UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Caracterização da Função das Células TCD4⁺ e TCD8⁺ na
Paracoccidioidomicose Pulmonar de Camundongos Isogênicos**

Andressa de Paiva Chiarella

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientador:

Profa. Dra. Vera Lucia Garcia Calich

São Paulo
2003

Andressa de Paiva Chiarella

Caracterização da Função das Células TCD4⁺ e TCD8⁺ na Paracoccidioidomicose
Pulmonar de Camundongos Isogênicos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Vera Lucia Garcia Calich
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo,

de 2003

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de
Imunopatologia das Micoses do Departamento de
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro
da Fundação de Amparo à Pesquisa **(FAPESP)**.

*“É impossível para um homem aprender aquilo
que ele acha que já sabe”*

*À Deus por mais uma
conquista na minha vida*

*Obrigada **Pai e Mãe** por me darem o alicerce para que
hoje eu conseguisse alçar vôos cada vez mais altos*

*Obrigada **Eduardo e Daniel**, por cada gesto de carinho
e toda convivência ao longo desses anos*

*Obrigada **Stéfano e Giorgia**, por cada sorriso que me deram*

*Agradeço com todo o meu amor ao **Luiz**, pessoa esta presente em
grandes momentos da minha vida, que me apoiou e meu deu todo
o seu amor e carinho ao longo da minha jornada.*

Aos meus tios “Nico” e Maria por todo carinho

e apoio em momentos tão difíceis.

Agradeço de coração

*Agradeço à Dra Vera Calich por ter me aberto caminhos,
graças a sua orientação e ensinamentos indispensáveis
hoje na minha vida*

*Às minhas amigas, Rita e Adriana, por terem
compartilhado cada passo deste caminho.
Obrigada pelo carinho e apoio*

*Agradeço à Tânia e a Marlene, por todo o
suporte dado para a realização deste trabalho.
Sem elas tudo seria mais difícil*

*Agradeço à Fátima pelo apoio e
por compreender cada ausência*

Sumário

Abreviaturas

Resumo

Introdução	1
Objetivos	14
Material e Métodos	
1. Produção e Purificação dos Anticorpos Monoclonais	15
1.1 Hibridomas	15
1.2 Expansão dos Hibridomas <i>in vitro</i>	15
1.3 Expansão dos hibridomas <i>in vivo</i>	16
1.4 Precipitação dos anticorpos monoclonais	16
1.5 Dosagem de proteínas	17
1.6 Análise do grau de pureza das amostras por SDS-PAGE	17
1.7 Purificação de γ globulina de rato	18
2. Animais	18
3. Depleção de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺	18
4. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas do baço	19
4.1 Obtenção das células e marcação celular	19
4.2 Análise por citometria de fluxo	20
5. Fungo	20

5.1 Preparação do inoculo-----	21
5.2 Determinação da viabilidade das leveduras-----	21
5.3 Infecção intratraqueal-----	21
6. Avaliação do grau de infecção-----	22
7. Produção do antígeno de Fava Netto-----	22
8. Avaliação da resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio---	23
9. Caracterização isotípica dos anticorpos anti-<i>P. brasiliensis</i>---	23
10. Caracterização das citocinas pulmonares: ELISA para quantificação de IFN-γ, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e GM-CSF-----	25
11. Análise Estatística-----	28

Resultados

1. Produção e Purificação do anticorpo monoclonal GK1.5 e H-35-----	29
2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas do baço-----	29
3. Avaliação do grau de infecção-----	36
4. Avaliação da Resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio---	44
5. Caracterização isotípica dos anticorpos anti-<i>P. brasiliensis</i>----	48
5.1 Efeito da depleção de linfócitos TCD4 ⁺ na produção de anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i> -----	48
5.2 Efeito da depleção de linfócitos TCD8 ⁺ na produção de anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i> -----	52
6. Caracterização das citocinas pulmonares-----	55
6.1 Efeito da depleção de linfócitos TCD4 ⁺ na produção das citocinas pulmonares-----	55
6.1.1 Níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 pulmonar-----	55
6.1.2 Níveis de IL-12, IFN- γ e IL-2 pulmonar-----	56
6.1.3 Níveis de IL-3 e GM-CSF pulmonar-----	57

6.2 Efeito da depleção de linfócitos TCD8 ⁺ na produção das citocinas pulmonares-----	61
6.2.1 Níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 pulmonar-----	61
6.2.2 Níveis de IL-12, IFN- γ e IL-2 pulmonar-----	62
6.2.3 Níveis de IL-3 e GM-CSF pulmonar-----	62
 Tabela Geral de Resultados -----	 66
 Discussão-----	 68
 Proposta sobre a atividade de TCD4⁺ e TCD8⁺ em B10.A e A/J -----	 85
 Conclusões-----	 87
 Referências Bibliográficas-----	 89
 Anexo	

Abreviaturas

AcM	Anticorpo Monoclonal
AgFN	Antígeno de Fava Netto
ANOVA	Análise de Variância
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BCA	Ácido Bicinconínico
BHI	Infusão de Cérebro e Coração
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade Óptica
D.P.	Desvio Padrão
E₂	17-β-Estradiol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
E.P.	Erro Padrão
FACS	Análise por Citometria de Fluxo
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GK1.5	Anticorpo Monoclonal anti-CD4 ⁺
GM-CSF	Fator estimulador de Crescimento para Monócitos e Granulócitos
gp	Glicoproteína
H-35	Anticorpo Monoclonal anti-CD8 ⁺
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HTT	Hipersensibilidade do Tipo Tardio

i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratraqueal
IFN-γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
L	Fase Leveduriforme (Levedura)
M	Fase Miceliana (micélio)
n	Tamanho da Amostra
NK	“Natural Killer”
OPD	Ortofenilenodiamina
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfatos
PCM	Paracoccidioidomicose
PCM-d	Paracoccidioidomicose Doença
PCM-i	Paracoccidioidomicose Infecção
PE	Ficoeritrina
PMN	Leucócito Polimorfonuclear Neutrófilo
PR	Porcentagem de Redução

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	Soro Fetal Bovino
SPF	"Specific Patogens Free"
TCB	Tampão Carbonato-Bicarbonato
TGF-β	Fator Transformador do Crescimento-beta
Th₁	T <i>helper</i> 1 (T auxiliar 1)
Th₂	T <i>helper</i> 2 (T auxiliar 2)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

Resumo

Para investigar o papel dos linfócitos T no modelo de Paracoccidioidomicose pulmonar, depletamos *in vivo* os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de camundongos resistentes (A/J) e susceptíveis (B10.A) infectados intratraquealmente com um milhão de leveduras de isolado virulento do *Paracoccidioides brasiliensis*. Quando comparados ao grupo não depletado de linfócitos TCD4⁺, após 4 semanas de infecção, camundongos A/J apresentaram aumento da disseminação de leveduras ao fígado; na 8ª semana, contudo, houve redução na carga fúngica pulmonar destes animais. Ao contrário, a depleção de células TCD4⁺ não alterou a gravidade da doença de animais B10.A em ambos os períodos de infecção. O tratamento com o AcM anti-CD4, em ambos os tempos de infecção, diminuiu as reações de HTT dos animais A/J, mas não alterou a anergia cutânea dos camundongos B10.A. Em adição, ambas as linhagens depletadas tiveram a produção específica de anticorpos diminuída na 4ª e 8ª semanas. Quanto às citocinas pulmonares, após 4 semanas de infecção, os animais A/J depletados apresentaram redução nos níveis de IL-12 pulmonar e na 8ª semana da infecção, esta linhagem apresentou redução nos níveis de IL-10, IL-4, IL-5, IL-2 e GM-CSF pulmonar, e os animais B10.A mostraram aumento nos níveis de IL-12. Por outro lado, verificamos que ambas as linhagens depletadas com o AcM anti-CD8, apresentaram aumento da gravidade da doença após 8 semanas de infecção, pois camundongos A/J tratados apresentaram aumento da carga fúngica pulmonar, e animais B10.A apresentaram aumento do crescimento fúngico no pulmão e fígado. Animais B10.A depletados de células TCD8⁺ apresentaram

ainda um incremento nas suas reações de HTT específicas. Esses dados sugerem que na linhagem susceptível há a presença de duas subpopulações celulares de TCD8⁺, uma subpopulação protetora que controla o crescimento fúngico e outra inibidora de reações de HTT. A depleção dos linfócitos TCD8⁺ não levou a grandes alterações na produção de anticorpos específicos em ambas as linhagens; no entanto, levou a alterações significativas nos níveis das citocinas pulmonares; os animais A/J apresentaram aumento de IL-4, IL-12, IL-3 e GM-CSF, e diminuição de IL-2. Por outro lado, os animais B10.A apresentaram aumento nos níveis de IL-10, IL-12, IL-3 e IFN- γ . Estes resultados demonstraram que nos animais B10.A as células TCD4⁺ têm pouca ou nenhuma participação no controle da infecção. No entanto, nos animais A/J há duas subpopulações, uma protetora (4^a semana) e outra exacerbadora (8^a semana) dependendo do estágio da doença. Contudo, em ambas as linhagens a subpopulação TCD8⁺ apresentou-se importante no controle da doença. Além disso, na PCM experimental, tanto as respostas de HTT como a produção de anticorpos específicos, são mecanismos que dependem de células TCD4⁺ e na linhagem B10.A há uma subpopulação TCD8⁺ que regula negativamente as reações de HTT.

Palavras-chaves: Paracoccidioidomicose, depleção, TCD4⁺, TCD8⁺.

Abstract

To investigate the role of T lymphocytes in the pulmonary model of Paracoccidioidomycosis (PCM), resistant and susceptible mice were in vivo depleted of T CD4⁺ and T CD8⁺ cells by intraperitoneal injection of specific monoclonal (mAb) antibodies and infected intratracheally with one million yeast cells of a virulent isolate of *Paracoccidioides brasiliensis*. When compared with the non-depleted group, at week 4 after infection A/J mice presented increased dissemination of yeasts to liver; however, at week 8 A/J-depleted mice showed decreased fungal loads in the lungs. In contrast, depletion of TCD4⁺ cells of B10.A mice did not alter the severity of disease at any periods of infection assayed. Treatment with anti-CD4 mAb diminished the delayed-type hypersensitivity reactions (DTH) of resistant mice but the cutaneous anergy of B10.A mice was not modified. In addition, CD4-depleted A/Sn and B10.A mice presented decreased titers of *P.brasiliensis* specific antibodies at both the 4th and 8th week postinfection. Regarding pulmonary cytokines, at week 4 of infection A/J-depleted mice presented diminished levels of IL-12 but at week 8 IL-10, IL-4, IL-5, IL-2 and GM-CSF appeared in lower levels. Only IL-12 was detected in lower levels in the lungs of B10.A-depleted mice at week 8 after infection. Depletion of CD8⁺ cells led to a more severe disease in both mouse strains. A/J-treated mice presented increased fungal burdens in the lungs whereas in the B10.A strain increased number of yeast cells was detected in the lungs and liver. Importantly, neutralization of CD8⁺ cells reverted the DTH anergy of susceptible mice. These data suggest the existence of two T CD8⁺ subpopulations in B10.A mice, a protective that controls fungal growth and another one that suppresses DTH reactions. The production of *P.brasiliensis* specific antibodies by resistant and susceptible mice depleted of CD8⁺ T cells was similar to that of mice given control antibody. Neutralization of CD8⁺ cells, however, induced significant alterations in the concentrations of pulmonary

cytokines. In A/J-treated mice, higher levels of IL-4, IL-12, IL-3 and GM-CSF were concomitant with reduced amounts of IL-2. B10.A mice depleted of CD8⁺ cells presented higher levels of pulmonary IL-10, IL-12, IL-3 and IFN- γ than their controls. As a whole, our results demonstrate that CD4⁺ T cells have no influence on the control of disease severity of B10.A mice. Depending on the period of the infection, A/J mice develop two subpopulations of CD4⁺ T cells: one protective subset which appeared early in the infection, followed by a subpopulation that lead to disease exacerbation. Moreover, in both mouse strains CD8⁺ T cells are protective and able to control fungal growth. It was also verified that DTH reactions and antibody production in murine PCM are CD4⁺ T cells mediated. Finally, only in B10.A mice a regulatory CD8⁺ T cell subpopulation was characterized by its ability to suppress DTH reactions.

Key Words: Paracoccidioidomycosis, depletion, TCD4⁺, TCD8⁺.

Introdução

Caracterização da Função das Células TCD4⁺ e TCD8⁺ na Paracoccidioidomicose Pulmonar de Camundongos Isogênicos

Introdução

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica, restrita geograficamente à América Latina, sendo seu agente etiológico o fungo dimórfico térmico *Paracoccidioides brasiliensis* (Restrepo, A., 1985).

O *P. brasiliensis* exibe a forma de levedura (L) na vida parasitária ou quando cultivado a 37°C e forma micelial (M) à temperatura ambiente. A partir das características ecológicas das áreas endêmicas e de dados laboratoriais, infere-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, A.; 1985).

O habitat natural do agente etiológico é exógeno ao homem, no entanto, ainda permanece desconhecido (Restrepo, A.; 1985). O fungo foi isolado de fezes de pingüim (Garcia et al, 1993), de ração de cachorro (Ferreira et al., 1990), de vísceras de tatu (Vidal et al, 1995; Bagagli et al, 1998; Silva–Vergara

et al.,2000) e de solo (Albornoz,M. C. B., 1971; Silva-Vergara et al., 1998), porém acredita-se que o solo seja a fonte natural de esporos do fungo.

Há evidências experimentais sugerindo que o fungo penetra no hospedeiro pelas vias aéreas superiores através da inalação de conídios, os quais seriam suas formas infectantes. McEWEN et al. infectaram, pela via inalatória, camundongos BALB/c com conídios. Estes pequenos propágulos (com um tamanho de aproximadamente 4 μm) alcançaram porções distais do pulmão, produzindo infecção pulmonar em praticamente todos os animais. Nos animais assim infectados, 12 horas após a inalação, os conídios presentes nos alvéolos transformaram-se rapidamente em células leveduriformes, condição necessária para a instalação da infecção. Estas formas cresceram então no parênquima pulmonar, produzindo uma doença progressiva que posteriormente disseminou-se para outros órgãos (McEwen et al; 1987). Este fato é de especial relevância, uma vez que os conídios têm sido postulados como uma provável forma infectante do fungo.

A doença clínica é mais comum em homens adultos, com uma razão homem/mulher de 13:1 em algumas áreas onde ela é endêmica (Brummer, E. et al., 1993; Restrepo, A., 1994; Wanke, B. et al., 1994), apesar do contato com o fungo ser essencialmente o mesmo para ambos os sexos (Franco, 1987). Devido a este fato, começou-se a pesquisar possíveis interações do fungo com hormônio esteróides e as alterações que tais fenômenos poderiam produzir nas respostas funcionais do fungo. Os estudos revelaram a existência de uma proteína receptora para o 17- β estradiol (E_2) localizada na porção citosólica do fungo (Loose et al., 1983). O E_2 , em concentrações próximas às fisiológicas, bloqueia a transição da forma M para L (Restrepo et al., 1984 (a)), assim como de conídio à forma L (Salazar et al., 1988). Demonstrou-se também que o E_2 altera a expressão de proteínas específicas do dimorfismo durante a transição à

fase L (Clemons et al., 1989). Aristizabal et al (1998) infectaram intranasalmente camundongos machos e fêmeas da linhagem BALB/c com conídios do fungo, e verificaram que em camundongos machos a transição de conídios nos fluídos do lavado broncoalveolar, para as formas intermediárias e leveduriformes ocorrem após 24 a 96 horas. No entanto, em camundongos fêmeas esta transição não ocorre até 96 horas pós-infecção. Este evento *in vivo* é consistente com as observações epidemiológicas e *in vitro*, sugerindo que os hormônios femininos bloqueiam a transição de conídio à levedura e são responsáveis, ao menos parcialmente, pela resistência.

Pouco se sabe sobre os fatores de virulência do *P. brasiliensis*. A virulência do isolado influencia a relação entre parasito-hospedeiro como foi demonstrada pelas diferenças na formação de granuloma e nos órgãos envolvidos na infecção experimental induzida por cada isolado (Zaccharias et al., 1986; Singer-Vermes et al.; 1989; Franco, M. et al., 1993).

Proteinases produzidas por certos fungos patogênicos em humanos têm sido reconhecidas como importantes fatores de virulência. O *P. brasiliensis* sintetiza diversas proteinases capazes de hidrolisar caseínas, colágenos, podendo, então, ter um papel na invasão nos tecidos do hospedeiro (Mendes-Giannini et al., 1990), e como constatado por de Assis C. M. et al. (1999), 20 isolados diferentes do fungo foram capazes de produzir proteinases e fosfolipases, porém houve uma variabilidade na produção de enzimas entre os diferentes isolados de *P. brasiliensis*.

As formas clínicas da PCM são diversas, com graus variáveis de manifestações, dificultando assim, sua sistematização. Dentre as classificações propostas, a mais aceita é a divisão da paracoccidioidomicose em PCM-infecção e PCM-doença.

A forma regressiva, também denominada PCM-infecção, tem sido detectada somente em indivíduos que apresentam positividade em testes

cutâneos. Esta se caracteriza por apresentar manifestações clínicas brandas e pequenas alterações pulmonares. É uma forma assintomática que afeta indivíduos de ambos os sexos que residem ou residiram em zonas endêmicas e que apresentam integridade da imunidade celular e fortes reações intradérmicas (Franco et al., 1989; Mendes, R.P., 1994).

Em algumas situações as formas assintomáticas podem sair de seu estado quiescente, reativar-se e disseminar. Assim, naqueles raros casos em que a infecção inicial progride, tem-se a PCM-doença que pode se apresentar sob a forma aguda ou sub-aguda (tipo juvenil) e crônica (tipo adulto).

