

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

Efeito da depleção *in vivo* de leucócitos PMN em camundongos resistentes e susceptíveis à Paracoccidioidomicose pulmonar.

Adriana Pina

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich

São Paulo  
2002

J7.077

DEDALUS - Acervo - CQ



30100004509

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P645e Pina, Adriana  
Efeito da depleção *in vivo* de leucócitos PMN em camundongos  
resistentes e susceptíveis à Paracoccidiodomicose pulmonar. /  
Adriana Pina. -- São Paulo, 2002.  
145p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas  
e Toxicológicas.

Orientador: Calich, Vera Lúcia Garcia

1. Hematologia 2. Imunologia : Fungo : Doenças 3.  
Paracoccidiodes brasilienses : Medicina I. T. II. Calich, Vera  
Lúcia Garcia, orientador.

616.15 CDD

Adriana Pina

Efeito da depleção *in vivo* de leucócitos PMN em camundongos resistentes e susceptíveis à Paracoccidioidomicose pulmonar.

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

---

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich  
orientador/presidente

---

Prof. Dr. Marcelo de Franco  
1º. examinador

---

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida  
2º. examinador

São Paulo, 05 de abril de 2002.

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)**.

*“Um caminho de mil quilômetros começa  
com o primeiro passo”.*

*Lao Tse*

*À Deus por ter guiado os meus caminhos e permitir que eu realizasse todo esse trabalho.*

*Aos meus pais que me apoiaram o tempo inteiro. Percebo em seus olhares o orgulho e o amor que sentem por mim.*

*Obrigado Mãe, pelas suas orações no momento que mais precisei e por me ensinar a rezar todos os dias.*

*Obrigado Pai, pelo seu belo e puro caráter. Você pode não acreditar, mas todos os seus conselhos eu guardo como se fossem ensinamentos.*

*Agradeço de todo o meu coração à minha primeira e eterna orientadora **Lúcia Helena Meloni Bruneri**.*

*Ao aceitar-me como sua aluna, e sabedora que eu seria a última, tentou ensinar-me tudo o que sabia. Mas não deu tempo .....É uma pena .....Ela sabia demais e o tempo foi curto para nós.*

*Mesmo assim, eu aprendi algo que muita gente demora anos e anos para aprender.*

**AMAR A VIDA É LUTAR POR ELA**

*Até um dia!!*

*Agradeço carinhosamente à minha orientadora **Vera Lúcia Garcia Calich**.*

*E difícil falar em Calich, sem dizer o quanto ela é competente, dedicada e muito inteligente.*

*Com você, Vera, eu aprendi a gostar da pesquisa e até mesmo de Imunologia. Aprendi também que é preciso assumir que nunca seremos grandes, mas que o importante é sempre estarmos em crescimento.*

OBRIGADO

## *AGRADECIMENTOS*

*Às minhas companheiras de laboratório – Rita, Andressa e Patrícia.*

*Obrigado pela troca de experiências, pelos momentos de alegria e apoio nas horas tristes.*

*À Dra. Eva Burger, pelo seu carinho e por sempre abrir as portas do seu laboratório quando eu mais precisei.*

*À Dra. Celidéia Vaz, pela sua alegria constante e seu exemplo de pesquisa.*

*Ao Dr. Montchilo Russo, pelas suas ricas sugestões e por ter sempre algo a acrescentar.*

*Ao Dr. Sandro Almeida, Dr. Marcelo de Franco e Dra. Ana Campa, pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação.*

*À Rosana Prisco, do Depto. de Informática do ICB-USP, pela realização das análises estatísticas dos resultados.*

*À Dra. Primavera Borelli, pela sua disposição em querer ajudar em todos os momentos.*

*Aos secretários da FCF-USP - Jorge, Benedita, Elaine, Sueli e em especial, Márcia Cristina, pela atenção e carinho em todas as horas.*

*Às minhas amigas Paula e Teresa, que sempre foram muito prestativas ao me ajudarem.*

*Aos meus amigos Ulisses, Tânia, Sônia Baueb, Ângela, Paulo Albe, Marileide (Leide), Thais e Silvia (Biotério), Renata, Deisy, Celina Arruda, Claudia, Marlene, Milton e Otacílio, pelo auxílio quando necessário.*

*Enfim, eu agradeço principalmente a mim mesma, porque sem a minha dedicação, coragem e paciência não chegaria aonde cheguei.*

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS

RESUMO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1) Leucócitos polimorfonucleares em modelos experimentais <i>in vivo</i> .....	05
1.2) Paracoccidiodomicose .....	08
1.3) <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .....	09
1.4) A infecção e as formas clínicas da PCM .....	11
1.5) O modelo murino isogênico da PCM .....	12
1.6) Os leucócitos PMN na PCM .....	19
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3- MATERIAL &amp; MÉTODOS</b>	
3.1) Fungo .....	22
3.2) Animais .....	23
3.3) Produção e purificação do AcM .....	24
3.4) Depleção de granulócitos em camundongos .....	28
3.5) Avaliação da depleção .....	28
3.6) Avaliação do tempo de sobrevivência .....	29
3.7) Produção do Antígeno de Fava Netto .....	29
3.8) Avaliação da resposta de HTT .....	29
3.9) Avaliação do grau de infecção .....	30
3.10) Avaliação da resposta imune humoral .....	31
3.11) Obtenção dos homogenatos dos pulmões.....	34
3.12) Análise estatística .....	36

## **4- RESULTADOS (I)**

I- Depleção de leucócitos PMN na fase de imunidade natural da doença	
4.1) Produção e purificação do AcM RB6-8C5 .....	38
4.2) Avaliação da depleção de leucócitos PMN .....	38
4.3) Avaliação dos linfócitos no sangue periférico .....	42
4.4) Tempo de Sobrevida .....	45
4.5) Grau de infecção .....	47
4.6) Resposta de HTT .....	50
4.7) Produção de anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i> .....	52
4.8) Dosagem de citocinas nos homogenatos dos pulmões .....	62
4.9) Dosagem de citocinas nos homogenatos de fígado .....	71

## **5- RESULTADOS (II)**

II- Depleção de leucócitos PMN na fase de imunidade adquirida da doença.	
5.1) Protocolos e grupos do experimento de imunoproteção .....	79
5.2) Gravidade da doença .....	79
5.3) Imunidade celular .....	82
5.4) Imunidade humoral .....	84
5.5) Dosagem de citocinas nos homogenatos de pulmão .....	85

## **6- RESUMO DOS RESULTADOS**

I- Depleção de leucócitos PMN na fase de imunidade natural da doença.....	88
II- Depleção de leucócitos PMN na fase de imunidade adquirida da doença.....	89

<b>7- DISCUSSÃO .....</b>	<b>90</b>
---------------------------	-----------

<b>8- CONCLUSÕES .....</b>	<b>111</b>
----------------------------	------------

<b>9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>113</b>
--	------------

## **10- ANEXO**

## ABREVIATURAS

AcM	Anticorpo monoclonal
Ac	Anticorpo (s)
Ag	Antígeno
AgFN	Antígeno de Fava Netto
ANOVA	Análise de variância
BCA	Ácido bicinconínico
BHI	Infusão de cérebro e coração
BSA	Albumina Sérica Bovina
CFA	“Cell Free Antigen”
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
DMSO	“Dimethyl-Sulfoxide”
D.O.	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme-linked immunosorbent assay”
EP	Erro padrão
G-CSF	“Granulocyte Colony-Stimulating Factor”
GM-CSF	“Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor”
gp43	glicoproteína de 43kDa específica do <i>P.brasiliensis</i> (no soro)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina-eosina
HTT	Hipersensibilidade do tipo tardio
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratraqueal
i.v.	intravenoso
L	Fase leveduriforme (levedura)

LMW	“Low Molecular Weight”
M	Fase miceliana (micélio)
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
NK	Natural Killer
NO	óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido
OPD	ortofenilenodiamina
OPS	Organização Panamericana de Saúde
PAF	Fator de agregação plaquetária
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>P.brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PbAg	Antígeno solúvel de <i>P.brasiliensis</i> (“cell free antigen”)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2
PCM	Paracoccidioidomicose
PGE2	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PMN	Polimorfonuclear Neutrófilo
r IL-12	IL-12 recombinante
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
s.c.	subcutâneo
SFB	Soro Fetal Bovino
SPF	“Specific Patogens Free”
TCB	Tampão carbono-bicarbonato, pH 9,5
T CD4 <sup>+</sup>	linfócitos T auxiliares
T CD8 <sup>+</sup>	linfócitos T supressores/citotóxicos
TGF-β	“Transforming Growth Factor-β”
Th1	células T helper 1
Th2	células T helper 2
TNF-α	“Tumor Necrosis Factor - α”
UFC	Unidade Formadoras de Colônias

## **RESUMO**

Estudos em nosso laboratório caracterizaram camundongos B10.A como susceptíveis e camundongos A/J como resistentes à infecção pulmonar pelo *P.brasiliensis*.

Para investigar o papel das células PMN na paracoccidiodomicose (PCM) pulmonar, camundongos B10.A e A/J foram depletados destas células através da inoculação *in vivo* por via intraperitoneal (i.p.) do anticorpo monoclonal anti-células PMN e infectados pela via intratraqueal (i.t.) com um milhão de leveduras viáveis. Camundongos-controle receberam doses equivalentes de IgG normal de rato.

A depleção de granulócitos diminuiu o tempo de sobrevivência dos animais B10.A, mas não dos animais A/J. Quando comparados com os animais não depletados, camundongos resistentes apresentaram aumento da carga fúngica no pulmão somente no dia 7 pós-infecção. Ao contrário, camundongos susceptíveis depletados de PMN apresentaram números mais elevados de células leveduriformes no pulmão, fígado e baço nos dias 7, 15, 30 e 120 pós-infecção, com relação aos seus grupos-controle tratados com IgG. A depleção dos granulócitos, entretanto, não alterou as reações de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) desenvolvidas por ambas as linhagens de animais.

Considerando a resposta imune humoral, a depleção de células PMN levou à maior produção de anticorpos específicos em animais B10.A (Ig Total, IgG1, IgA e IgG3) e em animais A/J (Ig Total, IgG2a, IgG2b e IgG3). A depleção também alterou o padrão de citocinas pulmonares. Nos animais B10.A-tratados foram encontradas concentrações mais elevadas de IL-12 aos 15 dias e de IL-4 aos 120 dias pós-infecção, em comparação aos animais controle. Níveis de IL-12 significativamente mais altos foram detectados no grupo de animais A/J-depletados aos 7 e 120 dias e o IFN- $\gamma$  foi detectado em níveis mais elevados em todo o curso da doença. Então, a depleção de PMN induz níveis mais altos de anticorpos e um ambiente mais pró-inflamatório no local da infecção.

previously immunized by the subcutaneous (s.c.) route were depleted or not of PMN cells and challenged i.t. with one million yeast cells. No differences were detected in the CFU counts in the lung, liver and spleen between untreated and PMN-depleted vaccinated mice. PMN depletion also did not alter the production of specific antibodies but enhanced IL-3 synthesis as well as DTH reactivity.

In conclusion, our results showed that, differently from natural immunity, PMN cells do not play a protective role in the acquired phase of immune response to *P.brasiliensis* infection.

Keywords: paracoccidioidomycosis, fungi, polymorphonuclear neutrophil, mice, immunity.

## ABSTRACT

Previous studies in our laboratory defined susceptible (B10.A) and resistant (A/J) mice to pulmonary *P.brasiliensis* infection. To investigate the role of PMN cells in pulmonary PCM, resistant and susceptible mice were depleted *in vivo* of these cells by intraperitoneal (i.p.) injection of a granulocyte-depleting monoclonal antibody and infected intratracheally (i.t) with one million yeast cells. Control mice received equivalent doses of normal rat IgG.

PMN depletion decreased survival times of B10.A, but not of A/J infected mice. When compared with the non-depleted counterparts, resistant mice presented increased fungal loads in the lung only at day 7 after infection. On the contrary, PMN-depleted susceptible mice presented higher number of yeast cells in the lung, liver and spleen at days 7, 15, 30 and 120 after infection than their IgG-treated controls. PMN cells depletion, however, did not alter the DTH reaction developed by both mouse strains.

Regarding humoral immune response, PMN cells depletion caused increased production of specific antibodies in B10.A (Total Ig, IgG1, IgA and IgG3) and A/J (Total Ig, IgG2a, IgG2b and IgG3) mice. Levels of pulmonary cytokines were also altered after PMN depletion. B10.A-treated mice presented increased levels of IL-12 and IL-4 at days 15 and 120 post-infection, respectively. In A/J-depleted mice, augmented levels of IL-12 were detected at days 7 and 120 after infection; IFN- $\gamma$ , however, was produced in higher levels during whole course of infection. Thus, PMN depletion induces higher levels of specific antibodies and enhanced pro-inflammatory milieu at the site of infection.

