sendo posteriormente marcadas com anticorpos anti CD3 (PE), B(FITC), CD11c (FITC) e T γ δ (FITC). As células marcadas foram submetidas à aquisição e leitura de 10000 eventos. A análise foi realizada por histogramas e o percentual de células foi transformado em valor absoluto por cálculo frente ao número total de células anteriormente observadas em Câmara de Neubauer.

Observamos que a depleção de IL-12 aumentou de forma significante a população de células B ($7,0 \pm 1,7 \times 13,5 \pm 0,4$) da linhagem atímica. Nos animais eutímicos nenhuma alteração foi detectada.

Os resultados da análise por citometria de fluxo das células de baço das depleções de IL-12 podem observados na figura 16.

Figura 16. Análise fenotípica das células de baço de camundongos BALB/c nu/nu e nu/+ após a depleção ou não de IL-12. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM anti IL-12 (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. A análise por citometria de fluxo foi realizada logo após a última dose do AcM anti IL-12. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5.9. Análise das células do LBA por citometria de fluxo

As células do LBA de camundongos atímicos e eutímicos foram submetidas a análise por citometria de fluxo para a pesquisa de populações celulares presentes nos pulmões durante a PCM e que poderiam ter sido alteradas em decorrência ao tratamento realizado com o AcM anti IL-12. Para isso, os pulmões dos grupos de animais tratados e controles foram perfundidos por uma solução de PBS + soro fetal bovino e as suspensões mantidas em banho gelo para a contagem em Câmara de Neubauer.

O número de células totais foi determinado em cada um dos LBA dos animais devido à presença de pequeno número de células, optamos por fazer um *pool* dos lavados por grupo e ajustar a concentração celular para 1×10^5 . As suspensões foram posteriormente marcadas com anticorpos anti CD3 (PE), B(FITC), CD11c (FITC) e $\gamma\delta$ (FITC). As células marcadas foram submetidas à aquisição e leitura de 5000 eventos.

Observamos que a depleção de IL-12 influenciou de forma significativa todas as populações celulares analisadas tanto em animais atímicos como em animais eutímicos. Deve-se, entretanto lembrar que o a análise das populações celulares ocorreu no dia seguinte à última dose do anticorpo monoclonal, e indica que a neutralização da IL-12 pode influenciar positivamente no aumento das populações celulares no pulmão.

Por exame morfológico às 48h pós-infecção observamos o aumento significativo de eosinófilos em camundongos *nu/+* e redução também significativa de linfócitos em ambas as linhagens. A análise por citometria de fluxo mostra que o tratamento com anti IL-12 induz ao aumento no número de linfócitos indicando que essa citocina controla o afluxo de células para o pulmão durante a infecção. Os resultados da análise por citometria de fluxo podem observados na figura 17.

Figura 17. Análise fenotípica das células do lavado-bronco-alveolar de camundongos BALB/c nu/nu e nu/+ após a depleção ou não de IL-12. Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM anti IL-12 (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. A análise por citometria de fluxo foi realizada logo após a última dose do AcM anti IL-12 com 5000 eventos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

5.10. Quantificação de NO no homogenato de pulmão

Demonstramos em nossas dosagens que houve aumento significativo dos níveis de NO em camundongos infectados de ambas as linhagens quando comparados aos animais não infectados.

Foi também observado aumento significativo da concentração de NO em animais *mu/mu* IgG e *mu/mu* tratados por anti-IL-12. A figura 18 apresenta os resultados obtidos quanto à produção de NO durante a depleção de IL-12 após 15 dias de infecção.

Figura 18. Quantificação de NO do homogenato de pulmão de animais BALB/c nu/nu e nu/+ depletados de IL-12. Os animais foram tratados por via i.p. com AcM anti IL-12 (-4h e nos dias +3 e +7 com 1mg/camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via intratraqueal. Os homogenatos foram obtidos no 15º dia de infecção. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. (n=5)

5.11. CONCLUSÕES PARCIAIS

- 1- Observamos que neutralização de IL-12 exerce importante atividade no controle da disseminação da infecção pulmonar em animais eutímicos e franca influencia na disseminação da PCM em ambas as linhagens analisadas.
- 2- A neutralização de IL-12 não alterou a resposta de HTT e não induziu a alteração significativa da mortalidade.
- 3- A IL-12 é importante moduladora da síntese de anticorpos circulantes em animais eutímicos e a sua neutralização leva a significativa alteração nos títulos de praticamente todos os isótipos pesquisados.
- 4- A neutralização de IL-12 exerceu atividade marcante sobre a síntese de citocinas pulmonares em ambas as linhagens. A síntese de citocinas hepáticas foi afetada em menor proporção enquanto que as esplênicas sofreram pouca influencia deste tratamento.
- 5- A neutralização sistêmica de IL-12 em animais atímicos modulou negativamente a síntese de IL-18 enquanto que em animais eutímicos ocorreu o aumento na sua produção.
- 6- A IL-12 pode influenciar o número de células (linfócitos e eosinófilos) presentes que migram para o pulmão na fase aguda da infecção.
- 7- As análises fenotípica por FACS de células do baço mostraram alteração significativa no número de células B do baço de animais atímicos. No LBA observou-se importante e significativa alteração nas populações de células T, B e de macrófagos em ambas as linhagens.
- 8- A neutralização de IL-12 induz a alteração na concentração de NO presente no sobrenadante de pulmão dos animais atímicos.

DEPLEÇÃO SISTÊMICA DE IFN- γ

6. DEPLEÇÃO SISTÊMICA DE IFN- γ

6.1) Produção e purificação do AcM anti IFN- γ

Inoculamos 1×10^7 células do hibridoma XMG 1.2 pela via i.p., em camundongos BALB/c atímicos (nu/nu). Após a purificação o anticorpo foi obtido com concentração de 16,5mg/ml. Na análise eletroforética (SDS-PAGE) observamos 2 bandas protéicas de peso molecular de cerca de 25 e 50 kDa.

6.2. Avaliação do grau de infecção e resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT).

Os resultados abaixo apresentados são de experimentos realizados com o AcM XMG 1.2 utilizado para a depleção de IFN- γ . Grupos de animais BALB/c nu/nu e nu/+ tratados com 1mg/camundongo de AcM anti-IFN- γ 4 h antes, +3 e +7 dias após a infecção.

O grupo controle recebeu imunoglobulina normal de rato com o mesmo protocolo de tratamento de e foram infectados por via i.t. com leveduras do *P. brasiliensis*. Após 15 dias de infecção foram sacrificados, seus órgãos foram retirados, pesados, macerados e plaqueados em ágar BHI suplementado e calculado o $\log_{10}$ do número de UFC/g de tecido.

Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais nós realizamos o teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) no coxim plantar dos camundongos. Verifica-se através dos resultados obtidos que a neutralização de IFN- γ pelo anticorpo monoclonal XMG 1.2 leva os animais eutímicos a apresentarem exacerbação da infecção, com aumento de UFC no pulmão ($4,9 \pm 0,2 \log_{10}$ X $5,4 \pm 0,3 \log_{10}$) e fígado ($0,8 \pm 0,4 \log_{10}$ X $1,8 \pm 0,8 \log_{10}$).

Os animais BALB/c nu/nu, entretanto, apresentaram além do aumento da carga fúngica no pulmão ($5,7 \pm 0,1 \log_{10}$ X $6,2 \pm 0,3 \log_{10}$) e fígado ($2,0 \pm 0,5 \log_{10}$ X $2,7 \pm 0,4 \log_{10}$) o aumento nos números de leveduras no baço ($1,2 \pm 0,6 \log_{10}$ X $2,3 \pm 0,7 \log_{10}$) indicando um aumento da disseminação ou crescimento do fungo após a neutralização desta citocina. Quando comparamos os camundongos atímicos e eutímicos, percebe-se que a diferença no grau da doença nos pulmões entre eles é significativa (ANOVA com múltiplas comparações de Tukey onde $p < 0,001$). Esse fato aponta o IFN- γ como o mediador da imunidade natural que mais confere proteção aos pulmões.

A análise dos resultados de UFC/g de tecido hepático dos animais eutímicos e atímicos também indicou a importância desta citocina na proteção desse órgão.

O teste de HTT mostra que a depleção de IFN- γ suprime a resposta celular nos animais suficientes de célula T enquanto que os animais deficientes (nu/nu) apresentaram um resultado inalterado (anergia).

A figura 19 mostra o resultado comparativo entre os animais BALB/c nu/nu e nu/+ após o tratamento com AcM anti IFN- γ após 15 dias de infecção i.t. com *P. brasiliensis* (análise de UFC e teste de Hipersensibilidade para todos os grupos estudados).

Figura 19. (A) Efeito da depleção sistêmica de IFN- γ no grau de infecção de animais BALB/c nu/nu e nu/+ (n=14-21) ao *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM (-4h, +5 e +7 com 1mg/camundongo) ou IgG de rato e infectados com 1×10^8 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.p.. O grau de infecção foi determinado após 15 dias de infecção pelo método de UFC. (B) Efeito do tratamento com AcM na resposta de HTT em camundongos BALB/c nu/nu e nu/+ após 15 dias de infecção; a barra de animais normais refere-se aos animais não infectados e submetidos ao ensaio de HTT com antígeno de Fava Netto.

6.3. Avaliação do tempo de sobrevida

Grupos de 8-10 camundongos BALB/c atímicos e eutímicos foram tratados com AcM (-4h, +3 e +7 com 1 mg/camundongo) ou IgG normal de rato e infectados com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. e mantidos sob observação para o estudo da mortalidade.

Os camundongos BALB/c nu/nu apresentaram redução significativa em seu tempo de sobrevida de modo que aos 70 dias de observação todos os camundongos nu/nu depletados já estavam mortos. Os animais eutímicos demonstram-se mais resistentes que os atímicos apresentando uma sobrevida superior a 200 dias e ao compararmos o tempo e sobrevida entre os animais atímicos e eutímicos depletados também observamos significância estatística.

Os resultados obtidos são demonstrados figura 20.

Figura 20. Efeito da depleção sistêmica de IFN- γ no tempo de sobrevivência de animais resistentes BALB/c nu/nu e nu/+ após infecção i.t. pelo *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM XMG 1.2 (-4h, +3 e +7 dias com 1 mg/camundongo) ou IgG de rato e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via it.

6.4. Determinação da resposta imune humoral específica

Os soros dos animais atímicos e eutímicos depletados por via i.p. foram submetidos ao ELISA para a detecção e quantificação de anticorpos específicos produzidos durante os experimentos.

No soro camundongos depletados de IFN- γ submetido à quantificação dos isótipos específicos anti *P. brasiliensis* somente detectamos a alteração nos níveis de IgA, onde o título sérico encontrado foi significativamente maior em animais atímicos ($2,1 \pm 1,3 \log_2$ X $6,1 \pm 0,5 \log_2$) e eutímicos ($5,3 \pm 0 \log_2$ X $6,8 \pm 0,5 \log_2$). Valor significativamente maior também foi observado nos títulos de Ig total em animais atímicos tratados ($6,3 \pm 0,6 \log_2$ X $8,3 \pm 0,3 \log_2$).

Observamos durante a neutralização de IFN- γ que esta parece não ser a citocina mais importante para o controle da resposta humoral. Notamos que a IgG2a não apresentou alteração aos 15 dias de infecção, logo, deve haver IFN- γ residual suficiente para a indução da mudança isotípica para a IgG2a. Entretanto, podemos notar que em geral os títulos de IgG são maiores nos animais nu/+ do que nos nu/nu, novamente evidenciando a participação das células T na síntese de anticorpos.

Os resultados podem ser analisados na figura 21 (A e B).

Figura 21. Quantificação dos isótipos específicos presentes no soro de animais BALB/c nu/nu e nu/+ (n=5) após 15 dias infectados pelo *P. brasiliensis* e depletados ou não de IFN- γ . Os animais foram tratados por via i.p. com AcM (-4h, +3 e +7 dias com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do fungo pela via i.t. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. (A) BALB/c nu/nu e (B) BALB/c nu/+

6.5. Quantificação de citocinas

6.5.1. Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão

A depleção sistêmica de IFN- γ induziu em animais atímicos a uma redução significativa de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (1983 ± 164 pg/mL X 1433 ± 99 pg/mL), IL-12 (428 ± 47 pg/mL X 278 ± 18 pg/mL) e de IL-2 (1707 ± 36 pg/mL X 1327 ± 98 pg/mL). Não foram obtidos resultados estatisticamente significativos para as outras citocinas.

Os animais eutímicos apresentaram aumento significativo de IFN- γ (981 ± 149 pg/ mL X 1698 ± 73 pg/mL) e de IL-2 (1129 ± 94 pg/mL X 1576 ± 99 pg/mL). Nestes mesmos animais, entretanto, notou-se a redução significativa de IL-10 (441 ± 133 pg/mL e nos animais depletados níveis não detectados).

Observamos novamente o efeito rebote encontrado nos animais depletados de IL-12 e como anteriormente comentado notamos que esse fenômeno somente foi notado em animais suficientes de células T.

A síntese de citocinas pulmonares em animais atímicos e eutímicos depletados por via i.p. de IFN- γ e infectados com *P. brasiliensis* é apresentada na figura 22.

Figura 22. Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante de pulmão de animais BALB/c nu/nu e nu/+ (n=5) após 15 dias de infecção e depletados ou não de IFN- γ . Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM anti IFN- γ (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG1 de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. (A) BALB/c nu/nu e (B) BALB/c nu/+.

6.5.2. Quantificação de citocinas no sobrenadante fígado e baço

O sobrenadante de fígado e baço foi obtido durante o experimento para a quantificação de UFC/g de tecido e foi mantido à -70°C sendo utilizado para a pesquisa de citocinas. Os valores de citocinas observados em animais atímicos e eutímicos depletados ou não de IFN- γ por via i.p. e infectados com *P. brasiliensis*. Foram utilizadas amostras de 5 animais para cada grupo experimental.

Durante as dosagens de citocinas hepáticas observamos que os animais BALB/c nu/nu apresentou alteração significativa de IFN- γ ($36358 \pm 8759\text{ pg/mL}$ X $7956 \pm 732\text{ pg/mL}$).

A dosagem de sobrenadantes de baço indicou a redução significativa de IL-4 ($42 \pm 14\text{ pg/mL}$ X a.l.d.). Não detectamos alterações significantes nas citocinas hepáticas dos animais eutímicos, contudo para as dosagens realizadas em macerados dos baços desses animais encontramos a elevação na produção de IL-4 ($62 \pm 47\text{ pg/mL}$ X $267 \pm 24\text{ pg/mL}$).

A quantificação das citocinas de fígado e baço dos sobrenadantes de fígado e baço de BALB/c nu/nu e nu/+ depletados de IFN- γ serão apresentados na figura 23.

Figura 23. Quantificação de citocinas presentes no sobrenadante de fígado (figuras A e C) e de baço (figuras B e D) de animais BALB/c nu/nu (figuras A e B) e nu/+ (figuras C e D) após 15 dias de infecção e depletados ou não de IFN- γ . Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM XMG 1.2 (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. (n=5)

6.5.3. Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço

A quantificação da síntese de IL-18 foi realizada nos sobrenadantes de pulmão fígado e baço dos animais BALB/c nu/nu e nu/+ depletados de IFN- γ por via i.p.. Os sobrenadantes foram mantidos sob congelamento à -70° C até o momento da dosagem.

A depleção i.p. de IFN- γ não alterou a síntese de IL-18 nos pulmões, entretanto observamos alterações significantes quando analisamos os sobrenadantes de fígado dos animais eutímicos (143066 ± 4660 pg/mL X 91150 ± 6122 pg/mL).

A quantificação nos sobrenadantes de baço indicou elevação significativa na síntese de IL-18 tanto em animais atímicos (3710 ± 1043 pg/mL X 16590 ± 1468 pg/mL) como nos animais eutímicos (6069 ± 2285 pg/mL X 16356 ± 2732 pg/mL).

Os resultados das dosagens estão representados na figura 24.

Figura 24. Quantificação de IL-18 presentes no sobrenadante de pulmão (A) fígado (B) e baço (C) de animais BALB/c nu/nu e nu/+ após 15 dias de infecção e depletados ou não de IFN- γ . Os animais foram tratados por via ip com o AcM XMG 1.2 (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^8 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

6.6. Caracterização da celularidade do LBA

Camundongos BALB/c atímicos e eutímicos foram tratados por via i.p. com AcM anti IFN- γ 4 horas antes da infecção i.t. com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis* ou IgG normal de rato. Após 48 horas da infecção os animais foram sacrificados a sua traquéia canulada e seus pulmões foram perfundidos com PBS estéril por 2 vezes. A celularidade foi analisada microscópicamente após coloração diferencial e contagem de 200 células.