A forma aguda é mais grave e acomete, predominantemente, indivíduos jovens de ambos os sexos, apresenta progressão rápida por propagar-se pela via linfohematogênica e leva a intensa disseminação e comprometimento do sistema monocítico-macrofágico (hipertrofia do baço, fígado, linfonodos e alterações da medula óssea). Os pacientes apresentam elevados títulos de anticorpos e depressão da resposta imune celular (Franco et al., 1989).

A forma crônica acomete com maior frequência adultos do sexo masculino; esta forma tem curso lento e pode demorar meses ou anos para se estabelecer. Esta resulta também de reativação, anos mais tarde, de focos quiescentes da infecção inicial, comprometendo principalmente a mucosa do sistema respiratório. O processo inicia-se no complexo primário (pulmão) podendo manter-se localizado a este órgão (forma unifocal) ou progredir lentamente para outros órgãos (forma multifocal). A resposta humoral mostra-se ativada em graus variáveis, em contraste à resposta imune celular que se apresenta preservada para a forma unifocal e deprimida para a forma multifocal (Franco et al., 1989).

Do ponto de vista da resposta imunológica, os pacientes paracoccidioidomicóticos têm sido classificados em duas formas polares: 1) um pólo hiperérgico, que se apresenta como uma forma benigna da doença, onde a

infecção do fungo é localizada, o hospedeiro apresenta resposta imune celular preservada e os achados histopatológicos mostram a formação de granulomas epitelióides compactos contendo poucos fungos e, 2) um pólo anérgico, que se apresenta como uma forma maligna da micose com disseminação da infecção e resposta imune celular deprimida; apresentam na histopatologia áreas de inflamação granulomatosa mista (frouxa e supurativa) com extensas áreas de necrose e abundantes células do fungo (revisado por Franco, 1987).

Os níveis de interferon-gama (IFN- γ) parecem ser fundamentais no controle da doença, como demonstrado por Karhawi, A. S. K. et al. (2000), que verificaram que a produção desta citocina estava prejudicada em pacientes com a doença ativa, mas que, no entanto restaurava-se após a remissão clínica. Os níveis de citocinas em pacientes com diferentes formas da doença foram estudados por Benard, G. et al. (2001) que constataram que pacientes com as formas aguda e crônica da doença produzem baixos níveis de interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ , mas quantidades substanciais de interleucina-10 (IL-10). Em outro trabalho foi verificado que pacientes com a forma juvenil da doença apresentavam níveis maiores de imunoglobulina E (IgE) (regulada por IL-4) do que pacientes com a forma crônica, sendo considerada a forma juvenil a mais grave da PCM. Os níveis de IgE decrescem, entretanto, com a remissão clínica do paciente (Mamoni, R. L. et al., 2001). Estes dados demonstram a importância das citocinas, que dependendo dos níveis e dos tipos produzidos, podem acarretar a exacerbação ou a proteção da doença. Em conjunto, os resultados em estudos clínicos apóiam sugestão obtida no modelo experimental da PCM descrito por Calich et al. (1994): preponderância de mecanismos Th₁ estão associados à proteção, enquanto que, prevalência da resposta imune do tipo Th₂ associa-se a formas graves da doença.

Vários mediadores e subpopulações celulares parecem estar envolvidos nos mecanismos de imunoproteção e imunopatogenia desta micose.

As células “natural Killer” (NK) parecem desempenhar papel importante na resistência natural ao *P. brasiliensis*. Este efeito foi observado, quando células NK de camundongos foram capazes de limitar o crescimento *in vitro* do fungo (Jimenez & Murphy, 1984). Estudos realizados com pacientes que apresentavam as formas aguda ou crônica da doença demonstraram que os mesmos possuíam um número elevado de células NK circulantes, porém a atividade citotóxica destas células era significativamente menor quando comparada ao grupo de indivíduos normais (Peraçoli, M. T.; 1991). A atividade citotóxica das células NK foi analisada em modelo de hamsters infectados pela via intratesticular com o *P. brasiliensis*. Neste estudo pôde-se verificar que os animais apresentavam altos níveis de atividade das células NK durante as 4 primeiras semanas de infecção e diminuição na 8ª semana, quando comparado ao grupo controle normal. A queda da atividade NK estava associada com a depressão da resposta imune celular e com o aumento na extensão das lesões histopatológicas. Foi também observados uma correlação inversa entre atividade de células NK e os níveis de anticorpos (Peraçoli, M. T. et al., 1995).

No modelo murino isogênico de PCM foram demonstradas diferenças na susceptibilidade ao fungo relacionadas com o padrão genético do camundongo (Calich et al., 1985). Camundongos A/J inoculados intraperitonealmente (i.p.) com o fungo foram caracterizados como resistentes e camundongos B10.A como susceptíveis à infecção pelo *P. brasiliensis*. Este mesmo padrão de resistência à infecção foi observado ao utilizar a via i.t. para infecção (Cano, L. E. et al., 1995).

A grave doença desenvolvida pela linhagem susceptível foi associada com elevada produção de anticorpos específicos, ativação policlonal de células B, anergia na reação de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) e ativação tardia de macrófagos. Por outro lado, os animais resistentes apresentam produção de baixos níveis de anticorpos, ausência de ativação policlonal de células B,

reações de HTT positivas e uma ativação precoce de macrófagos e PMNs (Calich et al., 1994; Cano et al., 1995; Fazioli et al., 1994; Meloni-Bruneri et al., 1996).

Foi investigado o efeito do bloqueio de macrófagos na resistência natural e na resposta imune adaptativa de camundongos susceptíveis (B10 D2/0Sn) e resistentes (A/Sn) ao *P. brasiliensis* (Calich et al., 1985) e verificou-se que ambas as linhagens de camundongos tornaram-se consideravelmente mais susceptíveis à infecção, como foi evidenciado pelo aumento da mortalidade e das lesões de disseminação (Kashino, S.S. et al., 1995). Macrófagos peritoneais residentes de camundongos são incapazes de limitar a multiplicação de leveduras fagocitadas (Brummer E., E., 1989), entretanto, quando estes são ativados pela ação do interferon-gama (IFN- γ) ou de outras linfocinas passam a apresentar características fungicidas (Brummer E., E., 1988). Gonzalez, A. et al. (2000) verificaram que macrófagos murinos ativados com IFN- γ *in vitro* produzem níveis elevados de óxido nítrico resultando na inibição do processo de transformação de conídio a levedura do *P. brasiliensis*.

Parise-Forte, M. R. et al. (2000) estudaram a atividade fungicida de macrófagos obtidos de hamsters infectados com o *P. brasiliensis* durante 16 semanas de infecção. Durante os estágios iniciais da infecção, observou-se aumento dos níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e disseminação fúngica limitada. Em contraste, em estágios tardios da infecção, altos níveis de TNF- α foram observados, enquanto que a atividade fungicida dos macrófagos foi menor e os animais apresentaram perda da vitalidade resultando em morte.

Kurita, N. et al. (1999) observaram que leucócitos polimorfonucleares (PMNs) do sangue periférico humano exibem efeito fungistático sobre as células leveduriformes do *P. brasiliensis*, e que o IFN- γ , mas não o TNF- α ou a interleucina -8 (IL-8), aumentam a atividade antifúngica dos leucócitos PMNs.

Estudos posteriores do mesmo grupo constataram que os leucócitos PMNs ativados com IFN- γ , fator estimulador de crescimento para monócitos e granulócitos (GM-CSF) e/ou interleucina 1-beta (IL-1 β) aumentam sua atividade fungicida (Kurita, N. et al., 2000).

Camundongos resistentes (A/J) à infecção intratraqueal (i.t.) ao *P. brasiliensis* depletados de células PMN apresentaram aumento na carga fúngica no pulmão 7 dias após inoculação. No entanto, camundongos susceptíveis (B10.A) depletados de PMNs apresentaram maior número de leveduras no pulmão, fígado e baço após 7, 15, 30 e 120 dias após a infecção i.t. quando comparados aos seus controles. (Pina, A. et al., 2001). Estes dados sugerem que os PMNs são importantes células protetoras na PCM.

Os anticorpos apresentam papel de defesa em uma variedade de infecções causadas por microrganismos (Chandra, R.K., 1982). Entretanto, diversos estudos na PCM sugerem a ausência de um papel protetor mediado por anticorpos. Ao contrário, existe uma forte correlação entre a gravidade da doença e altos títulos de anticorpos (Arango, M. 1980; Fava Netto, C., 1976; Ferreira-Da-Cruz, M. F. et al., 1990; Restrepo et al., 1978). Assim, pacientes com envolvimento orgânico limitado, assim como aqueles que respondem à terapia antimicótica, passam a apresentar baixos títulos de anticorpos (Campos, E.P. et al., 1984; Restrepo, A., 1984(b)).

Foi demonstrado que pacientes com a PCM-doença apresentam ativação policlonal de células B (revisado por Camargo, Z.P. & Cano, L.E., 1994), aumento do número de células secretoras de imunoglobulinas no sangue periférico (Chequer-Bou-Habib et al., 1989), hipergamaglobulinemia (Oliveira S.L. et al., 1993; Silva & Silva, 1995) com altos níveis de IgG (Biagioni, L. et al., 1984; Correa, A. & Giraldo, R., 1972), IgE (Arango, M. & Yarzabal, L. 1982) e IgA (Biagioni et al., 1984; Chequer-Bou-Habib et al., 1989).

Mota et al (1988) estudaram a possível associação entre a resposta imune celular deprimida dos doentes e a redução na relação dos linfócitos TCD4⁺ (TCD4⁺) e dos linfócitos TCD8⁺ (TCD8⁺). Em ambas as formas da doença (aguda e crônica) esta relação CD4⁺/CD8⁺ encontrava-se reduzida; os pacientes com a forma aguda da micose exibiram aumento nos níveis de células supressoras/citotóxicas e de células B.

Moscardi-Bacchi et al. (1989) utilizando as técnicas de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais, demonstraram que existe um predomínio de linfócitos TCD4⁺ nos granulomas dos doentes, em ambas as formas da PCM-d.

Foi demonstrado que, na PCM pulmonar experimental, as células TCD8⁺ possuem papel importante no controle da resistência à infecção i.t. pelo fungo tanto na linhagem susceptível como na resistente; entretanto nos animais resistentes (A/Sn) os linfócitos TCD8⁺ estão especialmente envolvidos no controle tardio da disseminação pulmonar da doença enquanto que nos camundongos susceptíveis (B10.A) esses linfócitos agem principalmente no início da infecção, controlando não só a infecção pulmonar como a disseminação precoce do fungo (Cano et al., 2000).

Cano et al. (1998), verificou que a depleção do IFN- γ pelo uso de um anticorpo monoclonal, tornou a infecção com o *P. brasiliensis* mais grave, tanto em animais resistentes quanto em animais susceptíveis, prejudicando a resposta imune celular.

Todos estes fatos demonstram que em ambas as formas clínicas da doença a resposta imune celular e a resposta humoral parecem estar sendo reguladas pela atuação dos linfócitos T “helper” 1 (Th₁) e T “helper” 2 (Th₂), pois cada tipo celular possui diferentes padrões de secreção de linfocinas (Mosmann & Coffman, 1989).

Um dos principais desafios na Imunologia Celular é definir o (s) fator (es) que determina (m) a ativação seletiva das subpopulações Th₁ e Th₂. As hipóteses são múltiplas e entre elas a forma de apresentação do antígeno e o “ambiente” de citocinas presentes têm sido considerados. Assim sendo, a interleucina 12 (IL-12), produzida principalmente por macrófagos, estimula a diferenciação preferencial das células TCD4⁺ (Tho) para Th₁ (Trinchieri, G. & Scott, P., 1994); está também bem estabelecido que o IFN- γ , derivado de células Th₁, T citotóxicas e NK, inibe a proliferação de células Th₂ e muitos dos efeitos da interleucina 4 (IL-4) (citocina produzida pelas células Th₂). A IL-4, por sua vez, pode estimular o crescimento de células Th₂ e estas produzem a interleucina 10 (IL-10) que inibe a secreção de citocinas de células Th₁ e também Th₂, principalmente a produção de IFN- γ (Mosmann & Coffman, 1989; Romani, L. et al., 1991). Assim, as diferentes formas polares da PCM-d (hiperérgica e anérgica) poderiam estar associadas com os distintos perfis de produção de citocinas (IFN- γ , interleucina 2 (IL-2), IL-4, IL-10, IL-12) e/ou do nível de expressão dos respectivos receptores.

Estudos usando camundongos atímicos BALB/c (nu/nu) e seus pares heterozigotos (nu/+), revelaram que a susceptibilidade à infecção ao *P. brasiliensis* é exacerbada em animais atímicos (Burger, E. et al.; 1996). Isto demonstra que a integridade da resposta imune celular é fundamental para estabelecer os mecanismos de resistência à infecção ao *P. brasiliensis*.

Há grande número de estudos na literatura demonstrando que linfócitos TCD4⁺ são essenciais nos mecanismos de proteção a vários tipos de patógenos. Assim, camundongos infectados intranasalmente com *Mycobacterium avium* e depletados de linfócitos TCD4⁺ apresentaram infecção exacerbada no pulmão, baço e fígado. Houve diminuição do número de células inflamatórias no pulmão e significativa diminuição da atividade citotóxica (Saunders, B. M. et al.; 1995).

Cantorna, M. T. et al. (1991) verificaram a importância que os linfócitos TCD4⁺ possuem na candidíase. Ao infectar camundongos bg/bg nu/+ com cultura de *Candida albicans* no trato gastrointestinal obtiveram a indução de linfócitos candida-específicos nas placas de Peyer e baço. Em cultura, estas células produziram IL-2 em resposta ao antígeno do fungo, e o fenômeno foi correlacionado com o *clearance* do fungo do esôfago e da língua. Porém, ao depletarem os linfócitos TCD4⁺, os camundongos apresentaram um aumento da susceptibilidade na mucosa da língua e do esôfago.

Os linfócitos TCD4⁺ parecem ser importantes também na histoplasmose. Gómez, A. M. et al. (1988) ao infectarem camundongos depletados desta subpopulação linfocitária com *Histoplasma capsulatum* pela via intravenosa, constatarem um aumento significativo do número de fungos no baço.

Na criptococose, a depleção *in vivo* de linfócitos TCD4⁺ em camundongos infectados pelo sistema nervoso central (SNC), acarretou na exacerbação da infecção neste sistema e uma redução de leucócitos no cérebro (Buchanan et al.; 2000).

Huffnagle, G.B. et al. (1991) verificaram o papel das células TCD4⁺ e TCD8⁺ na infecção criptocócica em camundongos infectados intratraquealmente. Após depleção dos linfócitos TCD4⁺ por injeções de AcM específico para CD4, os autores observaram um significativo aumento na colonização do cérebro e baço. No entanto, a depleção das células T CD4⁺ não alterou o influxo de células TCD8⁺ nos pulmões. Surpreendentemente, a depleção de células TCD8⁺ por AcM também teve um pequeno, mas significativo aumento na colonização do cérebro e baço. O influxo de células TCD4⁺ pulmonar foi independente da presença dos linfócitos TCD8⁺. Em pulmões analisados histopatologicamente, verificaram numerosas células do fungo fagocitadas, porém intactas em animais depletados de T CD8⁺, mas não foi visto em camundongos controles e depletados de TCD4⁺. Os autores

propuseram que os linfócitos TCD4⁺ podem recrutar e ativar fagócitos efetores, enquanto que, as células TCD8⁺ têm uma função predominantemente de lise.

Em algumas patologias, entretanto, os linfócitos TCD4⁺ não parecem ser as células fundamentais nos mecanismos de imunidade protetora. Por exemplo, trabalhos realizados com *Pneumocystis carinii* evidenciaram que animais depletados de linfócitos TCD4⁺ não desenvolveram infecção progressiva, indicando que os mecanismos de proteção são TCD4⁺-independentes (Beck et al.; 1991; Harmsen et al., 1995).

A participação das células TCD4⁺ nos mecanismos de resistência ao *P. brasiliensis* foi sugerida, de forma indireta, por Calich et al. (1994) trabalhando no modelo de infecção i.p. pelo fungo. Os autores sugeriram que as células dos animais resistentes ao fungo (A/Sn) poderiam ter a capacidade de desenvolver uma resposta imune com predomínio de linfócitos Th₁ e os animais susceptíveis (B10.A) apresentariam uma resposta imune predominantemente tipo Th₂. Realmente, a caracterização da população de citocinas no modelo de infecção i.p. demonstrou que camundongos A/Sn produzem IFN- γ e IL-2 em todo o curso da doença, caracterizando uma resposta de predomínio Th₁. Camundongos B10.A não secretam citocinas Th₁, mas não apresentam padrão típico Th₂, pois IL-4 foi somente detectada em alguns períodos pós-infecção (Kashino et al, 2000). Trabalho anterior realizado com animais resistentes e susceptíveis, inoculados intratraquealmente com o *P. brasiliensis* de baixa virulência, e depletados de células TCD4⁺ *in vivo*, demonstrou que este tratamento não induz exacerbação da infecção de animais A/SN e B10.A, se comparados a animais apenas infectados (CANO, 1995), indicando que o controle do *P. brasiliensis*, ao menos para isolados de baixa virulência, é mediado, nestes animais, por mecanismos TCD4-independentes.

Para complementar o estudo da função das células TCD4⁺ e TCD8⁺ nos mecanismos de defesa na PCM, depletamos pela via i.p. cada uma das

subpopulações e desafiámos intratraquealmente animais susceptíveis e resistentes com a cepa virulenta do fungo *P. brasiliensis* (Pb18).

Objetivos

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo estudar a função dos linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ na PCM, pela depleção *in vivo* destas células induzida pelos anticorpos monoclonais anti-linfócitos TCD4⁺ (GK 1.5) e pelo AcM anti-linfócitos TCD8⁺ (H-35). Foram estudados os efeitos destes tratamentos em animais resistentes (A/J) e susceptíveis (B10.A) ao *P. brasiliensis*, utilizando-se como via de infecção a intratraqueal, por ser o pulmão o órgão primário desta doença.