As a whole, our data on PMN depletion at the onset of infection showed that neutrophils are important cells in host defense to *P.brasiliensis* infection. However, the effect of PMN depletion depends on the genetic background of the host and has a more pronounced effect in the susceptible strain of mice.

We have also assessed the effect of *in vivo* depletion of the leukocytes on the acquired phase of immunity developed by B10.A mice. Thus, B10.A mice

De acordo com esses dados, pudemos verificar que os neutrófilos são células importantes na defesa do hospedeiro à infecção pelo *P.brasiliensis*. Entretanto, o efeito protetor desta população celular depende do patrimônio genético do hospedeiro e é mais marcante na linhagem susceptível de camundongos.

Neste trabalho também investigamos o efeito da depleção *in vivo* de leucócitos PMN na imunidade adquirida e protetora desenvolvida pela pré-imunização de animais B10.A. Assim, os camundongos foram previamente imunizados pela via s.c., depletados ou não de células PMN e desafiados i.t. com 1 milhão de células leveduriformes. Não foram detectadas diferenças significativas na contagem de fungos viáveis do pulmão, fígado e baço, entre os grupos imunizados tratados ou não com o AcM anti-PMN. A depleção não alterou a produção de anticorpos específicos, porém aumentou significativamente a síntese de IL-3, bem como a reatividade de HTT.

Portanto, nossos resultados mostraram que, diferentemente da imunidade natural, os leucócitos PMN não exercem um papel protetor na fase adquirida da resposta imune à infecção com o *P.brasiliensis*.

Palavras Chave: paracoccidiodomicose, fungo, polimorfonuclear neutrófilo, camundongos, imunidade.

# **INTRODUÇÃO**

## 1- INTRODUÇÃO

Quando um organismo recebe uma agressão, seja ela viral, tumoral, bacteriana, auto-imune ou fúngica, desenvolve-se uma resposta inflamatória e isso pode originar uma resposta imunológica específica. Este tipo de resposta é resultante da interação entre células da imunidade natural (macrófagos, células natural killer e neutrófilos) e adquirida (linfócitos T e B), que ao produzirem diferentes mediadores, dentre eles as citocinas, podem mobilizar e ativar diversos tipos celulares (revisado por Lloyd et al., 1992; por Quesenberry, 1995; por Cassatella et al., 1995).

Na espécie humana adulta, os granulócitos neutrófilos são células produzidas na medula óssea, através de uma célula pluripotente denominada "stem cell". Esta célula apresenta alta capacidade de autoduplicação e diferenciação (Quesenberry, 1995). Em condições normais, o processo de proliferação e de maturação de granulócitos nos compartimentos, como a medula-óssea e sangue periférico duram em média 14 dias (Bainton et al., 1995).

Os granulócitos maduros têm sobrevida de cerca de 6 a 8 horas no sangue periférico (Deubelbeiss et al., 1975; Bainton et al., 1995), sendo capazes de migrar para os tecidos mediante a presença de fatores quimiotáticos e receptores específicos (Bainton et al., 1995). Entretanto, em situações como infecções bacterianas ou virais, prática de exercícios, aplicações de drogas injetáveis como epinefrina e desordens hematológicas podem encurtar o tempo de maturação dessas células para 24 a 48 horas e a migração das mesmas para os tecidos em poucos minutos (Maloney et al., 1968; Dale, 1995).

Os granulócitos neutrófilos são importantes células de defesa do organismo, e este fato está associado à sua presença em grande número nos vertebrados. Em um adulto normal podem ser produzidos 100 bilhões de neutrófilos diariamente (Williams, W.J. et al., 1990; Dancey et al., 1976; Walker et al., 1980), indicando que estas células apresentam intenso potencial de defesa contra infecções, através de propriedades que lhe são próprias como: motilidade, quimiotaxia, fagocitose, ação bactericida e digestão de microorganismos. Porém, esta defesa é comprometida em pacientes com neutropenia, leucemia, anormalidade congênita na estrutura ou função dos neutrófilos (Muzyka, 1996; Wright, 1982).

Todos os granulócitos são capazes de exercer a fagocitose, embora esta função seja importante apenas em neutrófilos e macrófagos. A fagocitose de microorganismos pelos leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN) inicia-se após a interação dos mesmos com a membrana celular. O fagócito emite pseudópodes que participam da aderência e posterior interiorização do agente para o citoplasma da célula, formando-se o fagossoma, os lisossomas se deslocam em sua direção e fundem-se formando o fagolisossoma. A partir da interação da membrana com o agente, formam-se substâncias microbicidas em vias dependentes e independentes do oxigênio (revisado por Athens, 1993).

As substâncias independentes de  $O_2$  podem resultar da degranulação de neutrófilos, com liberação de hidrolases ácidas (fosfatase ácida e catepsina B e D), proteases neutras (elastases e catepsina G), de lisozima, fosfatase alcalina, lactoferrina (quelante de ferro) e colagenases (revisado por Athens, 1993 e Rosen et al., 1995). As substâncias microbicidas dependentes de  $O_2$  podem ser formadas independentemente ou mediadas por mieloperoxidase (MPO), substância que se encontra presente em elevadas concentrações nos grânulos azurófilos ou primários dos PMN (Winterbourn et al., 1992) e em baixas concentrações nos monócitos e macrófagos (Davies et al., 1992; revisado por Rosen et al., 1995).

Um outro mecanismo microbicida envolve a produção de metabólitos tóxicos do oxigênio. Quando as células estão em repouso, o consumo de  $O_2$  é baixo. Após a ingestão de partículas estranhas ocorre o estímulo celular, ocasionando aumento de consumo de  $O_2$ , que é conhecido como *burst* ou explosão respiratória. Estes fatos ocorrem através do estímulo de uma oxidase presente na membrana celular da célula, a NADPH-oxidase. Esta enzima capta o oxigênio, convertendo-o nos metabólitos, tais como, superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. As enzimas superóxido dismutase e catalase promovem a degradação do superóxido e do peróxido de hidrogênio, respectivamente, com o objetivo de limitar o acúmulo destes metabólitos tóxicos. Os neutrófilos são desprovidos da enzima superóxido dismutase e, assim, os produtos metabólicos formados durante a fagocitose acabam provocando a morte do próprio neutrófilo (Jancar, 2001).

Estudos realizados em indivíduos com deficiência de MPO têm demonstrado maior susceptibilidade às infecções por *Candida albicans* (Nauseef, 1983; 1990), indicando participação desta substância na resistência à infecção por fungos.

Vale a pena lembrar que a formação de ácido hipocloroso (HOCl), componente microbicida mais potente produzido pelos neutrófilos, requer a presença da enzima MPO contida nos grânulos primários ou azurófilos dos neutrófilos.

Existem relatos demonstrando que o componente principal da atividade fungicida dos PMN está localizado nas granulações azurófilas. Os resultados de uma destas investigações demonstraram que células PMN em humanos possuem uma potente atividade anti-fúngica contra leveduras de *Histoplasma capsulatum* (Newman et al., 1993). As defensinas HNP-1, HNP-2 e HNP-3, bem como a catepsina G e BPI (proteína que aumenta a permeabilidade bacteriana), derivadas dos grânulos azurófilos dos PMNs, apresentam uma potente atividade fungistática, sendo a de maior destaque a defensina HNP-2 (Newman et al., 2000).

Segundo Levitz et al. (1990), o comportamento dos PMN restritivo ao crescimento de conídios de *Aspergillus fumigatus*, está muito relacionado com a lactoferrina que é um constituinte importante das granações específicas e, uma vez liberada para dentro do vacúolo fagocítico de neutrófilos e de macrófagos, liga-se firmemente aos íons  $Fe^{++}$ . Deste modo, a lactoferrina consome o  $Fe^{++}$  que é necessário para a proliferação fúngica, agindo então como um elemento fungistático. Além dessa ação, a lactoferrina ativa a formação de metabólitos do  $O_2$ , atuando também como agente citocida. A lactoferrina promove aumento da agregação dos neutrófilos entre si no foco infeccioso, e a maior tendência de adesão dos mesmos junto ao endotélio dos vasos situados nestes focos. A liberação excessiva da lactoferrina inibe a produção do fator estimulador da formação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), atuando, pois, como mecanismo retroalimentado ou “feedback” negativo, regulador importante da produção excessiva de neutrófilos.

Estudos recentes demonstraram que, ao contrário do que se pensou por muito tempo, os PMN ativadas também são células capazes de sintetizar citocinas (Bliss et al., 1999; Djeu et al., 1990; Dubravec et al., 1990; Romani et al., 1997a), além dos linfócitos e macrófagos (revisado por Lloyd et al., 1992 e Cassatella et al., 1995). As citocinas liberadas como GM-CSF, G-CSF, IL-3, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  podem induzir a liberação de espécies reativas do oxigênio (revisado por Steinbeck et al., 1989; por HO et al., 1992; por Appelberg et al., 1992 e Sullivan et al., 1993), além de atrair células para o local da infecção (revisado por Djeu, 1992 e Bos et al., 1993).

Djeu et al. (1986) constataram que leucócitos PMN de sangue periférico normal quando estimulados com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  inibiram a replicação de *C. albicans*. Richardson et al. (1992), verificaram que células PMN de sangue periférico quando ativadas com GM-CSF também apresentaram atividade fungicida contra a mesma espécie fúngica. De acordo com Kowanko et al. (1991), neutrófilos de sangue periférico humano, quando estimulados com GM-CSF, aumentaram a sua atividade fungicida contra *Torulopsis glabrata*, devido à

estimulação do burst respiratório e liberação de enzimas específicas dos grânulos azurófilos. O mesmo tipo de atividade citocida foi evidenciado quando células PMN eram estimuladas com G-CSF, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por Roilides et al. (1993;1998) quando co-cultivaram hifas de *Aspergillus fumigatus* com leucócitos PMN estimulados por G-CSF, IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$ .

### **1.1) Leucócitos Polimorfonucleares em modelos experimentais *in vivo***

Para avaliar a importância de diversos tipos celulares nas infecções é muito comum o uso de animais de experimentação, tais como, coelhos, hamster, ratos e camundongos.

No camundongo, as células hemopoiéticas são formadas na medula óssea e no baço. Na medula óssea, predomina alta proliferação de granulócitos, enquanto no baço há predomínio de produção de eritroblastos e linfócitos (Bannermam, 1983; Quesenberry, 1995).

No camundongo adulto normal, o ciclo de vida dos neutrófilos pode ser dividido em vários compartimentos como a medula óssea, baço e sangue periférico. Conforme observado através de experimentos realizados em meios de culturas por Boll e colaboradores (1965), as formas imaturas dos neutrófilos de camundongos fazem parte do compartimento mitótico da medula óssea e baço envolvendo seqüencialmente mieloblastos, promielócitos e mielócitos, pois são capazes de se dividir. As formas maduras (metamielócitos, bastonetes e segmentados) não são capazes de se dividir; apenas continuam os processos de amadurecimento, formando o compartimento de maturação e armazenamento.

A instalação e a evolução de uma doença infecciosa depende da resposta do hospedeiro e da adaptação do agente infectante.

Para avaliar a importância dos leucócitos PMN nas infecções é muito utilizado o anticorpo monoclonal (RB6-8C5) que é específico para granulócitos maduros de camundongos. Este anticorpo reconhece o antígeno (Gr-1 ou Ly-6) presente na superfície de neutrófilos e eosinófilos maduros.

Vários estudos foram realizados sobre a participação das células PMN na resposta imune inata contra bactérias, protozoários e fungos.

O papel dos PMN nas infecções, em estudos "in vivo", tem sido caracterizado por vários autores. Appelberg et al. (1994), e Czuprynski et al. (1994), demonstraram que camundongos BALB/c, depletados de granulócitos e infectados com *Listeria monocytogenes*, apresentavam grande crescimento bacteriano, principalmente no fígado, resultando na morte dos animais. Da mesma maneira, Conlan (1997) demonstrou que camundongos da linhagem CB6/F1 se tornaram mais susceptíveis à bactérias enteroinvasivas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Yersinia enterocolitica* na ausência de granulócitos.

Estudos em camundongos BALB/c depletados de neutrófilos demonstraram maior susceptibilidade destes animais à infecções por *Staphylococcus aureus*, resultando em morte, apesar dos níveis elevados de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) observadas no soro. Os animais controle infectados, entretanto, resolveram a infecção (Verdrengh et al., 1997 e 2000).