A depleção sistêmica de IFN- γ não alterou o número de leucócitos PMN nos pulmões tanto em animais atímicos como em eutímicos. Com relação ao número de linfócitos pudemos notar a redução significativa somente em animais eutímicos (a.l.d. $X 0.1 \pm 0.01 \text{ céls.} \times 10^5$ X $0.02 \pm 0.001 \text{ céls.} \times 10^5$) e nestes mesmos animais o aumento significativo de eosinófilos no LBA ($0.03 \pm 0.001 \text{ céls.} \times 10^5$ X $0.06 \pm 0.01 \text{ céls.} \times 10^5$).

No LBA dos camundongos nu/nu não notamos alterações significantes quanto às células analisadas. Observamos que a depleção de IL-12 e IFN- γ controlam o fluxo de linfócitos e eosinófilos durante a infecção.

Os resultados quanto ao número de leucócitos PMN, linfócitos, monócitos e eosinófilos podem ser vistos na figura 25.

Figura 25. Celularidade do lavado branco-alveolar de animais BALB/c atímicos e eufímicos depletados de IFN- γ por via i.p. com AcM XMG 1.2, 4 h antes da infecção Lt com 1×10^8 leveduras de *P. brasiliensis*. Os pulmões foram lavados 48 horas após a infecção com PBS estéril. Após citocentrifugação as células foram coradas e analisadas quando a morfologia.

6.7. Análise das células de baço por citometria de fluxo

Os resultados da análise por citometria de fluxo das células de baço dos animais depletados de IFN- γ indicam aumento significativo das populações de células T $\gamma\delta$ na linhagem atímica e eutímica. Podemos observar também o aumento significativo no número de células B dos camundongos deficientes de célula T sendo que este resultado não foi reproduzido nos animais eutímicos.

Esses resultados indicam que provavelmente a população de células T $\gamma\delta$ seja importantes para a reposição de concentrações adequadas de IFN- γ em resposta à infecção pelo *P. brasiliensis*. A elevação no número relativo dessas células durante a neutralização de IFN- γ e não durante a depleção de IL-12 pode ser uma indicação relevante na participação dessas células na resposta imune inata durante a PCM.

Os resultados da análise por citometria de fluxo das células de baço das depleções de IFN- γ podem observados na figura 26. O percentual representa o valor absoluto encontrado durante a aquisição e leitura de 10000 eventos.

Figura 26. Análise das células de baço BALB/c nu/nu e nu/+ após a depleção ou não de IFN- γ . Os animais foram tratados por via l.p. com o AcM XMG 1.2 (-4h e nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t.. A análise por citometria de fluxo foi realizada logo após a última dose do AcM anti IFN- γ . Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

6.8. Análise das células do LBA por citometria de fluxo

A depleção de IFN- γ , contrariamente ao observado na análise por citometria do LBA de animais depletados de IL-12, influenciou de forma negativa o afluxo de células durante o tratamento em animais BALB/c nu/+. Observamos que, com exceção das células marcadas com CD11c, todas as outras populações celulares analisadas em animais eutímicos se apresentaram reduzidas. A neutralização de IFN- γ em animais atímicos influenciou de positivamente às populações celulares analisadas, pois elevou de forma significativa o número de células de todas as marcações realizadas.

Como já citado anteriormente, as populações celulares de animais depletados de IFN- γ sofreram poucas alterações quando submetidas à coloração diferencial e observadas microscópicamente após 48 horas. Semelhante ao que observamos com a depleção de IL-12, a neutralização de IFN- γ induziu a um aumento significativo de eosinófilos e redução também significativa de linfócitos em animais eutímicos

Os resultados da análise por citometria de fluxo das células do lavado-bronco-alveolar das depleções de IFN- γ podem observados na figura 27.

Figura 27. Análise das células do lavado-bronco-alveolar de camundongos BALB/c nu/nu e nu/+ após a depleção ou não de IFN- γ . Os animais foram tratados por via i.p. com o AcM XMG1.2 (-4h, nos dias +3 e +7 com 1 mg/camundongo ou IgG de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

6.9. Quantificação de NO do homogenato de pulmão

A depleção de IFN- γ induziu à síntese de NO aumentada nos animais atímicos ($31.7 \pm 2.3 \mu\text{M}$ X $44.8 \pm 3.1 \mu\text{M}$). A dosagem não detectou alteração significativa nos níveis de NO do homogenato de pulmão dos animais eutímicos infectados.

Resultados significantes foram obtidos quando comparados os animais normais e infectados de ambos os grupos atímico e eutímico. Os resultados indicam que apesar da depleção de IFN- γ os níveis de NO apresentaram-se elevados indicando mais uma vez a influência do fenômeno de rebote após o tratamento.

Observamos que os animais nu/nu depletados de IL-12 e de IFN- γ apresentam elevação significativa de NO homogenato de pulmão quando comparados aos animais nu/+.

A figura 28 apresenta os resultados obtidos quanto à produção de NO no protocolo de depleção IFN- γ (15 dias de infecção).

6.10. CONCLUSÕES PARCIAIS

- 1- Observamos que a neutralização de IFN- γ induziu à exacerbação da infecção pulmonar em ambas as linhagens.
- 2- A neutralização também aumentou a disseminação do fungo no início da doença para outros órgãos e tecido.
- 3- Os animais atímicos que receberam o tratamento pelo AcM XMG 1.2 apresentaram redução da sobrevivência em comparação aos seus controles.
- 4- O IFN- γ regula positivamente a resposta de HTT.
- 5- Observamos a elevação na síntese de IgA em ambas as linhagens tratadas pelo AcM anti IFN- γ .

DEPLEÇÃO SISTÊMICA DE CÉLULAS NK

7. DEPLEÇÃO DE CÉLULAS NK

7.1. Ac policlonal anti asialo-GM₁

O anticorpo Asialo-GM₁ foi adquirido junto ao laboratório Wako Chemicals®, Japão. O anticorpo era liofilizado e foi preparado seguindo as instruções do fornecedor. De acordo com nota técnica, a diluição sugerida para a depleção de células NK em animais BALB/c é de 1:50 após a ressuspensão em 1mL de PBS estéril.

Os animais foram depletados por via i.p. com 200µL do AcM diluído à 1:50 nos dias -6, -3 e +3 de acordo com o protocolo utilizado por Algarra *et al.* (2002).

7.2. Avaliação do Grau de Infecção e da Resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT).

Os resultados apresentados na fig. 29 são de experimentos realizados após o tratamento com o Ac policlonal anti Asialo-GM₁ utilizado para a depleção de células NK em camundongos BALB/c atímicos e eutímicos.

No dia zero os camundongos foram infectados por via i.t. com leveduras do *P. brasiliensis* e sacrificados após 15 dias de infecção. Seus órgãos foram retirados, pesados, macerados e plaqueados em Ágar BHI suplementado e calculado o log₁₀ do número de UFC/g de tecido.

Os sobrenadantes do macerado dos órgãos dos animais foram reservados para análise quanto à produção de citocinas e óxido nítrico (NO).

O soro também foi reservado para dosagem de anticorpos específicos produzidos neste período. Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais foram realizadas as reações de HTT no coxim plantar dos camundongos. Os experimentos foram repetidos por duas vezes.

Observamos aumento significativo das UFC/g de tecido no pulmão ($6.2 \pm 0.1 \log_{10}$ X $6.5 \pm 0.1 \log_{10}$), no baço ($2.5 \pm 0.1 \log_{10}$ X $3.3 \pm 0.1 \log_{10}$) e fígado ($2.7 \pm 0.1 \log_{10}$ X $3.2 \pm 0.1 \log_{10}$) de camundongos atímicos depletados de células NK. Os animais BALB/c nu/+ entretanto, apresentaram cargas fúngicas equivalentes nos órgãos de disseminação. No entanto, houve um aumento significativo nos pulmões ($5.2 \pm 0.1 \log_{10}$ X $5.6 \pm 0.1 \log_{10}$).

A figura 29 (A e B) mostra o resultado da análise de UFC e o teste HTT em animais BALB/c nu/nu e nu/+ após a depleção sistêmica ou não com Ac Asialo-GM₁ aos 15 dias de infecção intratraqueal com *P. brasiliensis*.

Figura 29. (A) Efeito da depleção sistêmica de células NK no grau de infecção de animais BALB/c nu/nu e nu/+ (n=10-12) pelo *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com Ac anti Asialo-GM₁ (dia -6, -3 e +3 com 200µL de uma diluição 1:50 do Ac Anti Asialo-GM₁/camundongo) ou IgG normal de rato e infectados com 1x10⁶ de leveduras do *P. brasiliensis* pela via intratraqueal. O grau de infecção foi determinado após 15 dias de infecção pelo método de UFC. (B) Efeito do tratamento com a Ac Anti Asialo-GM₁ na resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT) em camundongos BALB/c nu/nu e nu/+ após 15 dias de infecção; a barra controle refere-se aos animais normais e não infectados e que foram submetidos ao ensaio de HTT com antígeno de Fava Netto.

7.3. Avaliação do tempo de sobrevivência

Grupos de 8-10 camundongos BALB/c atímicos e eutímicos Ac anti asialo-GM₁ ou IgG normal de rato e infectados com 1×10^6 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via intratraqueal e mantidos sob observação para o estudo da mortalidade. Não encontramos diferenças entre os grupos tratados e não tratados.

Os resultados são demonstrados figura 30.

Figura 30. Efeito da depleção sistêmica de células NK no tempo de sobrevivência de animais BALB/c nu/nu e nu/+ após infecção i.t. pelo *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados por via i.v. com Anti asialo-GM1 (dias -6, -3, +3) ou IgG normal de rato e infectados com 1×10^8 de leveduras do *P. brasiliensis* pela via i.t. Teste de Logrank onde $p < 0,05$ é considerado significativo.

7.4. Determinação da resposta imune humoral específica

Os soros dos animais atímicos e eutímicos depletados de células NK pelo anticorpo anti Asialo-GM₁ por via intraperitoneal foram submetidos ao ELISA para a detecção e quantificação de anticorpos específicos produzidos durante os experimentos.

Verificamos que a depleção de células NK levou a aumentos significantes na síntese de Ig total, IgM, IgG1 e IgG2b em animais BALB/c atímicos enquanto que em animais suficientes de células T essa modulação da resposta humoral não ocorreu.

Os resultados obtidos com este protocolo e via de tratamento podem ser observados na figura 31 (A e B).

Figura 31. Quantificação dos isótipos de anticorpos específicos presentes no soro de animais BALB/c nu/nu e nu+ (n=5) depletados ou não de células NK após 15 dias de infecção pelo *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com o Ac anti Asialo-GM1 (dias -6, -3 e +6 com 200 µL/camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1x10⁸ leveduras do fungo pela via intratraqueal. Valores de p<0,05 são considerados significantes. (A) BALB/c nu/nu e (B) BALB/c nu+

7.5. Determinação de IgE total

Verificamos que as células NK não exerceram influência significativa na síntese de IgE tanto em camundongos atímicos como eutímicos.

Na figura 32 apresentamos os resultados da quantificação de IgE no soro dos animais BALB/c nu/nu e nu/+ aos 15 após a inoculação do *P. brasiliensis* e que foram depletados ou não de células NK.

Figura 32. Quantificação de IgE presente no soro de animais BALB/c nu/nu e nu/+ (n=5) após 15 de infecção pelo *P. brasiliensis* e depletados ou não de células NK. Os animais foram tratados por via i.p. com o Ac anti Asialo-GM1 (dias -6, -3, +3 e +6 com 50 µL/ camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do fungo pela via intratraqueal.

7.6. Quantificação de citocinas

7.6.1. Quantificação de citocinas no sobrenadante de pulmão

O sobrenadante de pulmão obtido durante o experimento para a quantificação de UFC/g de tecido foi mantido à -70°C e foi utilizado para a pesquisa de citocinas.

A depleção de células NK em animais atímicos induziu a uma marcante redução na síntese de IL-5 e elevação significativa da produção de IL-10. Outras citocinas analisadas apresentaram-se inalteradas.

Os animais eutímicos apresentaram o perfil inverso ao encontrado nos sobrenadantes de animais deficientes de células T; ocorreu o aumento significativo de IL-12 concomitante à redução também significativa de IL-4. As demais citocinas analisadas permaneceram inalteradas.

Os valores de citocinas observados em animais atímicos e eutímicos depletados ou não de células NK e infectados com *P. brasiliensis* são apresentados na figura 33 (A e B).

Figura 33. Quantificação das citocinas presentes no sobrenadante de pulmão de animais BALB/c nu/nu e nu/+ (n=5) após 15 dias de infecção e depletados ou não de células NK. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com o Ac anti asialo-GM₁ (dias -6, -3 e +6 com 200 μ L/ camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1×10^8 leveduras do fungo pela via intratraqueal. (A) BALB/c nu/nu e (B) BALB/c nu/+.

7.6.2. Quantificação de citocinas no sobrenadante fígado e baço

No fígado e baço de animais atímicos tratados foram detectados níveis mais elevados de IL-10. Nos sobrenadantes de baço dos animais nu/nu depletados observamos o aumento significativo das citocinas IL-3, IL-5. No sobrenadante de fígado dos animais eutímicos tratados houve a redução significativa de IL-2, IL-3 e IL-10 quando comparado aos animais controle.

Nesta mesma linhagem observamos que a depleção induziu a redução significativa de IL-3, IL-12, IFN- γ e IL-4 quando foram pesquisados os sobrenadantes de baço. O resultado apresentado indica que a depleção de células NK levou a alteração nos padrões de síntese de citocinas nas linhagens estudadas.

Os valores de citocinas observados em animais atímicos e eutímicos depletados ou não de células NK e infectados com *P. brasiliensis* são apresentados na figura 34. Foram utilizadas amostras de 5 animais para cada grupo experimental .

Figura 34. Quantificação de citocinas presentes no sobrenadante de fígado (A e C) e de baço (B e D) de animais BALB/c nu/nu (A e B) e nu/+ (C e D) (n=5) após 15 dias de infecção e depletados ou não de células NK. Os animais foram tratados por via i.p. com o Ac anti asialo-GM1 (dias -6, -3 e +6 com 200 μ L/ camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* pela via intratraqueal.

7.6.3. Quantificação de IL-18 no sobrenadante de pulmão, fígado e baço

A quantificação da síntese de IL-18 foi realizada nos sobrenadantes de pulmão fígado e baço dos animais BALB/c nu/nu e nu/+ depletados de NK por via i.p..

Pudemos verificar que enquanto a depleção de células NK induziu à diminuição de IL-18 nos pulmões de animais atímicos e na linhagem eutímica esse tratamento levou à redução desta citocina somente nos órgãos de disseminação, isto é, fígado e baço.

Os resultados das dosagens estão representados na figura 35.

Figura 35. Quantificação de IL-18 presentes no sobrenadante de pulmão (A), fígado (B) e baço (C) de animais BALB/c nu/nu e nu/+ após 15 dias de infecção e depletados ou não de células NK. Os animais foram tratados por via i.p. com o Ac anti asialo-GM1 (dias -6, -3, +3 e +6 com 50 µL/ camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1×10^8 leveduras do fungo pela via intratraqueal. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

7.7. Caracterização da celularidade do lavado bronco-alveolar (LBA)

Na figura 36 pudemos observar no LBA de ambas as linhagens de animais depletados de células NK uma redução significativa na população de leucócitos PMN, sendo mais pronunciada nos animais nu/nu. As outras populações celulares não sofreram alterações.

Figura 36. Celularidade do LBA de animais BALB/c atímicos e eutímicos depletados de células NK. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com o Ac anti asialo-GM₁ (dias -6, -3 e +6 com 200 µL/camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1x10⁸ leveduras do fungo pela via intratraqueal. Os pulmões foram lavados com PBS estéril 48 horas após a infecção. O LBA foi submetido a citocentrifugação, as células foram coradas e analisadas quando a morfologia. (A) Celularidade do LBA de animais atímicos (B) Celularidade do LBA de animais eutímicos.

7.8. Quantificação de NO no homogenato de pulmão

Examinamos a produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de pulmão dos animais BALB/c nu/nu e nu/+ depletados por via sistêmica de células NK e infectados por via intratraqueal com 1×10^6 de leveduras viáveis de *P. brasiliensis*.

Em todos os animais infectados observamos o aumento na síntese de NO. Entretanto, houve a redução nos níveis de NO no pulmão de camundongos atímicos depletados em comparação aos não tratados. Este fato não ocorreu com os animais eutímicos.

A figura 37 apresenta os resultados e foram expressos em média $\pm$ erro padrão.

Figura 37. Quantificação de NO no homogenato de pulmão de animais BALB/c nu/nu e nu/+ depletados de células NK. Os animais foram tratados por via intraperitoneal com o Ac anti asialo-GM₁ (dias -6, -3 e +6 com 200 µL/ camundongo ou IgG normal de rato) e infectados com 1x10⁶ leveduras do fungo pela via intratraqueal. Os homogenatos foram obtidos no 15º dia da infecção.