O efeito da depleção foi avaliado através da determinação do grau de infecção de diversos órgãos, em tempos diferentes pós-infecção. Avaliamos a eficiência da depleção dos linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ por análise do fenótipo de células do baço por citometria de fluxo. Foram também avaliados o desenvolvimento das reações de hipersensibilidade do tipo tardio, a produção de isótipos anti-*P. brasiliensis* e das citocinas pulmonares em animais tratados e controles.

Material e Métodos

Material e Métodos

1) Produção e Purificação de anticorpos monoclonais (AcM)

1.1) Hibridomas

Foi utilizado o hibridoma G.K. 1.5 (anti-CD4), secretor de AcM de rato (isótipo IgG2b), que reconhece especificamente a molécula CD4 de superfície de células T murinas, bloqueando a função desta subpopulação celular (Wilde, D. B. et al, 1983; Swain, S. L. et al, 1984). Este hibridoma, originalmente obtido por Dialynas et al. (1983), foi gentilmente fornecido pela Dra. Olga Célia Martinez Ibanez do Lab. de Imunogenética do Instituto Butantã

Foi também utilizado o hibridoma H-35, gentilmente cedido pelo Dr. José Menguel. O AcM secretado por este hibridoma é uma IgG1 de rato com especificidade anti-Lyt-2 (CD8 murino).

1.2) Expansão dos Hibridomas *in vitro*

As células dos hibridomas foram cultivadas *in vitro* em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2-mercaptoetanol 0,05mM, glutamina 2mM, penicilina 1000 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml, e mantidas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e repicadas a cada 48 horas. Para os repiques, as culturas foram centrifugadas (270 x g, 10°C, 6 minutos), as células foram ressuspensas em meio fresco, determinado seu número total e sua viabilidade pela contagem, em câmara de

Neubauer, após a mistura de 20 μ l da suspensão celular com 180 μ l de Azul de Trypan (0,4%).

Quando o número e a viabilidade das células eram adequados, parte das mesmas era colocada em meio RPMI 1640 contendo 20% soro fetal bovino e 10% de Dimethyl-Sulfoxide (DMSO), rapidamente congelada a -70°C (48 horas) e posteriormente estocada em nitrogênio líquido.

1.3) Expansão dos hibridomas *in vivo*

Os hibridomas desenvolvem-se muito bem na cavidade peritoneal de animais BALB/c geneticamente atímicos (nu/nu). Esses animais foram pré-tratados (dia -1) com 1ml de Pristane (2,6,10,14-Tetra-Methyl-Pentadecane, Sigma T-7640) pela via intraperitoneal (i.p). Após 24 horas, inoculamos nesses animais pela via i.p 1×10^7 células viáveis do hibridoma.

Os animais inoculados desenvolveram ascite evidente antes do décimo quinto dia. Os animais foram então sacrificados, dissecada a cavidade peritoneal e retirado todo o líquido ascítico. O líquido ascítico foi centrifugado a 270 x g, a 4°C por 10 minutos, e o sobrenadante (com os AcM) estocado a -20°C para posterior purificação dos anticorpos presentes.

1.4) Precipitação dos anticorpos monoclonais

Após a expansão dos AcM (*in vivo*) estes foram precipitados utilizando o método descrito por McKinney & Parkison (1987). O material ascítico foi diluído 1:5 em tampão acetato 60 mM, pH 4,0; o pH da solução 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 minutos e posteriormente centrifugada a 10000 x g, a 4 °C, por 30 minutos; foi coletado o sobrenadante e determinado o volume obtido; em seguida, foi

adicionado 1 ml de tampão PBS/EDTA 2mM (10x) para cada 10 ml do sobrenadante e o pH ajustado para 7,4 com NaOH 1N. A solução foi esfriada a 4 °C e adicionado sulfato de amônio até obter-se 45% de saturação; prosseguiu-se com a agitação por 30 minutos. A preparação foi centrifugada a 10000 x g, a 4 °C, por 30 minutos, separando-se o precipitado (o sobrenadante foi reservado até ter-se a certeza de que os anticorpos estavam no precipitado) que foi dissolvido em pequeno volume de tampão PBS/EDTA (uma vez concentrado); a solução foi dializada contra PBS durante 72 horas (com três trocas diárias); foi depois aquecida a 50-55 °C por 20 minutos e centrifugada a 5000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, determinado seu volume, assim como também o conteúdo de proteínas (método do ácido bicinconínico-BCA). Todo material foi filtrado em membrana Millipore (0,22 μ aliquoteado) e estocado a -20°C.

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

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

1.6) Análise do grau de pureza das amostras por SDS-PAGE

Para verificar o grau de pureza dos AcM precipitados 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. Este procedimento foi realizado com a ajuda técnica da técnica superior Sra. Sônia Baueb, no Laboratório de Imunoquímica da Dra. Celidéia A C. Vaz, do Depto. de Imunologia ICB/USP.

1.7) Purificação de γ -globulina normal de rato.

A IgG controle foi purificada a partir de “pool” de soros obtidos de ratos Wistar adultos (cedidos pelo Biotério Central das Químicas, 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, como descrito anteriormente nos itens 1.4, 1.5, 1.6, respectivamente.

2) Animais

Para a infecção intratraqueal foram utilizados camundongos machos das linhagens B10.A e A/J respectivamente susceptíveis e resistentes à infecção i.t. pelo *P. brasiliensis* (idade média de 8 – 12 semanas). Os animais foram criados em condições SPF (*specific pathogens free*) no Biotério de Camundongos Isogênicos do Depto. de Imunologia do ICB-USP.

3) Depleção de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺

Camundongos B10.A e A/J foram depletados de linfócitos TCD4⁺ ou de linfócitos TCD8⁺ através da inoculação intraperitoneal do anticorpo monoclonal GK 1.5 ou H-35 (200 μ g/ml/camundongo) 48 e 24 horas antes da infecção intratraqueal com leveduras de *P.brasiliensis*. A depleção foi mantida pela inoculação de 100 μ g do AcM por camundongo a cada 7 dias.

4) Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas do baço

4.1. Obtenção das células e marcação celular:

Os animais A/J e B10.A foram depletados por injeção i.p. dos anticorpos monoclonais GK1.5 ou H-35 (200µg/camundongo, nos dias -2 e -1) e seus respectivos controles receberam também por via i.p. gama globulina normal de rato, seguindo o mesmo esquema dos animais tratados com o AcM. No dia 0, seus baços foram removidos, macerados com tampão de FACS (PBS + 0,1% azida sódica e 3% de soro fetal bovino), centrifugados a 250g por 5 minutos a 8°C, e em seguida as células foram lavadas novamente no mesmo tampão. O botão celular foi ressuspensionado em 5 ml de tampão de FACS, determinada a concentração e a viabilidade celular, utilizando-se o corante Turkey. As células, nesta etapa, permaneceram no gelo.

Em uma placa de fundo em “u” (96 poços, Costar) foram colocadas 2×10^6 células por poço. A placa foi centrifugada a 250g por 5 minutos a 8°C. Após centrifugação, as células foram incubadas em um volume de 25µl dos anticorpos anti-CD3 FITC (Isotiocianato de fluoresceína) diluído a 1/50 (Southern Biotechnology Associates, Inc.) e anti-L3T4 PE (Ficoeritrina) (Southern Biotechnology Associates, Inc.) diluído 1/200. Em outras preparações usou-se como segundo anticorpo anti-Lyt2 PE diluído a 1/100 (Southern Biotechnology Associates, Inc.) ou anti-imunoglobulina PE diluído a 1/200 (Southern Biotechnology Associates, Inc.), incubado a 4°C por 30 minutos. As células foram, então, ressuspensionadas em 175µl de tampão de FACS e a placa foi centrifugada a 250g por 5 minutos a 8°C. As células, após centrifugação, foram ressuspensionadas em 200µl em tampão de FACS e lavadas novamente. Em seguida, as células foram ressuspensionadas em tampão de FACS sem soro e

transferidas para tubos de ensaio (Falcon, nº 2052) contendo este tampão, resultando em um volume final de 1ml.

Os títulos ótimos dos diferentes anticorpos monoclonais foram obtidos em padronização prévia.

4.2. Análise por citometria de fluxo:

A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando-se o aparelho FacScalibur (Becton & Dickison, CA) do Depto de Imunologia da USP. Foram analisadas 10000 células totais de acordo com o tamanho e a granulosidade, pela dispersão da luz frontal e vertical, respectivamente. Após a aquisição de dados, estes foram analisados utilizando o programa Cell Quest.

Foi também calculada a porcentagem de redução (PR) dos diferentes fenótipos celulares dos linfócitos esplênicos para os animais A/J e B10.A utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de redução (PR)} = \frac{\% \text{ no controle} - \% \text{ no depletado}}{\% \text{ no controle}} \times 100$$

5) Fungo

Foi utilizada a cepa virulenta Pb 18 do *P.brasiliensis*. Isolados do fungo foram avaliados quanto à sua virulência e conclui-se que o isolado Pb 18 é altamente virulento para camundongos susceptíveis (Kashino et al. 1985). O fungo foi mantido na sua fase leveduriforme em meio Fava Netto com passagens a cada 7 dias e incubação a 36°C (Fava Netto, 1955).

5.1) Preparação do inóculo

O fungo foi coletado 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.

5.2) Determinação da viabilidade das leveduras

A viabilidade das leveduras foi determinada pela técnica descrita por BERLINER & RECA (1966), utilizando a coloração vital de Janus Green B.

5.3) Infecção intratraqueal (i.t)

Os animais foram infectados por injeção intratraqueal (i.t) de 1×10^6 leveduras viáveis de *P.brasiliensis* contidas em 50 μ l 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 do Brasil) a 0,4% pela via i.p. (0,2 ml de ROMPUN); 2) após 10 minutos, administração de 10 ml/kg de peso de hidrato de cloral (Reagen do Brasil) a 2,5% pela via intraperitoneal (0,2ml de Hidrato de Cloral).

Quando o animal estava insensível à dor (após 10 minutos) foi feita uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço, e a traquéia exposta. O fungo foi administrado em um volume total de 50 μ l. 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.

6) Avaliação do grau de infecção

O grau de infecção foi avaliado em animais depletados de linfócitos T CD4⁺ ou TCD8⁺, através da recuperação de fungos viáveis do pulmão, fígado e baço, após 4 ou 8 semanas de infecção em meio BHI suplementado com soro de cavalo e filtrado de cultura do isolado 192 do *P. brasiliensis* (Castañeda et al., 1988; Singer-Vermes et al., 1992).

7) Produção do antígeno de Fava Netto

Este antígeno (AgFN), de natureza polissacarídica, foi obtido segundo método descrito por FAVA NETTO et al. (1969). O *P. brasiliensis* foi cultivado em sua fase leveduriforme a 36°C em meio de FAVA NETTO (1955), por 10 dias. Após este período, as células foram lavadas com solução salina estéril e tratadas com éter etílico e acetona p.a. (1:1). O sedimento foi ressuspenso em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril. A suspensão obtida foi autoclavada a 120°C por 25 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e o sedimento desprezado. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore (0,45µm) e utilizado como antígeno. A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico BCA (ácido biscinconínico – Pierce, cat. nº 23225, “BCA protein assay reagent”) segundo instruções do fabricante.

8) Avaliação da resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio

Grupos de animais B10.A e A/J infectados foram avaliados quanto à resposta de hipersensibilidade do tipo tardio específica para o fungo, realizando-se o teste do coxim plantar de acordo às condições descritas por FAZIOLI et al (1994). O estudo foi feito às 4 e 8 semanas após infecção ou somente na 8ª semana, dependendo do protocolo utilizado.

Assim, 24 horas antes do teste, a pata esquerda do animal foi medida com o auxílio de um espessímetro (Mitutoyo, Japão), e em seguida, foi injetado subcutaneamente no coxim plantar esquerdo 25µl de antígeno fúngico. As medidas do inchaço das patas foram feitas após 24 horas com o mesmo espessímetro. Os resultados obtidos foram expressos como a diferença, em mm, entre as medidas feitas imediatamente antes, e 24 horas após a inoculação do antígeno.

9) Caracterização isotípica dos anticorpos anti-*P. brasiliensis*

A determinação da resposta imune humoral de animais A/J e B10.A, infectados i.t. com 1×10^6 células leveduriformes e tratados com AcM anti-CD4 ou anti-CD8, ou infectados e tratados com γ -globulina de rato normal foi realizado, pela quantificação de anticorpos circulantes presentes no soro destes animais, pelo método imunoenzimático (ELISA). Para a realização deste ensaio utilizamos exoantígeno ou C. F. A. (*Cell-Free-Antigen*) descrito por CAMARGO et al. (1991). Este antígeno é constituído da mistura de antígenos individuais obtidos de 4 isolados distintos do *P. brasiliensis*: Pb339, Pb265, Pb18 virulento e Pb18 de baixa virulência. Os antissoros não marcados anti-Ig total e anti-isótipos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA anti-camundongos

(Southern Biotechnology Assoc.) foram obtidos em cabra. O antissoro marcado foi uma anti-IgG de cabra, produzida em coelho, conjugada com peroxidase (Southern Biotechnology Assoc.). As concentrações ótimas de cada antissoro utilizadas nos diversos ensaios foram obtidas previamente por titulação em bloco.

Basicamente o ensaio consiste em:

- 1) Sensibilização de placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Costar) com 100 μ l do preparado antigênico por poço, diluído 1:1000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) (denominado tampão TCB). As placas foram incubadas por uma hora a 37 C e 18 horas a 4 C;
- 2) Realização de 3 lavagens com 200 μ l/poço de PBS contendo Tween 20 a 0,05% (v/v), processo este repetido a cada etapa, exceção feita à fase final de interrupção da reação enzimática;
- 3) Bloqueio dos sítios livres com 200 μ l/poço de solução de gelatina a 0,5 % (m/v) (Difco) em tampão TCB 0,05M. Incubadas por uma hora a 37 C;
- 4) Adição dos soros experimentais e controles positivo e negativo da reação, diluídos em PBS-Tween 20 de forma seriada na base 2. Incubação por 1 hora a 37 C;
- 5) Adição de 100 μ l/poço do antissoro comercial produzido em cabra (anti-imunoglobulina total ou anti-isótipo). Incubação por 1 hora a 37 C;
- 6) Adição de 100 μ l/poço do antissoro anti-IgG de cabra marcada com peroxidase tipo IV. Incubação por 1 hora a 37 C;

- 7) Reação com o substrato (100 µl/poço) que consistiu em 10 µl de H₂O₂ a 30% (Merck) diluídos em 25 ml de tampão citrato de sódio a 0,1 M, pH 5,0 contendo 10 mg do revelador ortofenilenodiamina (OPD) (Merck). Incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz;
- 8) Interrupção da reação enzimática com 100 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico 4,0 N;
- 9) Leitura da densidade óptica (D. O) em leitor automático de ELISA (VERSAmax – Molecular Devices Corporation), em comprimento de onda de 490 nm.

As D.O. obtidas das leituras dos soros de animais controles (normais) serão consideradas como o “cut-off”. As D.O. de cada diluição dos soros experimentais, para cada isótipo analisado, foram comparadas ao seu respectivo “cut-off” do controle isotípico negativo. Para cada tempo e grupo experimental foram determinadas as médias em log₂ dos títulos individuais.

10) Caracterização das citocinas pulmonares: ELISA para quantificação de IFN-γ, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e GM-CSF.

A determinação da concentração de cada citocina nos sobrenadantes dos macerados pulmonares foi estabelecida através de ELISA de captura utilizando-se pares de AcM para cada citocina murina (Pharmingen).

As concentrações antecipadamente determinadas em nosso laboratório para cada um dos AcM primário e secundário no ELISA, contra cada citocina, estão mostradas na tabela abaixo.

Citocina	AcM de captura	AcM de detecção biotinilado
IFN- γ	R4-6A2 (2 μ g/ml)	XMG 1.2 (0,5 μ g/ml)
IL-2	JES6-1A12 (4 μ g/ml)	JES6-5H4 (2 μ g/ml)
IL-3	MP2-8F8(0,5 μ g/ml)	MP2-4J8(0,5 μ g/ml)
IL-4	BVD4-1D11 (3 μ g/ml)	BVD6-24G2 (2 μ g/ml)
IL-5	TRFK5 (6 μ g/ml)	TRFK4 (3 μ g/ml)
IL-10	JES5-2A5 (5 μ g/ml)	SXC-1 (2 μ g/ml)
IL-12	C15.6 (6 μ g/ml)	C17.8 (2 μ g/ml)
GM-CSF	MP1-22E9(4 μ g/ml)	MP1-31G6(2 μ g/ml)

As condições ótimas para o ELISA, comuns a todas as interleucinas e previamente testadas em nosso laboratório, estão apresentadas a seguir:

- 1) sensibilização das placas (fundo chato, Difco) com 50 μ l/poço do AcM primário na concentração determinada, diluído em solução de bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 8,2. As placas foram incubadas por 24 horas a 4°C;
- 2) bloqueio dos sítios livres com 200 μ l/poço de gelatina (Difco) a 1% (m/v) em PBS, pH=7,0, por 2 horas à temperatura ambiente;

3) adição de 50 µl/poço da citocina recombinante (Pharmingen) seguindo uma diluição seriada em meio PBS isotônico contendo 10% de SFB para obtenção de uma curva-padrão, e adição de 50 µl das amostras, em duplicata, nos demais poços;

4) adição de 50 µl/poço do AcM secundário biotinilado na concentração desejada, diluído em meio PBS com 10% de SFB; segue-se incubação por 45 minutos à temperatura ambiente;

5) incubação com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite, Vector Lab) diluído em tampão PBS 0,25% de gelatina, pH=7,0;

Cada uma das etapas acima mencionada foi intercalada por 5 lavagens dos poços com tampão PBS, pH=7,0 e Tween 20 a 0,05% v/v;

6) reação com o substrato (100 µl/poço) constituído de 5 µl de H₂O₂ a 30% (Merck) diluídos em solução composta por 2,8 ml de tampão fosfato de sódio 0,2 M, 2,2 ml de ácido cítrico 0,1M, pH=5,0 e 10 ml de H₂O, adicionado de 10 mg do revelador ortofenilenodiamina (OPD, Merck). Incubação por 45 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz;

7) interrupção da reação enzimática pela adição de ácido sulfúrico 4 N (100 µl/poço);

8) leitura das densidades ópticas em leitor automático (VERSAmax – Molecular Devices Corporation), em comprimento de onda de 490 nm.