A participação dos neutrófilos na infecção por *Mycobacterium tuberculosis* foi caracterizada por Pedrosa et al. (2000), demonstrando que o fígado de camundongos BALB/c depletados de PMN e infectados com a bactéria por via intravenosa apresentava maior número de UFC deste patógeno em relação aos controles infectados e não deficientes de PMN; este estudo sugeriu também que os animais depletados de células PMN expressavam baixos níveis de mRNA para a síntese de IFN- $\gamma$  e óxido nítrico e, conseqüentemente, não controlavam a infecção.

Buendía et al. (1999) verificaram que camundongos *Swiss* grávidas depletadas de células PMN e submetidas a infecção por *Chlamydia psittaci* apresentavam maior taxa de aborto e de disseminação deste patógeno para baço, resultando em altos índices de mortalidade em relação aos controles infectados e não depletados de neutrófilos.

Estes dados demonstram que células PMN são importantes durante a fase inicial da infecção, e têm um papel como células efetoras da imunidade inata, reduzindo o número de parasitos no sítio de infecção.

A participação dos leucócitos PMN na infecção murina experimental por *Leishmania major* tem sido estudada por muitos autores. Lima et al. (1998) verificaram que camundongos BALB/c (susceptíveis) e C57BL/6 (resistentes) depletados de células PMN e infectados com *L.major* apresentavam uma disseminação acelerada do patógeno e um comprometimento mais grave do local da infecção (pata) em relação ao grupo de animais controle, indicando a importância dos leucócitos PMN no mecanismo de resistência à infecção causada por este protozoário. A análise histológica da pata desses animais depletados de células PMN e infectados com *L.major* demonstrou diferenças marcantes entre os grupos de animais depletados e não depletados apenas durante a primeira semana de infecção.

Trabalho desenvolvido por Chen et al. (2001) mostrou que camundongos Balb/c depletados um dia antes de serem infectados com *Trypanosoma cruzi* apresentaram exacerbação da infecção e diminuição da expressão de RNAm para citocinas do tipo Th1 no baço. Entretanto, em camundongos C57BL/6 a depleção de neutrófilos induziu um efeito protetor contra a doença e elevados níveis de citocinas inflamatórias. Estes dados mostram que os neutrófilos exercem papéis diferentes em duas linhagens de camundongos e que a exacerbação e proteção da doença podem estar relacionadas com a modulação de citocinas Th1 e Th2.

As células PMN também contribuem para a resistência a micoses em geral, pois são células muito eficazes na atividade citocida contra diversos fungos patogênicos quando comparadas a outras células em termos de imunidade natural.

De acordo com os estudos de Baughman et al. (1986), os PMNs exercem um importante papel na defesa do hospedeiro contra leveduras de *H.capsulatum* no início da infecção, pois foi observado em camundongos C57BL/6 um intenso afluxo de leucócitos PMN no pulmão na primeira semana de infecção, após inoculação intranasal de leveduras do fungo. Na segunda semana de infecção, a migração de células PMNs foi suplantada por células do tipo mononuclear, caracterizando uma resposta inflamatória granulomatosa.

A patogenicidade de alguns fungos parece estar associada à resistência aos neutrófilos e à atividade fungicida das células PMN (Schaffner et al., 1986). Esta resistência poderia estar relacionada a níveis altos de catalase no fungo (Brummer et al., 1984), inibição na fusão fagossoma-lisossoma (Bertram et al., 1986), tamanho da levedura ou ainda na deficiência em estimular o *burst* oxidativo de neutrófilos (Brummer et al., 1992, Meloni-Bruneri et al., 1996).

## 1.2) Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) foi primeiramente descrita por Adolfo Lutz, em 1908, em dois pacientes com lesões bucais, chamando atenção para a natureza dimórfica do parasito (Lutz, 1908 apud Lacaz, 1994).

Desde a sua descoberta, a doença tem recebido várias denominações: blastomicose brasileira, blastomicose sul-americana, doença de Lutz, doença de Lutz-Splendore-Almeida, granuloma ganglionar maligno de origem blastomicética, adenomicose e finalmente **paracoccidioidomicose**, nome

reconhecido oficialmente no simpósio sobre a doença realizada na Colômbia em 1971 pela Organização Panamericana de Saúde (OPS).

A PCM é uma doença crônica granulomatosa, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. É a micose profunda mais comum no Brasil (Wanke & Londero, 1994) e endêmica em vários países latino-americanos, principalmente na Venezuela, Colômbia, Argentina e México (Mackinnon, 1972; Sihma & CIB, 1986; Restrepo, 1985; Lacaz et al., 1991). É mais freqüente em adultos de 20 a 60 anos de idade, do sexo masculino, que exercem atividades agrícolas (Fava Netto et al., 1965).

Devido a maior incidência da PCM em homens do que em mulheres e apesar do contato com o fungo ser o mesmo para ambos os sexos (Franco, 1987), consideraram a hipótese hormonal como explicação. Muchmore et al. (1974) demonstraram que o estradiol, um dos componentes dos hormônios sexuais femininos, inibe o crescimento das células leveduriformes. Loose et al. (1983) verificaram que o 17- $\beta$ -estradiol (E2) reconhecia uma proteína receptora, localizada na porção citosólica do fungo e que o E2, em concentrações próximas às fisiológicas, bloqueava a transição da forma de micélio (M) para leveduriforme (L) (Restrepo et al., 1984), assim o conídio à forma L (Salazar et al., 1988).

### **1.3) *Paracoccidioides brasiliensis***

O agente etiológico da PCM, o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), é conhecido até o presente momento na sua forma assexuada, imperfeita (Almeida, 1930 apud Lacaz, 1994). Este fungo apresenta característica dimórfica, crescendo na forma miceliar à temperatura de 25 a 27°C, apresentando colônias de aspecto cotonoso, de crescimento lento e, observado ao microscópio, apresenta hifas hialinas delgadas e septadas. Na forma

leveduriforme a 35 - 37°C, o fungo cresce como colônias cerebriformes, que ao exame microscópico podem apresentar formas arredondadas ou ovaladas, ou multibrotantes, com aspecto morfológico característico de roda de leme, com diâmetro variável de 1-30µm (Lacaz et al., 1991). As características da fase leveduriforme são utilizadas no diagnóstico micológico da PCM, por ser a morfologia que o fungo apresenta na vida parasitária.

O habitat natural do agente etiológico é exógeno ao homem, no entanto, ainda permanece pouco conhecido (Restrepo, 1985), tendo sido isolado de fezes de pingüim (Garcia et al., 1993), de ração de cachorro (Ferreira et al., 1990) e de solo (Albornoz, 1971; Negroni et al., 1966 e Silva-Vergara et al., 1998). Acredita-se que micélios e conídios cresçam no solo, na água e nas plantas à temperatura ambiente e seriam as formas infectantes naturais do *P.brasiliensis* (Restrepo, 1985).

O homem é o hospedeiro conhecido, capaz de desenvolver a doença e contaminado possivelmente por via respiratória (González-Ochoa, 1972; Restrepo et al., 1970; Pupo, 1965). Outras vias infectantes foram também descritas, entre as quais a penetração do fungo em tecido traumatizado (Soares & Iabuki, 1974; Brito, 1973; Bopp, 1955).

Alguns trabalhos relataram o isolamento do *P.brasiliensis* a partir das vísceras de tatus (*Dasyurus novemcinctus*), sugerindo que esses animais sejam o reservatório natural da PCM. Assim, Naiff et al. (1986) isolaram este fungo das vísceras destes animais que habitavam no interior do Pará. Posteriormente, Bagagli et al. (1998) também isolaram o fungo a partir das vísceras de tatus da região de Botucatu, interior de São Paulo. Todos os isolados obtidos desses animais foram virulentos em modelos experimentais de hamster e mostraram similaridades micológicas, bioquímicas, antigênicas e moleculares com os isolados humanos (Sano et al., 1998-99a; Sano et al., 1998-99b).

#### 1.4) A infecção e as formas clínicas da PCM

Inicialmente, acreditava-se que a infecção pelo *P.brasiliensis* ocorresse através de tecidos injuriados como pele e mucosas (Fialho, 1947). Por outro lado, Gonzalez-Ochoa, (1957) sugeriu que a infecção com este fungo ocorresse através das vias respiratórias. Hoje em dia, acredita-se que a infecção por este patógeno ocorre através das vias respiratórias quando esporos, provavelmente sob forma de conídios (Bustamante et al., 1985; Restrepo, B.I. et al., 1986; Mc Ewen et al., 1987; Restrepo et al., 1988) alcançam os bronquíolos terminais e os alvéolos pulmonares. As lesões primárias da PCM ocorrem mais freqüentemente nos pulmões, ocorrendo, a partir daí, disseminação linfohematogênica.

Uma vez que o sistema imune do hospedeiro entre em contato com o fungo, características do indivíduo (idade, sexo, estado nutricional entre outras), do fungo (virulência e antigenicidade) e da interação entre eles contribuirão para que se instale a PCM-infecção ou a PCM-doença (revisado por Franco et al., 1993).

Em alguns indivíduos, a infecção pode ser assintomática, caracterizando a PCM-infecção. Neste caso, a infecção se localiza nos pulmões ou em tecido mucocutâneo e o foco infeccioso pode desaparecer (Sihma & CIB, 1986; Franco et al., 1987). A infecção também pode evoluir de assintomática para progressiva, com disseminação para vários órgãos, causando diversas lesões; este quadro caracteriza a PCM-doença a qual pode evoluir para a forma aguda ou subaguda ou para a forma crônica que pode ser subdividida em branda, moderada e grave (Franco et al., 1987).

A forma aguda da doença apresenta disseminação sistêmica, com hipertrofia do baço, fígado, linfonodos e alteração da medula-óssea. Esta forma clínica representa cerca de 3 a 5% dos casos, é mais freqüente em jovens (Franco et al., 1989; Brummer et al., 1993) e os pacientes apresentam grave

comprometimento da resposta imune celular (Mota et al., 1985). Por outro lado, a forma crônica representa cerca de 90% dos casos, é freqüente em homens adultos, apresenta curso lento, comprometimento pulmonar, disseminação podendo afetar mucosas, linfonodos, adrenais e, menos freqüentemente, o sistema nervoso central, medula e órgãos genitais (Franco et al., 1989; Brummer et al., 1993). Geralmente, com a evolução da forma grave da doença, há depressão da imunidade celular e elevação dos títulos de anticorpos específicos (Mota et al., 1985; Biagioni et al., 1984). Há também diferenças marcantes nos achados histopatológicos. Na forma benigna da doença aparecem granulomas epitelióides compactos e na forma grave os granulomas são frouxos, supurativos com numerosas células fúngicas (Fava Netto, 1961).

Do ponto de vista da resposta imunológica, os pacientes paracoccidioidomicóticos têm sido classificados em duas formas polares (Lacaz et al., 1982): 1) um pólo hiperérgico, que se apresenta como uma forma benigna da doença, onde a infecção é localizada, o hospedeiro apresenta resposta imune celular preservada, baixos títulos de anticorpos 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, resposta celular deprimida e altos níveis de anticorpos específicos; apresentam na histologia áreas de inflamação granulomatosa mista (frouxa e supurativa) com extensas áreas de necrose e abundantes células do fungo.

### **1.5) Modelo murino isogênico da PCM**

Muitos estudos têm caracterizado modelos experimentais de paracoccidioidomicose, pois, em alguns aspectos, são comparáveis aos encontrados nos pacientes, permitindo acumular informações sobre a

morfologia do agente nos tecidos, a resposta tecidual ao fungo em diferentes fases da infecção nos diversos órgãos, avaliar as respostas imunitárias humoral e celular do hospedeiro e estudar o controle genético da doença.

A evolução da doença em animais (por exemplo: camundongo, hamster e rato) depende da espécie, da cepa do fungo, da dose, da via de inoculação e da resposta do hospedeiro (Coelho et al., 1982; Calich et al., 1993; Kashino et al., 1990; Arruda, 1993; Ferreira, 1993; Singer-Vermes et al., 1994).