7.9. CONCLUSÕES PARCIAIS

1. As células NK controlam a carga fúngica pulmonar de camundongos atímicos e eutímicos.
2. A depleção de células NK em ambas as linhagens não alterou a resposta de HTT e não induziu a alteração significativa quanto à mortalidade.
3. As células NK regulam a síntese dos isótipos controlados por IL-4 (IgG1) e TGF- β (IgG2b) em animais atímicos.
4. As células NK parecem ser reguladoras da síntese de citocinas em animais eutímicos.
5. As células NK parecem ser elementos importantes na regulação da quimiotaxia de leucócitos nos períodos iniciais da PCM.
6. A presença das células NK influenciou a produção de óxido nítrico em animais atímicos.
7. A síntese de IL-18 em ambas as linhagens parece ser relacionada à presença das células NK.

DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

Vários tipos celulares e mediadores envolvidos na imunidade inata têm importante ação na atividade antimicrobiana e na imunoregulação da resposta imune adquirida. O processo de eliminação do *P. brasiliensis*, assim como de outras infecções, depende principalmente do sucesso da interação entre essas duas respostas. Evidentemente, a ativação dessa complexa rede de eventos durante a resposta imune desencadeará outros mecanismos de resistência alternativos evitando assim a instalação do microrganismo e conseqüentemente da doença.

Entre as muitas células envolvidas com a resposta imune durante a paracoccidiodomicose (PCM) estão os leucócitos PMN que são células móveis e através da circulação podem ser atraídas ao sítio infeccioso onde utilizando múltiplos mecanismos de ação (mediadores pró e antiinflamatórios, moléculas de adesão e quimiocinas) podem ser considerados elementos importantes para o desenvolvimento de uma resposta imune favorável ao hospedeiro (Parkin et al., 2001; Burg et al., 2001).

Os resultados obtidos com animais infectados pelo *P. brasiliensis* e depletados de leucócitos PMN, demonstraram que a ausência destas células pouco influenciou a gravidade da doença. Nós observamos que os animais suficientes de células T e que foram depletados de leucócitos PMN apresentaram um padrão de colonização fúngica semelhante aos seus controles não depletados. Esse fato indicou que a presença ou não dessas células no início da infecção não induziu a alterações significantes nesses animais.

Em camundongos BALB/c *nu/nu* depletados de leucócitos PMN pudemos demonstrar a alteração significativa no número das UFC/g no baço. Esse agravamento foi caracterizado pela disseminação do fungo e pôde ser correlacionado à ausência das células T, que são essenciais para a construção de uma resposta imune eficiente contra o fungo.

Estudos anteriores com animais atímicos (Miyaji et al., 1983) demonstraram que esses camundongos são incapazes de controlar o crescimento fúngico sugerindo, portanto, que a imunidade mediada por célula exerce um papel essencial na defesa contra a PCM.

Como anteriormente comentado, a depleção de leucócitos PMN nas fases iniciais da PCM não induziu o agravamento da doença. Em concordância, em tempos longos pós-infecção (experimento de mortalidade) demonstramos a ausência do efeito protetor dos leucócitos PMN em camundongos atímicos e eutímicos uma vez que a depleção *in vivo* não aumentou a sobrevida desses animais. Observamos também que os animais atímicos apresentaram menor sobrevida do que os animais suficientes de células T, mas não encontramos diferença estatística entre a sobrevida entre grupos tratados (eutímicos e atímicos) e seus controles.

Outro trabalho relacionando a presença das células T e resistência foi realizado por Huffnagle et al. (1991) que através de transferência de células T de animais imunocompetentes para camundongos atímicos e *scid* infectados pelo *Cryptococcus neoformans* observaram a redução da infecção criptococcócica nesses animais. Em nosso trabalho pudemos perceber que na ausência de células T o tempo de sobrevida é menor do que o observado em animais eutímicos confirmando o fenômeno observado anteriormente por outros autores (Miyaji et al., 1983; Burger et al., 1996).

A produção de anticorpos específicos em nossos experimentos indicou pouca influência dessas células na resposta humoral ao fungo. Na titulação de isótipos específicos no soro de animais atímicos depletados detectamos somente a elevação de IgA.

Entretanto, a síntese de citocinas sofreu alterações importantes, encontramos a redução significativa nos níveis de IL-5 e IL-12 nos animais atímicos depletados e nos animais eutímicos detectamos a elevação significativa de IL-3 e a redução nos níveis de IL-2 e IL-5, indicando que o fluxo de leucócitos PMN ao pulmão de camundongos infectados pelo *P. brasiliensis* parece

exercer papel modulatório na síntese local de citocinas. Com esses dados, demonstramos que ambos os tipos de citocinas, pró e antiinflamatórias provavelmente podem ser controladas pela presença de leucócitos PMN no exsudato inflamatório.

Pesquisas anteriores verificaram que algumas citocinas podem exercer efeito inibitório sobre a população de leucócitos PMN. Em um modelo murino de glomerulonefrite foi verificado que a administração de IL-4 inibiu o afluxo de leucócitos PMN para os rins reduzindo os danos teciduais provocados pela presença desta célula (Saleem et al. em 1998). Esses dados associados aos nossos, indicam que os leucócitos PMN além de atuarem como moduladores da síntese de citocinas e podem ser controlados pela presença desses mediadores.

Em vários modelos experimentais (*in vivo* ou *in vitro*) foi estabelecida a correlação direta entre as citocinas secretadas por populações de células Th e a produção de determinados isótipos de anticorpos. A análise comparativa entre os resultados por nós obtidos não nos permitiu essa correlação.

Na análise do lavado-bronco-alveolar (LBA) demonstramos que ocorreram alterações importantes quanto aos tipos celulares encontrados nos pulmões dos animais depletados. Vimos que os animais (atímicos ou eutímicos) tratados com o AcM RB6-8C5 apresentaram redução significativa no número de leucócitos PMN na fase inicial da doença e a ocorrência do aumento compensatório de monócitos em ambos os grupos (*nu/nu* e *nu/+*) além do aumento no número de eosinófilos em camundongos suficientes de células T.

Este achado seria contraditório quando relacionado à redução da IL-5 detectada nos sobrenadantes de pulmão destes animais, mas devemos ressaltar que a obtenção do LBA foi feita nas primeiras 48 horas e os níveis de citocinas foram analisados após 15 dias de infecção. Ao analisarmos a figura 1, notamos que nas primeiras 48 horas de infecção ainda não ocorreu a repopulação dos leucócitos PMN e ao comparar essa situação com a figura 6 verificamos que há

o aumento compensatório dos monócitos em ambas as linhagens e dos eosinófilos somente na linhagem eutímica.

Ainda analisando a figura 1, verificamos que após 15 dias de infecção a população de leucócitos PMN chega próxima aos níveis normais. Talvez esse fator tenha exercido influência nos tipos celulares do LBA e conseqüentemente na síntese de citocinas.

Provavelmente outros mediadores também atuaram no compartimento pulmonar induzindo ao aumento de eosinófilos nas 48 horas iniciais da infecção. Infelizmente não pudemos verificar os níveis de produção de IL-18 nos sobrenadantes de pulmão destes animais; esta citocina poderia ser um dos fatores envolvidos com o aumento do número de eosinófilos encontrado no LBA de animais eutímicos, sendo atualmente descrita por sua relação com respostas alérgicas caracterizadas por eosinofilia (Nakanishi et al., 2001).

Pesquisas anteriores que analisaram a resposta tecidual em animais atímicos e eutímicos demonstraram que ambos os grupos apresentaram padrão de lesão tecidual equivalente, com o envolvimento de macrófagos e neutrófilos ao início da infecção (1º mês); no entanto, posteriormente os animais *nu/+* controlam a doença, enquanto que os camundongos *nu/nu* apresentam maior disseminação fúngica apesar da presença de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos nas lesões (Burger et al., 1996).

De modo geral, nossos dados estão de acordo com trabalhos anteriores que comparam o curso da PCM em camundongos atímicos e eutímicos. Notamos o aumento no número de UFC/g em animais BALB/c *nu/nu* quando comparados com os *nu/+* e verificamos que camundongos atímicos apresentam menor sobrevida que os camundongos eutímicos indicando que a deficiência de células T dificulta o controle do crescimento fúngico durante a PCM.

Sabemos também, que os animais deficientes de células T, de modo compensatório apresentam uma ativação maior de células NK e de células $T\gamma\delta$ (em menor escala) o que nos leva

a supor que o controle da infecção tenha sido transferido para a responsabilidade funcional destas subpopulações celulares que têm a função de garantir a sobrevivência destes camundongos.

A capacidade de animais BALB/c *nu/nu* para controlar a infecção i.p. pelo fungo de baixa virulência foi analisada por Burger et al. (1996) que inferiram que os macrófagos ativados por IFN- γ , talvez produzido por células NK ativadas, poderiam ser responsáveis pela resistência dos camundongos atímicos na PCM. Outros trabalhos também demonstraram que em determinadas infecções a atividade dos leucócitos PMN pode substituir com sucesso a ação dos macrófagos (Leemans et al., 2001).

Suttman et al. (2003) também evidenciaram em seu trabalho que a presença de agentes patogênicos como o *Mycobacterium bovis* (BCG) podem ativar os leucócitos PMN e esta ativação pode ser um estágio essencial à resposta imune contra a bactéria. Esses pesquisadores observaram a ocorrência da inibição de apoptose espontânea dessas células além da alteração na expressão de vários genes para síntese de citocinas, quimiocinas e receptores de superfície.

Diferentes pesquisas analisaram a participação dos leucócitos PMN durante a infecção com *Listeria monocytogenes* e *Leishmania major* e destacaram a importante função destas células no controle da infecção, pois os animais que tiveram essas células reduzidas apresentaram exacerbação da doença e morte precoce (Czuprynski et al., 1996; Lima et al., 1998; Edelson et al., 2000).

Huffnagle et al. (2000) demonstraram que animais geneticamente deficientes em CCR2 $^{-/-}$ (receptor de MCP-1 que é uma quimiocina importante no recrutamento de leucócitos PMN) e infectados com *Cryptococcus neoformans* apresentaram sérias dificuldades no recrutamento de monócitos, macrófagos e leucócitos e apresentaram também deficiência na produção de IFN- γ . Mostraram nesta situação experimental, uma resposta do tipo Th2 com disseminação fúngica para

figado e cérebro, eosinofilia pulmonar, produção de IL-4 e IL5, diminuição de IFN- γ e aumento nos níveis de IgE sérica.

Em trabalho desenvolvido anteriormente em nosso laboratório (Pina et al., 2002) verificamos que a depleção de PMN provocou exacerbação da doença de animais B10.A (suscetíveis), mas não de animais A/J (resistentes). Por outro lado nossos resultados demonstraram que a depleção dos leucócitos PMN não influenciou o curso da PCM em animais BALB/c (atímicos ou eutímicos) esse fato indica que o efeito destas células é provavelmente linhagem-dependente o que explicaria os resultados por nós obtidos.

No trabalho de Pina et al. (2002) demonstrou-se que a depleção de PMN induziu ao aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN- γ e TNF- α) no pulmão dos animais tratados. Nos nossos resultados não verificamos um padrão determinado na alteração das citocinas, sendo verificados aumentos e diminuições de citocinas tanto anti como pró-inflamatórias.

Netea et al. (2000) observaram a redução do número de neutrófilos no fígado e pulmões de camundongos depletados de IL-18 e desafiados com *E. coli* e *S. typhimurium*. Esses animais apresentaram aumento na sobrevivência e este fato foi acompanhado pela redução dos níveis de IFN- γ e TNF- α , indicando que a neutralização da IL-18 durante a endotoxemia protege os animais dos efeitos do LPS. Esta proteção era parcialmente mediada pela inibição da produção de IFN- γ e conseqüente diminuição do dano tecidual provocado pelos neutrófilos, redução da síntese de quimiocinas e TNF- α .

Mednick et al. (2003) investigaram a ação dos leucócitos PMN na defesa de camundongos BALB/c depletados destas células pelo AcM RB6-8C5 contra a infecção pelo *Cryptococcus neoformans*. Essa pesquisa demonstrou que os camundongos neutropênicos infectados apresentaram sobrevivência maior do que os seus controles. Esses autores demonstraram

que a ausência de células PMN no pulmão nas fases iniciais da doença aparentemente alterou a de uma maneira benéfica a resposta inflamatória ao fungo. Esses dados estão em concordância com os resultados por nós encontrados, indicando que a redução de neutrófilos nem sempre é acompanhada pelo agravamento da doença.

Concluindo, observamos que os leucócitos PMN não exercem, no início da doença, efeito marcante na regulação da gravidade da PCM pulmonar de camundongos BALB/c e parecem atuar principalmente na regulação da produção local de citocinas. Demonstramos também que a redução na população de leucócitos PMN, em diferentes condições experimentais (presença ou ausência de linfócitos T), pode alterar o infiltrado celular nos pulmões com provável interferência na síntese de citocinas que podem definir o curso da PCM.

Em várias infecções por patógenos intracelulares foi demonstrado que o sistema de defesa do hospedeiro depende de um controle rígido entre as respostas Th1 e Th2. Na PCM experimental, a resposta imune protetora parece ser modulada preferencialmente pela resposta Th1 exigindo a participação de células e citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α , IFN- γ entre outras (Kashino, et al., 2000; Murphy et al., 1998; Arruda et al., 2002).

A IL-12 biologicamente ativa é composta por um heterodímero de aproximadamente 70kDa (p70) composto por duas subunidades não relacionadas p40 e p35 sendo originalmente descoberta e caracterizada como produto da linhagem de células B, mas estudos subsequentes indicaram as células fagocitárias como a principal fonte dessa importante citocina (Ma et al., 1995; Trinchieri, 1993).

Primariamente produzida por macrófagos, a IL-12 parece ser determinante dos mecanismos protetores, pois tem a habilidade de coordenar e ativar os vários compartimentos da

imunidade celular, sendo responsável pela ativação da produção de IFN- γ por células T e NK, promover a maturação e ativação de células T helper 1 (Th1) e favorecer o estabelecimento da resposta imune celular (Trinchieri, et al., 1995; Tominaga et al., 2000; Beenhouwer et al., 2001, Geng et al., 2000). Vários trabalhos demonstram que a supressão da síntese de IL-12 pode ser considerada o mecanismo de evasão mais comumente empregado por microrganismos patogênicos (Matsunaga et al., 2001; Retini et al., 2001).

Nossos resultados com a depleção seletiva sistêmica de IL-12 demonstraram que na ausência desta citocina provavelmente outras vias de imunoproteção podem ser ativadas durante a PCM. Assim, se a produção de IFN- γ na PCM fosse totalmente dependente da presença da IL-12 a neutralização desta citocina levaria a efeitos equivalentes à depleção de IFN- γ . Como demonstramos a doença foi mais grave nos animais depletados de IFN- γ , fato este que sugere que existem vias alternativas e independentes de IL-12 para a indução da síntese de IFN- γ na PCM.

Nossos dados indicaram que a IL-12 parece exercer função essencial no controle da disseminação do fungo em animais deficientes de células T, contudo observamos que o pulmão não foi gravemente afetado.

Os animais eutímicos que receberam o AcM anti IL-12 apresentaram aumento no grau de infecção do pulmão e baço, mas devemos ressaltar que, apesar desses valores se apresentarem significantes, notamos que o número de UFC/g dos órgãos dos animais tratados com anti IFN- γ foi maior, sugerindo portanto que a neutralização de IFN- γ induziu à exacerbação da doença de forma mais marcante.

Estudos anteriores demonstraram a importância da IL-12 na indução de IFN- γ , e conseqüentemente a sua ausência levaria ao agravamento das infecções por diversos patógenos. Os resultados obtidos em nosso trabalho corroboram em parte com esse fato, e indicam que

outros fatores como, por exemplo, a IL-18, a IL-23, a IL-27 e células NK ou $T\gamma\delta$ podem estar envolvidas na produção de IFN- γ independente da presença da IL-12.

A IL-23 é composta pela subunidade p40 que combinada à subunidade p19, ativa o fator de transcrição Stat4 e induz a síntese de IFN- γ . Não se sabe ao certo se a IL-23 exerce efeitos sobre as células NK similares à IL-12, ou está envolvida em outros processos de regulação da resposta imune inata (Jacobson et al., 1995; Oppmann et al., 2000; Gollob et al., 1998). Em nossos resultados podemos excluir a atividade desta citocina, pois o anticorpo monoclonal C17.8 utilizado nos experimentos de depleção atua neutralizando especificamente a cadeia p40 comum à IL-12 e IL-23 deste modo, neutralizando ambas as citocinas.