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 (Pharmingen).

11) Análise estatística

A análise estatística aplicada aos resultados obtidos de experimentos realizados com camundongos depletados de TCD4⁺ foi analisado pelo One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey (Zar, 1984). Quando comparamos somente dois grupos (8ª semana após depleção de TCD8⁺) aplicamos o teste t de Student, para amostras não pareadas. O nível de significância crítico admitido foi de uma probabilidade máxima de erro de até 5% ($P < 0,05$) em todas as análises realizadas.

Resultados

Resultados

1) Produção e Purificação do Anticorpo Monoclonal GK 1.5 e H-35

Inoculamos 1×10^7 células do hibridoma GK 1.5 (anti-TC $CD4^+$) pela via intraperitoneal, em camundongos BALB/c atímicos (Nu/Nu). Cerca de 10-15 dias após inoculação, retiramos o líquido ascítico, purificamos o anticorpo com ácido caprílico e sulfato de amônia, utilizando o método de McKinney & Parkison (1987), dosamos proteínas totais pelo método do ácido bicinonínico (Pierce, N/C 23225) e a pureza foi verificada em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Após 3 preparações obtivemos cerca de 29 mg de anticorpo monoclonal purificado, e na análise eletroforética (SDS-PAGE) observamos 2 bandas protéicas de peso molecular de cerca de 25 e 50 kDa.

O anticorpo monoclonal anti-TC $CD8^+$ (H-35) utilizado neste trabalho encontrava-se purificado e dosado no estoque do laboratório, com concentração de 11,1 mg/ml.

2) Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas do baço

A porcentagem de depleção dos linfócitos T $CD4^+$ ou TC $CD8^+$ pela inoculação respectiva do anticorpo monoclonal GK 1.5 ou H-35 nos animais A/J e B10.A foi determinada com o auxílio da técnica de citometria de fluxo.

Os camundongos de ambas as linhagens foram inoculados intraperitonealmente nos dias -2 e -1 com 200 μ g do AcM. Os animais controle receberam gama globulina normal de rato na mesma dose e nos mesmos dias que os grupos experimentais. No dia 0 seus baços foram retirados, macerados e a marcação foi feita de acordo com o item 4 de Material e Métodos.

Os grupos experimentais eram compostos por 4 animais e foram divididos da seguinte maneira em ambas as linhagens: 1) camundongos que receberam IgG; 2) camundongos que receberam o AcM GK1.5; 3) camundongos que receberam o AcM H-35.

Para cada amostra foram realizadas marcações simples e duplas e analisados 10.000 eventos. Foram calculados os números absolutos médios de células e as porcentagens médias obtidas a partir das marcações simples e duplas para cada fenótipo celular (anti-Ig, anti-L3T4, e anti-Ly2).

Os resultados das análises pela citometria de fluxo das células esplênicas dos animais tratados com IgG de rato, e que consideramos como nosso controle, caracterizadas para cada fenótipo e linhagem, encontra-se na tabela 2.1. Podemos observar que animais A/J tratados com IgG apresentaram no baço 51,15% ($32,18 \pm 3,48 \times 10^6$ células) de linfócitos B, 16,99% ($10,85 \pm 1,66 \times 10^6$) de células TCD4⁺ e 9,94% ($6,30 \pm 0,75 \times 10^6$ células) de TCD8⁺. Os camundongos B10.A apresentaram média de 51,20% ($40,15 \pm 4,79 \times 10^6$ células) de linfócitos B, 15,93% ($12,49 \pm 1,49 \times 10^6$ células) de TCD4⁺ e 10,38% ($8,15 \pm 0,98 \times 10^6$ células) de TCD8⁺.

A figura 2.1 mostra alguns histogramas obtidos com células esplênicas de animais A/J e B10.A marcados com antissoros anti-Ig, anti-L3T4, e anti-Ly2.

Como podemos observar na tabela 2.1, os animais depletados da subpopulação TCD4⁺ apresentaram uma marcante diminuição na porcentagem destas células. Os animais A/J tratados apresentaram porcentagem de redução igual a 99, e também apresentaram redução dos linfócitos TCD8⁺ (PR=10,46) e aumento das células B (PR=-17,83). Nos animais B10.A, a porcentagem de redução da subpopulação TCD4⁺ foi semelhante ao dos animais resistentes (PR = 98, 75), porém os animais tratados apresentaram aumento das células TCD8⁺ (PR=-12,33) e aumento dos linfócitos B (PR=-19,73). Ambas as linhagens mostraram uma relação CD4⁺/CD8⁺ de 0,02.

Nos camundongos depletados dos linfócitos TCD8⁺, observamos acentuada redução na porcentagem destas células nos animais A/J (PR = 97,38), que também apresentaram uma pequena diminuição das células TCD4⁺ (PR=6,30) e um discreto aumento dos linfócitos B (PR=-13,43), apresentando uma relação CD4⁺/CD8⁺ de 51,65. Nos animais B10.A, a porcentagem de redução das células TCD8⁺ foi igual a 94,51, no entanto, estes animais apresentaram aumento das células TCD4⁺ (PR=-12,49) e dos linfócitos B (PR=-15,25) e uma relação CD4⁺/CD8⁺ igual a 35,57.

Tabela 2.1- Distribuição fenotípica dos linfócitos esplênicos de animais A/J e B10.A no dia 0, tratados com gama globulina de rato ou depletados com anticorpo monoclonal GK1.5 ou H-35.

linhagem	tratamento	Número de células x10 ⁶ /Porcentagem de redução				
		Total	TCD4 ⁺	TCD8 ⁺	Ig ⁺	CD4/CD8
A/J	IgG normal	63,25 ± 31,63	10,85 ± 1,66	6,30 ± 0,75	32,18 ± 3,48	1,72
	α CD4	77,33 ± 44,65	0,13 ± 0,02	6,88 ± 0,33	46,60 ± 1,19	0,02
			99	10,46	-17,83	
	α CD8	55,5 ± 57,33	8,78 ± 0,44	0,17 ± 0,03	36,88 ± 5,03	51,65
			6,30	97,38	-13,43	
B10.A	IgG normal	78,5 ± 39,25	12,49 ± 1,49	8,15 ± 0,98	40,15 ± 4,79	1,53
	α CD4	63,0 ± 36,37	0,13 ± 0,05	7,31 ± 0,55	38,03 ± 3,94	0,02
			98,75	-12,33	-19,73	
	α CD8	59,25 ± 29,63	10,67 ± 1,49	0,30 ± 0,13	34,54 ± 4,8	35,57
			-12,49	94,51	-15,25	

O sinal (-) significa aumento percentual da população celular.

A/J

a) animais tratados com γ globulina de rato

TCD4

TCD8

linfócitos B

b) animais tratados com GK1.5 (anti-CD4)

TCD4

TCD8

linfócitos B

c) animais tratados com H-35 (anti-CD8)

B10.A

d) animais tratados com γ globulina de rato

e) animais tratados com GK1.5 (anti-CD4)

TCD4

TCD8

linfócitos B

f) animais tratados com H-35 (anti-CD8)

TCD4

TCD8

linfócitos B

Figura 2.1. Histograma de células esplênicas de camundongos A/J e B10.A, tratados nos dias -2 e -1 com 200µg/camundongo de γ globulina de rato, ou de AcM GK1.5 ou de AcM H-35. Os linfócitos foram marcados com antissoros anti-B, anti-L3T4, e anti-Ly2.

3) Avaliação do grau de infecção

Grupos de animais A/J e B10.A tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD4⁺, anti-CD8⁺ ou IgG normal de rato e infectados intratraquealmente com leveduras de *P. brasiliensis* foram sacrificados após 4 semanas (apenas o grupo tratado com GK1.5) e 8 semanas de infecção. Os animais receberam por via i.p. nos dias -2 e -1 200µg/camundongo de AcM GK1.5 ou H-35 e 100µg/camundongo de AcM GK1.5 ou H-35 a cada 7 dias. Os animais controle receberam tratamento equivalente com IgG de rato.

Seus órgãos foram retirados, pesados, macerados e plaqueados em ágar BHI suplementado, e calculado o log₁₀ do número de UFC/g de tecido.

Depletamos os camundongos resistentes (A/J) com anticorpo monoclonal GK1.5 (anti-TCR4⁺) conforme protocolo descrito acima, e o seu controle recebeu em tempos equivalentes a mesma dose de IgG de rato. Os animais foram sacrificados após 4 e 8 semanas da infecção. Na figura 3.1 apresentamos a média de UFC/g de tecido (log₁₀) no pulmão, fígado e baço. Os grupos (depletado e IgG) do experimento de 4 semanas eram ambos compostos por 13 camundongos, e o grupo do experimento de 8 semanas era constituído de 11 animais depletados e 10 que receberam IgG.

Figura 3.1. Efeito da depleção de linfócitos TCD4⁺ no grau de infecção de animais resistentes A/J ao *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM (dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100 µg/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 4 e 8 semanas de infecção pelo método de UFC. As linhas verticais representam o E. P.

* Diferença significativa (p<0,05)

Diferença significativa (p<0,01)

Na 4^a semana de infecção o pulmão dos animais depletados apresentou carga similar ($5,58 \pm 0,18 \log_{10}$) ao do seu controle ($5,57 \pm 0,11 \log_{10}$). No

entanto, o grupo depletado apresentou aumento da disseminação fúngica para o fígado ($1,37 \pm 0,26 \log_{10}$) quando comparado ao seu respectivo controle ($0,40 \pm 0,20 \log_{10}$). No grupo depletado houve uma pequena disseminação (3 de 13 animais) para o baço ($0,65 \pm 0,32 \log_{10}$), e não houve disseminação nos animais controle.

Na 8ª semana pós-infecção os animais depletados e infectados apresentaram redução na carga fúngica no pulmão ($5,018 \pm 0,19 \log_{10}$) quando comparados aos seus controles ($5,78 \pm 0,17 \log_{10}$). O grupo depletado não apresentou disseminação para o fígado ($0,0 \pm 0,0 \log_{10}$), e o grupo controle apresentou pequena disseminação (2 de 10 animais) neste órgão ($0,36 \pm 0,22 \log_{10}$). No baço, ambos os grupos apresentam pequena disseminação, o grupo depletado apresentou carga fúngica de $0,49 \pm 0,31 \log_{10}$ e o grupo controle $0,14 \pm 0,13 \log_{10}$.

Os camundongos B10.A foram tratados com o AcM GK1.5 adotando o mesmo protocolo utilizado nos animais A/J e o seu grupo controle foi tratado de modo equivalente com IgG de rato. A figura 3.2 exibe a média de UFC/g de tecido ($\log_{10}$) no pulmão, fígado e baço. Os grupos (depletado e IgG) do experimento de 4 semanas eram ambos compostos por 17 camundongos, e o grupo do experimento de 8 semanas era constituído de 11 animais depletados e 8 que receberam IgG.

Figura 3.2. Efeito da depleção de linfócitos TCD4⁺ no grau de infecção de animais susceptíveis B10.A ao *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM (dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100 µg/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 4 e 8 semanas de infecção pelo método de UFC. As linhas verticais representam o E.P.

A carga fúngica pulmonar nos animais depletados com 4 semanas de infecção ($5,87 \pm 0,08 \log_{10}$) foi semelhante ao do grupo controle ($5,73 \pm 0,10 \log_{10}$); o mesmo ocorreu no fígado (depletado $1,92 \pm 0,16 \log_{10}$; controle $1,95 \pm 0,22 \log_{10}$) e no baço (depletado $1,22 \pm 0,31 \log_{10}$; controle $1,26 \pm 0,32 \log_{10}$).

Com 8 semanas de infecção os animais mantiveram o mesmo padrão do experimento de 4 semanas: a carga fúngica pulmonar foi semelhante em ambos os grupos (depletado $5,97 \pm 0,06 \log_{10}$; controle $5,91 \pm 0,12 \log_{10}$), assim como a disseminação para o fígado (depletado $2,23 \pm 0,19 \log_{10}$; controle $2,51 \pm 0,16 \log_{10}$) e baço (depletado $1,51 \pm 0,32 \log_{10}$; controle $1,45 \pm 0,38 \log_{10}$).

Estudamos também o papel dos linfócitos TCD8⁺ em animais A/J e B10.A frente à infecção pelo *P. brasiliensis*. Os animais foram inoculados intraperitonealmente com 200µg/camundongo de AcM H-35 (anti-CD8⁺) 48 e 24 horas antes da infecção intratraqueal, e a cada 7 dias com 100µg/camundongo. O grupo controle recebeu ao mesmo tempo a dose equivalente de γ globulina de rato. Os camundongos foram sacrificados 8 semanas após a infecção intratraqueal.

Na figura 3.3 estão apresentadas a média de UFC/g de tecido ($\log_{10}$) no pulmão, fígado e baço dos animais A/J tratados com o AcM H-35. O grupo inoculado com AcM anti-CD8⁺ era constituído por 7 camundongos e o grupo tratado com IgG de rato era constituído por 4 camundongos.

Figura 3.3. Efeito da depleção de linfócitos TCD8⁺ no grau de infecção de animais resistentes A/J ao *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM (dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100 µg/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 8 semanas de infecção pelo método de UFC. As linhas verticais representam o E.P.

Diferença significativa (p<0, 01).

Podemos verificar que animais A/J depletados de linfócitos TCD8⁺ apresentam aumento da carga fúngica no pulmão ($5,48 \pm 0,10 \log_{10}$) quando comparados aos seus controles ($4,7 \pm 0,33 \log_{10}$). Os camundongos depletados tiveram pequena disseminação fúngica para o fígado ($0,93 \pm 0,33 \log_{10}$) assim como o seu controle ($1,49 \pm 0,86 \log_{10}$); houve também discreta disseminação para o baço (1 de 7 camundongos) no grupo depletado (depletado $0,36 \pm 0,36 \log_{10}$) e (1 de 4 camundongos) no grupo controle ($0,61 \pm 0,61 \log_{10}$).

Na figura 3.4 apresentamos a média de UFC/g de tecido ($\log_{10}$) no pulmão, fígado e baço dos animais B10.A tratados com o AcM H-35. O grupo inoculado com AcM anti-CD8⁺ era constituído por 8 camundongos e o grupo tratado com IgG de rato era constituído por 6 camundongos.

Figura 3.4. Efeito da depleção de linfócitos TCD8⁺ no grau de infecção de animais susceptíveis B10.A ao *P. brasiliensis*. Os animais foram tratados com AcM (dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100 µg/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 8 semanas de infecção pelo método de UFC. As linhas verticais representam o E.P.

* Diferença significativa (p<0, 05).

Diferença significativa (p<0,01).

O grupo de camundongos B10.A depletados com AcM H-35 apresentou maior carga fúngica pulmonar ($5,76 \pm 0,13 \log_{10}$) do que o grupo controle ($5,03 \pm 0,37 \log_{10}$); a carga fúngica no fígado foi igualmente maior no grupo depletado ($3,17 \pm 0,18 \log_{10}$) do que no controle ($1,84 \pm 0,48 \log_{10}$), contudo os animais depletados não apresentaram aumento da carga fúngica no baço ($2,79 \pm 0,41 \log_{10}$) quando comparados com os seus controles ($1,62 \pm 0,67 \log_{10}$).

4) Avaliação da Resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT).

Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais, realizamos o teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT no coxim plantar) em camundongos A/J e B10.A depletados de linfócitos TCD4⁺ e seus respectivos grupos controles que receberam nos mesmos tempos doses equivalentes de imunoglobulina normal de rato. Os grupos dos animais B10.A (depletado e IgG) do experimento de 4 semanas eram ambos constituído de 17 animais, e o grupo do experimento de 8 semanas era constituído de 11 animais depletados e 8 que receberam IgG. Os grupos de animais A/J (depletado e IgG) do experimento de 4 semanas eram ambos constituído de 13 animais, e o grupo do experimento de 8 semanas era constituído de 11 animais depletados e 10 que receberam IgG. A figura 4.1 mostra a média dos valores obtidos no teste de HTT em mm em camundongos depletados da linhagem A/J e B10.A e de seus respectivos controles (IgG), após 4 semanas e 8 semanas de infecção.

Figura 4.1. Efeito do tratamento com o AcM GK1.5 (dias -2 e -1 com 200 μ g/camundongo e a cada 7 dias com 100 μ g/camundongo) na resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT) em camundongos A/J e B10.A machos, após 4 e 8 semanas da infecção i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P.brasiliensis*. As linhas verticais representam o E.P. A linha horizontal tracejada representa a média + 2 D.P. (intervalo de confiança 95%) da reatividade de animais normais, não infectados e inoculados com antígeno na pata.

Podemos observar que o grupo depletado de linfócitos TCD4⁺ dos animais A/J e sacrificados após 4 semanas apresentou reação negativa ao teste de HTT ($0,08 \pm 0,017$) quando comparados com os seus respectivos controles ($0,18 \pm 0,012$). Os animais após 8 semanas, também apresentaram uma menor reação ao antígeno de Fava Netto ($0,09 \pm 0,03$) do que o grupo tratado com IgG ($0,14 \pm 0,03$).