Trabalho pioneiro desenvolvido em 1927 por Montenegro (citado por Coelho et al., 1994) demonstrou que a inoculação intratesticular do fungo em hamster levava a uma resposta inicial no foco infeccioso dominado por neutrófilos, posteriormente substituídos por macrófagos, com formação de granulomas e o aparecimento de linfócitos. Muitos outros modelos experimentais foram então desenvolvidos e cada um deles trouxe contribuições importantes para o conhecimento da relação patógeno-hospedeiro na PCM (revisto por Coelho et al., 1982)

Calich et al. (1985) desenvolveram um modelo de infecção intraperitoneal (i.p.) utilizando várias linhagens de camundongos isogênicos e caracterizaram linhagens altamente resistentes (A/J, A/Sn), intermediárias (BALB/c, CBA, C57/BL e C3HeB/Fe) e susceptíveis (B10.A, B10.D2/oSn, B10.D2/nSn) ao *P.brasiliensis* de acordo com a taxa de mortalidade e grau de infecção em diversos órgãos (Singer-Vermes et al., 1993). Resultados semelhantes foram observados por via intravenosa (i.v.) (Ferreira, 1993) e pela via intratraqueal (i.t.), camundongos B10.A mantiveram-se como susceptíveis e A/J como resistentes (Cano et al., 1995a) ao isolado Pb18 do fungo. Calich et al. (1987) já mostraram que a resistência dos animais está relacionada a um gene autossômico dominante chamado Pbr. A resistência dos animais não é controlada pelo complexo H-2 de histocompatibilidade (Calich et al., 1985) e nem mesmo pela presença do componente C5 do sistema complemento (Burger et al., 1985).

Nas infecções experimentais induzidas por inoculação i.p., i.v. ou i.t., nesse modelo isogênico, ocorre uma disseminação do fungo para vários órgãos, tais como pulmões, baço, fígado, epíplon/ pâncreas (Singer-Vermes et al., 1993; Calich et al., 1985; Cano et al., 1995a) e mesmo medula óssea e cérebro (Ferreira, 1993 – via i.v.). O que diferencia a linhagem resistente (A/J) da susceptível (B10.A), é o grau menor de colonização dos tecidos desses animais (Singer-Vermes et al., 1993), com a presença de granulomas restritos e bem organizados. Esses achados indicaram um melhor controle da doença pelos camundongos A/J, sem alteração significativa na sobrevivência desses animais. Já os animais susceptíveis à infecção fúngica, induzida por diversas vias de inoculação, implicava em sobrevivência média reduzida.

Animais susceptíveis infectados i.p. ou i.t. apresentam uma ativação macrofágica ineficiente (expressão transitória de antígenos de classe II do complexo principal de histocompatibilidade, CPH – Cafalli-Favatti, 1993; baixa produção de  $H_2O_2$  – Cano et al., 1995a) e anergia para as respostas de HTT (Fazioli et al., 1994; Cano et al., 1995a). Na doença progressiva de camundongos B10.A induzida pela via i.p., foram observados altos níveis de anticorpos específicos, tais como, IgG2b e IgA (Cafalli-Favatti, 1993) e ativação policlonal de células B produtoras de IgG1, IgG2b e IgG2a (Calich et al., 1988). No modelo de infecção i.t. observou-se IgG2b aumentada (Cano et al., 1995a). Células de linfonodos totais, em cultura com estímulo antigênico do próprio fungo, produzem níveis muito baixos de IL-2 e IFN- $\gamma$  durante toda a infecção. Foram produzidos níveis elevados de citocinas do tipo 2, tais como, IL-5 (níveis elevados na primeira semana de infecção), IL-10 (níveis altos a partir da segunda semana) e a IL-4 (níveis elevados em tempos tardios da infecção). A caracterização de citocinas no modelo i.t. (Cano et al., 1998) demonstrou que camundongos susceptíveis apresentam níveis mais elevados de citocina Th1 (IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) que animais resistentes, quando analisados os homogenatos de células pulmonares obtidos na 4<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> semana pós-infecção.

Em conjunto, as características imunológicas desenvolvidas por animais susceptíveis apontam para uma ativação preferencial de mecanismos desativadores de macrófagos, alguns deles associados à uma resposta preferencial do tipo Th2.

Animais resistentes, ao contrário, apresentam uma ativação macrofágica eficiente, respostas positivas de HTT e processo infeccioso controlado, restrito aos sítios de inoculação. Foram encontrados níveis relativamente baixos de anticorpos específicos, com ausência de ativação policlonal de células B e predominância do isótipo IgG2a (modelo i.p. – Cafalli-Favatti, 1993); IgG2a e IgG3, no modelo de infecção i.t. (Cano et al., 1995a). As principais citocinas produzidas pelos animais A/J são do tipo 1, com níveis altos de IFN- $\gamma$  desde a segunda semana e IL-2 sintetizada durante todo o curso da doença. As citocinas do tipo 2 aparecem tardiamente. Assim, a infecção de camundongos resistentes aponta para uma ativação preferencial de mecanismos mediados por células Th1.

Estudos realizados por Cano et al. (1998), demonstraram que a depleção *in vivo* de IFN- $\gamma$  endógeno em animais B10.A e A/Sn infectados i.t. com o fungo *P.brasiliensis* apresentaram aumento no grau de infecção pulmonar e disseminação precoce do fungo para o fígado e baço. A depleção provocou anergia em suas respostas de HTT, indicando que esta citocina exerce papel importante em reações inflamatórias. A depleção de IFN- $\gamma$  aumenta a produção dos isótipos IgG1 e IgG2b anti-*P.brasiliensis*, em animais susceptíveis. Já os animais resistentes revertem o seu padrão isotípico (IgG2a e IgG3), produzindo níveis maiores de IgG1, IgG2a e IgG2b. Os efeitos da depleção do IFN- $\gamma$  foram marcantes tanto em animais resistentes como susceptíveis, indicando que esta citocina exerce um papel protetor e mediador da resistência ao fungo (Cano et al., 1998), independente da susceptibilidade genética do hospedeiro.

Para melhor entender os efeitos das citocinas do tipo Th2 na PCM pulmonar em animais susceptíveis, Arruda et al. (1996) depletaram a IL-4 através do anticorpo monoclonal (11B11) em camundongos B10.A. Este tratamento não alterou drasticamente os resultados da doença, sugerindo que a IL-4 não exerce papel importante na susceptibilidade ao *P.brasiliensis*. Entretanto, estudos recentes com camundongos geneticamente deficientes de IL-4 demonstraram que a ausência de IL-4 leva a uma doença menos grave nos órgãos de disseminação (fígado e baço) e a estrutura mais compacta e organizada dos granulomas pulmonares (Calich & Arruda, observações não publicadas).

A IL-10 parece ser uma citocina que tem alto desempenho no processo de exacerbação da doença. A PCM em animais IL-10 KO é muito menos grave, quando comparada com animais C57BL/6 controle, e apresenta um padrão regressivo tanto em relação ao número de fungos como quanto ao aspecto de lesões pulmonares. Além disso, a ausência geneticamente determinada de IL-10 impede a disseminação do fungo para o fígado e baço (Alves & Calich, dados não publicados).

O papel da IL-12 na infecção i.t. pelo *P.brasiliensis* também foi estudado em animais susceptíveis por Arruda et al. (1996), quando administraram IL-12 recombinante por via i.p.. Houve uma redução na carga fúngica do fígado e baço. A citocina recombinante também provocou a diminuição de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL-4 e IL-10) em homogenatos de pulmão. A atividade protetora do rIL-12 foi acompanhada por aumento de infiltrado de células mononucleares (MMN) no pulmão, revelada por estudos histopatológicos.

Estudando a participação de células T CD8<sup>+</sup> em animais infectados por via i.t. com o fungo, Cano et al. (2000), demonstraram que animais susceptíveis apresentaram aumento da carga fúngica no pulmão e disseminação para fígado

e baço no tempo de 4 e 8 semanas de infecção. Em animais resistentes não houve alteração da carga fúngica pulmonar quando comparados aos animais controle, mas ocorreu disseminação acentuada do fungo na oitava semana pós-infecção. É importante também relatar que a depleção de células T CD8<sup>+</sup> não modificou as reações de HTT nos animais resistentes, porém induziu aumento destas reações em animais susceptíveis.

As células T CD4<sup>+</sup> apresentaram pequena importância nos mecanismos protetores desenvolvidos por camundongos B10.A e A/Sn quando desafiados i.t. com o fungo de baixa virulência (Cano et al., 1995b). Nosso laboratório tem ampliado o estudo destas células no controle da infecção i.t., mas com isolado virulento do fungo *P.brasiliensis*. Resultados prévios têm demonstrado uma pequena contribuição desta população celular na resposta imune protetora desenvolvida por camundongos susceptíveis e resistentes; entretanto os linfócitos T CD4<sup>+</sup> parecem exercer um ativo papel regulador da produção de anticorpos específicos e nas reações de hipersensibilidade tardia (Chiarella, A. & Calich, V.L.G., 2001).

O papel dos macrófagos na resistência ao *P.brasiliensis* vem sendo estudado por diversos pesquisadores. Macrófagos peritoneais residentes fagocitam células leveduriformes de *P.brasiliensis*, mas não são capazes de matá-las. Entretanto, macrófagos peritoneais ou pulmonares murinos ou mesmo monócitos e macrófagos humanos tratados com IFN- $\gamma$  são capazes de inibir a replicação das leveduras de *P.brasiliensis* e esta inibição pode ser abolida com a adição de anticorpos contra o IFN- $\gamma$  (Brummer et al., 1993; Moscardi-Bachi et al., 1994).

Trabalho desenvolvido em nosso laboratório demonstrou que a prévia inoculação do fungo *P.brasiliensis* por via subcutânea (infecção local) protege

os animais B10.A quando desafiados pela via intratraqueal. Essa proteção foi correlacionada à imunidade conferida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e a atividade da IL-12 e do IFN- $\gamma$  no controle da multiplicação do fungo nos pulmões e na sua disseminação para o fígado (Arruda, tese de doutorado, 1999).

Sabe-se que a via de inoculação é um dos fatores que altera o desenvolvimento da doença para vários agentes infecciosos e uma mudança da via de infecção pode transformar um animal susceptível em resistente, como foi demonstrado por Arruda (1993). Neste trabalho, a pré-inoculação do fungo pela via s.c. protegia animais B10.A de um inóculo pela via i.p., porém exacerbava a doença quando o desafio era realizado pela via intra-venosa.

A inoculação subcutânea de *P.brasiliensis* mostrou-se, nos trabalhos de Mackinnon (1959) utilizando camundongos Swiss e de Arruda (1993 e 1999) com camundongos isogênicos, um processo infeccioso localizado e de resolução espontânea. A via subcutânea é conhecida também como boa indutora de resposta imune protetora e em vários modelos de infecção experimental em camundongos tem-se utilizado esta forma de inoculação para induzir efeitos protetores, como foi realizado com o *Cryptococcus neoformans* (Moser et al., 1982) e com o *Blastomyces dermatitidis* (Spencer et al., 1973).

## **1.6) Leucócitos Polimorfonucleares na PCM**

O papel dos leucócitos PMN na PCM ainda não foi definitivamente estabelecido (Brummer et al., 1993), apesar da sua presença marcante nos tecidos infectados. Na doença humana, Restrepo et al. (1975) demonstraram que células PMN de pacientes podiam matar leveduras de *P.brasiliensis in vitro*; no entanto, Goihman-Yahr et al. (1985) demonstraram que leucócitos PMN de pacientes apresentavam fagocitose normal, mas alterações na

capacidade digestiva. Schaffner et al. (1986), mostraram que células PMN isoladas de sangue periférico de indivíduos saudáveis fagocitavam leveduras de fungos dimórficos, aumentavam o *burst* respiratório, mas não eram capazes de matá-los. Entretanto, Kurita et al. (1999a, 1999b e 2000) mostraram, *in vitro*, que os leucócitos PMN de indivíduos normais apresentavam atividade fungistática para as células leveduriformes do fungo, mas quando leucócitos eram ativados com IFN- $\gamma$ , GM-CSF ou IL-1 $\beta$  aumentavam a atividade fungicida.

Em modelo experimental, Calich et al. (1979) demonstraram intenso infiltrado inflamatório, formado principalmente por PMN, nos sítios de inoculações i.p. e s.c. com *P.brasiliensis* em camundongos suíços e de B10.A respectivamente. Este influxo mostrou ser independente da ativação do sistema complemento ou de outras substâncias como prostaglandinas.

Trabalho desenvolvido por Meloni-Bruneri et al. (1996) demonstrou que a inoculação do fungo pela via s.c. (bolsa de ar) induzia intensa migração de neutrófilos que podiam ser recuperados com um bom grau de pureza (81-90%) até os 15 dias de infecção. Neste tempo, a resposta de HTT apresentou-se elevada tanto em animais B10.A como em A/J. Os resultados deste trabalho mostraram que, durante a infecção, os neutrófilos presentes nos exsudatos (bolsa de ar) de camundongos resistentes A/J, apresentavam-se progressivamente mais ativados quando estimulados "*in vitro*" com leveduras mortas de *P.brasiliensis* (inibição de 61% do crescimento de leveduras do isolado), ao contrário do observado com leucócitos PMN de camundongos susceptíveis B10.A., que apresentavam inibição de apenas 14% do crescimento de leveduras do isolado do fungo.