A IL-27 apresenta similaridades funcionais e estruturais à IL-12 e está associada a regulação da resposta imune Th1 (Trinchieri et al., 2003; Lucas et al., 2003; Larousserie et al., 2004). Como a mesma não foi por nós investigada não podemos afirmar se essa citocina estaria ou não influenciando os nossos resultados.

Pudemos notar também que a depleção sistêmica de IL-12 levou a doença mais grave, com maior carga fúngica, tanto em camundongos atímicos como eutímicos. Entretanto, os experimentos de mortalidade e HTT concordam com dados obtidos por outros autores e indicam a pequena influência da IL-12 na sobrevida e nas reações de HTT dos camundongos infectados com o *P. brasiliensis*.

Os animais atímicos e eutímicos depletados de IL-12 não tiveram sua mortalidade alterada ao contrário dos depletados de IFN- γ ; o mesmo fenômeno ocorreu nos testes de HTT: o IFN- γ regula esta reação enquanto que a IL-12 não o faz.

Outro parâmetro avaliado no presente trabalho para caracterizar a função da IL-12 na PCM experimental, foi a quantificação das citocinas pulmonares. Os resultados verificados nas

dosagens das citocinas pulmonares de animais eutímicos depletados de IL-12 indicaram o aumento na síntese de IFN- γ . Este fato parece paradoxal, entretanto, estudos cinéticos de produção de citocinas em camundongos B10.A depletados de IL-12 realizados em nosso laboratório demonstraram que os níveis de citocinas pulmonares permanecem baixos enquanto a IL-12 está sendo neutralizada. A interrupção do tratamento, contudo, induz a um efeito rebote e os animais tratados passam a apresentar valores de citocinas mais altos do que aqueles observados nos animais controle (Molinari-Madlum, 2002).

Outro fato observado em animais *nu/+* tratados com o AcM C17.8 é que a IL-12 controla a produção dos isótipos regulados por citocinas Th1 (IgG2a) e Th2 (IgG1, IgE) ou TGF- β (IgA, IgG2b). Nesses animais o aumento de IFN- γ foi concomitante à negatificação da IL-10 pulmonar, demonstrando que nem sempre a ausência de citocinas inibidoras de macrófagos induz à melhora da PCM.

A função da IL-12 como reguladora da resposta imune humoral foi descrita por vários autores. Germann et al. (1995) demonstraram através do tratamento de camundongos CBA/J com IL-12 recombinante associada a antígenos protéicos e adjuvantes que existe uma produção excessiva de anticorpos, que pertencem preferencialmente às subclasses fixadoras de complemento (IgG2a, IgG2b e IgG3) e que esse processo depende parcialmente da presença de IFN- γ .

A identificação da IL-12 como importante reguladora da síntese de IFN- γ é reconhecida e essa importante função levou à investigação quanto às vias de sinalização utilizadas por essa citocina. Recente trabalho demonstrou que sinais da cadeia IL-12R β 2 ativa a via Jak/Stat a qual primeiramente ativa Stat4, um fator de transcrição que regula a produção de IFN- γ . Embora a IL-12 seja um dos elementos centrais para a indução da resposta por células NK em diversos

processos infecciosos, existem evidências de que outras citocinas, por exemplo, a IL-23, podem ativar a Stat4. Como já comentado anteriormente, podemos excluir a ação dessa citocina (IL-23) em nossos experimentos, contudo ainda podemos supor a ação simultânea da IL-18 e da IL-27 em substituição à IL-12.

A produção de NO também aumentou de forma significativa nos animais *nu/nu* depletados de IL-12; este resultado é de difícil explicação face aos níveis diminuídos de IFN- γ e aumento de IL-10 presentes no pulmão destes animais.

Estudos realizados em camundongos *scid* (deficientes de células T e B) depletados com AcM anti IL-18 e infectados com *T. gondii* indicaram a diminuição de IFN- γ , além da redução da resistência à infecção. Este trabalho relacionou também os efeitos protetores da IL-18 com o aumento da atividade das células NK e T-citotóxicas e com o aumento nos níveis de NO produzidos por células de baço (Cai et al., 2000).

Nossos resultados referentes ao aumento na síntese de NO pulmonar em animais atímicos poderiam estar relacionados à síntese de IL-18; entretanto, o resultado da concentração desta citocina no macerado de pulmão desses animais mostrou-se diminuído indicando assim que outros mediadores podem ter concorrido para esse achado.

Existem vários autores que descrevem a via independente de IL-12 que permite a geração de resistência dependente de IFN- γ para vários patógenos intracelulares (Zhang et al., 1997; Vankayalapti et al. 2000; Cai et al., 2000; Biet et al., 2002; Stuyt et al., 2002).

Qureshi et al. (1999) demonstraram em seu estudo *in vitro* que a IL-12 e a IL-18 induzem de forma sinérgica a produção de IFN- γ por células NK e T γ/δ e aumentam a atividade fungicida contra o *C. neoformans in vivo*. Essas células parecem exercer papel relevante na manutenção da

resistência de animais atímicos e necessitam de uma melhor caracterização quanto ao seu papel na resposta durante a PCM.

Outro trabalho destaca a função das células $T\gamma/\delta$ como participantes dos mecanismos de defesa durante os estágios iniciais da infecção. Takada et al. (1994) trataram camundongos com o anticorpo anti NK1.1 no início da infecção e observaram a eliminação da *L. monocytogenes* acompanhada pelo aumento no número de células $T\gamma/\delta$ na cavidade peritoneal. Em outra situação os camundongos foram depletados das células $T\gamma/\delta$ e essa redução bacteriana não foi observada.

A presença de eosinófilos e das proteínas dos seus grânulos têm sido associados com mecanismos de resistência contra parasitas, entretanto estas células são pouco reconhecidas como efetoras durante a PCM.

Dados obtidos em nossos experimentos com a neutralização de IL-12 mostraram que esse tratamento induziu a significativa elevação nos títulos de IgE sérica e ao aumento de IL-18 nos sobrenadantes de baço nos animais *nu/+* tratados com o AcM. Cabe ressaltar que encontramos no LBA desses mesmos animais a marcante elevação nos números de eosinófilos. Sendo assim, esses dados podem ser relacionados e parecem indicar uma hiperreatividade brônquica provavelmente induzida pela presença de células e citocinas pró-inflamatórias.

Trabalho realizado anteriormente em nosso laboratório indicou que camundongos suscetíveis (B10.A) tratados com AcM anti IL-12 apresentavam nas primeiras 48 horas e após a 8ª semana de infecção intensa eosinofilia pulmonar (Molinari-Madlum, 2002) o que corrobora também com nossos resultados.

Hoshino et al. (1999) apresentaram dados que sugerem que a IL-18 além de estar envolvida com o desenvolvimento de células Th1 também pode ser indutora de citocinas Th2. Em estudos com animais geneticamente deficientes de IFN- γ demonstram que a IL-2 + IL-18

podem induzir a expressão de IL-13 sugerindo assim, que os níveis de IFN- γ podem regular de forma endógena a produção desta citocina. Observam ainda que a IL-2 associada à IL-12 na mesma situação experimental não provocou efeito semelhante. Concluíram com isso que, na ausência de IFN- γ , a IL-18 pode ser um co-fator no desenvolvimento da resposta imune humoral através da indução de IL-13.

Nakanishi et al. (2001) em revisão sobre a atividade da IL-18 na resposta imune descrevem que esta citocina pode ser reguladora tanto da resposta Th1 quando associada à IL-12 induzindo a síntese de IFN- γ , como da resposta Th2 quando na ausência da IL-12 induzindo a produção de citocinas Th2, assim como a resposta alérgica. Esse fato talvez possa ser relacionado ao aumento de eosinófilos encontrado no LBA dos animais depletados de IL-12.

A relação entre a produção de IL-18 e as respostas alérgicas também foi demonstrada por Wang et al. (2001) que sugeriram que esta citocina pode exercer influência sobre as atividades biológicas relacionadas à inflamação alérgica, além de induzir aumento dose-dependente da expressão de IL-8 pelos eosinófilos em lesões localizadas de modelo alérgico murino.

Outro importante trabalho destacando a relação da IL-18 com a síntese de citocinas Th1, Th2 e reação alérgica, foi realizado por Yoshimoto et al. (2000) que demonstraram que camundongos que receberam IL-18, isoladamente, apresentaram elevada expressão de IgE em células B, sendo essa expressão dependente da presença das células TCD4⁺, da IL-4 e STAT6.

Trabalho anterior realizado em nosso laboratório com as linhagens B10.A e A/J depletadas de IL-12 demonstraram um aumento da gravidade na infecção em animais susceptíveis (B10.A) após 8 semanas de infecção. Contudo, os resultados de mortalidade aqui obtidos indicam a maior importância da manutenção de IFN- γ durante a resposta imune inata,

pois somente a neutralização desta citocina aumentou de forma significativa a mortalidade dos animais *nu/nu*.

Uma visão geral do efeito da IL-12 na imunidade natural de camundongos BALB/c atímicos e eutímicos mostraram que a IL-12 é muito importante na imunidade local e na proteção de ambas as linhagens. Ela pode modular a produção de anticorpos em camundongos eutímicos e controlar a produção de citocinas e o fluxo de células em ambas as linhagens.

Investigamos também o papel IFN- γ em animais atímicos e eutímicos durante a PCM e verificamos que a neutralização de IFN- γ , mais uma vez, mostrou grande importância na resistência imune natural na PCM. Verificamos que os animais atímicos foram seriamente afetados pela depleção de IFN- γ , pois esse tratamento induziu à disseminação fúngica para o fígado e baço e também ao aumento significativo da gravidade da infecção nos pulmões.

Vários pesquisadores afirmam que o IFN- γ é importante na ativação de macrófagos e sabe-se que os macrófagos não ativados têm baixa atividade fungicida permitindo com isso a replicação fúngica levando à morte precoce dos animais (Cano et al., 1998; Karwari, et al., 2000; Souto et al., 2000).

Nossos resultados confirmam essas pesquisas; os animais atímicos que receberam o AcM anti-IFN- γ , apresentaram um intenso crescimento fúngico em todos os órgãos analisados, enquanto que nos animais eutímicos foi observado o aumento significativo na gravidade da infecção no pulmão e no fígado.

É conhecido o fato de que o IFN- γ promove a síntese de TNF- α por macrófagos e que o IFN- γ e o TNF- α atuam de forma sinérgica induzindo a atividade antimicrobiana em muitas

doenças infecciosas; na ausência desta citocina todo o sistema de ativação de macrófagos fica comprometido.

Essa relação entre o IFN- γ e a resistência à infecção por *P. brasiliensis* pôde ser também observada nos nossos resultados de HTT e mortalidade. Na reação de HTT em animais eutímicos notamos a redução significativa na resposta imune celular, que se deslocou para o padrão anérgico associado às formas graves da PCM.

A reação de HTT ocorre devido à resposta inflamatória provocada pelo afluxo de células T e monócitos após o desafio dos camundongos com o Ag de Fava-Netto. Coffman et al.(1986) demonstraram claramente que as reações de HTT são mediadas por linfócitos Th1 e que a síntese de IFN- γ é essencial para que o fenômeno se estabeleça. No nosso caso, demonstramos que a ausência desta citocina influenciou na redução da resposta inflamatória dos animais eutímicos e esta resposta pôde observada pela redução obtida pela medida média da espessura das patas dos animais tratados com o AcM quando comparada a dos seus controles.

O IFN- γ é um potente estimulador de migração linfocitária e essencial na resposta de HTT, por ter ação no recrutamento de células inflamatórias; sua neutralização induz a depressão da imunidade mediada por células nos camundongos eutímicos, dado este revelado por nossos resultados através da hiporresponsividade ao teste de HTT. A anergia por nós observada pode ter sido provocada pela alteração no padrão de migração celular para o local de inoculação do antígeno ou então pela deficiente ativação celular de células T “naive”.

Shams et al. (2001) demonstraram que o IFN- γ tem ação central na imunidade contra o *M. tuberculosis*, pois seus estudos indicaram que a presença desta citocina está freqüentemente associada aos indivíduos que são reativos à tuberculose, mas não apresentam a doença. Na PCM a situação é semelhante, a doença é muito mais grave em camundongos depletados (Cano et al.,

1998) ou nocautes (Souto et al., 2000) para IFN- γ e em pacientes observa-se a correlação entre a doença grave e baixa ou ausente secreção de IFN- γ (Kurita et al., 2000; Mamoni et al. 2000).

A neutralização sistêmica de IFN- γ levou ao aumento da síntese de IgA concomitante à doença mais grave. Este dado não pôde ser correlacionado aos níveis de citocinas pulmonares. Mas, de modo geral, podemos-se afirmar que o IFN- γ não é um grande regulador da produção de anticorpos (Gracie et al., 1996; Lorenz et al., 1995; Snapper et al., 1988).

Verificamos em nossos resultados a redução de IL-2, IL-12 e de IFN- γ nos pulmões de camundongos *nu/nu* e o aumento de IL-2, IFN- γ e a redução IL-10 nos *nu/+*. O padrão de citocinas em animais atímicos confirma o efeito regulador do IFN- γ que potencia a síntese de citocinas pró-inflamatórias e inibe a síntese de citocinas Th2 (IL-4, IL-5). Inesperadamente, em animais eutímicos encontramos a redução significativa de IL-10 e aumento de IFN- γ , fato este que pode ser considerado discrepante com a maior carga fúngica pulmonar e hepática.

Nos animais *nu/nu* depletados de IFN- γ observou-se a redução de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e de IFN- γ) e o aumento da síntese de IL-18 no baço que poderia estar associada ao aumento de eosinófilos no lavado-bronco-alveolar e ao agravamento da doença nesses animais.

O aumento da síntese NO observado em animais *nu/nu* depletados é de difícil explicação. Esse aumento foi concomitante à diminuição de IL-12 e de IFN- γ e nos leva a sugerir que outra citocina ou quimiocina esteja relacionada a esse resultado. Este fato é também interessante, pois mostra o aumento de NO associado à doença mais grave em animais *nu/nu*. Esse fato poderia ser explicado pelo aumento da síntese de IL-18 encontrada no baço desses animais e sua relação com a ativação das células NK pelo seguinte raciocínio: a IL-18 associada à IL-12 ativa macrófagos

que ativados produzem NO. Essa molécula tem influência na citotoxicidade das células NK diretamente dependente da sua concentração.

Em resumo, a depleção de IFN- γ levou a um agravamento da doença pulmonar além da precoce disseminação para outros órgãos e diminuição da atividade inflamatória sistêmica demonstrada pela redução apresentada nos resultados de HTT.

Nossos experimentos de depleção de IFN- γ demonstraram que esta citocina influencia diretamente as reações de HTT em camundongos eutímicos, controla a carga fúngica e altera negativamente a síntese de IgA. Nos animais *nu/nu*, o IFN- γ regula a síntese de citocinas inflamatórias (IL-2, IL-12 e IFN- γ) enquanto que em animais *nu/+*, além de controlar estas citocinas pró-inflamatórias, regula também a citocina Th2 (IL-10). Os dados de mortalidade mostram claramente que esta é a citocina mais importante na imunidade contra o *P. brasiliensis* e que seu efeito é absolutamente essencial na proteção relativa de camundongos atímicos.

Sabendo que os animais atímicos têm as células NK como principal fonte de IFN- γ e que essas células parecem exercer uma função essencial no controle e ativação da resposta imune natural contra o *P. brasiliensis*, achamos pertinente realizar ensaios de depleção sistêmica de células NK comparativamente em camundongos BALB/c atímicos e eutímicos.

Ehl et al. (1996) analisaram comparativamente *in vivo* a eficácia e a especificidade de 3 anticorpos utilizados na depleção de células NK, entre eles: anti NK1.1, anti asialo-GM₁ e o TM β 1 (age diretamente contra o receptor β da IL-2). Observaram que todos os 3 foram eficazes na eliminação do efeito citolítico das células NK sendo o AcM NK1.1, o que exerceu menor efeito sobre estas células.

Os resultados da depleção sistêmica de células NK em camundongos BALB/c através do Ac anti Asialo-GM₁ sugerem a atividade protetora das células NK nos animais *nu/nu*, fato este demonstrado pela exacerbação da doença nos pulmões, fígado e baço. Entretanto, em animais *nu/+* as células NK parecem não exercer atividade no controle da disseminação do fungo para o fígado e baço, pois não foram encontradas alterações na carga fúngica nestes órgãos.

Podemos concluir que as células NK participam mais ativamente nos mecanismos imunoprotetores de camundongos atímicos do que dos animais eutímicos e este fato já havia sido descrito com as outras depleções, onde foram mostrados mecanismos de imunidade natural mais eficientes em camundongos deficientes de célula T quando comparados a animais normais.