Analisando o teste de HTT dos animais B10.A, observamos que os animais infectados depletados ($0,09 \pm 0,02$) apresentaram valores semelhantes aos dos animais infectados e tratados com IgG ($0,12 \pm 0,02$) após 4 semanas de infecção e ambos os grupos apresentaram discreta reatividade ao antígeno de Fava Netto. Ambos os grupos de 8 semanas de infecção, mostraram-se

anérgicos, o grupo tratado com o AcM GK1.5 apresentou inchaço de pata no valor de $0,04 \pm 0,01$ e o grupo tratado com IgG $0,04 \pm 0,011$

Camundongos resistentes da linhagem A/J e B10.A foram tratados com anticorpo monoclonal anti-TCD8⁺ (H-35) nos dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100µg/camundongo, e após 8 semanas da infecção i.t. com o *P. brasiliensis* foram sacrificados. Esquema equivalente empregando IgG normal de rato foi utilizado nos grupos controles. Na figura 4.2, apresentamos a média dos valores obtidos no teste de HTT; o grupo de animais A/J tratados com o AcM H-35 era composto por 7 camundongos e o grupo tratado com γ-globulina normal de rato composto de 4 camundongos. Os grupos de animais B10.A eram constituído de 8 animais depletados e 6 animais tratados com IgG.

Figura 4.2. Efeito do tratamento com o AcM H-35 (dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100µg/camundongo) na resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT) em camundongos A/J e B10.A machos, após 8 semanas de infecção i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P.brasiliensis*. As linhas verticais representam o E. P. A linha horizontal tracejada representa a média + 2 D.P. (intervalo de confiança 95%) da reatividade de animais normais, não infectados e inoculados com antígeno na pata.

Ambos os grupos de camundongos A/J, o depletado de linfócitos TCD8⁺ ($0,14 \pm 0,006$) e o tratado com IgG ($0,15 \pm 0,03$) apresentaram-se reativos ao antígeno de Fava Netto, quando comparados ao grupo de animais normais, não infectados. A depleção de linfócitos TCD8⁺ não alterou este comportamento.

Como podemos notar na figura 4.2, os animais B10.A que receberam o AcM H-35, reverteram a anergia característica da linhagem, e apresentaram intensa reatividade ($0,15 \pm 0,007$) ao antígeno. O grupo que foi tratado com IgG manteve-se anérgico ($0,02 \pm 0,01$).

5) Caracterização isotípica dos anticorpos anti-*P. brasiliensis*

Uma vez que as células T, através de algumas das citocinas por elas produzidas, têm um importante papel na regulação da resposta imune humoral assim como no “switching” para os diferentes isótipos, propusemo-nos a estudar, no nosso modelo, a resposta imune humoral dos animais B10.A e A/J depletados ou não de linfócitos TCD4⁺ ou TCD8⁺ infectados i.t. com o fungo. Os níveis de anticorpos específicos foram determinados por método imunoenzimático (ELISA) como descrito no item 9 e a análise estatística como descrito no item 11 de Material e Métodos.

5.1) Efeito da depleção de linfócitos TCD4⁺ na produção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* (Fig.5.1)

5.1.1) Nos camundongos A/J a depleção de linfócitos TCD4⁺ reduziu a produção de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*. Na 4^a semana pós-infecção a produção do isótipo IgG1 dos animais tratados foi significativamente menor quando comparadas com o seu grupo controle. Após 8 semanas da infecção i.t., a redução na produção de anticorpos apresentou-se mais acentuada, e os camundongos tratados apresentaram diminuição significativa na produção de Ig Total e dos isótipos IgG1, IgG2a e IgG2b quando comparados ao seu grupo controle (Fig 5.1).

5.1.2) Em ambos os tempos de infecção, os camundongos B10.A depletados apresentaram redução na produção de Ig Total e dos isótipos IgG1 e IgG2b quando comparados ao seu grupo controle (Fig 5.1).

Em resumo: o tratamento com o AcM GK1.5 induziu modificações marcantes na produção de anticorpos específicos por ambas as linhagens de camundongos. Estes efeitos foram mais marcantes no tempo de 8 semanas pós-infecção do que no de 4 semanas.

A/J **B10.A** **continua**

Figura 5.1. Níveis de anticorpo séricos anti-*P. brasiliensis* (Ig Total, IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) em camundongos A/J e B10.A machos, infectados i.t com leveduras de *P. brasiliensis* tratados com anticorpo monoclonal (AcM) GK1.5 (anti-CD4) nos dias -2 e -1 com 200µg/ml/camundongo e a cada 7 dias com 100µg/ml/camundongo ou tratados com a mesma dose com gamaglobulina normal de rato (IgG). As linhas verticais representam o E.P.

(*) $p < 0,05$.

(#) $p < 0,01$.

(+) $p < 0,001$.

5.2) Efeito da depleção de linfócitos TCD8⁺ na produção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* (Fig.5.2)

5.2.1) Nos camundongos A/J, a depleção da subpopulação TCD8⁺, após 8 semanas de infecção, não alterou a produção de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*, os camundongos tratados com o AcM H-35 não apresentaram diferença em relação ao grupo controle (Fig 5.2).

5.2.2) Nos camundongos B10.A, o tratamento com o AcM aumentou significativamente os níveis de produção de Ig Total e de IgM quando comparados com o grupo controle, após 8 semanas de infecção (Fig 5.2).

O tratamento com o AcM H-35 não induziu modificações marcantes na produção de anticorpos específicos pela linhagem A/J e B10.A. Este fato demonstra que os linfócitos TCD8⁺ possuem pouca ou nenhuma participação na resposta imune humoral após 8 semanas de infecção.

continua

Figura 5.2. Níveis de anticorpo séricos anti-*P. brasiliensis* (Ig Total, IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) em camundongos A/J e B10.A machos, infectados i.t com leveduras de *P. brasiliensis* tratados com anticorpo monoclonal (AcM) H-35 (anti-CD8) nos dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100µg/camundongo ou tratados com a mesma dose com gamaglobulina normal de rato (IgG). As linhas verticais representam o E.P.

(*) $p < 0,05$.

6) Caracterização das citocinas pulmonares.

A determinação da concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias nos sobrenadantes dos macerados pulmonares foi estabelecida através de ELISA de captura como descrito no item 10 de Material e Métodos.

6.1) Efeito da depleção de linfócitos TCD4⁺ na produção das citocinas pulmonares.

Apresentaremos a seguir os resultados obtidos na dosagem das citocinas pulmonares dos animais A/J e B10.A depletados com 200µg/camundongo de AcM anti-CD4⁺ (GK1.5) nos dias -2 e -1 e semanalmente com 100µg/camundongo, e o seu grupo controle que recebeu ao mesmo tempo a mesma dose de IgG de rato. Os animais foram sacrificados 4 e 8 semanas após a infecção i.t. com o *P. brasiliensis*. Ambos os grupos (depletado e controle) eram constituído por 6 animais cada.

6.1.1) Níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 pulmonar (figura 6.1.1).

Os animais A/J depletados apresentaram, após 8 semanas de infecção, diferença significativa na produção de IL-4 e IL-5 e IL-10 pulmonar quando comparados aos seus respectivos controles que receberam IgG de rato.

Os animais B10.A depletados, em ambos os tempos de infecção, não apresentaram diferença nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 pulmonar quando comparados aos seus controles.

A análise comparativa, entre as linhagens, da produção de citocinas do tipo Th₂ demonstra que camundongos resistentes (A/J) produzem mais IL-4 que animais B10.A. O mesmo ocorre com relação a IL-10 na 8ª semana pós-infecção. Animais A/J secretam IL-4 em níveis superiores aos controles normais, enquanto que, os susceptíveis apresentam níveis semelhantes aos animais controle.

Ambas as linhagens produzem IL-10 após a infecção com o fungo e valores altos desta citocina foram encontrados no grupo A/J IgG de 8 semanas.

Em conjunto, estes dados mostram que camundongos A/J produzem mais citocinas Th₂ (IL-4 e IL-10) no sítio de infecção que camundongos B10.A.

6.1.2) Níveis de IL-12, IFN- γ e IL-2 pulmonar (figura 6.1.2).

A análise em conjunto da produção de citocinas pró-inflamatórias demonstra que camundongos A/J secretam níveis mais elevados de IL-12, IFN- γ e IL-2 que animais B10.A.

Animais A/J depletados, após 4 semanas de infecção, não apresentaram redução na produção de IL-2 e IFN- γ , mas apresentaram redução significativa na produção de IL-12 quando comparados com seu respectivo grupo controle. No entanto, após 8 semanas, os camundongos depletados não apresentaram diferenças nos níveis de IL-12 e IFN- γ , porém apresentaram diminuição

significante na produção de IL-2 pulmonar quando comparados ao seu grupo controle.

Os camundongos B10.A depletados não apresentaram diferença significativa na produção de IL-12, IFN- γ e IL-2 pulmonar quando comparados aos seus respectivos controles que receberam IgG de rato, com exceção da 8ª semana da infecção, quando os animais depletados apresentaram aumento significativo de IL-12.

6.1.3) Níveis de IL-3 e GM-CSF pulmonar (figura 6.1.3).

Como pode ser verificado na Fig. 6.1.3, camundongos A/J produzem mais GM-CSF no pulmão que camundongos B10.A. A secreção de IL-3 é pequena em ambas as linhagens.

Animais A/J depletados, após 8 semanas de infecção, apresentaram redução significativa na produção de GM-CSF quando comparados com seu respectivo grupo controle.

Animais B10.A, em ambos os tempos de infecção, não apresentaram diferenças nos níveis de IL-3 e GM-CSF pulmonar entre os animais depletados e controle.

Figura 6.1.1. Efeito do tratamento com o AcM GK1.5 (dias -2 e -1 com 200 μ g/camundongo e a cada 7 dias com 100 μ g/camundongo) nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 pulmonar em camundongos A/J e B10.A machos, após 4 e 8 semanas da infecção i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P.brasiliensis*. As linhas verticais representam o E.P.

* Diferença significativa ($p < 0,05$)

Diferença significativa ($p < 0,01$)

Figura 6.1.2. Efeito do tratamento com o AcM GK1.5 (dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100µg/camundongo) nos níveis de IL-12, IFN-γ e IL-2 pulmonar em camundongos A/J e B10.A machos, após 4 e 8 semanas da infecção i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P.brasiliensis*. As linhas verticais representam o E.P.

* Diferença significativa ($p < 0,05$)

Diferença significativa ($p < 0,01$)

Figura 6.1.3. Efeito do tratamento com o AcM GK1.5 (dias -2 e -1 com 200µg/camundongo e a cada 7 dias com 100µg/camundongo) nos níveis de IL-3 e GM-CSF pulmonar em camundongos A/J e B10.A machos, após 4 e 8 semanas da infecção i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P.brasiliensis*. As linhas verticais representam o E.P.

* Diferença significativa ($p < 0,05$)

6.2) Efeito da depleção de linfócitos TCD8⁺ na produção das citocinas pulmonares

Apresentaremos a seguir os resultados obtidos na dosagem das citocinas pulmonares dos animais A/J e B10.A depletados com 200µg/camundongo de AcM anti-CD8⁺ (H-35) nos dias -2 e -1 e semanalmente com 100µg/camundongo, e o seu grupo controle que recebeu ao mesmo tempo a mesma dose de IgG de rato. Os animais foram sacrificados 8 semanas após a infecção i.t. com o *P. brasiliensis*. O grupo controle da linhagem A/J era composto por 4 animais e o grupo depletado era composto por 7 animais. Ambos os grupos (controle e depletado) da linhagem B10.A eram compostos por 6 animais cada.

6.2.1) Níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 pulmonar (figura 6.2.1).

Os animais A/J tratados com o AcM H-35, sacrificados após 8 semanas, apresentaram aumento de IL-4, IL-5 e IL-10, porém somente a diferença de IL-4 apresentou-se em níveis significativos quando comparados ao seu respectivo controle que recebeu IgG de rato.

Camundongos B10.A infectados (IgG) produz níveis de IL-4 e IL-5 equivalentes ao dos animais normais. A IL-10 é produzida em níveis mais altos. A depleção de células TCD8⁺ não alterou significativamente a produção de nenhuma das três citocinas Th₂.

6.2.2) Níveis de IL-12, IFN- γ e IL-2 pulmonar (figura 6.2.2).

Na 8ª semana de infecção a comparação entre os grupos B10.A e A/J somente infectados e tratados com IgG demonstra que camundongos A/J secretam maiores quantidades de IFN- γ e IL-2 que animais B10.A.

Animais A/J depletados apresentaram aumento significativo nos níveis de IL-12 pulmonar quando comparados aos animais controles, no entanto, apresentaram redução significativa de IL-2 e não apresentaram alteração nos níveis de IFN- γ pulmonar quando comparado ao grupo tratado com IgG

Os camundongos B10.A depletados apresentaram aumento significativo nos níveis de IL-12 e IFN- γ pulmonar quando comparado com o grupo tratado com IgG de rato, porém não apresentaram diferença nos níveis de IL-2 pulmonar.

6.2.3) Níveis de IL-3 e GM-CSF pulmonar (figura 6.2.3).

Animais A/J tratados com o AcM H-35, após 8 semanas de infecção, apresentaram aumento nos níveis de IL-3 e GM-CSF pulmonar ao serem comparados com os animais controles.

Os camundongos B10.A depletados, assim como os animais A/J, apresentaram aumento significativo nos níveis de IL-3, porém não apresentaram diferença nos níveis de GM-CSF pulmonar quando comparados ao seu grupo controle.

Figura 6.2.1. Efeito do tratamento com o AcM H-35 (dias -2 e -1 com 200 μ g/camundongo e a cada 7 dias com 100 μ g/camundongo) nos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 pulmonar em camundongos A/J e B10.A machos, após 8 semanas da infecção i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P.brasiliensis*. As linhas verticais representam o E.P.

Diferença significativa ($p < 0,01$)

Figura 6.2.2. Efeito do tratamento com o AcM H-35 (dias -2 e -1 com 200 μ g/camundongo e a cada 7 dias com 100 μ g/camundongo) nos níveis de IL-12, IFN- γ e IL-2 pulmonar em camundongos A/J e B10.A machos, após 8 semanas da infecção i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P.brasiliensis*. As linhas verticais representam o E.P.

* Diferença significativa ($p < 0,05$)

Diferença significativa ($p < 0,01$)

Figura 6.2.3. Efeito do tratamento com o AcM H-35 (dias -2 e -1 com 200 μ g/camundongo e a cada 7 dias com 100 μ g/camundongo) nos níveis de IL-3 e GM-CSF pulmonar em camundongos A/J e B10.A machos, após 8 semanas da infecção i.t. com 1×10^6 leveduras viáveis do *P.brasiliensis*. As linhas verticais representam o E.P.

* Diferença significativa ($p < 0,05$)

Diferença significativa ($p < 0,01$)

Tabela Geral de Resultados

Tabela Geral de Resultados

	4ª semana pós -infecção				8ª semana pós-infecção			
	A/J		B10.A		A/J		B10.A	
	IgG normal	α CD4	IgG normal	α CD4	IgG normal	α CD4	IgG normal	α CD4
Carga fúngica no rimão (UFC/log ₁₀)	5,57 ± 0,11	5,58 ± 0,18	5,73 ± 0,10	5,87 ± 0,08	5,78 ± 0,17	↓ * 5,01 ± 0,19	5,91 ± 0,12	5,97 ± 0,06
Carga fúngica no gado (UFC/log ₁₀)	0,40 ± 0,20	↑ #1,37 ± 0,26	1,92 ± 0,16	1,95 ± 0,22	0,36 ± 0,22	0,0 ± 0,0	2,51 ± 0,16	2,23 ± 0,19
Carga fúngica no baço (UFC/log ₁₀)	0,0 ± 0,0	0,65 ± 0,32	1,26 ± 0,32	1,22 ± 0,31	0,14 ± 0,13	0,49 ± 0,31	1,45 ± 0,38	1,51 ± 0,32
HTT	0,18 ± 0,01	↓ 0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,14 ± 0,03	↓ 0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Anticorpos específicos		↓ IgG1		↓ IgG total, IgG1, IgG2b		↓ IgG total, IgG1, IgG2a, IgG2b		↓ IgG total, IgG1, IgG2b
Citocinas pulmonares		↓ IL-12				↓ IL-10, IL-4, IL-5, GM-CSF, IL-2.		↑ IL-12

* p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle

p<0,01 em relação ao respectivo grupo controle

Tabela Geral de Resultados

	8ª semana pós -infecção			
	A/J		B10.A	
	IgG normal	α CD8	IgG normal	α CD8
Carga fúngica no pulmão (UFC/log ₁₀)	4,7 ± 0,33	$\uparrow$ #5,48 ± 0,10	5,03 ± 0,37	$\uparrow$ *5,76 ± 0,13
Carga fúngica no fígado (UFC/log ₁₀)	1,49 ± 0,86	0,93 ± 0,33	1,84 ± 0,48	$\uparrow$ #3,17 ± 0,18
Carga fúngica no baço (UFC/log ₁₀)	0,61 ± 0,61	0,36 ± 0,36	1,62 ± 0,67	2,79 ± 0,41
HTT	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,006	0,02 ± 0,01	$\uparrow$ 0,15 ± 0,007
Anticorpos específicos				$\uparrow$ IgG total, IgM
Citocinas pulmonares		$\uparrow$ IL-4, IL-3, GM-CSF, IL-12 $\downarrow$ IL-2		$\uparrow$ IL-12, IL-3 IFN- γ ,

* p<0,05 em relação ao respectivo grupo controle

p<0,01 em relação ao respectivo grupo controle

Discussão

Discussão

Considerando que a Paracoccidioidomicose é, provavelmente adquirida pela via respiratória (Gonzalez-Ochoa, 1956 apud Wanke & Londero, 1994; Restrepo, 1985; Wanke & Londero, 1994), estudamos a função dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nesta doença utilizando duas linhagens de camundongos isogênicos inoculados pela via intratraqueal com isolado virulento do fungo (Pb 18).

Experimentos com camundongos BALB/c atímicos e eutímicos (Burger et al.; 1996) confirmaram a importância dos linfócitos T na PCM experimental. A doença é mais grave nos animais deficientes em linfócitos T do que naqueles suficientes para esta população celular.