Em sua tese de doutorado Cano, L.E. (1995) caracterizou o afluxo de células inflamatórias nos tempos iniciais da infecção intra-pulmonar pelo *P.brasiliensis*. Verificou que em camundongos susceptíveis ocorria um infiltrado maior de leucócitos PMN neutrófilos e eosinófilos que nos camundongos resistentes. Esta diferença foi detectada nos tempos de 24 e 48 horas pós-infecção.

Em conjunto, os resultados de trabalhos acima expostos indicam um papel importante dos leucócitos PMN nos mecanismos de defesa dos hospedeiros contra o *P.brasiliensis*. Entretanto, este assunto parece merecer estudos mais dirigidos, sobre a importância desta população celular em modelos de PCM. Assim, decidimos investigar o efeito da depleção *in vivo* de leucócitos PMN no curso da infecção pelo fungo. Para tanto, foram utilizados camundongos susceptíveis e resistentes infectados pela via i.t., uma vez que o pulmão parece ser o sítio primário da infecção em seres humanos.

## **OBJETIVOS**

## 2- OBJETIVOS

### 2.1) OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da depleção de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos na gravidade da doença induzida pela infecção intratraqueal (i.t.) de camundongos resistentes (A/J) e susceptíveis (B10.A) com células leveduriformes do *P.brasiliensis* em vários tempos após a infecção.

Julgamos também de grande interesse o estudo do papel dos leucócitos PMN neutrófilos na imunidade adquirida ao fungo *P.brasiliensis* em animais susceptíveis (B10.A), uma vez que somente esta linhagem é capaz de desenvolver imunoproteção ao *P.brasiliensis* (Arruda, 1999).

### 2.2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Vários parâmetros foram estudados:

- a) o efeito do tratamento nas populações celulares do sangue periférico;
- b) a determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) nos órgãos mais afetados pela infecção i.t. (pulmões, fígado e baço);
- c) o acompanhamento da resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT);
- d) a determinação do nível e qualidade (isotipia) dos anticorpos específicos produzidos (ELISA);
- e) o estudo das citocinas próprias dos padrões Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) e pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-3 e GM-CSF) no homogenato dos pulmões, que refletiriam o estado de ativação do sítio primário da infecção.

### **3- MATERIAL & MÉTODOS**

#### **3.1) FUNGO**

Foi utilizada a cepa virulenta Pb18 do *P.brasiliensis*. Isolados do fungo foram avaliados quanto à sua virulência e concluiu-se que o isolado Pb18 é altamente virulento para camundongos susceptíveis (Kashino et al., 1987).

Essa amostra, originalmente isolada de paciente, foi mantida na micoteca do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e nos últimos 15 anos, no Laboratório de Imunologia das Micoses do Departamento de Imunologia do ICB, USP. Como alterações de virulência para amostras em cultivo são conhecidas (Kashino et al., 1990), reisolamentos periódicos do fungo são providenciados. O fungo recém isolado é empregado nas inoculações e também repicado em ágar batata recoberto com óleo mineral, onde é mantido por no máximo 1 ano. Desse repique “estoque”, mantido a 25°C e, portanto em fase miceliana, fazem-se retiradas a cada 2 ou 3 meses para, após conversão em leveduras, substituir o repique então em uso.

A virulência do fungo é controlada periodicamente pela análise da sobrevivência de camundongos susceptíveis à inoculação com o fungo (Kashino et al., 1990).

##### **3.1.1) PREPARAÇÃO DO INÓCULO**

Para as inoculações, o fungo Pb18 foi cultivado em meio semi-sólido de Fava Netto (Fava Netto, 1955) à temperatura de 35°C por 6 a 7 dias, tempo em que apresenta máximo crescimento e viabilidade (Kashino et al., 1985).

As células leveduriformes foram recolhidas e lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7.2) estéril. Ressuspensas as células, permitiu-se à decantação dos grumos mais grosseiros por 5 minutos ou procedeu-se a uma rápida centrifugação, separando-se o sobrenadante contendo a suspensão mais fina. A suspensão foi passada por agulha fina, para desfazerem-se os grumos e evitar-se a embolização dos bronquíolos.

A contagem final foi acertada para conter  $5 \times 10^7$  ou  $2 \times 10^7$  células viáveis do fungo por ml (para inoculação s.c. e i.t., respectivamente), pela contagem em câmara de Neubauer e determinação da viabilidade pelo corante Vital Janus Green B (Berliner & Reça, 1966).

### 3.2) ANIMAIS

Foram usados camundongos SPF (Specific Patogens Free) machos das linhagens B10.A e A/J respectivamente susceptíveis e resistentes à infecção i.t. pelo *P.brasiliensis* (idade média de 8 – 11 semanas no momento dos experimentos), adquiridos do Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos à temperatura de 22°C com ciclo de luz de 12 horas e água e ração *ad libitum*. Foram também usados camundongos atímicos (nudes) da linhagem BALB/c para expansão *in vivo* do hibridoma secretor de anticorpo monoclonal (AcM) empregado na depleção de granulócitos, criados no Biotério do ICB-USP.

Para os experimentos de imunidade adquirida foram somente utilizados camundongos da linhagem B10.A, uma vez que somente esta linhagem é capaz de desenvolver imunoproteção ao *P.brasiliensis* (Arruda, 1999).

### **3.2.1) INFECÇÃO DOS ANIMAIS**

A inoculação s.c. foi feita na base da cauda dos animais pela introdução de agulha fina o mais superficialmente possível na pele desta região. O inóculo continha  $5 \times 10^6$  células leveduriformes do fungo.

A inoculação i.t. envolve um procedimento cirúrgico, com prévia anestesia dos animais. O procedimento foi realizado com o seguinte 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. (0.2ml de Rompun); 2) após dez minutos, administração de 10 ml/kg de peso de hidrato de cloral (Reagen do Brasil) a 2.5%, pela via i.p. (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 $\mu$ l de uma suspensão de  $2 \times 10^7$  células leveduriformes do fungo/ml ( $1 \times 10^6$  células) diretamente na traquéia. 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 (Cano et al., 1995a).

## **3.3) PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS (ACM) EMPREGADOS NOS EXPERIMENTOS DE DEPLEÇÃO.**

### **3.3.1) HIBRIDOMA**

Foi utilizado o hibridoma RB6-8C5 (anti-PMN), gentilmente cedido pelo Dr. Coffman, R.L. (DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA). O AcM secretado por este hibridoma é uma IgG2b de rato, contra o antígeno GR-1 de granulócitos maduros de camundongos (Conlan et al., 1997; Lima et al., 1998).

A expansão foi realizada *in vivo* em camundongos atímicos, além da expansão *in vitro*.

### **3.3.2) EXPANSÃO DO HIBRIDOMA *IN VITRO***

Inicialmente as células do hibridoma RB6-8C5 foram mantidas por cultivo *in vitro* utilizando meio de cultura RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, glutamina 2mM, penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml, As células do hibridoma foram incubadas a 37°C, em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, em atmosfera úmida e repicadas a cada 48 horas. As células foram ressuspensas em meio fresco, determinado seu número total e sua viabilidade pela contagem, em câmara de Neubauer, após a mistura de 20µl da suspensão celular com 180µl 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.

### **3.3.3) EXPANSÃO DO HIBRIDOMA *IN VIVO***

Os hibridomas desenvolvem-se muito bem na cavidade peritoneal de animais BALB/c geneticamente atímicos (nu/nu). Sete 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 pela via i.p.  $5 \times 10^6$  células viáveis do hibridoma RB6-8C5.

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.

### 3.3.4) PRECIPITAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS COM ÁCIDO CAPRÍLICO E SULFATO DE AMÔNIO.

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  $\mu$ 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 1ml de tampão PBS/EDTA 2 mM (10x) para cada 10 ml do sobrenadante e o pH ajustado para 7,4 com NaOH 1N. A solução foi 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/EDTA 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 bicinonínico-BCA). Todo material foi filtrado em membrana Millipore (0,22 $\mu$ l aliquoteado) e estocado a -20°C.

### **3.3.5) 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

### **3.3.6) 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.

### **3.3.7) PURIFICAÇÃO DE $\gamma$ -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 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6, respectivamente.

### 3.4) DEPLEÇÃO DE GRANULÓCITOS

Camundongos B10.A e A/J foram depletados de granulócitos através da inoculação do anticorpo monoclonal RB6-8C5 purificado (250 $\mu$ g/camundongo). O anticorpo monoclonal foi aplicado por via i.p. 24 horas antes da inoculação i.t. de leveduras virulentas do Pb18. Esta depleção foi repetida nos dias 2 e 5 após a infecção.

Os animais controle foram inoculados com IgG normal de rato nos mesmos dias e na mesma concentração protéica do anticorpo monoclonal.

### 3.5) AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO

O número de leucócitos PMN foi avaliado antes do tratamento (tempo -1) e 24 horas após a inoculação do AcM, imediatamente antes da inoculação de leveduras de *P.brasiliensis* (tempo zero). Foi coletado o sangue da cauda de camundongos de ambas as linhagens, para contagem total e diferencial dos leucócitos.

A contagem global foi realizada em câmara de Neubauer, com diluição 1/10 com solução de Turk (líquido diluente para contagem de glóbulos brancos) e a diferencial foi feita em extensão sanguínea corada com May-Grünwald-Giemsa modificado por Rosenfeld (1947). Animais controle foram inoculados com IgG de rato normal na mesma concentração do AcM RB6-8C5.

O número de leucócitos também foi determinado sempre um dia antes desses animais serem sacrificados para avaliação do grau de infecção (6, 14, 29 e 119 dias de infecção).

### **3.6) AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIDA**

Grupos de animais depletados e não depletados de PMN das linhagens A/J e B10.A infectados i.t. com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis do *P. brasiliensis* foram observados por período de 400 dias; as mortes ocorridas foram registradas diariamente. As medianas da sobrevivência (em dias) foram calculadas para cada linhagem.

### **3.7) 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 ressuspensão 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. n° 23225, “BCA protein assay reagent”) segundo instruções do fabricante.

### **3.8) AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO (HTT)**

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 aos 7, 15, 30 e 120 dias após infecção pulmonar.

Assim, 24 horas antes do teste, a pata esquerda do animal foi medida com o auxílio de um espessímetro (Mitutoyo, Japão), e em seguida, foram injetados subcutâneamente no coxim plantar esquerdo 25 $\mu$ l de antígeno polissacarídico de Fava Netto (1955) em diluição adequada para conter 5 $\mu$ g de proteína. 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.

A diferença entre essas medidas é chamada de “aumento de espessura da pata” e registrada como indicador da resposta de hipersensibilidade do tipo tardio.

Animais normais, não infectados, foram também inoculados com o antígeno e o aumento da espessura das patas utilizado como controle negativo da reação.

### **3.9) AVALIAÇÃO DO GRAU DE INFECÇÃO**

O grau de infecção foi avaliado em animais B10.A e A/J depletados de granulócitos e respectivos controles, inclusive em animais B10.A previamente inoculados pela via s.c. com o fungo, depletados ou não de granulócitos, e desafiados pela via i.t. com leveduras viáveis de *P.brasiliensis*.

Nos tempos adequados após a infecção i.t., os animais foram sacrificados e pulmão (esquerdo), fígado (lobo maior) e baço (metade) separados, pesados e macerados em 5ml de PBS com o uso de homogenizadores. O macerado dos órgãos foi submetido à centrifugação e o sedimento final retomado em um volume de 0,5ml de PBS. Uma alíquota de 100 $\mu$ l dessa suspensão e de suas diluições foram semeadas em placas de Petri

com meio de cultura adequado. A incubação foi feita a 35°C e o crescimento das colônias de *P.brasiliensis* acompanhado e registrado diariamente por um período médio de 15 dias.

O meio de cultura empregado é constituído de BHI-ágar suplementado com 5% de “fator de crescimento do fungo” (Restrepo & Jiménez, 1980; Singer-Vermes et al., 1992) e 4% de soro eqüino, conforme preconizado por Castañeda et al., 1988.

É importante ressaltar que o pulmão (esquerdo) de cada camundongo foi utilizado para a determinação de UFC e o sobrenadante do macerado para a dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, IL-3, GM-CSF, IL-10, IL-4 e IL-5).

### **3.10) AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL**

Para determinar a resposta imune humoral dos animais (previamente inoculados ou não pela via s.c. com o fungo, depletados ou não de granulócitos, e desafiados pela via i.t. com leveduras viáveis de *P.brasiliensis*), amostras de soro foram obtidas nos períodos indicados após a infecção.