A importância deste resultado pode também ser confirmada com a observação dos resultados da sobrevida onde os animais atímicos depletados de células NK têm morte precoce quando comparados aos seus controles; além disso, é importante ressaltar o fato de que os animais atímicos apresentaram tempo de sobrevida menor do que os eutímicos em todos os tratamentos realizados.

A dosagem dos títulos de anticorpos específicos detectados com esse tratamento sugere que as células NK podem regular a síntese de anticorpos e os isótipos sintetizados por camundongos atímicos. O aumento de Ig total, IgM, IgG1 e IgG2b, indica que as células NK exercem um papel imunomodulador preferencial dos isótipos regulados por IL-4 (IgG1) e TGF- β (IgG2b).

Embora o controle do “switch” de linfócitos B para a síntese de imunoglobulinas seja preferencialmente realizado por linfócitos T (Th1 e Th2), outras células produtoras de citocinas (macrófagos, células B ativadas e células NK) podem contribuir com a seleção das subclasses de Ig a serem produzidas durante uma infecção (Gao et al., 2001; Solffer et al., 1995; Satoskar et al.

em 1999). A síntese dos diferentes isótipos envolve complexos mecanismos celulares e moleculares que podem ser diferentes para cada um dos isótipos. Esse mecanismo de indução da síntese de anticorpos por células NK também foi demonstrado por Koh et al. (2000) que relacionam o aumento do isótipo IgG2a com o aumento da ADCC mediada por células NK.

Os nossos resultados com a depleção de células NK não induziu ao aumento significativo do isótipo IgG2a em nenhuma linhagem, esse dado poderia ser relacionado à redução destas células e a secreção deste isótipo.

Várias citocinas exercem efeito modulatório sobre as células NK. Dinarello et al. (1999) observou que a IL-12 e IL-18 derivadas de macrófagos são reconhecidas como reguladoras da produção de IFN- γ por células NK e T. Estas citocinas quando atuam sozinhas induzem baixos níveis de IFN- γ , entretanto quando juntas produzem efeito sinérgico aumentando a síntese de IFN- γ .

Assim como a IL-2, a IL-21 também é uma citocina que exerce efeito sobre células B, T e NK. Foi recentemente identificada como citocina Th1 sendo produzida por células TCD4⁺ e é estruturalmente relacionada à IL-15 a qual também apresenta efeitos similares à IL-2. Diferentemente ao que ocorre com os animais nocautes de IL-15, os animais deficientes de IL-21 mostram desenvolvimento normal das células T e NK; contudo, as células NK mostram atividade citolítica diminuída indicando que esta citocina pode estar envolvida com o processo de maturação destas células (Strengell et al., 2002 e 2003; Habib et al., 2003).

A similaridade funcional e estrutural da IL-15 com a IL-2 pode ser particularmente atribuída ao fato de que as duas citocinas ligam-se e sinalizam através de um mesmo receptor IL-2/IL-15R β (CD122) e a subunidade comum γ , mas a IL-15 também utiliza a subunidade própria IL-15R α , sendo através dessa subunidade que ocorre a ligação de alta afinidade. Em animais com

a falta de qualquer um desses componentes há um reduzido número de células NK mostrando que essa citocina é crítica no desenvolvimento dessas células (Gosselin et al. 1999; Fehniger et al., 2000; Shibuya et al., 2003; Kawamura, et al., 2003; Yokoyama et al., 2004).

Outro estudo interessante indicou a importância da IL-15 na resposta imune desenvolvida por animais *scid*; a reação de Shwartzman é uma resposta letal induzida por citocina produzida pela ativação inicial e posterior desafio com bactérias ou componentes bacterianos (por exemplo, LPS). Fehniger et al. (2000) demonstraram que a neutralização da IL-15 durante a primeira fase da reação de Shwartzman induz a proteção de camundongos, reduzindo a mortalidade e os efeitos letais da exagerada síntese de IFN- γ , principalmente por células NK. Dieli et al., (2000) analisaram a participação das células NK durante a reação de Shwartzman e também observaram que essa população celular participa ativamente na geração desta reação.

Strengell et al. (2003) avaliaram a ação da IL-15, IL-18 e da IL-21 na regulação da expressão do gene para IFN- γ e sua síntese por células T e NK e sugerem a interação sinérgica entre estas citocinas e a importante ação na ativação da resposta imune inata associada às células NK.

Cai et al. (1999) concluíram que a IL-10 pode aumentar a proliferação, citotoxicidade e a produção de IFN- γ por células NK quando combinada com a IL-18. Testes realizados *in vitro* com células NK estimuladas por IL-12, IL-12 + IL-18 e IL-18 isoladamente resultaram em baixas concentrações de IFN- γ ; no entanto, embora a IL-10 sozinha não exerça efeito ativador sobre essas células, quando combinada com a IL-18 e não com a IL-12 aumentou significativamente a síntese de IFN- γ . Essa ativação dose-dependente não foi observada quando foram utilizadas células Th1 indicando que o mecanismo é célula-específico.

Zhang et al. (1997) ao depletarem células NK em camundongos infectados por *C. neoformans* observaram que houve a supressão da produção de IFN- γ além da inibição da produção de NO. Estes autores demonstraram em seu trabalho a participação das células do exsudato peritoneal na produção de NO e IFN- γ e a análise feita por citometria de fluxo demonstrou que 40,5% das células produtoras de IFN- γ eram células NK.

A atividade das células NK na modulação da resposta durante a tuberculose foi pesquisada por Sugawara et al. (2002) que utilizaram camundongos KO para células NK infectados com *M. tuberculosis* e examinaram sua capacidade de controle da doença, formação de granuloma e produção de citocinas. Concluíram que os animais deficientes de células NK produziram granulomas semelhantes aos dos controles, os números de UFC estavam aumentados nas primeiras 3 semanas de infecção, mas diminuíram 9 a 11 semanas depois indicando que as células NK têm uma função exacerbadora nas fases mais tardias e protetora nas fases iniciais da doença. Estes resultados podem explicar em parte os nossos dados de mortalidade onde verificamos que mesmo após a depleção das células NK os animais atímicos apesar do aumento da mortalidade nos primeiros 20 dias de infecção praticamente mantiveram sobrevida equivalente aos animais eutímicos aos 150 dias de infecção (figura 30).

Várias pesquisas detectaram pouca ou nenhuma alteração de comportamento em animais depletados de células NK pelo asialo-GM₁ indicando com esse resultado que mesmo sendo ativadas durante a resposta inicial em infecções por *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes*, *T. gondii*, *E. coli* e serem fonte importante de IFN- γ , a sua remoção não altera necessariamente o padrão de resistência de camundongos a diferentes patógenos (Junqueira-Kipnis et al., 2003; Schultheis e Kearns, 1990; Hunter et al. 1994; Flórido et al., 2003; Badgwell et al., 2002).

Em recente publicação Vankayalapati et al. (2004) estudaram a ação das células NK na regulação da função efetora de células T CD8⁺ contra macrófagos infectados com *M. tuberculosis* e observaram que a depleção das células NK reduziu a frequência das células TCD8⁺IFN- γ ⁺ que respondem ao *M. tuberculosis* diminuindo assim sua capacidade de lisar macrófagos infectados pela bactéria.

Carson et al. (1999) apontaram a participação de células NK na resposta inflamatória sistêmica e comprovam esse fato através do tratamento de animais com IL-2 + IL-12 ou IL-2 + IL-15. Os animais tratados desenvolveram edema pulmonar, lesões degenerativas do trato gastrointestinal, elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda além de apoptose de células NK. Esses efeitos foram completamente abolidos com a depleção das células NK.

A ação das células NK na resposta imune tem sido extensa área de interesse, pois estas células atuam como primeira linha de defesa contra microrganismos e não necessitam de ativação prévia; elas não somente lisam as células infectadas como também secretam citocinas que podem regular a resposta do sistema imune adaptativo.

As células NK são abundantes no fígado e a expressão dos ag de MHC classe I são normalmente indetectáveis nos hepatócitos sendo, porém a sua expressão regulada pela presença de IFN- γ . É conhecida a importância dos antígenos de MHC de classe I na inativação das células NK, indicando que essas células têm importante ação protetora no fígado principalmente na fase aguda da infecção.

Usando um modelo de infecção por adenovírus que é causa de infecção hepática, Liu et al. (2000) demonstraram que as células NK exercem duas funções: induzem a apoptose dos hepatócitos infectados pelo vírus e, concomitante a isso, estimulam a resposta por células T.

Concluíram também que a eliminação dessas células antes da infecção leva à inibição da destruição celular no fígado.

No caso da PCM, o aprisionamento do fungo em macrófagos e granulomas é necessário para o controle do crescimento e disseminação do fungo. Neste caso o aumento da produção de IgG1, que por ser conhecidamente um Ac opsonizante, facilitaria a fagocitose das células leveduriformes e o destino das mesmas dependeria do grau de ativação dos macrófagos.

Outra hipótese a ser considerada é o fato de que as células NK uma vez ativadas entrem em apoptose e a fagocitose de células apoptóticas induziria a produção de prostaglandinas e de citocinas antiinflamatórias (IL-10) por macrófagos, o que levaria à desativação dos mecanismos de eliminação do fungo. Além disso, a ausência de células NK talvez possibilite a maior permanência das células fúngicas nos macrófagos que, por não serem inibidos por corpos apoptóticos, podem realizar de forma mais eficiente sua função, principalmente nos órgãos onde existe abundância dessas células como no fígado e baço.

Alguns autores levantam a hipótese de que existam subtipos de células NK: NK1 e NK2 semelhante aos subtipos de células TCD4 Th1 e Th2. Estudos *in vitro* demonstraram que células NK humanas cultivadas com IL-12 e anti IL-4 produziram IFN- γ (NK1) enquanto que células cultivadas com IL-4 e anti-IL-12 produziram IL-5 e IL-13 (NK2). Outros autores levantam a possibilidade de que as células imaturas são NK2 e são capazes de proliferar na presença de IL-4; posteriormente se diferenciam em NK0 que produzem IL-13 e IFN- γ , e finalmente diferenciam-se em NK1 que produzem IFN- γ e são citotóxicas (Lieberman e Hunter, 2002).

Quando observamos comparativamente os resultados de depleção de células NK em animais eutímicos e atímicos notamos que são os camundongos *nu/nu* os únicos a apresentarem doença mais grave além de elevada mortalidade no início da infecção. Talvez na ausência das

células T, NK a presença aumentada da população das células B esteja exercendo a sua ação através da síntese de IL-10 que poderia atuar como desativadora de macrófagos e indutora do agravamento da infecção.

Em resumo, verificamos através dos nossos estudos que o mediador mais importante na imunidade natural na PCM é o IFN- γ . Foi também demonstrado que a IL-12 e a ação de células NK parecem ser mais eficientes em camundongos atímicos, evidenciando a importância maior dos mecanismos de resistência natural nesta linhagem.

A participação das células T γ/δ na PCM ainda não está esclarecida, mas estudos realizados com camundongos infectados por *L. monocytogenes* demonstraram a importância deste tipo celular; animais depletados desta sub-população de célula T apresentam aumento da mortalidade devido à produção insuficiente de citocinas. Este trabalho apresenta evidências de que as células T γ/δ estão envolvidas com a regulação da síntese de IFN- γ (Skeen, et al. 2001).

Pesquisas anteriores mostraram por citometria de fluxo que as células NK são a maior fonte de IFN- γ e que a sua produção é prejudicada nos animais TCR- $\delta^{-/-}$ infectados com *L. monocytogenes*. Concluiu-se que provavelmente a produção reduzida de TNF- α nesses animais contribuiu para a falha na ativação das células NK e conseqüente redução na síntese de IFN- γ (Ladel et al., 1996).

Esses dados podem sugerir a ação das células T γ/δ em animais *nu/nu* que seriam uma outra fonte de IFN- γ além daquela produzida pelas células NK e apontam também para uma possível atividade imunomoduladora das células T γ/δ na PCM.

A IL-18 também merece destaque nessa complexa rede de resultados, sendo uma citocina importante, reconhecidamente ativadora da produção de IFN- γ e que provavelmente exerce papel fundamental no mecanismo de resposta imune desenvolvida durante a PCM. Verificamos que a

IL-18 apresentou níveis menores do que os encontrados nos animais controles, contudo notamos também que em animais atímicos a redução foi detectada somente no compartimento pulmonar enquanto que nos animais eutímicos o fígado e o baço foram os órgãos atingidos.

Ao relacionarmos esse fato com os resultados de UFC podemos notar que na linhagem eutímica não foi evidenciada a disseminação do fungo para o fígado e o baço esse dado talvez esteja relacionado à ausência das células NK e diminuição na síntese de IL-18, pois, como anteriormente discutido, a IL-18 pode ser reguladora tanto da resposta Th1, como da resposta Th2 induzindo a produção de citocinas Th2 e também de resposta alérgica (Hoshino et al., 1999; Yoshimoto et al., 2000; Nakanishi et al., 2001). Uma vez diminuída a síntese de IL-18, e em ambiente adequado, provavelmente a resposta Th2 seja inibida por outro mecanismo resultando praticamente na redução dos números de UFC encontrados nesses animais.

Nossos resultados, quanto à depleção de células NK, são inéditos e suscitam uma série de propostas de mecanismos sendo, portanto, essencial um novo delineamento experimental para que novas peças sejam adicionadas a esse grande quebra-cabeça que é a paracoccidiodomicose.

CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

1. As células T são essenciais à proteção durante a PCM.
2. A depleção de leucócitos PMN não alterou o padrão da infecção, no entanto modulou a síntese de citocinas.
3. A IL-12 parece exercer função de controle da disseminação do fungo em animais atímicos; pouco influenciou na resposta de HTT e na sobrevivência dos animais é importante moduladora da resposta humoral em animais eutímicos e controla a produção de citocinas em ambas as linhagens.
4. A depleção de IFN- γ alterou significativamente a sobrevivência dos animais atímicos e a resposta ao teste de HTT, parece não ser um grande regulador da síntese de anticorpos, mas exerce efeito importante na modulação da produção de citocinas Th1 e Th2. É considerado o mais importante mediador da PCM.
5. As células NK são essenciais aos animais deficientes de células T, podem regular a síntese dos isótipos regulados por IL-4 (IgG1) e TGF- β (IgG2b) em animais atímicos, além de controlar a produção de IL-18 em ambas as linhagens e importantes na regulação da quimiotaxia de leucócitos nos períodos iniciais da PCM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S. The role of IL-18 in innate immunity. **Cur. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 59-63, 2000.

ALGARRA, I.; ORTEGA, E.; SERRANO, M. J.; CIENFUEGOS, A.; GAFORIO, J. J. Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following *in vivo* depletion of natural killer cells in immunocompetent BALB/c mice and T-cell deficient nude mice. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v. 33, p. 159-63, 2002.

ALMEIDA, S. R.; LOPES, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 529-537, 2001.

APPELBERG, R.; CASTRO, A. G.; SILVA, M. T. Neutrophils as effector cells of T-cell-mediated immunity in murine listeriosis. **Immunol.**, v. 83, p.302-7, 1994.

ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; COCK, A. M.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice influence of hormonal status of the host on tissue response. **Med. Microb.**, v. 40, p. 169-178, 2002.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Interleukin-12 protect mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhanced pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 185-195, 2002.

AKIRA, S. The role of IL-18 in innate immunity. **Cur. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 59-63, 2000.

BADGWELL, B.; PARIHAR, R.; MAGRO, C.; DIERKSHEIDE, J.; RUSSO, T.; CARSON, W. E. Natural Killer cells contribute to the lethality of a murine model of *Escherichia coli* infection. **Surgery**, v. 132, p. 205-12, 2002.

BAIDA, H.; BISELLI, A. P. J. C.; JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G. M. B.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form of paracoccidioidomycosis. **Micr. Infec.**, v. 1, p. 273-78, 1999.

- BEENHOUWER, D. O.; SHAPIRO, S.; FELDEMESSER, M.; CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. Both Th1 and Th2 cytokines affect the ability of monoclonal antibodies to protect mice against *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6445-55, 2001.
- BENDELAC, A. Mouse NK 1.1. ⁺ T cells. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, p. 367-74, 1995.
- BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia**, v. 5, p. 26-9, 1966.
- BERMUDEZ, L. E.; WU, M.; YOUNG, L. IL-12 stimulated natural killer cells can activate human macrophages to inhibit growth of *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4099-4104, 1995.
- BIET, F.; LOCHT, C.; KREMER, L. Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. **J. Mol. Med.**, v. 80, p. 147-162, 2002.
- BLISS, S. K.; BUTCHER, B. A.; DENKERS, E. Y. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. **J. Immunol.**, v. 165, p. 4515-21, 2000.
- BLISS, S. K.; GAVRILESCU, C. L.; ALCARAZ, A.; DENKERS, E. Y. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4898-4905, 2001.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 64-76, 2000^a.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol. reviews.**, v. 173, p. 17-26, 2000^b.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis an update. **Clin. Microb. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.
- BRUNET, L. R. Nitric oxide in parasitic infections. **Inter. Immunopharmac.**, v. 1, p. 1457-1467, 2001.