Analisando o papel desempenhado por linfócitos TCD8⁺ na PCM, Cano et al. (2000) demonstraram que estas células são fundamentais para a proteção de animais susceptíveis e também desempenham papel ativo, no controle da carga fúngica de animais A/J.

Não há trabalho na literatura que analise diretamente a função dos linfócitos TCD4⁺ na PCM. Nosso laboratório, entretanto, na tese de doutorado de Luz Elena Cano Restrepo, verificou que a depleção de células TCD4⁺ não alterava a gravidade da infecção produzida por isolado pouco virulento do *P. brasiliensis*. Ao contrário de outras patologias [histoplasmose (Gómez, A. M. et al.; 1988), criptococose (Buchanan et al, 2000), por exemplo], o isolado de baixa virulência não levou a doença mais grave tanto em animais susceptíveis como resistentes. Este dado sugeriu que linfócitos TCD4⁺, pelo menos para o

isolado pouco virulento, não exercem controle fundamental na gravidade da doença.

Com a intenção de determinar se os linfócitos TCD4⁺ estão envolvidos na proteção da PCM, resolvemos depletar *in vivo* esta subpopulação celular de animais resistentes (A/J) e susceptíveis (B10.A) e coloca-los frente ao isolado virulento Pb 18.

Os camundongos foram depletados com uso de anticorpo monoclonal, antes e após infecção intratraqueal com leveduras do fungo, e o grau da doença foi analisado após 4 e 8 semanas.

Sabemos, após verificação por citometria de fluxo, que o anticorpo monoclonal GK1.5 inoculado nos animais produziu o efeito esperado, levando a uma porcentagem de redução igual a 99 em animais A/J e 98,75 em animais B10.A, após dois dias consecutivos de inoculação de AcM, o que equivale ao dia zero da inoculação do fungo.

O grau de infecção foi avaliado pela cultura dos órgãos (pulmões, fígado e baço) pela técnica de UFC. Após 4 semanas de infecção camundongos A/J depletados de linfócitos TCD4⁺ apresentaram maior disseminação fúngica para o fígado, porém a carga fúngica do pulmão e baço dos animais depletados e controle não diferiram estatisticamente. Porém, após oito semanas de infecção, os animais A/J tratados com GK1.5 apresentam redução significativa da carga fúngica pulmonar quando comparados aos animais controle, mas o número de leveduras viáveis no fígado e no baço não foi estatisticamente diferente entre os grupos. Logo, os linfócitos TCD4⁺, na 4^a semana de infecção, de camundongos resistentes parecem ter uma função protetora; no entanto, na 8^a semana, esta função protetora é substituída por uma função exacerbadora da doença.

Nos animais depletados da linhagem B10.A, a carga fúngica dos órgãos analisados foi análoga ao do grupo controle, em ambos os tempos de infecção. Inesperadamente, para animais susceptíveis, linfócitos TCD4⁺ não se mostram ativos, e tanto a gravidade da doença como os testes de HTT parecem não sofrer qualquer influência da depleção desta subpopulação celular.

Os camundongos A/J depletados, após quatro semanas de infecção apresentaram uma resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT) diminuída. Por outro lado, os camundongos B10.A, após o mesmo período de infecção, não apresentaram alterações no teste de HTT, isto é, os animais apresentaram baixas reações cutâneas com ou sem depleção de linfócitos TCD4⁺. Estes dados sugerem que, na 4^a semana pós-infecção, as reações de HTT de animais resistentes são mediadas, ao menos parcialmente, por linfócitos TCD4⁺, enquanto que animais susceptíveis estas reações não recebem a influência desta subpopulação linfocitária.

Na 8^a semana pós-infecção, a resposta do HTT nos animais A/J, igualmente à 4^a semana, diferiu entre os grupos. Já os animais B10.A, mantiveram a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio negativa frente ao antígeno de Fava Netto.

Nossos dados demonstram que camundongos A/J desenvolvem linfócitos TCD4⁺ mediadores de reações de HTT e a sua depleção leva a anergia destas reações. Nos animais B10.A, entretanto, há pequena mobilização de linfócitos TCD4⁺ na 4^a semana que, entretanto, comportam-se como anérgicos na 8^a semana da doença.

De forma geral, os linfócitos TCD4⁺, não parecem exercer função essencial nos mecanismos de proteção na PCM de animais susceptíveis, pois não observamos nenhuma diferença entre os animais tratados e seus controles. Nos animais resistentes, entretanto, pudemos observar uma dupla função da

subpopulação TCD4⁺: é protetora do fígado na 4^a semana pós-infecção, porém é exacerbadora da doença pulmonar na 8^a semana.

Em relação ao ensaio de HTT, os animais resistentes (A/J) apresentaram após quatro e 8 semanas de infecção, diminuição da resposta celular frente ao antígeno de Fava Netto. Os animais B10.A de fracamente positivos na 4^a semana, tomam-se anérgicos a resposta de HTT na 8^a semana. Nos camundongos A/J a melhora do quadro infeccioso pulmonar esteve associado à redução nas respostas de hipersensibilidade do tipo tardio. Este fato não é usual na doença humana (Franco, M.; 1987) uma vez que o tratamento com a melhora clínica dos pacientes associa-se, em muitas ocasiões, a reversão da anergia nos testes cutâneos.

Nos camundongos B10.A a depleção das células TCD4⁺ em ambos os pontos experimentais analisados, não alterou a gravidade da doença (quando medida pelo número de UFC), e a fraca reatividade do HTT na 4^a semana passou a ser negativa na 8^a semana. Estes dados sugerem que na PCM de animais susceptíveis induzida pela via pulmonar, os linfócitos TCD4⁺ não são as principais células reguladoras do crescimento fúngico e da imunidade celular. De fato, trabalho prévio de nosso laboratório (Cano, L. E. et al.; 2000) demonstrou que na linhagem B10.A, os linfócitos TCD8⁺ são extremamente importantes no controle da carga fúngica pulmonar e disseminação das leveduras para o fígado e baço. Este trabalho também demonstrou que há uma subpopulação TCD8⁺ que controla negativamente as reações de HTT. Nos animais depletados *in vivo* de linfócitos TCD8⁺ houve um aumento significativo nas reações cutâneas contra o antígeno apesar da presença de doença mais grave. Estes resultados foram reproduzidos em nosso trabalho, ao depletarmos camundongos resistentes (A/J) e susceptíveis com o AcM H-35 (anti-CD8⁺).

Podemos questionar se uma resposta positiva ao teste de HTT significa proteção. Murphy et al. (1998) compararam a resposta ao teste de HTT entre

camundongos imunizados com antígeno proveniente do filtrado de cultura de *Cryptococcus neoformans* em adjuvante completo de Freund's (CFA) e camundongos imunizados com células mortas por aquecimento do mesmo fungo (HKC). O CFA induziu células TCD4⁺ responsável pela reatividade ao HTT e pela amplificação da resposta anti-criptocócica, e os animais que receberam CFA apresentaram melhor resposta protetora, com menor número de fungos nos tecidos, maior tempo de sobrevivência e menores lesões cerebrais. Enquanto que, o HKC induziu células TCD4⁺ e TCD8⁺ responsáveis pela resposta ao HTT e células T ativadas contra o fungo, entretanto, os camundongos imunizados com HKC não apresentaram resposta protetora equivalente aos animais imunizados com CFA, e sua resposta foi similar aos animais controles.

Nichols et al. (2002) utilizando um imunógeno que confere uma resposta imunoprotetora anti-criptocócica e um imunógeno não protetor, verificaram que animais imunizados com o imunógeno protetor apresentam uma clássica resposta de HTT caracterizada pela presença de células mononucleares e neutrófilos e a presença de Interferon gama (IFN- γ) e Óxido Nítrico. Em contraste, camundongos imunizados com o imunógeno não protetor apresentaram influxo inicial de neutrófilos e produção de TNF-alfa no sítio da reação de HTT.

Comparando estes dados apresentados acima e os resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a resposta positiva a um teste de HTT pode ou não ser protetora, destacando a complexidade do sistema imune.

Nosso laboratório demonstrou em trabalho recente que o Óxido Nítrico é importante mediador do efeito fungicida e é produzido por macrófagos de animais susceptíveis e resistentes. No entanto, camundongos susceptíveis produzem níveis muito elevados de NO e este fato leva a fenômeno imunossupressivo (Nascimento et al., 2002). Como os linfócitos TCD4⁺ não

funcionaram como células reguladoras da gravidade da doença na PCM pulmonar de camundongos susceptíveis, pode-se especular que o principal mecanismo que leva à susceptibilidade de camundongos B10.A não é mediado por linfócitos TCD4⁺ e que a reatividade desta população estaria inibida pelos efeitos supressores do NO.

Pela técnica de UFC, camundongos A/J depletados de linfócitos TCD8⁺ apresentaram aumento da carga fúngica pulmonar após 8 semanas de infecção, porém o número de leveduras viáveis recuperadas do fígado e do baço não foi diferente do grupo controle. Os animais B10.A depletados, no mesmo tempo de infecção, apresentaram aumento da carga fúngica no pulmão e no fígado, no entanto, o baço não apresentou aumento significativo no número de leveduras quando comparado ao controle. Os linfócitos TCD8⁺, como foi observado por Cano, L. E. et al. (2000), exercem função protetora nos animais de ambas as linhagens.

A resposta ao teste de hipersensibilidade do tipo tardio, em animais A/J, foi analogamente positiva em ambos os grupos. Porém, a anergia comum aos animais B10.A, foi revertida nos animais depletados de linfócitos TCD8⁺, e estes apresentaram alta reatividade ao teste de HTT, como já constatado anteriormente por Cano, L. E. et al. (2000).

Trabalhos de diferentes grupos têm demonstrado que as células TCD8⁺ contribuem na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Tarleton; 1990), *Toxoplasma gondii* (Brown & McLeod; 1990), *Leishmania ssp.* (Farrell et al.; 1989), *Histoplasma capsulatum* (Deepe, Jr.; 1994) e *Cryptococcus neoformans* (Huffnagle et al., 1991), entre outros.

A inoculação intraperitoneal do anticorpo monoclonal H-35, após 2 dias consecutivos, o que equivaleria ao dia da inoculação intratraqueal do fungo, levou a uma porcentagem de redução de linfócitos TCD8⁺ de 97,38 nos animais A/J e 94,51 nos animais B10.A.

Pode-se especular que a depleção por via i.p. altera somente a população linfocitária do baço e não do pulmão e dos linfonodos drenantes do sítio de infecção. Este fato pode ser verdadeiro, e poderá ser verificado pela análise de linfócitos infiltrantes de pulmão e linfonodos do mediastino. Entretanto, em trabalho anterior (Cano et al, 2000) de depleção de linfócitos TCD8⁺ usando o mesmo AcM e a mesma via e protocolo de tratamento, verificamos que o procedimento altera concomitantemente o número dos linfócitos esplênicos, dos infiltrantes do pulmão, e daqueles obtidos através do lavado bronco-alveolar.

Bloom et al. (1992) propuseram um modelo de supressão por células T, das propriedades inter-reguladoras das linfocinas e da capacidade diferencial de apresentação de antígenos por distintas APC. Estes autores propõem um novo modelo de supressão por células T, baseado nas diferentes subpopulações funcionais de células CD4⁺ e CD8⁺ que reconhecem antígeno ou idiótipo no contexto de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CPH). Células TCD4⁺, CPH classe II restritas, e células TCD8⁺, CPH classe I restritas, estariam subdivididas em tipo 1 ou 2, dependendo do padrão de citocinas secretadas, o qual confere-lhes uma participação diferencial importante nos diversos mecanismos envolvidos na resposta imune. Assim, as células TCD4⁺ do tipo 1 estariam envolvidas principalmente na resposta de HTT e, de forma mais secundária, seriam inibidoras da resposta imune humoral pela supressão de células B; as células TCD4⁺ do tipo 2, pelo contrário, seriam auxiliadoras da resposta imune humoral e, de forma secundária, inibidoras da resposta de HTT. Por outro lado, as células TCD8⁺ do tipo 1 apresentam

principalmente uma atividade citotóxica e, secundariamente, uma atividade supressora das células B. Já as células TCD8⁺ tipo 2 exercem, principalmente, uma função supressora na resposta de HTT e secundariamente, são auxiliaadoras da resposta imune humoral.

Levando esta hipótese em consideração, pelos dados obtidos nos animais A/J em relação à resposta ao teste de hipersensibilidade do tipo tardio, poderíamos supor que as principais células reguladoras da resposta ao HTT seriam da subpopulação TCD4⁺ do tipo 1, já que observamos anergia nas reações de HTT quando depletamos os linfócitos TCD4⁺, e uma resposta positiva e inalterada ao teste nos animais depletados somente de TCD8⁺.

Ao contrário, nos animais B10.A verificamos que as células TCD8⁺ do tipo 2 seriam as principais reguladoras na resposta ao HTT talvez mediada por células TCD4⁺ do tipo 1, já que animais depletados de TCD4⁺ mantiveram-se anérgicos e os animais depletados de TCD8⁺ apresentaram-se hiperérgicos.

Poderíamos sugerir que nos animais A/J, na 8ª semana de infecção com o fungo *P. brasiliensis*, os linfócitos TCD4⁺ tipo 2 (Th₂) e os linfócitos TCD8⁺ tipo 1 seriam as principais células na resposta imune pulmonar, pois camundongos A/J depletados de TCD4⁺ apresentaram redução da carga fúngica pulmonar, o que sugere, que no pulmão as células TCD4⁺ são exacerbadoras da doença, levando nos a acreditar que sejam da subpopulação Th₂. Porém, quando estes animais foram depletados de linfócitos TCD8⁺ houve um aumento da carga fúngica pulmonar, levando nos a inferir que estes linfócitos TCD8⁺ seriam do tipo 1, que apresentam alta atividade citotóxica. Fato semelhante foi descrito na criptococose por Huffnagle et al. (1991) que verificaram o papel das células TCD4⁺ e TCD8⁺ na infecção criptocócica em camundongos infectados intratraquealmente. Após depleção dos linfócitos TCD4⁺ por injeções de AcM específico para CD4⁺, os autores observaram aumento significativo na colonização do cérebro e baço. No entanto, a depleção das células TCD4⁺ não

alterou o influxo de células TCD8⁺ nos pulmões. Surpreendentemente, a depleção de células TCD8⁺ por AcM específico levou a um pequeno, mas significativo aumento na colonização do cérebro e baço. O influxo de células TCD4⁺ para o pulmão foi independente da presença dos linfócitos TCD8⁺. Em pulmões analisados histopatologicamente, verificaram numerosas células do fungo intactas em animais depletados de linfócitos TCD8⁺, mas este fato não foi visto em camundongos controle e depletados de células TCD4⁺. Os autores propuseram que os linfócitos TCD4⁺ podem recrutar e ativar fagócitos efetores, enquanto que, as células TCD8⁺ têm uma função predominantemente de lise. Análise histopatológica de órgãos colhidos após os vários esquemas de tratamento, poderão nos auxiliar na interpretação dos dados aqui relatados.

Os linfócitos T reconhecem antígenos somente quando expressos pelas APC (Célula Apresentadora de Antígeno) no contexto de moléculas do CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade); ao mesmo tempo, este reconhecimento antigênico restrito pelo CPH é diferencial para as distintas subpopulações linfocitárias. As células TCD4⁺ reconhecem antígenos no contexto de moléculas de Classe II do CPH, enquanto que as células CD8⁺ nas de Classe I. De forma geral os antígenos apresentados no contexto de moléculas de Classe I do CPH são peptídeos de antígenos endógenos processados em compartimentos celulares não lisossomais, provavelmente no citosol da APC. A grande maioria destes antígenos endógenos correspondem a produtos virais ou de microorganismos que possuem a capacidade de desenvolver mecanismos de penetração citosólica. Entretanto, foi sugerida uma nova via “alternativa” para o processamento e apresentação de antígenos exógenos particulados no contexto de moléculas de Classe I do CPH (Pfeifer et al., 1993). Este trabalho mostrou que a fagocitose de bactérias, que não tinham mecanismo de penetração citosólica conhecido, pode resultar em apresentação

de antígenos bacterianos por moléculas de Classe I do CPH. Este mecanismo é resistente ao efeito de ciclohexamida e de brefeldina A, as quais bloqueiam a via clássica de processamento de antígenos para classe I. A teoria de uma via alternativa “vacuolar” para o processamento de antígenos exógenos fagocitados e apresentação no contexto de CPH I foi posteriormente confirmada por Kovacsovics-Bankowski et al. (1993) demonstrando que o macrófago possui a capacidade de apresentar eficientemente antígenos exógenos fagocitados no contexto de moléculas de Classe I do CPH. Svensson, M. et al. (1997) demonstraram que células dendríticas estimuladas com fator estimulador de crescimento granulocítico e macrofágico podem processar células intactas e vivas de bactérias Gram-negativa, apresentando os peptídeos pelo CPH Classe I e II. Portanto é plausível a idéia que antígenos de *P. brasiliensis* possam estar sendo apresentados por macrófagos, após a fagocitose do fungo, no contexto de moléculas de Classe I do CPH, sendo possível então o reconhecimento por parte das células CD8⁺ envolvidas no mecanismo de proteção.

As APCs mais estudadas são os macrófagos, células B e células dendríticas, pois se localizam nos tecidos linfóides secundários onde ocorre a ativação dos linfócitos T. Entretanto, estas células diferem na quantidade relativa de antígenos expressos pela Classe II do CPH, na ligação e no processamento de qualquer antígeno e na secreção de fatores co-estimulatórios (Harding, et al., 1989).