Os anticorpos totais específicos produzidos e os seus isótipos IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram quantificados pelo método de ELISA previamente padronizado para esse sistema antígeno-anticorpo por Mendes-Giannini et al. (1984) e modificado por Vaz et al. (1988).

#### **• ANTÍGENO**

O antígeno utilizado foi do tipo solúvel, obtido pela lavagem de células leveduriformes de 4 diferentes isolados (Pb18 – amostra virulenta e avirulenta, Pb339, Pb265) do *P.brasiliensis* em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2 (CFA – “cell free antigen” – Camargo et al. (1991).

- ANTISSOROS

Foram utilizados 7 antissoros não marcados e um marcado com peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Inc.).

ANTISSORO	PRODUZIDO EM	DILUIÇÃO
Anti-Imunoglobulina murina	Cabra	1: 4000
Anti-IgM murina	Cabra	1: 1000
Anti-IgA murina	Cabra	1: 1000
Anti-IgG1 murina	Cabra	1: 4000
Anti-IgG2a murina	Cabra	1: 1000
Anti-IgG2b murina	Cabra	1: 4000
Anti-IgG3 murina	Cabra	1: 1000
Anti-IgG de cabra marcada com peroxidase	Coelho	1: 8000

Cada antissoro foi utilizado no ELISA na diluição ótima pré-determinada por titulação em bloco.

- TÉCNICA

A técnica de ELISA constituiu basicamente em:

1) Sensibilização das placas de microtitulação (96 poços, fundo chato, COSTAR) com 100µl do antígeno CFA diluído 1:100 em Tampão-Carbonato-Bicarbonato 0,1M – pH 9,5 (TCB) para uma concentração de 39.3µg/ml de proteínas (3.93µg/well) por poço. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e aproximadamente 18 horas a 4°C (“overnight”). Após incubação foram feitas 3 lavagens com 200µl/poço de solução de PBS, pH 7,2, contendo

Tween 20 a 0,05% v/v (PBS-T20), processo este repetido a cada etapa, exceção feita à fase final de interrupção da reação enzimática.

2) Bloqueio dos sítios livres com 200 $\mu$ l/poço de solução de gelatina a 0,5% (p/v) em TCB. Incubação por 1 hora a 37°C.

3) Adição dos soros experimentais e controles positivo e negativo, diluídos (em PBS/ Tween 20) de forma seriada na base 2, com diluição inicial 1:20. Incubação por 1 hora a 37°C.

4) Adição de 100  $\mu$ l/poço da diluição ótima do antissoro não marcado (anti-imunoglobulina murina total ou anti-isótipo). Incubação de 1 hora a 37°C.

5) Adição de 100 $\mu$ l/poço do antissoro anti-IgG de cabra produzido em coelho, conjugado à peroxidase tipo IV, e utilizado na diluição de 1:8000. Incubação de 1 hora a 37°C.

6) Reação com o substrato (100 $\mu$ l/poço), que consistiu em 11,4 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% diluídos em 25ml de tampão citrato de sódio a 0,1M pH 5,0 contendo 10 mg do revelador-OPD (ortofenilenodiamina, Merck). Incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

7) Interrupção da reação enzimática com 100 $\mu$ l/poço de uma solução de ácido sulfúrico, 4,0N.

8) Leitura da densidade óptica (D.O.) em leitor automático de ELISA (Dynatech MR 5000), em comprimento de onda de 492nm. O "cut-off" da reação é determinado, em cada placa, pela média das DO obtidas para um "pool" de soros controle negativos (de animais não inoculados, mas conviventes com os animais de experimentação), dosado em quadruplicata. Os títulos foram expressos como a recíproca da maior diluição do soro experimental apresentando DO superior à leitura do soro negativo. Foi calculada a média  $\pm$  erro-padrão do log<sub>2</sub> dos títulos dos diversos grupos analisados.

### **3.11) OBTENÇÃO DOS HOMOGENATOS DOS PULMÕES**

As dosagens de citocinas foram feitas em material proveniente de animais B10.A e A/J (previamente inoculados ou não pela via s.c. com o fungo, depletados ou não de granulócitos, e desafiados pela via i.t. com leveduras viáveis de *P.brasiliensis*), utilizados na determinação de UFC. Neste procedimento o pulmão (esquerdo) era colhido logo após o sacrifício do animal, pesado e, macerado em um volume de 5 ml de PBS estéril. Após a separação do sobrenadante, o macerado era semeado em meio adequado para o crescimento do fungo.

Os sobrenadantes dos macerados de pulmões (homogenatos) eram separados, aliquotados e mantido a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem das citocinas.

#### **3.11.1) DOSAGEM DE CITOCINAS**

A presença e concentração das citocinas foram determinadas por testes de ELISA de captura, segundo método preconizado por Coligan et al. (1991).

Estes ensaios são baseados na utilização de pares de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, um dos quais marcado por biotina. O uso dos complexos biotina-avidina e peróxido de hidrogênio-peroxidase permite a determinação da concentração da citocina presente por medidas de densidade óptica.

Foram seguidos os procedimentos recomendados pelo fabricante dos anticorpos utilizados (Pharmingen) os quais estão relacionados abaixo.

CITOCINA	ANTICORPO PRIMÁRIO	ANTICORPO BIOTINILADO	"CUT-OFF" DA REAÇÃO
TNF- $\alpha$	G281-2626 (10 $\mu$ g/ml)	MP6-XT3 (2 $\mu$ g/ml)	31,25 pg/ml
IFN- $\gamma$	R4-6A2 (2 $\mu$ g/ml)	XMG1.2 (0.5 $\mu$ g/ml)	31,25 pg/ml
IL-12	C15.6 (6 $\mu$ g/ml)	C17.8 (2 $\mu$ g/ml)	15,625 pg/ml
IL-2	JES6-1A12 (4 $\mu$ g/ml)	JES6-5H4 (2 $\mu$ g/ml)	15,625 pg/ml
IL-3	MP2-8F8 (0.5 $\mu$ g/ml)	MP2-43D11 (0.5 $\mu$ g/ml)	1,953 pg/ml
GM-CSF	MP1-22E9 (6 $\mu$ g/ml)	MP1-31G6 (3 $\mu$ g/ml)	31,25 pg/ml
IL-10	JES5-2A5 (5 $\mu$ g/ml)	SXC-1 (2 $\mu$ g/ml)	31,25 pg/ml
IL-4	BVD4-1D11 (4 $\mu$ g/ml)	BVD6-24G2 (2 $\mu$ g/ml)	15,625 pg/ml
IL-5	TRFK5 (6 $\mu$ g/ml)	TRFK4 (3 $\mu$ g/ml)	31,25 pg/ml

- Técnica utilizada no laboratório para a dosagem das citocinas:

A sensibilização da placa de fundo chato foi feita com 50 $\mu$ l/poço do Ac primário ou de captura na concentração ótima pré-determinada. O AcM primário foi diluído em solução de bicarbonato de sódio 0,1M, pH 8,2. As placas foram vedadas com plástico e incubadas por 24h à 4°C.

Os sítios livres foram bloqueados com 200 $\mu$ l/poço de gelatina (DIFCO) 1% (m/v) em PBS, pH 7,0 por 2 horas à temperatura ambiente.

Adição das respectivas citocinas recombinantes e sua diluição seriada em PBS-10% SFB num volume de 50 $\mu$ l/poço para obtenção das curvas-padrão; são adicionadas as amostras puras e/ou diluídas ao 1/2 no mesmo tampão, em duplicata, aos demais poços e procede-se à incubação a 4°C por um período de 18 horas, aproximadamente.

O anticorpo secundário foi adicionado após diluição em PBS-10% de SFB, no volume de 50 $\mu$ l para cada poço. Após 45 minutos à temperatura ambiente, o

conjugado estreptavidina peroxidase (Streptavidin biotinylated horseradish peroxidase complex) diluído a 1:1000 em PBS com 0,25% de gelatina foi acrescentado e a placa incubada a 37°C por 1 hora.

Notar que a adição de cada reagente mencionada anteriormente era procedida por 5 ou 6 lavagens das placas com PBS-Tween20 (PBS pH 7.0 e 0.05% v/v de Tween20)

A reação com o substrato foi feita com 100µl de uma solução de OPD (ortofenilenodiamina) em tampão fosfato 0,2M, ácido cítrico 0,1M, pH 5,0 e água destilada, acrescida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> imediatamente antes do uso. A reação, ao abrigo da luz, foi aguardada por 45 minutos a contar do seu início.

A finalização se deu pela colocação de 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N em cada poço.

A leitura das densidades ópticas foi realizada em leitor automático em 492nm de comprimento de onda (VERSAmax – Molecular Devices Corporation).

As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear obtida com os dados referentes às diluições das citocinas recombinantes (curva-padrão).

### **3.12) ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados referentes às contagens totais e absoluta dos neutrófilos e linfócitos, avaliação da resposta imune celular (resposta de hipersensibilidade do tipo tardio), avaliação do grau de infecção através da recuperação de fungos viáveis observados nos órgãos dos animais, avaliação da resposta imune humoral (dosagem de anticorpo) e dosagem de citocinas no pulmão foram submetidos à análise de variância com dois ou três critérios (tempo, tratamento e linhagem) seguida por comparações múltiplas, pelo método de Tukey (Zar, 1984). Para o experimento de mortalidade o método utilizado para análise dos

resultados foi a Curva de sobrevida (Logrank). O nível de significância adotado foi  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

## 4- RESULTADOS

### 4.1) PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO AcM RB6-8C5

Obtivemos cerca de 2,5ml de anticorpos purificados com concentração de 36 mg/ml, que foi suficiente para todos os experimentos realizados em animais B10.A e A/J.

### 4.2) AVALIAÇÃO DA DEPLEÇÃO DE LEUCÓCITOS PMN

Os neutrófilos foram avaliados no sangue periférico obtido através de um pequeno corte na base da cauda de camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/J) depletados ou não de células PMN.

A avaliação foi realizada antes do tratamento com AcM anti-PMN e com IgG normal de rato, e antes dos animais serem submetidos à infecção com leveduras viáveis de *P.brasiliensis* pela via i.t.. Este dado serviu de controle inicial dos animais subsequentemente utilizados nos experimentos de depleção (tempo -1).

Pode-se notar, na figura 1, uma pequena variabilidade quanto ao número de leucócitos PMN neutrófilos entre os grupos no tempo -1. O grupo de animais B10.A que recebeu o tratamento com AcM anti-PMN apresentou 4.063 células/mm<sup>3</sup> e o grupo de animais que serviu de controle apresentou 2.976 células/mm<sup>3</sup>. Já o grupo de animais A/J que recebeu o tratamento com AcM anti-PMN apresentou 3.972 células/mm<sup>3</sup> e o grupo controle apresentou 3.663 células/mm<sup>3</sup> no sangue periférico.

Às 24 horas após o tratamento com AcM anti-PMN (250µg/animal pela via i.p.) e antes da infecção com o fungo, o sangue periférico dos

camundongos foi novamente avaliado para comprovar o efeito da depleção (tempo zero de infecção). Pode-se verificar uma grande diminuição no número de leucócitos PMN nos animais tratados com o AcM.

Esta diminuição foi significativa quando comparada com o número de células PMN dos animais controle B10.A (554 células/mm<sup>3</sup> para animais depletados e 3.363 células/mm<sup>3</sup> para os animais controle) e A/J (348 células/mm<sup>3</sup> para animais depletados e 3.880 células/mm<sup>3</sup> para animais controle).

Os animais do grupo experimental receberam nova inoculação do AcM nos dias 2 e 5 após a infecção com o fungo. O sangue foi coletado no dia 6, e os grupos novamente caracterizados quanto à presença de leucócitos PMN neutrófilos no sangue periférico.

Ao compararmos o efeito do tratamento da depleção de neutrófilos no sangue de ambas linhagens de animais verificamos que aos 6 dias de infecção, os grupos de camundongos susceptíveis e resistentes depletados de células PMN reagem igualmente ao tratamento com anticorpo monoclonal (RB6-8C5). A inoculação do AcM levou a diminuição significativa dos neutrófilos de animais B10.A (210 células/mm<sup>3</sup> para o grupo RB6 e 4.518 células/mm<sup>3</sup> para o grupo IgG) e A/J (132 células/mm<sup>3</sup> para o grupo RB6 e 10.174 células/mm<sup>3</sup> para o grupo IgG) infectados com o fungo *P.brasiliensis*.

Deve-se notar que somente os camundongos A/J infectados e tratados com IgG apresentaram no sexto dia um grande aumento de leucócitos PMN no sangue periférico.

Os animais antes de completarem 15, 30 e 120 dias de infecção, e seus órgãos serem retirados para avaliar o grau de infecção (UFC), foram submetidos a nova sangria para contagem do número de leucócitos PMN.