BURGER, E.; MIYAJI, M.; SANO, A.; CALICH, V. L. G.; NISHIMURA, K.; LENZI, H. L. Histopathology of paracoccidioidomycotic mice a sequential study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 235-42, 1996^a.

BURGER, E.; VAZ, C. A. C.; SANO, A.; CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; XIDIEH, C. F.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell - dependent components. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 391-98, 1996^b.

BURG, N. D.; PILLINGER, M. H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clin. Immunol.**, v. 99: 7-17, 2001.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v. 111, p. 121-133, 1993.

CAI, G.; KASTELEIN, R.; HUNTER, C. A. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN- γ when combined with IL-18. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 2658-2665, 1999.

CAI, G.; KASTELEIN, R.; HUNTER, C. A. Interleukin-18 (IL18) enhances innate IL-12 mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6932-38, 2000.

CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; SINGER-VERMES, L. M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect. Immun.**, v. 55, p.1919-1923, 1987.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; RUSSO, M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. - Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. Inp. FRANCO, M. F.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. Paracoccidioidomycosis. Miami, USA, **CRC Press.**, v. p.151-168, 1993.

CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J Med Vet Mycol.**, v. 29, p. 31-8, 1991.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 41-48, 2000.

CANO, L. E.; FAZIOLI, R. A.; TEIXEIRA, H. C.; RUSSO, M.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; VAZ, C. A. C. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice relationship among progression of the infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1777-83, 1995.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 800-806, 1998.

CARSON, W. E.; YU, H.; PFEFFER, K.; BOUCHARD, P.; CLARK, R.; BALDWIN, A. S.; PESCHON, J.; JOHNSON, P. R.; KU, G.; BAUMANN, H.; CALIGIURI, M. A. A fatal cytokine-induced systemic inflammatory response reveals a critical role for NK cells. **J. Immunol.**, v. 162, p. 4943-4951, 1999.

CARSON, W. E.; DIERKSHEIDE, J. E.; JABBOUR, S.; ANGHELINA, M.; BOUCHARD, P.; KU, G.; YU, H.; BAUMANN, H.; SHAH, M.; MEGAN, A. C.; DURBIN, J.; CALIGIURI, M. A. Co-administration of interleukin-18 and interleukin-12 induces a fatal inflammatory response in mice critical role of natural killer cell interferon γ production and STAT-mediated signal transduction. **Blood**, v. 96, p. 1465-1473, 2000.

CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol. Today**, v. 16, p. 21-6, 1995.

CASTANEDA, E.; BRUMMER, E.; PERLMAN, A. M.; MCEWEN, J.G.; STEVENS, D.A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency and the effect of siderophores. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, p. 351-8, 1988.

COFFMAN, R. L.; CARTY, J. A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon- γ . **J. Immunol.**, v. 136, p. 949-954, 1986.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 129, p. 4-10, 2002.

CONLAN, J. W. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infection of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 630-5, 1997.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M.; SABROZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v. 18, p. 1441-1454, 2002

CRUZ, M. L. S.; SOUZA, M. J.; TERRA, G. M. F.; MACHADO, E. S.; RIOS-GONÇALVES, A. J. Paracoccidioidomycosis. A propósito de mais um caso da forma infantil. *Supl. Arq. Bras. Med.*, v. 65, p. 102-104, 1991.

CZUPRYNSKI, C. J.; THEISEN, C.; BROWN, J. F. Treatment with the antigranulocyte monoclonal antibody RB6-8C5 impairs resistance of mice to gastrointestinal infection with *Listeria monocitogenes*. *Infect. Immun.*, v. 64, p. 3946-49, 1996

DIELI, F.; SIRECI, G.; RUSSO, D.; TANIGUCHI, M.; IVANYI, J.; FERNÁNDEZ, C.; TROYE-BLOMBERG, M.; DE LEO, G.; SALERNO, A. Resistance of natural-killer T cell-deficient mice to systemic Shwartzman reaction. *J. Exp. Med.*, v. 11, p. 1645-1651, 2000.

DINARELLO, C.A. Interleukin -18. *Methods*, v. 19, p. 121-132, 1999.

EDELSON, B. T.; UNANUE, E. R. Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol.*, v. 12, p. 425-31. 2000

EHL, S.; NUESCH, R.; TANAKA, T.; MYASAKA, M.; HENGARTNER, H.; ROLF, Z. A comparison of efficacy and specificity of three NK depleting antibodies. *J. Immunol. Meth.*, v. 199, p. 149-153, 1996.

ELAHL, S.; PANG, G.; ASHMAN, R. B.; CALNCY, R. Nitric-oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. *Immunol.*, v. 104, p. 447-54, 2001.

FARAH, C.S.; ELAHL, S.; GOTJAMANOS, T.; SEYMOUR, G. J.; CLANCY, R. L.; ASHMAN, R. B. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 6110-18, 2001.

FAZIOLI, R. A.; KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; FRANCO, M. F. Delayed-type hypersensitivity response in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. *Mycopathol.*, v. 126, p. 137-146, 1994.

FEHNIGER, T. A.; YU, H.; COOPER, M. A.; SUZUKI, K.; SHAH, M. H.; CALIGIURI, M. A. Cutting edge IL-15 costimulates the generalized Shwartzman reaction innate immune IFN- γ production in vivo. **J. Immunol.**, v. 164, p. 1643-1647, 2000.

FELDEMESSER, M.; MEDNICK, A.; CASADEVALL, A. Antibody-mediated protection in murine *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotrophic effects on cytokine and leukocyte responses. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 1571-80, 2002.

FLÓRIDO, M.; CORREIA-NEVES, M.; COOPER, A. M.; APPELBERG, R. The cytolytic activity of natural killer cells is not involved in the restriction of *Mycobacterium avium* growth. **Intern. Immunol.**, v. 15, p. 895-91, 2003.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p.129-32, 1987.

FRANCO, M.F. Host parasite relationship in Paracoccidioidomycosis. **J. Med.Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18, 1987.

GAO, N.; DANG, T.; YUAN D. IFN- γ - dependent and independent initiation of switch recombination by NK cells. **J. Immunol.**, v. v. 167, p. 2011-2018, 2001.

GERMAN, T.; BONGARTZ, M.; HESS, H.; KOLBE, L. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses in vivo **Eur. J. Immunol.**, v. v. 25, p. 823-29, 1995.

GENG, Y.; BERENCSI, K.; GYULAI, Z.; VALYI-NAGY, T.; GONCZOL, E.; TRINCHIERI, G. Roles of interleukin-12 and gamma interferon in murine *Chlamydia pneumoniae* infection. **Infect. Immun.**, v. 68:2245-2253, 2000.

GOIHMAN-YAHR, M.; ROTHENBERG, A.; ROSQUETE, R.; AVILA-MILLAN, E.; DE ALBORNOZ, M. C.; DE GOMEZ, M.H.; SAN MARTIN, B.; OCANTO, A.; PEREIRA, J.; MOLINA, T. A novel method for estimative killing ability and digestion of *Paracoccidioides brasiliensis* by phagocytic cells "in vitro". **Saboraudia**, v. 23, p. 245-51, 1985.

- GOLLOB, J. A.; MURPHY, E. A.; MAHAJAN, S.; SCHNIPER, C. P.; RITZ, J.; FRANK, D. A. Altered interleukin-12 responsiveness in Th1 and Th2 cells is associated with the differential activation of STAT5 and STAT1. **Blood**, v. 91: 1347-54, 1998.
- GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A. CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2546-52, 2000.
- GOSSELIN, J.; TOMULU, A.; GALLO, R. C.; FLAMAND, L. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. **Blood**, v. 94, p. 4210-19, 1999.
- GOW, N. A. R.; BROW, A. J. P.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Cur. Op. Microbiol.**, v. 5, p. 366-71, 2002.
- GRACIE, J. A.; BRADLEY, J. A. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 1217-21, 1996.
- HABIB, T.; NELSON, A.; KAUSHANSKY, K. IL-21: a novel IL-2-family lymphokine that modulates B, T and natural killer cell responses. **J. allergy Clin. Immunol.**, v. 112, p. 1034-45, 2003.
- HOSHINO, T.; WILTROUT, R. H.; YOUNG, H. A. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. **J. Immunol.**, v. 162, p. 5070-7, 1999.
- HUFFNAGLE, G. B.; YATES, J. L.; LIPSCOMB, M. F. T-cell-mediated immunity in the lungs: a *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection model using scid and athymic nude mice. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 1423-33, 1991.
- HUFFNAGLE, G. B.; TRAYNOR, T. R.; MCDONALD, R. A.; OLSZEWSKI, M. A.; LINDELL, D. M.; HERRING, A. C.; TOEWS, G. B. Leukocyte recruitment during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection – Review. **Immunopharmacol.**, v. 48, p. 231-6, 2000.
- HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by IL-10, IL-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2818-24, 1994.

JACOBSON, N. G.; SZABO, S. J.; WEBER-NORDT, R. M.; ZHONG, Z.; SCHEREIBER, R. D.; DARNELL, J. E.; MURPHY, K. M. Interleukin-12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription Stat3 and Stat 4. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 1755-62, 1995.

JENSEN, J.; WARNER, T.; BALISH, E. Resistance of SCID mice to *Candida albicans* administered intravenously or colonizing the gut, role of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. **J. Infect. Dis.**, v. 167, p. 912, 1993.

JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; KIPNIS, A.; JAMIESON, A.; JUARRERO, M. G.; DIEFENBACH, D. H.; TURNER, J.; ORME, I. M. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis* but play a minimal role in protection. **J. Immunol.**, v. 171, p. 6039-45, 2003.

KARHAWI, A. S. K.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN- γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.**, v. 38, p.225-9, 2000.

KARLHOFFER, F. M.; YOKOYAMA, W. M. Stimulation of murine natural killer (NK) cell by monoclonal antibody specific for NK1.1 antigen IL-2 activated NK cells possess additional specific stimulation pathways. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3662-73, 1991.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L. M. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathol.**, v. 92, p. 173-8. 1985.

KASHINO, S. S.; SINGER-VERMES, L. M; CALICH, V. L. G.; BURGER, E. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do no correlate with its "in vitro" growth. **Mycopat**, v. 111, p. 173-80, 1990.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; SINGER, L. M; CALICH, V. L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. **J. Interf. Cytok. Res.**, v. 20, p. 89-97, 2000.

KAWAKAMI, K.; KOGUCHI, Y.; QURESHI, M.H.; AKIRA, S.; TAKEDA, K. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN- γ production by NK cells. **J. Immunol.**, v. 165, p. 941-7, 2000.

KAWAMURA, T.; KOKA, R.; M. A, A.; KUMAR, V. Differential roles for IL-15R α -chain in NK cell development and Ly-49 induction. **J. Immunol.**, v. 171, p. 5085-90, 2003.

KOH, C. Y.; YUAN, D. The functional relevance of NK-cell-mediated up regulation of antigen-specific IgG2a responses. **Cel. Immunol.**, v. 204, p. 135-42, 2000.

KURITA, N.; TERAOKA, K.; BRUMMER, E.; ITO, E.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Resistance of *Histoplasma capsulatum* to killing by human neutrophils evasion of oxidative burst and lysosoma fusion products. **Mycopat**, v. 115, p. 207-13, 1991.

KURITA, N.; OARADA, M.; MIYAJI, M.; ITO, E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cell of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 177-82, 2000.

LACAZ, C. S. Historical evolution of the knowledge on Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. Inp. FRANCO, M.F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. Ed. Paracoccidioidomycosis. Boca Ratón, Florida, CRC Press, 1994. p.1-11.

LADEL, C. H.; BULM, C.; KAUFMANN, S. H. E. Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by γ/δ T lymphocytes. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 1744-49, 1996.

LAMMAS D. A.; CASANOVA J. L.; KUMARARATNE, D. S. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon-gamma (IFN-gamma) pathway. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 121, p. 417-25, 2000.

LANIER, L. L. On guard – activating NK cells receptors. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 23-7, 2001.

LAROUSSE, F.; PFLANZ, S.; COULOMB-L'HERMINE, A.; BROUSSE, N.; KASTELEIN, R.; DEVERGNE, O. Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. **J. Pathol.**, v. 202, p. 164-71, 2004.

LEEMANS, J. C.; JUFFERMANS, N. P.; FLORQUIN, S.; VAN ROOIJEN, N.; VERVOORDELDONK, M. J.; VERBON, A.; VAN DEVENTER, S. J.; VAN DER POLL, T. Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. **J. Immunol.**, v.166, p. 4604-11, 2001.

LENDVAL, N.; QU, X.; HSUEH, W.; CASADEVALL, A. Mechanism for isotype dependence of antibody-mediated toxicity in *Cryptococcus neoformans* infected mice **J. Immunol.**, v. 164, p. 4367-74, 2000

LERTMEMONGKOLCHAI, G.; CAI, G.; HUNTER, C. A.; BANCROFT, G. J. Bystander activation of CD8⁺ T cells contributes to the rapid production of IFN- γ in response to bacterial pathogens. **J. Immunol.**, v. 166, p. 1097-1105, 2001.

LEVIN M.; NEWPORT M. Inherited predisposition to mycobacterial infection: historical considerations. **Micr. Infect.**, v. 2, p. 1549-52, 2000.

LIBERMAN, L. A.; HUNTER, C. A. Regulatory pathways involved in the infection-induced production of IFN- γ by NK cells. **Micr. Infect.**, v. 4, p. 1531-8, 2002.

LIMA, G. M. A. C.; VALLOCHI, A. L.; SILVA, U. R.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; KIFFER, M. M. F.; ABRAHAMSON, I. A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. **Immunol. Let.**, v. 64, p. 145-51, 1998.

LIRK, P.; HOFFMANN, G.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 1, p. 89-108, 2002.

LIU, Z. X.; GOVINDARAJAN, S.; OKAMOTO, S.; DENNERT, G. NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T-cell mediated immunity to a viral liver infection. **J. Immunol.**, v. 164, p. 6480-6, 2000.

LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunol. Today**, v. 13, p. 169-72, 1992.

LONG, B. O. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 875-904, 1999.

LOOSE, D. S.; STOVER, E. P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol protein and inhibits a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 7659-63, 1983.

LORENZ, M.; JUNG, S.; RALDBRUCH, A. Switch transcripts in immunoglobulins class switching. **Science**, v. 267, p.1825-8, 1995.

LUCAS, S.; GHILARDI, N.; LI, J.; DE SAUVAGE, F. J. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4⁺ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 100, p. 15047-522003, 2003.

MA, X. TNF- α and IL-12 a balancing act in macrophage functioning. **Microb. Infect.**, v. 3, p. 21-9, 2001.

MAMONI, R. L.; NOUER, A. S. A.; OLIVEIRA, S. A.; MUSATTI, C. C.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med. Micol.**, v. 40, p. 1-7, 2002

MANSOUR, M. K.; LEVITZ, S. M. Interactions of fungi with phagocytes. **Cur. Opin. Microbiol.**, v. 5, p. 359-65, 2002.

MARTINEZ, R.; MOYA, M.J. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. **Rev. Saude Pub.**, v. 26, p. 12-6, 1992.

MATSUMOTO, H.; SUZUKI, K.; TANAKA, E.; AMITANI, R.; MAEDA, A.; YAMAMOTO, K.; SASADA, M. Interleukin-12 gene expression in human monocyte-derived macrophages stimulated with *Mycobacterium bovis* BCGp. cytokine regulation and effect of NK cells. **Infect. Immun.**, v. 65, p.4405-10, 1997.

MATSUNAGA, K.; KLEIN, T. W.; NEWTON, C.; FRIEDMAN, H.; YAMAMOTO, Y. *Legionella pneumophila* suppresses interleukin-12 production by macrophages. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1929-33, 2001.

MATTOS, D. G.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 6534-42, 2003.

MC EWEN, J. G.; SUGAR, A.M.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Toxic effect of products of oxidative metabolism on the yeast form of *P. brasiliensis*. **J. Med. Microbiol.**, v. 18, p. 423-8, 1984.

MC EWEN, J. G.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 36, p. 603-8, 1987.

MCKINNEY, M. M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **J. Immunol. Methods**, 96, p. 271 - 8, 1987.

MEDNICK, A. J.; FELDMESSER M.; RIVERA, J.; CASADEVALL, A. Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 1744-53, 2003.

MELONI-BRUNERI, L. H.; CAMPA, A.; ABDALLA, D. S. P.; CALICH, V. L. G.; LENZI, H.; BURGER, E. Neutrophils oxidative metabolism and killing of *P.brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J. Leuk. Biol.**, v. 59, p. 526-33, 1996.