Almeida et al (1998) constataram que em animais resistentes (A/Sn), a gp43 purificada, principal componente antigênico do *P. brasiliensis*, foi preferencialmente apresentada por macrófagos resultando em uma produção de linfocinas do tipo Th₁. Por outro lado, em camundongos susceptíveis (B10.A), a gp 43 foi distintamente apresentada por linfócitos B, a qual teve uma forte ativação da subpopulação Th₂. Transpondo esta idéia ao nosso trabalho, visto que a inoculação dos anticorpos monoclonais anti-TCD4 e anti-TCD8

levaram a um aumento de linfócitos B em ambas as linhagens (dados observados na imunofenotipagem por citometria de fluxo), poderíamos supor que este aumento foi capaz de prejudicar a resposta imune em camundongos A/J, visto que os mesmos apresentaram aumento da carga fúngica no fígado 4 semanas após a inoculação do fungo.

Kemeny et al. (1994) sugerem que há subpopulações de células TCD8⁺ funcionalmente distintas, que produzem diferentes combinações de citocinas, e que parecem ter um papel importante na determinação do padrão de citocinas produzidas pelas células TCD4⁺ (Th₁ ou Th₂) e no isótipo das imunoglobulinas expressas por células B. Seguindo este raciocínio, os linfócitos TCD8⁺, para animais B10.A, possuem uma notória importância na regulação do sistema imune, como indicado pela exacerbação da doença pulmonar e maior disseminação para o fígado em animais depletados de células TCD8⁺, mas não nos animais depletados de TCD4⁺.

O fato das células TCD4⁺ mostrarem, surpreendentemente, ter pouca ou nenhuma participação no controle da infecção por *P. brasiliensis* (em camundongos susceptíveis) poderia ser correlacionado ao que ocorre com os pacientes com AIDS, os quais apresentam uma associação muito baixa com a PCM. Embora Bernard & Duarte (2000) acreditem que os casos de coinfeção PCM-HIV tenham aumentado, na maioria dos casos, devido à reativação da infecção latente da doença. Talvez a associação AIDS-PCM só ocorra quando nos pacientes aidéticos ocorra uma diminuição drástica de linfócitos TCD8⁺, em fases avançadas da doença. O número baixo de linfócitos TCD4⁺ não predisporia a riscos aumentados de infecção pelo *P. brasiliensis*. Este fato seria válido para somente alguns patrimônios genéticos.

Por outro lado, as células TCD4⁺ são conhecidas como excelentes células auxiliadoras/indutoras da ativação de células B; assim, as células TCD4⁺, tanto as Th₁ como as Th₂, contribuem na regulação para o “switching”

dos diferentes isótipos de imunoglobulinas (revisado por Mosmann & Coffman, 1989). A influência de várias citocinas na produção de anticorpos, assim como, na expressão dos diferentes isótipos, tem sido documentada (Esser & Radbruch, 1990; Finkelman et al., 1990; Snapper & Paul, 1987). O IFN- γ é considerado o maior indutor do “switch” para a secreção de IgG2a (Bancherau & Rosset, 1992), enquanto que a IL-4 tem sido associada com o “switching” para IgG1 e IgE (no camundongo) e o TGF- β funciona como um importante fator no “switch” para IgA e IgG2b.

A análise em conjunto de nossos dados demonstra que as células TCD4⁺ são potentes reguladoras da produção de anticorpos em ambas as linhagens e as células TCD8⁺ pouco alteram a imunidade humoral ao *P. brasiliensis*.

Camundongos A/J tratados com o AcM GK1.5, após 4 semanas de infecção apresentaram redução na produção de IgG1 anti-*P. brasiliensis*. Após 8 semanas de infecção, os camundongos depletados apresentaram uma queda significativa na produção dos isótipos Ig Total, IgG1, IgG2a e IgG2b. Estes dados demonstram que linfócitos TCD4⁺ em animais A/J são exacerbadores da doença e reguladores da produção de anticorpos, sejam eles regulados por citocinas Th₁ como Th₂. Estes resultados estão em consonância com os achados de UFC e HTT.

Há indicações da presença, nos animais resistentes, de linfócitos TCD4⁺ exacerbadores da doença e reguladores da produção de anticorpos (provavelmente da subpopulação Th₂) e de células TCD4⁺ que regulam positivamente reações de HTT e a produção de anticorpos do isótipo IgG2a (provavelmente do tipo Th₁).

Camundongos B10.A depletados de linfócitos TCD4⁺, após 4 e 8 semanas, apresentaram diminuição na produção de isótipos Ig total, IgG1 e IgG2b. A diminuição de linfócitos TCD4⁺ na linhagem B10.A traduziu-se na produção diminuída de anticorpos totais e no decréscimo de IgG1 (regulado por

IL-4) e IgG2b (regulado por TGF- β). Assim, apesar de a carga fúngica não haver ser alterado, a diminuição dos isótipos Th₂ (IgG1) e regulados por TGF- β (IgG2b) indica que a principal população TCD4⁺ é provavelmente composta pela subpopulação Th₂ ou Th₃ (secretora de TGF- β).

Referente à participação das células TCD8⁺ na produção de anticorpos específicos, assim como no perfil dos isótipos produzidos podemos dizer que a depleção *in vivo*, após 8 semanas, das células CD8⁺ em animais A/J não alterou a produção de Ig total específica, nem a dos diferentes isótipos; no entanto, em animais B10.A verificou-se um incremento significativo nos níveis de Ig total e IgM específica anti-*P. brasiliensis*. Pode-se então inferir a pequena ou ausente participação das células TCD8⁺ na resposta imune humoral de ambas as linhagens.

As citocinas induzidas por um organismo ou antígeno logo após a entrada no corpo influencia se as células T “helper” 0 (Th₀) vão desenvolver-se em células Th₁ que produzem interleucina-2 (IL-2), IFN- γ e TNF- β , ou células Th₂ que auxiliam na maturação de células B. As células Th₂ produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Ambas as células Th₁ ou Th₂ produzem GM-CSF (Janeway & Travers; 1996). As células Th₁ e as linfocinas que elas produzem são associadas com a resposta imune celular, enquanto que as células Th₂ e suas linfocinas são associadas com a imunidade humoral. Se um imunógeno ou organismo estimula macrófago a produzir IL-12, então as células NK são estimuladas a produzir IFN- γ resultando em uma resposta Th₁ (Trinchieri, G.; 1995).

Em geral, em hospedeiros imunocompetentes, os fungos patogênicos induzem preferencialmente células Th₁ ou resposta imune celular, a qual fornece ao hospedeiro alguma proteção. A extensão e eficácia da resposta imune celular na proteção contra os diferentes fungos podem variar

dependendo da rota de infecção, do tecido infectado e a resposta imune local, o padrão genético do hospedeiro, e o isolado que está causando a infecção.

Na PCM, foi verificado a importância do IFN- γ ; camundongos A/Sn e B10.A que tiveram o IFN- γ neutralizado apresentaram exacerbação da infecção pulmonar e disseminação para os órgãos extrapulmonares, e tiveram a sua resposta imune celular comprometida resultando em baixas reações de HTT (Cano et al.; 1998). Foi constatado que esta mesma citocina é pouco secretada em pacientes com PCM ativa (Karhawi, A.S. K. et al.; 2000). Portanto, torna-se evidente que a resposta imune protetora na PCM deva ser sustentada por células do tipo 1, ou por outra fonte secretora de IFN- γ .

A depleção *in vivo* de células TCD4⁺ nos animais A/J e B10.A, após 4 semanas de infecção, não levou a alteração nos níveis de citocinas produzidas quando comparados aos dos animais tratados com IgG de rato. Exceto a interleucina 12, que em animais A/J, teve sua produção significativamente reduzida; no entanto, este fato não levou a alteração da carga fúngica pulmonar destes animais, mas como observamos na 8ª semana de infecção a redução significativa do número de fungos viáveis no pulmão, esta redução da IL-12 pode ter ocorrido pelo o início da queda do estímulo mediado pela carga fúngica. Estes dados de citocinas são compatíveis com os resultados do CFU pulmonar, já que a depleção das células TCD4⁺ não alterou a carga fúngica neste órgão dos animais de ambas as linhagens.

Na 8ª semana de infecção, os animais resistentes (A/J) depletados da subpopulação TCD4⁺ apresentaram níveis de IL-10, IL-4 e IL-5 reduzido, levando-nos a deduzir que houve uma diminuição das células Th₂, e provavelmente esta redução explicaria a redução na carga fúngica pulmonar destes animais. Este fato poderia explicar, também, a redução dos níveis de GM-CSF detectados no mesmo sobrenadante pulmonar, já que com a redução da carga fúngica teríamos a redução do estímulo celular. Foi observada

também uma diminuição de IL-2 concomitantemente a redução nas reações de HTT. Estes dois fatos sugerem que, na 8ª semana da infecção camundongos A/J apresentam linfócitos TCD4 do tipo 1 em concomitância com linfócitos do tipo 2.

Os animais B10.A tratados com AcM anti-CD4⁺ apresentaram níveis de IL-12 aumentados no pulmão, porém o aumento desta interleucina não ocasionou na 8ª semana de infecção alteração na carga fúngica pulmonar. Talvez, este efeito poderia ser notado em um tempo maior de infecção, pois a IL-12 estimula uma resposta imune celular (Trinchieri, G.; 1995), e hipoteticamente poderíamos ter uma redução da carga fúngica pulmonar. Entretanto, como camundongos B10.A e A/J sintetizam citocinas pró e anti-inflamatórias no pulmão, o desbalanceamento de só uma citocina poderia não se traduzir em diferentes números de fungos viáveis no pulmão. Parece ser o balanço final de citocinas que resulta em estados controladores ou não da infecção pulmonar. A análise em conjunto das citocinas nos protocolos de depleção de linfócitos TCD4⁺ demonstra que, ao contrário da produção de anticorpos, esta subpopulação regula mais evidentemente a presença de citocinas pulmonares nos camundongos resistentes.

Nos animais A/J a depleção de linfócitos TCD8⁺ aumenta a carga fúngica pulmonar na presença de níveis diminuídos de IL-2 (marcador Th₁) e aumentada de IL-4 (marcador Th₂). Assim, estes dados sugerem que em animais A/J os linfócitos TCD8⁺ são controladores do crescimento fúngico do pulmão (T citotóxicos?) e possivelmente do tipo 1. Entretanto, este perfil foi acompanhado de aumento concomitante de IL-12, IL-3 e GM-CSF que são mediadores ativadores de células fagocíticas ou fatores de crescimento celular. Este fato parece ser discrepante; entretanto, vários trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório têm consistentemente demonstrado que maiores cargas fúngicas no pulmão (e no fígado) estão associadas com a presença de níveis

mais elevados de IL-12 e GM-CSF. Por exemplo, a depleção de IL-12 ou de leucócitos PMN leva a doença mais grave com aumento de citocinas pró-inflamatórias. Assim, o fungo por si mesmo é grande indutor de citocinas pró-inflamatórias e o seu número aumentado leva à maior produção das mesmas que contudo, não consegue restringir o crescimento do patógeno.

Animais B10.A tratados com AcM anti-CD8⁺ apresentaram, após 8 semanas de infecção, aumento nos níveis de IL-12 e IL-3. Estes achados são compatíveis com os dados do CFU, onde os animais apresentaram aumento da carga fúngica pulmonar que induziriam níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias. Maior infecção associada à produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, que entretanto, não conseguem sobrepujar a falta de linfócitos TCD8⁺ que parecem ser os principais controladores do crescimento fúngico. Estas células podem ter atuação direta, lisando células infectadas, ou ainda, ter atuação indireta, pela liberação de citocinas que levam à ativação de células fagocitárias. O aumento de IFN- γ indica que no pulmão haveria também uma subpopulação TCD8 do tipo 2. Este fato explicaria ou estaria em consonância com o achado de respostas de HTT positivas observadas após a depleção de linfócitos TCD8⁺.

Na resposta imune natural e adquirida participam várias células produtoras de citocinas TCD4⁺, TCD8⁺, T $\gamma\delta$, NK, T-NK, leucócitos PMN, macrófagos, células epiteliais do pulmão, etc. Assim, as citocinas são o reflexo da atividade secretora das diferentes subpopulações celulares e de seus efeitos inibitórios umas sobre as outras. Além disso, o influxo de células inflamatórias (linfócitos T e B, macrófagos, leucócitos PMN) que expressam receptores para citocinas, levam ao consumo dos mediadores produzidos localmente e o que resta no sobrenadante é o que sobrou da complexa interação entre síntese e consumo.

Entretanto, a análise conjunta de nossos dados revela que na PCM as células TCD8⁺ são as grandes reguladoras da produção de citocinas pulmonares. Além disso, o nível de citocinas é proporcional à carga fúngica local.

No entanto, para um melhor entendimento, faz-se necessário à realização de experimentos adicionais, no qual possamos isolar as populações celulares do pulmão no intuito de definir as subpopulações predominantes em um determinado tempo de infecção, e *in vitro* estimulá-las com antígeno de *P. brasiliensis* e determinar o padrão de citocinas secretadas e, até mesmo a atividade fungicida de algumas células.

Em conclusão, nosso trabalho demonstrou diferentes participações de células TCD4⁺ e TCD8⁺ nos mecanismos imunoprotetores e imunorreguladores da PCM de hospedeiros susceptíveis e resistentes. Trabalhos adicionais com subpopulações purificadas de células T poderão trazer subsídios aos achados aqui relatados. Além disso, experimentos realizados com animais geneticamente deficientes de células T (camundongos CD4-nocaute e camundongos CD8-nocaute) poderão complementar e esclarecer a função dessas subpopulações celulares nos mecanismos de resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*.

*Proposta sobre a atividade de
 $TC\mathcal{D}4^+$ e $TC\mathcal{D}8^+$ em B10.A e A/J*

Proposta sobre a atividade de TCD4⁺ e TCD8⁺ em B10.A e A/J

Em animais A/J:

- Linfócitos TCD4⁺:

Tipo 1: Subpopulação protetora na fase inicial da doença e reguladora das respostas de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT);

Tipo 2 : Subpopulação exacerbadora da doença pulmonar em fase mais avançada da PCM e reguladora da imunidade.

- Linfócitos TCD8⁺:

Tipo 1: Subpopulação responsável pela atividade fungicida, e, portanto, protetora na PCM.

TCD4 tipo 1 e 2

→TCD8 tipo 1

Em animais B10.A:

- Linfócitos TCD4⁺:

Tipo 1: Subpopulação anérgica pela ação de células supressoras, mas que pode mediar reações de HTT quando são eliminados os linfócitos TCD8.

Tipo 2: Subpopulação reguladora da resposta imune humoral.

- Linfócitos TCD8⁺:

Tipo 1: Subpopulação responsável pela atividade fungicida, e, portanto protetora na PCM.

Tipo 2: Subpopulação responsável pela supressão da resposta de teste de HTT

Conclusões

Conclusões

Nosso trabalho permitiu as seguintes conclusões:

1) Nos animais A/J os linfócitos TCD4⁺ desempenham um papel protetor e exacerbador da doença dependendo do tempo de infecção. Nos animais susceptíveis estas células não parecem ter função importante no controle da colonização fúngica, pois a depleção dos linfócitos TCD4⁺ não alterou a carga fúngica.

2) Em relação ao teste de HTT, as células TCD4⁺ mostraram-se importantes mediadoras da resposta celular nos animais A/J, e desempenham pequena atividade nesta resposta ao início da doença em animais B10.A.

3) A subpopulação TCD4⁺ é importante reguladora da resposta imune humoral em ambas as linhagens, visto que a depleção *in vivo* acarretou uma queda significativa na produção de anticorpos.

4) Os linfócitos TCD4⁺ parecem ter pequena participação na regulação da produção de citocinas pulmonares nos camundongos B10.A e A/J, pois os animais depletados desta subpopulação praticamente não apresentaram alteração na produção das citocinas pró e anti-inflamatórias; em animais A/J parece haver predomínio de linfócitos TCD4 do tipo 2, secretores de IL-4, IL-5 e IL-10.

5) Os linfócitos TCD8⁺ desempenham importante papel protetor, em ambas as linhagens, e atuam no controle do crescimento fúngico.

6) Nos animais B10.A encontramos duas subpopulações de células TCD8⁺, uma protetora, que controla o crescimento fúngico, e outra inibidora de reações de HTT, visto que a depleção destas células acarretou no incremento da resposta de HTT destes animais. As células TCD8⁺ não participam na resposta de HTT nos animais A/J.

7) Em ambas as linhagens, os linfócitos TCD8⁺ não estão envolvidos na regulação da resposta imune humoral.

8) Os linfócitos TCD8⁺ apresentam importante participação na regulação da produção das citocinas pulmonares pró e anti-inflamatórias nos animais A/J e B10.A (Talvez por sua ação fungicida, direta ou indiretamente).

9) Em conclusão, na PCM, os linfócitos TCD8⁺ são as principais células reguladoras do crescimento fúngico, e reguladoras da produção de citocinas; no entanto, o controle da doença em animais resistentes é parcialmente controlada pelos linfócitos TCD4⁺, que possuem importante papel regulador da resposta imune humoral.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ALBORNOS, M. C. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**. 9: 248-52, 1971.

ALMEIDA, S. R., MORAES J. Z., CAMARGO, Z. P., GESZTESI, J. L., MARIANO, M. & LOPES J.D. Pattern of immune response to gp 43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cell Immunol**. 190(1): 68-76, 1998.

ARANGO, M. Alteraciones de la inmunidad en la paracoccidioidomicosis. Caracas, 1980. (Tesis de grado – Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas).

ARANGO, M. & YARZÁBAL, L. T-cell dysfunction and hypergammaglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. **Mycophatologia**. 79: 115-23, 1982.

ARISTIZABAL, B. H.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. AND RESTRPO, A. Morphological of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells. *In vivo* inhibition in females. **Infect. Immun**. 66(11): 5587-91, 1998.

ASSIS, C. M.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Production of proteinase and phospholipase by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycophatologia**. 146 (1): 13-7, 1999.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; CAMARGO, Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M. & MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasipus novencinctus*) captured in an endemic area of Paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 58(4): 505-512, 1998.

BANCHERAU, J. & ROSSET, F. Human B lymphocytes,: phenotype, proliferation and differentiation. **Adv. Immunol.**, 52: 125-45, 1992.