Com 14 dias de infecção os animais B10.A depletados de células PMN recuperaram o seu número original de células no sangue periférico, não havendo diferença significativa entre os grupos de animais depletado

(4.687 células/mm<sup>3</sup>) ou não depletado (2.785 células/mm<sup>3</sup>). Já os animais A/J tratados, aos 14 dias de infecção, apresentaram aumento significativo de células PMN (9.063 células/mm<sup>3</sup>) em relação ao grupo de animais controle (4.365 células/mm<sup>3</sup>).

Aos 14 dias, quando comparamos o número de células PMN no sangue periférico de ambas as linhagens, depletados de células PMN, verificamos que o número destas células foi significativamente maior (dobro) nos animais resistentes (9.063 células/mm<sup>3</sup>) do que nos animais susceptíveis (4.687 células/mm<sup>3</sup>). Ainda no grupo de animais resistentes depletados verificamos que o número de células PMN liberado para o sangue foi quase três vezes maior (9.063 células/mm<sup>3</sup>) do que o número de células PMN presente antes do tratamento e da infecção (3.972 células/mm<sup>3</sup>).

Nos animais susceptíveis depletados, este fenômeno de produção de maior número de células PMN aos 14 dias de infecção (4.687 células/mm<sup>3</sup>), em relação ao seu número basal de células, não aconteceu (4.063 células/mm<sup>3</sup>).

Já com 29 dias de infecção, o número de células PMN em animais B10.A depletados ou não de células PMN não apresentou diferença (6.121 células/mm<sup>3</sup> para o grupo RB6 e 6.427 células/mm<sup>3</sup> para o grupo IgG). O mesmo ocorreu com os animais A/J (5.820 células/mm<sup>3</sup> para o grupo RB6 e 4.984 células/mm<sup>3</sup> para o grupo IgG).

Aos 119 dias de infecção, observamos que não houve diferença significativa entre o número de células PMN no sangue periférico de camundongos B10.A depletados (7.276 células/mm<sup>3</sup>) ou não (6.467 células/mm<sup>3</sup>) de neutrófilos. Em animais A/J tal diferença também não ocorreu (7.731 células/mm<sup>3</sup> para o grupo depletado e 6.747 células/mm<sup>3</sup> para o grupo tratado com IgG).

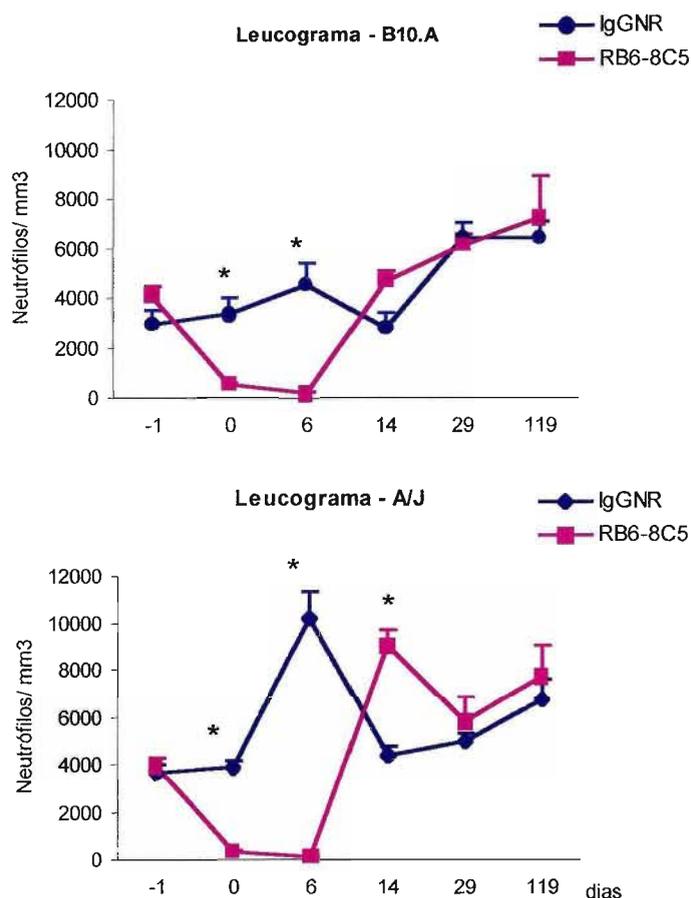


Figura 1: Neutrófilos totais do sangue de animais B10.A e A/J. A coleta foi realizada nos grupos de animais antes da primeira inoculação do AcM anti-PMN RB6-8C5 (dia -1 de infecção). Às 24 horas após a primeira depleção foi feita nova coleta de sangue para avaliar a depleção de células PMN neutrófilos (tempo zero de infecção) e subsequentemente à infecção pelo *P.brasiliensis*. Os animais do grupo experimental receberam nova inoculação do AcM nos dias 2 e 5 após a infecção. O sangue foi coletado no dia 6, e os grupos novamente avaliados quanto à presença de leucócitos PMN no sangue periférico. Antes dos animais serem sacrificados nos períodos programados para o UFC, foi coletado o sangue na base da cauda para quantificar o número de leucócitos PMN no sangue periférico. Foram utilizados 7 animais/linhagem para o grupo de animais controle e 8 animais/linhagem para o grupo de animais tratados com AcM RB6-8C5. Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos grupos ensaiados e (\*) significa diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

### 4.3) AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO.

O material colhido para quantificar o número de leucócitos PMN foi também caracterizado quanto ao número de linfócitos presentes.

A figura 2 mostra o número total de linfócitos nos grupos experimentais e controles antes de serem tratados com AcM anti-PMN e com IgG normal de rato pela via i.p. (dia -1 de infecção). Podemos observar que os animais B10.A apresentam uma pequena variabilidade quanto ao número de linfócitos entre o grupo que posteriormente foi submetido ao tratamento com AcM anti-PMN (11.843 células/mm<sup>3</sup>) e o grupo de animais controle (13.907 células/mm<sup>3</sup>). Em animais A/J nota-se uma diferença menor no número de linfócitos entre os grupos que posteriormente seriam tratados com o AcM (10.717 células/mm<sup>3</sup>) e com IgG “controle” (9.281 células/mm<sup>3</sup>).

Na quantificação de linfócitos no sangue periférico 24 horas após o tratamento (tempo zero de infecção) verificou-se que os animais B10.A depletados de neutrófilos apresentaram diminuição destas células (9.657 células/mm<sup>3</sup>), com relação ao seu controle (14.768 células/mm<sup>3</sup>) e ao seu número basal de linfócitos (11.843 células/mm<sup>3</sup>).

Quanto ao número de linfócitos presente no sangue periférico de animais A/J, observamos que não houve diferença significativa entre o grupo depletado (7.765 células/mm<sup>3</sup>) e o grupo não depletado de neutrófilos (9.759 células/mm<sup>3</sup>).

No tempo zero quando comparamos o número de linfócitos presentes nas duas linhagens de camundongos, verificamos que os animais susceptíveis (grupo IgG) apresentaram número maior de linfócitos do que os animais resistentes do grupo equivalente. Tal diferença não ocorreu entre os grupos RB6.

Ao quantificar os linfócitos no sangue periférico aos 6 dias de infecção das duas linhagens de animais, tratadas com AcM ou não tratadas, observamos que havia número maior de linfócitos nas linhagens B10.A (10.151 células/mm<sup>3</sup>) e A/J (7.915 células/mm<sup>3</sup>) tratadas com IgG em relação, respectivamente, aos animais B10.A (5.583 células/mm<sup>3</sup>) e A/J (2.485 células/mm<sup>3</sup>) tratados com o AcM.

Ao caracterizar o número de linfócitos aos 14 dias de infecção no sangue periférico verificamos que o número destas células no grupo de animais B10.A depletado de neutrófilos foi significativamente menor (8.751 células/mm<sup>3</sup>) que o apresentado pelo grupo controle (17.162 células/mm<sup>3</sup>).

Em animais A/J depletados de neutrófilos também havia número menor de linfócitos (8.887 células/mm<sup>3</sup>) com relação aos seus controles (13.895 células/mm<sup>3</sup>), porém, esta diferença não se mostrou significativa.

Aos 29 e 119 dias de infecção verificamos que não houve diferenças significativas entre os grupos de animais B10.A e A/J tratados ou não com o AcM anti-PMN.

A análise conjunta dos dados demonstra que a depleção de leucócitos PMN induz diminuição concomitante, porém mais prolongada, de linfócitos nos camundongos B10.A (dias 0, 6 e 14). Tal fenômeno é mais transitório nos camundongos A/J, e só ocorre no dia 6 pós-infecção.

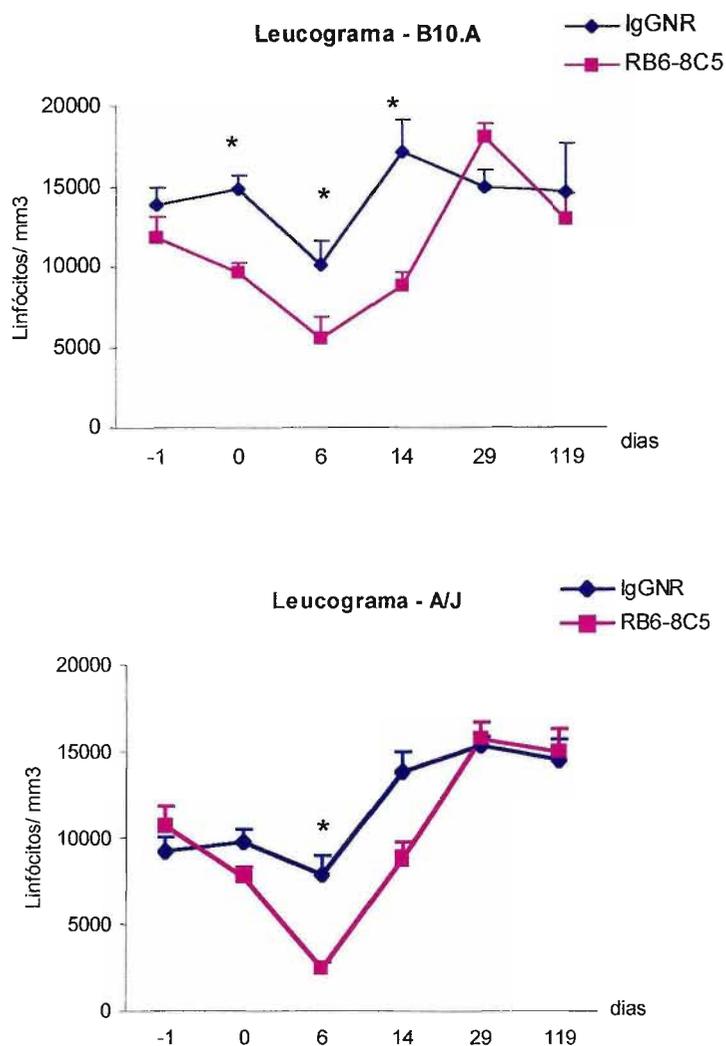


Figura 2: Linfócitos totais do sangue de animais B10.A e A/J. A coleta foi realizada nos grupos depletados e não depletados nos dias -1, 0, 6, 14, 29 e 119. Foram utilizados 7 animais/linhagem para os grupos de animais controle e 8 animais/linhagem para os grupos de animais tratado com AcM RB6-8C5.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos grupos ensaiados e (\*) significa diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4) TEMPO DE SOBREVIDA

Grupos de 8 animais A/J e B10.A machos, tratados com AcM anti-PMN e infectados i.t. com leveduras viáveis do *P.brasiliensis* assim como 6 animais controle, tratados com IgG normal e infectados com *P.brasiliensis*, foram observados durante um período de 400 dias, sendo registrado o tempo de sobrevivida para cada animal (em dias).

Na Figura 3 podemos observar que a curva de sobrevivida dos animais B10.A infectados e tratados com AcM anti-PMN tem uma queda mais precoce que aquela dos animais controle. A morte dos animais se inicia no dia 128, e no dia 238 após infecção todos os animais já haviam morrido. A mortalidade dos animais B10.A controle começou no dia 161 quando 83,34% dos animais estão vivos e termina no dia 291 quando nenhum animal permanece vivo.

A sobrevivida média dos animais B10.A tratados com o AcM foi de  $158,0 \pm 36,22$ /dias, enquanto que a dos camundongos controle foi de  $239,5 \pm 54,61$ /dias. Análise estatística destes dados (método de comparação de curvas de sobrevivida pelo Logrank) demonstrou que a sobrevivida dos animais tratados é significativamente menor do que a dos não tratados ( $p < 0,05$ ).