MENDES-GIANNINI, M. J.; CAMARGO, M. E.; LACAZ, C. S.; FERREIRA, A. W. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 20, p. 103-8, 1984.

MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Granuloma formation and killing functions of granuloma in congenitally athymic nude mice infected with *Blastomyces dermatitides* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathol.**, v. 82, p.129-41, 1983.

MOLINARI-MADLUM, E. E. W. Caracterização da função da IL-12 na paracoccidioidomicose pulmonar. 2002. Tese (Doutorado em Imunologia [Sp-Capital]) - Universidade de São Paulo.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Pathology. Inp.** Paracoccidioidomycosis. Eds. Franco, M.F.; Lacaz, C.S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. Boca Raton, CRC Press, p. 131-50, 1994.

MUCHMORE, H. G.; MCKOWN, B. A.; MOHR, J. A. Effects of the steroid hormones on the proliferation of *Paracoccidioidomycosis brasiliensis* **Bol. Sanit. Pan. Am.**, v. 1, p. 55-60, 1974.

MURPHY, J.W.; BISTONI, F.; DEEPE, G. S.; BLACKSTOCK, R. A.; BUCHANAN, K.; SHMAN, R. B.; ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; FE D'OSTIANI, C.; DEL SERO, G.; CALICH, V. L.; KASHINO, S. S. Type I and Type 2 cytokines p. from basic science to fungal infections. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 109-18, 1998.

NAKAMURA, S.; OTANI, T.; IJIRI, Y.; MOTODA, R.; KURIMOTO, M.; ORITA, K. IFN- γ dependent and independent mechanism in adverse effects caused by concomitant administration of IL-18 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3330-6, 2000.

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 423-74, 2001.

NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J. Interleukin-IL-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice no intermediate role for cytokines of tumor necrosis factor family and interleukin - 1 β . **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 3057-60, 2000.

NOLT, D.; FLYNN, J. Interleukin-12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2976-88, 2004.

OKAMOTO, M.; KATO, S.; OIZUMI, K.; KINOSHIDA, M.; INOUE, Y.; HOSHINO, K.; AKIRA, S.; MACKENZIE, A. N. J.; YOUNG, H. A.; HOSHINO, T. IL-8 in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia. **Blood**, 99, p. 1289-98, 2002.

OPPMANN, B.; LESLEY, R.; TIMANS, J. C.; XU, Y.; HUNTE, B.; VEGA, F.; WANG, J.; SINGH, K.; ZONIN, F.; VAISBERG, E.; CHURAKOVA, T.; LIU, M.; GORMAN, D.; WAGNER, J.; ZURAWSKI, Y.; LIU, Y.; ABRAMS, J. S.; MOORE, K. W.; RENNICK, D.; WAAL-MALEFYT, R.; HANNUN, C.; BAZAN, J. F.; KASTELEIN, R. A. Novel p19 protein engages IL-12 p40 to form a cytokine IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, 13, p. 715-25, 2000.

OTTENHOFF, T. H. M.; BOER, T.; VERHAGEN, C. E.; VERRECK, F. A. W. DISSEL, J. T. Human deficiencies in type 1 cytokine receptors reveal the essential role of type 1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 1559-66, 2000.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, p. 1777-89, 2001.

PINA, A. Efeito da depleção de leucócitos PMN em camundongos resistentes e susceptíveis à paracoccidiodomicose pulmonar. 2002. Dissertação de Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas) - Universidade de São Paulo.

POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cell. Immunol.**, v. 218, p. 87-94, 2002.

PUCCIA, R., v. SCHENKMAN, P. A.; GORIN, P. A.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 199-206, 1986.

QURESHI, M. H.; ZHANG, T.; KOGUCHI, Y.; NAKASHIMA, K.; KAWAKAMI, K. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 643-49, 1999.

REINER, S. L.; SEDER, R. A. T helper cell differentiation in immune response. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, p. 360-6, 1995.

RESTREPO, A; VÉLEZ, H. Effects de la fagocitosis "in vitro" sobre *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouradia**, v. 13, p. 10-21, 1975.

RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E. P.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to *Paracoccidioidomycosis*. **Infect. Immun.**, v. 46, p. 346-53, 1984.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, p. 323-34, 1985.

RESTREPO, A.; McEWEN, J. G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Review. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 233-41, 2001.

RETINI, C.; KOZEL, T. R.; PIETRELLA, D.; MONARI, C.; BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A. Interdependency of interleukin-10 and interleukin-12 in regulation of T-cell differentiation and effector function of monocytes in response to stimulation with *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6064-73, 2001.

ROGGE, L.; SINAGLIA, F. Regulation of IL-12 receptor expression in developing T helper cell subsets. **The Immunol.**, v. 6, p. 142-5, 1998.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; DEL SERO, G.; NICOLETTI, I.; TRINCHIERI, G.; BISTONI, F.; PUCCETTI, P. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. **J. Immunol.**, v. 158, p. 5349-56, 1997.

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

ROMANO, C. C.; MENDES-GIANINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the *in vitro* antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v. 18, p. 149-57, 2002.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 711-3, 1988.

SALLEN, S.; DAI, Z.; COELHO, S. N.; KONIECZNY, B. T.; ASSMAN, K. J. M.; BADDOURA, F. K.; LAKKIS, F. G. IL-4 is an endogenous inhibitor of neutrophil influx and subsequent pathology in acute antibody-mediated inflammation. **J. Immunol.**, v. 160, p. 979-84, 1998.

SAN-BLAS, G.; VERNET, D. Induction of the synthesis of cell wall alpha-1, 3-glucan in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. **Infect Immun.**, v. 15, p. 897-902, 1977.

SAN-BLAS, G.; TRAVASSOS, L. R.; FRIES, B. C.; GOLDMAN, D. L.; CASADEVALL, A.; CARMONA, A. K.; BARROS, T. F.; PUCCIA, R.; HOSTETTER, M. K.; SHANKS, S. G.; COPPING, V. M.; KONX, Y.; GOW, N. A. Fungal morphogenesis and virulence. **Med. Micol.**, v. 38, p. 79-86, 2000.

SANTOS, W. A.; SILVA, B. M.; PASSOS, E. D.; ZANDONADE, E.; FALQUETO, A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, p. 245-53, 2003.

SATOSKAR, A. R.; STAMM, L. M.; ZHANG, X.; OKANO, M.; DAVID, J. R.; TERHOST, C.; WANG, B. NK cell- deficient mice developed a Th1-like response but fail to mount an efficient antigen-specific IgG2a antibody response. **J. Immunol.**, v. 163, p. 5298-5302, 1999.

SCHULTHEIS, R. J.; KEARNS, R. J. *In vivo* administration of anti-asialo-GM₁ antibody enhances splenic clearance of *Listeria monocitogenes*. **Nat. Immun. Cell. Growth Regul.**, v. 9, p. 376-86, 1990.

SHAMS, H.; WIZEL, B.; WEIS, S. E.; SAMTEN, B.; BARNES, P. F. Contribution of CD8⁺ T cells to gamma interferon production in human tuberculosis. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3497-3501, 2001.

SHIBUYA, A. Development and functions of natural killer cells. **Inter. J. Hematol.**, v.78, p. 1-6, 2003.

SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M. C.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; CALICH, V. L. The source of the growth-promoting factor (s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med.Vet. Mycol.**, v. 30, p. 261-4, 1992.

SKEEN, M. J.; RIX, E. P.; FREEMAN, M. M.; ZIEGLER, H. K. Exaggerated proinflammatory and Th1 responses with absence of γ/δ T cells after infection with *Listeria monocitogenes*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 7213-23, 2001.

SNAPPER, C. M.; FINKELMAN, F. D.; PAUL, W. E. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 183-96, 1988.

SNAPPER, C. M.; YAMAGUCHI, H.; MOORMAN, M. A.; SNEED, R.; SMOOT, D.; MOND, J. J. Natural Killer cell induce activated murine B cells to secrete Ig. **J. Immunol.** 10, p. 5251-60, 1993.

SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. A. Interferon- γ and TNF- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Amer. J. of Pathol.**, v. 156, p. 1811-20, 2000.

SOUTO, J. T.; ALIBERTI, J. C.; CAMPANELLI, A. P.; LIVONESE, M. C.; MAFFEI, C. M. L.; FERREIRA, B. R.; TRAVASSOS, L. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, L. R.; SILVA, J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . **Am. J. of Pathol.**, v. 163, p. 583-90, 2003.

SOLFFER, R. J.; MURRAY, C.; PHILLIPS, N.; JACOBSON, D.; CHARTIER, S.; AMBROSINO, D. Recombinant interleukin-2 infusions and decreased IgG2 subclass concentrations. **Blood**, v. 85, p. 925-28, 1995.

STEFANO, G. B.; MAGAZINE, H. I. Nitric oxide autoregulation and its significance. **Mod. Asp. Immunobiol.**, v. 1, p. 182-6, 2001.

STRENGELL, M.; SARENEVA, T.; FOSTER, D.; JULKUNEN, I.; MATIKAINEN, S. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. **J. Immunol.**, v. 169, p. 3600-5, 2002.

STRENGELL, M.; MATIKAINEN, S.; SIRÉN, J.; LEHTONEN, A.; FOSTER, D.; JULKUNEN, I.; SARENEVA, T. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN- γ production in human NK and T cells. **J. Immunol.**, v. 170, p. 5464-9, 2003.

STUYT, R. J. L.; NETEA, M. G.; VERSCHUEREN, I.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C. A.; VAN der MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J. Role of IL-18 in host defense against disseminated *Candida albicans* infection. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 3284-6, 2002.

SUGAWARA, I. Interleukin-18 (IL-18) and infections diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. **Mic. Infect.**, v. 2, p. 1257-63, 2000.

SUGAWARA, I.; YAMADA, H.; MIZUNO, S.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M. Mycobacterial infection in natural killer cell knockout mice. **Tuberculosis**, v. 82, p. 97-115, 2002.

SUTTMAN, H.; LEHAN, N.; BÖHLE, A.; BRANDAU, S. Stimulation of neutrophil granulocytes with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces changes in phenotype and gene expression and inhibits spontaneous apoptosis. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 4647-56, 2003.

TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A. Immunoglobulin M efficacy against *Cryptococcus neoformans* mechanism, dose dependence, and prozone-like effects in passive protection experiments. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2100-07, 2001.

TAKADA, H.; MATSUZAKI, G.; HIROMATSU, K.; NOMOTO, K. Analysis of the role of natural killer cells in *Listeria monocytogenes* infection: relation between natural killer cells and T-cell receptor gamma delta T cells in the host defense mechanism at early stage of infection. **Immunol.** 82, p. 106-12, 1994.

TERRA, G. M. F.; RIOS-GONÇALVES, A. J.; LONDERO, A.T.; BRAGA, M. P.; OURICURI, A. L.; MESQUITA, C. C.; MARINHO, J. C. A.; ERVILHA, L. M.; VIEIRA, A. R. M. - Paracoccidioidomicose em crianças – relato de casos. **Arq. Bras. Med.**, v. 65, p. 8-15, 1991.

THORTON, S.; KUHN, K. A.; FINKELMAN, F. D.; HIRSCH, R. NK cells secrete high levels of IFN- γ in response to in vivo administration of IL-2. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 3355-60, 2001.

TOMINAGA, K.; YOSHIMOTO, T; TORIGOE, K.; KURIMORO, M.; MATSUI, K.; TOSHIKAZU, H.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1 β for IFN- γ production from human T cells. **Intern. Immunol.**, 12, p. 151-60, 2000.

TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, P.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E. G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J. F.; ALMEIDA, I. C. Biochemical and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p. 297-304, 1995.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv.Immunol.**, v. 47, p. 187-376, 1989.

TRINCHIERI, G. Interleukin 12 and its role in the generation of Th1 cells. **Immunol. Today**, v. 14, p. 335-8, 1993.

TRINCHIERI, G., v. SCOTT, P. Interleukin 12 a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. **Res. Immunol.**, v. 146, p. 423-31, 1995.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immun.**, v. 19, p. 641-4, 2003.

VANKAYALAPATI, R.; WIZEL, B.; WEIS, S. E.; SAMTEM, B.; GIRARD, W.M.; BARNES, P.F. Production of interleukin-18 in human tuberculosis. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 234-9, 2000.

VANKAYALAPATI, R.; KLUCAR, P.; WIZEL, B.; WEIS, S. E.; SAMTEN, B.; SAFI, H.; SHAMS, H.; BARNES, P. F. NK cells regulate CD8⁺ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. **J. Immunol.**, v. 172, p. 130-7, 2004.

VAZ, C. A.; MACKENZIE, D. W.; HEARN, V. M.; CAMARGO, Z. P.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 88, p. 119-23, 1992.

VICARI, A. P.; ZLOTNIK, A. Mouse NK1.1⁺ T cell a new family of T cells. **Immunol. Today**, v. 17, p. 71-5, 1996.

VONK, A. G.; WIELAND, C. W.; NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J. Phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by neutrophils and macrophages: a comparison of different microbiological test systems. **J. Microbiol. Meth.**, v. 49, p. 55-62, 2002.

WAGNER, J. M.; FRANCO, M.; KEPHART, G. M.; GLEICH, G. J. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 66-72, 1998.

WANG, M.; ELLISON, C. A.; GARDNER, J. G.; HAYGLASS, K. T. Natural killer cell depletion fails to influence initial CD4 T cell commitment in vivo in exogenous antigen-stimulated cytokine and antibody responses. **J. Immunol.**, v. 160, p. 1098-1105, 1998.

WANG, W.; TANAKA, T.; OKAMURA, H.; SUGITA, M.; HIGA, S.; KISHIMOTO, T.; SUEMURA, M. Interleukin-18 enhances the production of interleukin-8 by eosinophils. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1010-16, 2001.

XIDIEH, C. F.; LENZI, H. L.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 188, p. 41-9, 1999.

YOKOYAMA, W. M.; KIM, S.; FRENCH, A. R. The dynamic life of natural killer cells. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 405-29, 2004.

YOSHIMOTO, T.; OKAMURA, H.; TOGAWA, Y. I.; IWAKURA, Y.; NAKANISHI, K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon γ production from activated B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 3948-53, 1997.

YOSHIMOTO, T.; MIZUTANI, H.; TSUTSUI, H.; NOBEN-TRAUTH, N.; YAMANAKA, K.; TANAKA, M.; OKAMURA, H.; PAUL, W.; NAKANISHI, K. IL-18 induction of IgE: dependence on CD-4⁺ T cells, IL-4 and STAT6. **Nat. Immunol.**, v. 1, p. 132-7, 2000.

ZHANG, T.; KAWAKAMI, K.; QURESHI, M. H.; OKAMURA, H.; KURIMOTO, M.; SAITO, A. Interleukin-12 (IL-18) synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudates cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. *Infect. Immun.*, v. 65, p. 3594-9, 1997.