BECK, J. M.; WARNOCK, M. L.; CURTIS, J.L.; SNIEZECK, M. J.; ARRAG-PEFFER, S. M.; KAETREIDER, H.B.; SHELLITO, J.E. Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 5: 186-197, 1991.

BENARD, G. AND DUARTE, A. J. S. Paracoccidioidomycosis: A model for evaluation of the effects of Human nImmunodeficiency Virus infection on the natural history of endemic tropical diseases. **Clin. Infect. Dis.** 31: 1032-9, 2000.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-2, IFN- γ e IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**. 13 (4): 248-52, 2001.

BERLINER, M. D. & RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia**. 5: 26-9, 1966.

BIAGIONI, L.; SOUZA, M. J.; CHAMMA, L. G.; MENDES, R. P.; MARQUES, S.; MOTA, N. G. S.; FRANCO, M. Serology of Paracoccidioidomycosis. II Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 78: 617-21, 1984.

BLOOM, B. R.; SALGAME, P.; DIAMOND, B. Revisting and revising. Supressor T cells. **Immunology Today.** 13: 131-6, 1992.

BROWN, C. R. & McLEOD, R. Class I MHC genes and CD8⁺ cells determine uptnumber in *Toxoplasma gondii* infection. **J. Immunol.** 145: 3438-41, 1990.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; STEVENS, D. A. Gamma-Interferon activation of macrophage for killing *Paracoccidioides brasiliensis* evidence for nonoxidative mechanisms. **Int. J. Immunopharmacol.** 10: 945-52, 1988.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophage. **Infect. Immun.** 57: 2289-94, 1989.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.** 6: 89-117, 1993.

BUCHANAN, K. L. AND DOYLE, H. A. Requirement for CD4⁺ T lymphocytes in host resistance against *Cryptococcus neoformans* in the Central Nervous System of immunized mice. **Infect. Immun.** 68(2): 456-462, 2000.

BURGER, E.; MIYAJI, M.; SANO, A.; CALICH, V.L.G.; NISHIMURA, K. & LENZI, H.L.. Histopathology of paracoccidioidomycotic mice: a sequential study. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**,55: 235-242, 1996.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.** 66: 585-94, 1985.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; RUSSO, M.; VAZ, C. A.C AND BURGER, E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. *In*: Paracoccidioidomycosis. Eds. Franco, M.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A. and Del Negro, G. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 151-73, 1994.

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

CAMARGO, Z. P. & CANO, L. E. Humoral immunity. *In*: Paracoccidioidomycosis. Eds. Franco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. Boca Raton, CRC Press, p. 187-201, 1994.

CAMPOS, E. P.; SARTORI, J. C.; HETCH, M. L., FRANCO, M. F. Clinical and serologic features of 47 patients with paracoccidioidomycosis treated by amphotericin B. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 26: 212-7, 1984.

CANO, L. E. R. Paracoccidioidomicose Pulmonar Experimental: Caracterização do modelo de infecção intratraqueal em camundongos resistentes e susceptíveis; participação do IFN- γ , células T CD4⁺ e CD8⁺ na resistência ao fungo. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 1995.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A.C; RUSSO, M. AND CALICH, V.L.G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, brochoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. **Infect. Immun.** 63: 1777-1783, 1995.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E. AND CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.** 66(2): 800-06, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; COSTA, T. A., MENGEL, J. O.; XIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D. C.; VAZ, C. A.C; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Depletion of CD8⁺ T cells *in vivo* impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.** 68 (1): 352-9, 2000.

CANTORNA, M.T. & BALISH, E. Role of CD4⁺ lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis. **Infect. Immun.** 59 (7): 2447-2455, 1991.

CASTAÑEDA, 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.** 26: 351-8, 1988.

CHANDRA, R. K. Immune responses parasitic disease. Part B: mechanisms. **Rev. Infect. Dis.** 4: 756-61, 1982.

CHEQUER-BOU-HABIB, D.; DANIEL-RIBEIRO, C.; BANIC, D. M.; FRANCISCONE DO VALLE, A. C.; GALVÃO-CASTRO, B. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia.** 108: 89-93, 1989.

CLEMONS, K. V.; FELDMAN, D.; STEVENS, D. A. Influence of β -estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Gen. Microbiol.** 135: 1607-17, 1989.

CORREA, A. & GIRALDO, R. Study of immune mechanisms in paracoccidioidomycosis. I. Changes in immunoglobulins (IgG, IgM and IgA). **PAHO Scient Publ.** 254: 245-50, 1972.

DEEPE, G. S. Jr. Role of CD8⁺T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice. **J. Immunol.** 152: 3491-500, 1994.

DIALYNAS, D. P.; QUAN, Z. S.; WALL, K. A.; PIERRES, A.; QUINTANS, J.; LOKEN, M. R.; PIERRES, M.; FITCH, F. W. Characterization of the murine T cell surface molecule designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK 1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. **J. Immunol.** 131: 2445-51, 1983.

ESSER, C. H. & RADBRUCH, A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. **Annu. Rev. Immunol.**, 8: 713-35, 1990.

FARAH, C. S.; ELAHI, S.; PANG, G.; GOTJAMANOS, T.; SEYMORE, G. J.; CLANCY, R. L. and ASHMAN, R. B. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. **Infect. Immun.** 69 (10): 6110-18, 2001.

FARREL, J. P.; MÜLLER, J.; LOUIS, J. A. A role for Lyt-2⁺ T cells in resistance to cutaneous leishmaniasis in immunized mice. **J. Immunol.** 142: 2052-6, 1989.

FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp. São Paulo.** 18: 197-254, 1955.

FAVA NETTO, C.; VEGAS, V. S.; SCIANNAMÉA, I. M.; GUARNIERI, D. B. Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *Paracoccidioides brasiliensis*, necessário ao preparo do antígeno. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 11: 177-81, 1969.

FAVA- NETTO, C. Imunologia da paracoccidioidomicose. **Rer. Inst. Med, Trop. São Paulo.** 18: 42-53, 1976.

FAZIOLI, R. A.; SINGER-VERMES, L. M.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; FRANCO, M. F; MOSCARDI-BACCHI, M. AND CALICH, V.L.G. Delayed-type hypersensitivity response in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia.** 126: 137-146, 1994.

FERREIRA DA CRUZ, M. F.; FRANCESCONI-DO-VALE, A. C.; ESPINERA, M. C. D.; WANKE, B.; GALVÃO-CASTRO, B. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up during and after treatment. **J. Med. Vet. Mycol.** 28: 151-7, 1990.

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S.; DEL NEGRO, G. M. B.; MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; ASSIS, C. M.; SALEBIAN, A. & HEINS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.** 28: 253-56, 1990.

FINKELMAN, F. D.; HOLMES, J.; KATONA, I. M.; URBAN, J. F. JR.; BECKMAN, M. P.; PARK, L. S.; SCHOOLEY, K. A.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T.R.; PAUL, W.E. Lymphokine control of *in vivo* immunoglobulin isotype selection. **Annu. Rev. Immunol.**, 8: 303-33, 1990.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** 25: 5-18, 1987.

FRANCO, M. F.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. *In*: Clinical tropical medicine and communicable diseases. London, Baillière, v. 4, p. 1-36, 1989.

FRANCO, M.; PERAÇOLI, M. T.; SOARES, A.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MEIRA, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Trop. Med. Mycol.** 5: 115-49, 1993.

GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.; ASSIS, C. M. & LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de um pingüim (*Pygoscelis adeliae*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 35(3): 227-235, 1993.

GOMEZ, A.M.; BULLOCK, W.; TAYLOR, C.L.; DEEPE, G. S. Role of L3T4⁺T cells in host defense against *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, 56: 1685-1691, 1988.

GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A. AND CO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.** 68 (5): 2546-52, 2000.

GONZÁLEZ-OCHOA, A. Clasificación clínica de las micosis. **Rev. Inst. Salubr. Ef. Trop.**, 16: 1, 1956.

HARDING, C. V.; COBIAN, F. L. & UNNUE, E. R. Mechanisms of antigen processing. **Immunological Reviews.**, 106: 77-92, 1989.

HARMSSEN, A. G.; CHEN, W.; GIGLIOTTI, F. Active immunity to *Pneumocystis carinii* reinfection in T-cell-depleted mice. **Infect. Immun.**, 63: 2391-2395, 1995.

HUFFNAGLE, G. B.; YATES, J. L.; LIPSCOMB, M. F. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **J. Exp. Med.** 173: 793-800, 1991.

JANEWAY, C. A. & TRAVERS, P. Immunobiology: The immune system in health and disease. (2nd, ed.) New York: Garland Publishing Inc. 1996.

JIMENEZ, B. E. & MURPHY, J. W. *In vitro* effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. **Infect. Immun.** 46(2): 552-58, 1984.

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.** 38: 225-9, 2000.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L. M. *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**. 92: 173-178, 1985.

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R. D.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; CALICH, V. L. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**. 130 (3): 131-40, 1995.

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C.; BURGER, E.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked preferential Th₁ immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. **J. Interf Cytok Res**. 20(1): 89-97, 2000.

KEMENY, D. M.; NOBLE, A.; HOLMES, B. J.; DIAZ-SANCHEZ, D. Immune regulation: a new role for the CD8⁺ T cell. **Immunology Today**. 15: 107-10, 1994.

KOVACSOVICS-BANKOWISKI, M.; CLARK, K.; BENACERRAF, B.; ROCK, K. L. Efficient major histocompatibility complex Class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 90: 4942-6, 1993.

KURITA, N.; OARADA, M.; ITO, E.; MIYAJI, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.** 37(4): 261-7, 1999.

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

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.** 80: 7659-63, 1983.

MAMONI, R. L.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 65 (3): 237-41, 2001.

MC EWEN, J. G.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M. M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A M.- Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, 25: 165 - 175, 1987.

MC KINNEY, M. M. & PARKINSON, A. A simple non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. . **J. Immunol. Meth.** 96: 71-8, 1987.

MELONI-BRUNERI, L. H.; CAMPA, A.; ABDALLA, D. S. P.; CALICH, V.L.G; LENZI, H. L. AND BURGER, E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P.brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J. Leukocyte Biol.** 59: 526-533, 1996.

MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestation. *In: Paracoccidioidomycosis.* Eds. Franco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. Boca Raton, CRC Press, p. 233-58, 1994.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MORAES, R. A.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 32: 384-5, 1990.

MODY, C. H.; LIPSCOMB, M.F.; STREET, N. E. AND TOEWS, G. B. Depletion of CD4⁺ (L3T4⁺) lymphocytes *in vivo* impairs murine host defense to *Cryptococcus neoformans*. **J. Immunol.** 144: 1472-1477, 1990.

MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **J. . Med. Vet. Mycol.** 27: 149-58, 1989.

MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. Th₁ and Th₂ cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.** 7: 145-73, 1989.

MOTA, N. G. S.; PERAÇOLI, M. T. S.; MENDES, R. P.; GATTASS, C. R.; MARQUES, S. A.; SOARES, A. M. V. C.; IZATTO, I. C.; REZKALLAH-IWASSO, M. T. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** 26: 105-11, 1988.

MURPHY, J.W., SCHAFER, F., CASADEVALL, A., ADESINA, A. Antigen-induced protective and nonprotective cell-mediated immune components against *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** 66(6): 2632-9, 1998.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.** 168(9): 4593-600, 2002.

NICHOLS, K. L., BAUMAN, S. K., SCHAFER, F. B. MURPHY, J. W. Differences in components at delayed-type hypersensitivity reaction sites in mice immunized with either a protective or a nonprotective immunogen of *Cryptococcus neoformans*. **Infect. Immun.** 70(2): 591-00, 2002.

OLIVEIRA, S. L.; SILVA, M. F.; SOARES, A. M.V. C.; SILVA, C. L. Cell wall fractions from *Paracoccidioides brasiliensis* induce hypergammaglobulinemia. **Mycopathologia**. 121: 1-5, 1993.

PARISE-FORTES, M. R.; PEREIRA DA SILVA, M. F.; SUGIZAKI, M. F.; DEFAVERI, J.; MONTENEGRO, M. R.; SOARES, A. M. V. C. & PERAÇOLI, M. T. S. Experimental paracoccidioidomycosis of the syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. **Med. Mycol.** 38: 51-60, 2000.

PERAÇOLI, M. T.; SOARES, A. M.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; PEREIRA, P. C.; REZKALLAH-IWASSO, M. T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** 29 (6): 373-80, 1991.

PERAÇOLI, M. T.; FORTES, M. R. P.; PEREIRA DA SILVA, M. F.; MONTENEGRO, M. R. Natural killer cell activity in experimental Paracoccidioidomycosis of the syrian hamster. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** 37: 129-36, 1995.

PFEIFER, J. D.; WICK, M. J.; ROBERTS, R. L.; FINDLAY, K.; NORMARK, S. J.; HARDING, C.V. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. **Nature.** 361: 359-62, 1993.

PINA, A. & CALICH, V. L. G. PMN leukocytes play a more prominent role in natural immunity of susceptible than resistant mice to pulmonary paracoccidioidomycosis (PCM). Trabalho apresentado no XXVI Meeting of the Brazilian Society of Immunology, 2001.

RESTREPO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*,. In: M. Franco, C.; Da Silva-Lacaz, A. Restrepo-M, and G. Del Negro (ed), Paracoccidioidomycosis, CRC Press, Boca Raton, Flórida., p. 121-8, 1994.

RESTREPO, A.; RESTREPO, M.; RESTREPO, F.; ARISTIZÁBAL, L. H.; MONCADA, L. H.; VÉLEZ, H. Immune response in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. **Sabouraudia.** 16: 151-63, 1978.

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*: implication for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.** 46: 346-53, 1984 (a).

RESTREPO, A. Proceditos serológicos en la Paracoccidioidomycosis. **Adel. Microbiol. Enfermed. Infec.** 3: 183-211, 1984(b).

RESTREPO, A. The ecology *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**.23: 323-334,1985.

ROMANI, L.; MOCCIA, S.; BIETTA, C.; LANFALONI, L.; PUC CETI, P.; BISTONI, F. Th₁ and Th₂ cytokine secretion patterns in murine candidiasis: association of Th₁ responses with acquired resistance. **Infect. Immun.** 59: 4647-54, 1991.

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

SAUNDERS, B. M.; CHEERS, C. Inflammatory response following intranasal infection with *Mycobacterium avium*: role of T-cell subsets and gamma interferon. **Infect. Immun.** 63 (6): 2282-2287, 1995.

SCANGA, A. C.; MOHAN, V. P.; YU, K.; JOSEPH, H.; TANAKA, K.; CHAN, J. AND FLYNN, J. Depletion of CD4⁺ T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon- γ and nitric oxide synthase 2. **J. Exp. Med.** 192(3): 347-358, 2000.

SILVA, C. L. & SILVA, M. F. The role of somatic structure of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* upon B cell activation in experimental paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.** 101: 321-7, 1995.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G. & MAFFEI, C. M. L. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, 36: 37-42, 1998.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G. & MAFFEI, C. M. L. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novencinctus*) in an area where the fungus was recent isolated from soil. **Med. Mycol.** 38 (3): 193-9, 2000.

SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; DI-BACCHI, M. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; CALICH, V. L. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.** 27(2): 71-82, 1989.

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

SNAPPER, C. M. & PAUL, W. E. Interferon γ and B-stimulatory factor-I reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, 236: 944-7, 1987.

SVENSSON M.; STOCKINGER, B.; WICK, M. J. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC I and MHCII presentation to T cells. **J. Immunol.** 158 (9): 4229-36, 1997.

SWAIN, S. L.; DIALYNAS, D. P.; FITCH, F. W.; ENGLISH, M. Monoclonal antibody to L3T4 blocks the function of T cells specific for class 2 major histocompatibility complex antigens. **J. Immunol.** 132 (3): 1118-23, 1984.

TARLETON, R. L. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** 144: 717-24, 1990.

TRINCHIERI, G. & SCOTT, P. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. **Immunology Today**. 15: 460-3, 1994.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. **Annu. Rev. Immunol.** 13: 251-76, 1995.

VIDAL, M. S. M.; MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; ASSIS, C. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; D. NAIFF, R.; MENDES, R. P. & LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*. A mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an armadillo (*Dasipus novencinctus*) **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 37(1): 43-49, 1995.

WANKE, B. & LONDERO, A. T. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis infection. *In*: Franco, M. F.; Lacaz, C. S.; Restrepo, A.; Del Negro, G. Ed. Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Flórida, p. 109-20, 1994.

WILDE, D. B.; MARRACK, P.; KAPPLER, J.; DIALYNAS, D. P.; FITCH, F. W. Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigen reactivity; monoclonal antibody GK1.5 (anti-L3T4a) blocks class II MHC antigen-specific proliferation, release of lymphokines, and binding by cloned murine helper T lymphocyte lines. **J. Immunol.** 131 (5): 2178-83, 1983.

ZACCHARIAS, D.; UEDA, A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SAN-BLAS, G. A comparative histopathological, immunological and biochemical study of experimental intravenous paracoccidioidomycosis induced in mice by three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **J. Med. Vet. Mycol.** 24: 445-54, 1986.

ZAR, J. H. Bioestatistical analysis. 2 ed. New Jersey, Prentice Hall, p. 718, 1984.

Anexo

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) 8130900 – telefax : (55) (011) 818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 23/2000, sobre o projeto intitulado "*Caracterização da função das células T-CD4 na paracoccidioidomicose pulmonar de animais isogênicos*" sob a responsabilidade **Andressa de Paiva Chiarella** 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 (CEEAA) em reunião de 06/04/2000

(We certify that the protocol nº 23/2000 about "*Effect at in vivo depletion of T CD4⁺ cells in the pulmonary paracoccidioidomycosis*" 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 (CEEAA) in 06/04/2000 meeting.)

São Paulo, 06 de abril de 2000.

Prof. Dr. Hi-Sei Watanabe
Coordenador - CEEA

Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado
Secretário - CEEA