ANEXOS

RESUMO DOS RESULTADOS DA DEPLEÇÃO DE LEUCÓCITOS PMN

	BALB/c nu/nu IgG	BALB/c nu/nu Anti PMN	BALB/c nu/+ IgG	BALB/c nu/+ Anti PMN
HTT	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02

UFC/gr de tecido

Pulmão	5,8 ± 0,2	5,6 ± 0,3	5,0 ± 0,3	4,8 ± 0,1
Fígado	2,6 ± 0,3	2,7 ± 0,3	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,5
Baço	1,4 ± 0,6	2,4 ± 0,4 *	0,9 ± 0,7	0,9 ± 0,6

Título de anticorpos

Ig total	6,1 ± 0,5	5,7 ± 0,4	6,6 ± 0,7	7,7 ± 0,5
IgM	4,0 ± 1,3	3,6 ± 1,5	4,0 ± 1,3	5,7 ± 0,2
IgA	2,7 ± 0,5	5,5 ± 0,2 **	5,3 ± 0	5,5 ± 0,2
IgG1	5,8 ± 0,3	6,1 ± 0,2	8,8 ± 0,9	10,1 ± 0,7
IgG2a	6,6 ± 0,9	5,5 ± 0,2	4,0 ± 1,3	5,7 ± 0,2
IgG2b	6,8 ± 0,3	6,3 ± 0	6,6 ± 1,2	6,9 ± 0,4
IgG3	6,3 ± 0,4	6,5 ± 0,2	4,4 ± 1,4	5,7 ± 0,2

Determinação das citocinas no sobrenadante de pulmão

IL-2	2184 ± 113	1935 ± 157	3050 ± 223	2306 ± 205 ↓*
IL-3	274 ± 31	349 ± 45	227 ± 12	295 ± 24 ↑*
IL-4	936 ± 91	971 ± 288	1786 ± 210	1876 ± 226
IL-5	236 ± 38	88 ± 28 ↓*	2465 ± 274	96 ± 55 ↓***
IL-10	a.l.d.	a.l.d.	a.l.d.	a.l.d.
IL-12	492 ± 48	328 ± 32 ↓*	483 ± 19	468 ± 50
IFN-γ	1892 ± 212	1323 ± 132	896 ± 55	1197 ± 137

Concentração de NO no homogenato pulmonar

[] de NO	25,1 ± 61	20,2 ± 4,2	30,7 ± 2,7	27,5 ± 8,4
-----------	-----------	------------	------------	------------

RESUMO DOS RESULTADOS DA NEUTRALIZAÇÃO DE IL-12

	BALB/c nu/nu IgG	BALB/c nu/nu Anti IL-12	BALB/c nu/+ IgG	BALB/c nu/+ Anti IL-12
HTT	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,08

UFC/g de tecido

Pulmão	5,7 ± 0,3	5,9 ± 0,1	5,5 ± 0,3	5,9 ± 0,1 *
Fígado	1,6 ± 0,7	3,4 ± 0,5**	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,3
Baço	1,1 ± 0,5	2,4 ± 0,6 *	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,4 *

Título de anticorpos

Ig total	5,3 ± 0	5,5 ± 0	7,3 ± 0,3	9,1 ± 0,5 *
IgM	5,9 ± 0,4	6,1 ± 0,5	6,3 ± 0,4	6,1 ± 0,2
IgA	5,3 ± 0	5,3 ± 0	5,7 ± 0,4	7,3 ± 0 **
IgG1	5,3 ± 0	6,5 ± 1,0	6,1 ± 0,5	8,1 ± 0,4*
IgG2a	4,5 ± 1,6	7,1 ± 0,5	6,7 ± 0,4	9,3 ± 0,8*
IgG2b	5,6 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,7 ± 0,4	8,6 ± 0,2 ***
IgG3	5,3 ± 0	6,9 ± 0,5 *	6,1 ± 0,4	7,3 ± 0,4

Quantificação de IgE

IgE (pg/mL)	77 ± 15	81 ± 19	45 ± 7	74 ± 4 ↑**
-------------	---------	---------	--------	------------

Determinação das citocinas no sobrenadante de pulmão

IL-2	1707 ± 135	1271 ± 228	1129 ± 94	1550 ± 38↑**
IL-3	148 ± 10	134 ± 7 ↓*	135 ± 12	171 ± 26
IL-4	346 ± 34	260 ± 38	192 ± 33	142 ± 33
IL-5	165 ± 14	113 ± 3 ↓*	108 ± 10	139 ± 17
IL-10	a.l.d.	282 ± 163 ↑*	441 ± 63	a.l.d. ↓***
IL-12	428 ± 47	483 ± 50	263 ± 15	347 ± 20↑*
IFN-γ	1983 ± 164	997 ± 87 ↓**	981 ± 120	1573 ± 185↑*

	BALB/c nu/nu IgG	BALB/c nu/nu Anti IL-12	BALB/c nu/+ IgG	BALB/c nu/+ Anti IL-12
--	---------------------	----------------------------	--------------------	---------------------------

Determinação das citocinas no sobrenadante de fígado

IL-2	810 ± 180	1512 ± 212 *↑	226295 ± 25379	155321 ± 25987
IL-3	19 ± 9	42 ± 27	979 ± 159	1920 ± 301 *↑
IL-12	185 ± 65	395 ± 95	3850 ± 462	2954 ± 791
IFN-γ	36358 ± 8759	17381 ± 535	191231 ± 22968	121204 ± 24966
IL-4	35 ± 17	54 ± 22	692 ± 123	1097 ± 143
IL-5	163 ± 38	246 ± 82	2512 ± 368	10136 ± 1162 ***↑
IL-10	137 ± 71	839 ± 136 **↑	11166 ± 1026	8414 ± 1012

Determinação das citocinas no sobrenadante de baço

IL-2	25 ± 11	38 ± 14	15658 ± 1359	8631 ± 2751
IL-3	16 ± 10	98 ± 49	318 ± 38	237 ± 23
IL-12	159 ± 16	145 ± 62	1081 ± 322	1470 ± 88
IFN-γ	267 ± 29	61 ± 18 **↓	4616 ± 221	3607 ± 587
IL-4	42 ± 14	54 ± 8	62 ± 47	23 ± 19
IL-5	75 ± 28	97 ± 23	333 ± 62	248 ± 78
IL-10	164 ± 42	236 ± 34	1232 ± 899	964 ± 420

Quantificação de IL-18 (pg/mL)

Pulmão	3374 ± 353	2118 ± 339 ↓*	1091 ± 437	1889 ± 335
Fígado	104207 ± 18495	152745 ± 23931	116733 ± 7839	87518 ± 20463
Baço	5221 ± 806	7691 ± 1183	5293 ± 377	12057 ± 1008 ↑***

	BALB/c nu/nu IgG	BALB/c nu/nu Anti IL-12	BALB/c nu/+ IgG	BALB/c nu/+ Anti IL-12
Análise por Citometria de Fluxo das células presentes no baço				
CD3	0,8 ± 0,2	1,2 ± 0,3	6,4 ± 2,2	4,8 ± 0,6
B	7,0 ± 2,0	13,5 ± 0,4 ↑*	13,2 ± 4,3	8,3 ± 1,1
CD11c	1,2 ± 0,7	0,9 ± 0,3	7,5 ± 2,6	5,7 ± 0,8
Tγδ	1,7 ± 0,5	1,7 ± 0,8	7,8 ± 4,4	6,2 ± 1,1
Análise por Citometria de Fluxo das células presentes no LBA				
CD3	0,02 ± 0,003	0,6 ± 0,1 ↑***	0,6 ± 0,1	2,3 ± 0,7 ↑*
B	0,04 ± 0,006	0,8 ± 0,1 ↑***	0,5 ± 0,1	2,5 ± 0,7 ↑*
CD11c	0,01 ± 0,002	0,4 ± 0,1 ↑***	0,5 ± 0,1	1,3 ± 0,4
Tγδ	0,01 ± 0,001	0,7 ± 0,1 ↑***	0,4 ± 0,05	1,4 ± 0,4 ↑*
Concentração de NO no homogenato pulmonar				
[] de NO	31,7 ± 2,3	44,8 ± 3,1 **	43,2 ± 2,6	40,2 ± 3,1

RESUMO DOS RESULTADOS DA NEUTRALIZAÇÃO DE IFN- γ

	BALB/c nu/nu IgG	BALB/c nu/nu Anti-IFN γ	BALB/c nu/+ IgG	BALB/c nu/+ Anti-IFN γ
HTT	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02 *

UFC/g de tecido

Pulmão	5,7 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,3**	4,9 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,3 ***
Fígado	2,0 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,4**	0,8 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,8 *
Baço	1,2 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,7***	1,3 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,4

Título de anticorpos

Ig total	6,3 $\pm$ 0,6	8,3 $\pm$ 0,3 *	7,1 $\pm$ 0,6	7,8 $\pm$ 0,3
IgM	7,5 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,2	5,9 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 0,2
IgA	2,1 $\pm$ 1,3	6,1 $\pm$ 0,5 **	5,3 $\pm$ 0	6,8 $\pm$ 0,5 *
IgG1	2,5 $\pm$ 1,6	2,1 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 2,1	8,7 $\pm$ 0,2
IgG2a	2,1 $\pm$ 1,3	1,8 $\pm$ 0,5	5,3 $\pm$ 0	7,6 $\pm$ 1,0
IgG2b	2,1 $\pm$ 1,3	2,7 $\pm$ 1,5	5,3 $\pm$ 0	5,3 $\pm$ 0
IgG3	3,6 $\pm$ 1,5	5,6 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0	6,1 $\pm$ 0,7

Determinação das citocinas no sobrenadante de pulmão

IL-2	1707 $\pm$ 36	1327 $\pm$ 98* $\downarrow$	1125 $\pm$ 94	1576 $\pm$ 99 * $\uparrow$
IL-3	148 $\pm$ 10	147 $\pm$ 4	135 $\pm$ 12	173 $\pm$ 13
IL-4	346 $\pm$ 34	265 $\pm$ 26	192 $\pm$ 33	361 $\pm$ 72
IL-5	165 $\pm$ 14	147 $\pm$ 6	108 $\pm$ 10	136 $\pm$ 5
IL-10	a.l.d.	a.l.d.	441 $\pm$ 133	a.l.d. * $\downarrow$
IL-12	428 $\pm$ 47	278 $\pm$ 18* $\downarrow$	263 $\pm$ 15	271 $\pm$ 23
IFN- γ	1983 $\pm$ 164	1433 $\pm$ 99* $\downarrow$	981 $\pm$ 149	1698 $\pm$ 73*** $\uparrow$

	BALB/c nu/nu IgG	BALB/c nu/nu Anti-IFN γ	BALB/c nu/+ IgG	BALB/c nu/+ Anti-IFN γ
--	---------------------	-----------------------------------	--------------------	----------------------------------

Determinação das citocinas no sobrenadante de fígado

IL-2	810 ± 180	932 ± 187	226295 ± 25379	183617 ± 0321
IL-3	19 ± 9	49 ± 32	979 ± 159	836 ± 195
IL-12	185 ± 65	215 ± 38	3850 ± 462	4569 ± 627
IFN- γ	36358± 8759	7956 ± 732 *↓	191231 ± 22968	171204 ± 4966
IL-4	35 ± 17	43 ± 12	692 ± 123	1284 ± 233
IL-5	163 ± 38	140 ± 62	2512 ± 368	4136 ± 956
IL-10	137 ± 71	317 ± 56	11166 ± 1026	12568 ± 813

Determinação das citocinas no sobrenadante de baço

IL-2	25 ± 11	22 ± 13	15658 ± 1359	11731 ±4624
IL-3	16 ± 10	67 ± 22	318 ± 38	397±63
IL-12	159 ± 16	189 ± 54	1081± 322	985±72
IFN- γ	267 ± 29	163 ± 45	4616 ± 221	5212±367
IL-4	42 ± 14	a.l.d.*↓	62 ± 47	267±24 *↑
IL-5	75 ± 28	102 ± 32	333 ± 62	487±48
IL-10	164 ± 42	195 ± 27	1232 ± 899	1604±520

Quantificação de IL-18 (pg/mL)

Pulmão	3374 ± 353	2118 ± 339 ↓*	1091 ± 437	1889 ± 335
Fígado	104207 ± 18495	152745 ± 23931	116733 ± 7839	87518 ± 20463
Baço	5221 ± 806	7691 ± 1183	5293 ± 377	12057 ± 1008 ↑***

	BALB/c nu/nu IgG	BALB/c nu/nu Anti IFN- γ	BALB/c nu/+ IgG	BALB/c nu/+ Anti IFN- γ
Análise por Citometria de Fluxo das células presentes no baço				
CD3	1,0 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,1	6,4 $\pm$ 2,2	6,2 $\pm$ 1,2
B	7,0 $\pm$ 1,7	13 $\pm$ 1,5 * $\uparrow$	13,2 $\pm$ 4,3	14,4 $\pm$ 1,6
CD11c	1,2 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 2,6	5,7 $\pm$ 3,0
T$\gamma$$\delta$	1,6 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 0,8 * $\uparrow$	8,0 $\pm$ 4,4	20,9 $\pm$ 5,0 * $\uparrow$
Análise por Citometria de Fluxo das células presentes no LBA				
CD3	0,02 $\pm$ 0,003	0,2 $\pm$ 0,02 $\uparrow$ ***	0,6 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,7 $\downarrow$ *
B	0,04 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,04 $\uparrow$ ***	0,5 $\pm$ 0,07	2,5 $\pm$ 0,7 $\downarrow$ *
CD11c	0,01 $\pm$ 0,002	0,4 $\pm$ 0,03 $\uparrow$ ***	0,5 $\pm$ 0,06	1,3 $\pm$ 0,4
T$\gamma$$\delta$	0,01 $\pm$ 0,001	0,2 $\pm$ 0,02 $\uparrow$ ***	0,4 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,02 $\downarrow$ *
Concentração de NO no homogenato pulmonar				
[] de NO	31,7 $\pm$ 2,3	45,3 $\pm$ 0,9***	43,2 $\pm$ 2,6	46,6 $\pm$ 1,6

RESUMO DOS RESULTADOS DA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS NK

	BALB/c nu/hu	BALB/c nu/hu	BALB/c nu/+	BALB/c nu/+
	IgG	Anti-NK	IgG	Anti-NK
HTT	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,1 ± 0,01

UFC/g de tecido

Pulmão	6,2 ± 0,1	6,5 ± 0,1*	5,2 ± 0,1	5,6 ± 0,1 *
Fígado	2,7 ± 0,1	3,2 ± 0,1**	0,6 ± 0,4	0,2 ± 0,2
Baço	2,5 ± 0,1	3,3 ± 0,1***	0,5 ± 0,5	0,4 ± 0,4

Título de anticorpos

Ig total	7,3 ± 0,4	9,0 ± 0,2**	5,3 ± 0	5,3 ± 0
IgM	5,8 ± 0,3	9,1 ± 0,2***	5,3 ± 0	3,7 ± 1,2
IgA	2,6 ± 1,5	3,7 ± 1,1	6,1 ± 0,2	6,5 ± 0,5
IgG1	5,3 ± 0	6,9 ± 0,2***	4,2 ± 1,4	4,8 ± 1,0
IgG2a	5,3 ± 0	5,8 ± 0,2	1,3 ± 1,3	3,0 ± 1,4
IgG2b	4,0 ± 1,3	7,1 ± 0,3*	6,6 ± 1,2	6,9 ± 0,4
IgG3	5,6 ± 0,2	6,0 ± 0,4	1,3 ± 1,3	1,8 ± 1,1

Quantificação de IgE

IgE (pg/mL)	68 ± 20	50 ± 18	76 ± 10	99 ± 9
-------------	---------	---------	---------	--------

Determinação das citocinas no sobrenadante de pulmão

IL-2	2526 ± 246	2031 ± 113	2118 ± 309	1743 ± 153
IL-3	175 ± 36	222 ± 53	263 ± 39	231 ± 79
IL-4	134 ± 32	105 ± 19	120 ± 34	a.l.d. ↓*
IL-5	8032 ± 520	3280 ± 157 ↓***	2732 ± 311	2690 ± 333
IL-10	37 ± 21	186 ± 41 ↑*	213 ± 11	140 ± 32
IL-12	337 ± 107	114 ± 52	108 ± 15	13459 ± 942 ↑***
IFN-γ	8489 ± 590	9348 ± 716	10264 ± 1550	7241 ± 1013

	BALB/c nu/nu IgG	BALB/c nu/nu Anti-NK	BALB/c nu/+ IgG	BALB/c nu/+ Anti-NK
--	---------------------	-------------------------	--------------------	------------------------

Determinação das citocinas no sobrenadante de fígado

IL-2	1590 ± 590	1494 ± 641	426295 ± 8499	225321 ± 26880 ↓***
IL-3	a.l.d.	37 ± 37	3720 ± 459	2279 ± 180 ↓*
IL-12	92 ± 92	329 ± 113	6050 ± 642	5754 ± 832
IFN-γ	69410 ± 8998	3544 ± 2535	251622 ± 24766	201280 ± 28188
IL-4	15 ± 15	44 ± 17	1378 ± 141	1276 ± 150
IL-5	92 ± 92	274 ± 147	11512 ± 3622	10156 ± 1298
IL-10	243 ± 238	975 ± 450 ↑*	13192 ± 1115	9102 ± 1003 ↓ *

Determinação das citocinas no sobrenadante de baço

IL-2	a.l.d.	a.l.d.	35258 ± 20360	2751 ± 2551
IL-3	a.l.d.	133 ± 133 ↑ *	238 ± 138	23 ± 23 ↓*
IL-12	16 ± 16	269 ± 156	981 ± 322	180 ± 88 ↓*
IFN-γ	a.l.d.	a.l.d.	19306 ± 7221	607 ± 587 ↓*
IL-4	44 ± 44	24 ± 8	175 ± 47	26 ± 19 ↓*
IL-5	a.l.d.	111 ± 41 ↑*	1633 ± 802	478 ± 288
IL-10	4,3 ± 4,3	406 ± 104 ↑*	2402 ± 899	821 ± 420

Quantificação de IL-18 (pg/mL)

Pulmão	5456 ± 1004	2183 ± 1001 ↓*	4048 ± 243	4707 ± 616
Fígado	5523 ± 5523	1796 ± 1796	219493 ± 12466	126868 ± 528 ↓**
Baço	9753 ± 7438	2226 ± 1194	24510 ± 6049	3001 ± 2132 ↓*

Concentração de NO no homogenato pulmonar

[] de NO	18,9 ± 1,4	11,2 ± 2,1* ↓	34,6 ± 1,9	28,7 ± 2,2
-----------	------------	---------------	------------	------------