Como pode ser observado na figura 3 (gráfico inferior), apenas um camundongo A/J tratado e infectado apresentou morte precoce aos 3 dias pós-infecção. A partir deste tempo não foram observadas novas mortes neste grupo de animais. Todos os animais controle permaneceram vivos durante o período de observação. Nesta linhagem não foi possível calcular a sobrevivida média e os resultados obtidos com animais experimentais não diferiram significativamente dos camundongos controle ( $p > 0,05$ ). O experimento de sobrevivida foi repetido duas vezes, com resultados equivalentes.

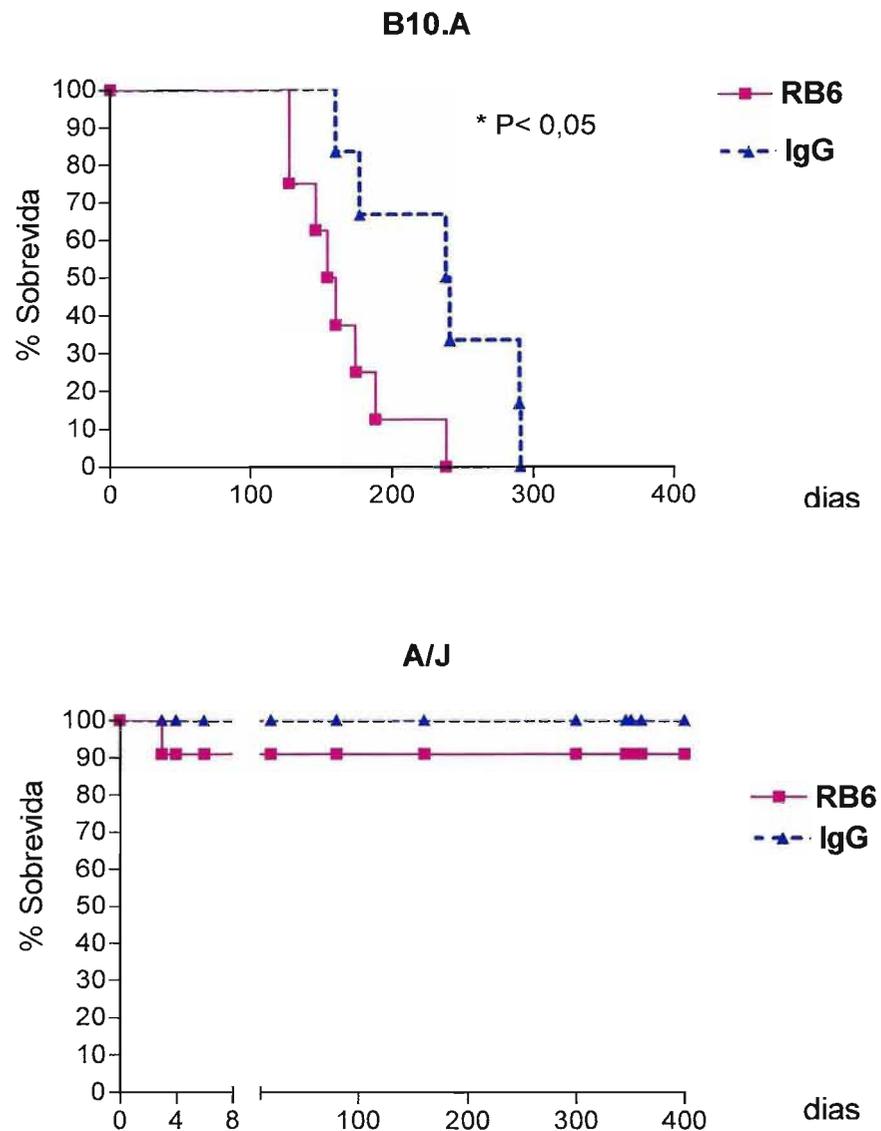


Figura.3: Tempo de sobrevida de camundongos isogênicos B10.A e A/J machos, tratados com AcM anti-PMN e infectados i.t. com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis do *P.brasiliensis* (n=8-10 camundongos/linhagem) e camundongos infectados e tratados com IgG normal de rato como controle (n= 6 camundongos/linhagem). A sobrevida dos animais foi acompanhada por 400 dias. O experimento foi repetido por duas vezes com resultados semelhantes. (\*) Análise estatística pelo método de Logrank ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5) GRAU DE INFECÇÃO

Grupos de animais B10.A e A/J tratados com o AcM anti-PMN ou IgG normal e infectados com leveduras viáveis do *P.brasiliensis* foram sacrificados após 7, 15, 30 e 120 dias de infecção.

Seus órgãos (pulmão, fígado e baço) foram retirados, pesados, homogeneizados, plaqueados em ágar-BHI-suplementado, e calculado o  $\log_{10}$  do número de UFC/g de tecido.

Ao início da infecção (7 dias), ambas as linhagens apresentaram no pulmão, número elevado de leveduras (figura 4). Animais B10.A controle apresentaram  $5,044 \pm 0,077 \log_{10}$  de leveduras no pulmão, enquanto que aqueles tratados com AcM apresentavam  $5,716 \pm 0,126 \log_{10}$  aos 7 dias de infecção ( $p < 0,05$ ). O tratamento com AcM anti-PMN em animais A/J também aumentou significativamente a carga fúngica pulmonar ( $5,211 \pm 0,039 \log_{10}$  para animais controle e  $6,109 \pm 0,059 \log_{10}$  para animais tratados). Foi também observada, em ambas as linhagens, disseminação para o fígado e baço, sendo mais evidente no grupo tratado com AcM, porém não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos.

Comparados aos resultados de 7 dias de infecção, animais B10.A apresentaram aos 15 dias um aumento do número de fungos no pulmão, fígado e baço. Este número é significativamente maior nos pulmões ( $6,141 \pm 0,053 \log_{10}$ ) e baço ( $1,834 \pm 0,290 \log_{10}$ ) de animais tratados com AcM quando comparado com os pulmões ( $5,444 \pm 0,100 \log_{10}$ ) e baço ( $0,365 \pm 0,246 \log_{10}$ ) de animais que receberam IgG normal de rato.

Nos camundongos A/J a infecção pulmonar aos 15 dias igualou-se nos grupos tratado ( $5,666 \pm 0,104 \log_{10}$ ) e não tratado ( $5,602 \pm 0,081 \log_{10}$ ). Houve uma diminuição no número de fungos no baço e fígado quando comparado ao

resultado de 7 dias de infecção e os grupos tratado e não tratado não apresentavam diferenças significativas entre si.

Aos 30 dias de infecção em animais B10.A (Figura 4) observa-se uma grande colonização pulmonar, particularmente nos animais depletados de leucócitos PMN ( $6,570 \pm 0.137 \log_{10}$  em camundongos tratados e  $5,812 \pm 0.178 \log_{10}$  em camundongos controle) e observa-se também nesta linhagem uma disseminação significativamente maior do fungo para o fígado nos animais tratados ( $2,270 \pm 0.216 \log_{10}$  em camundongos tratados e  $0.576 \pm 0.359 \log_{10}$  em animais controle). Na linhagem A/J a infecção pulmonar também não diferiu entre os grupos de animais tratados com AcM anti-PMN ( $5,917 \pm 0.046 \log_{10}$ ) e os não tratados ( $5,656 \pm 0.182 \log_{10}$ ). Verifica-se, neste tempo, uma evidente diminuição da colonização de fígado e baço.

Nos camundongos B10.A a infecção pulmonar aos 120 dias igualou-se no grupo tratado ( $5,923 \pm 0.208 \log_{10}$ ) e não tratado ( $5,833 \pm 0.238 \log_{10}$ ) com o AcM; no entanto, a disseminação extra-pulmonar é muito mais intensa e significativamente maior nos animais depletados de granulócitos. Camundongos tratados apresentaram  $5,518 \pm 0.136 \log_{10}$  de UFC no fígado, enquanto que nos camundongos controle observamos  $1,991 \pm 0.947 \log_{10}$  UFC (diferença de  $3,6 \log_{10}$ ). Os camundongos tratados apresentaram  $4,735 \pm 0.221 \log_{10}$  UFC no baço e os não tratados  $1,977 \pm 0.515 \log_{10}$  (diferença de  $2,7 \log_{10}$ ), como se observa na figura 4.

Animais A/J com 120 dias de infecção (figura 4) apresentaram no pulmão a mesma carga fúngica, tanto os animais tratados com AcM anti-PMN ( $5,795 \pm 0.125 \log_{10}$ ) como os animais inoculados com IgG normal ( $5,716 \pm 0.131 \log_{10}$ ). Houve pequena disseminação do fungo para o fígado ( $0,073 \pm 0.073 \log_{10}$ ) e baço ( $0,150 \pm 0.150 \log_{10}$ ) nos animais tratados. Já os animais controle apresentam no fígado  $0,173 \pm 0.175 \log_{10}$  e no baço  $0,278 \pm 0.281 \log_{10}$  de UFC. Estes valores nos órgãos de disseminação não são diferentes entre os grupos estudados.

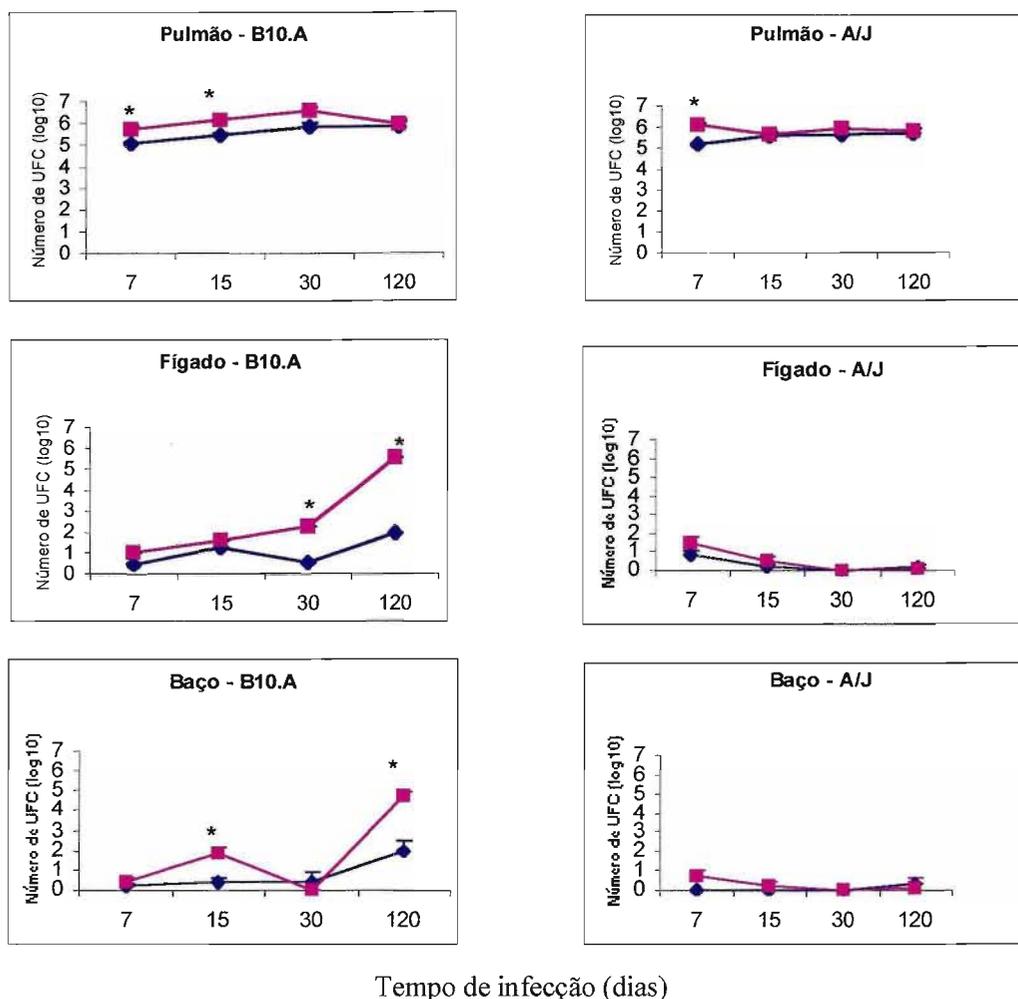


Figura 4: Efeito da depleção de leucócitos PMN no grau de infecção de animais susceptíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*. Animais B10.A e A/J foram tratados com AcM nos dias -1, 2 e 5 (■) ou IgG normal de rato (◆) e infectados no dia zero com  $1 \times 10^6$  de leveduras do *P. brasiliensis* pela via intratraqueal. O grau de infecção foi determinado aos 7, 15, 30 e 120 dias pós-infecção pelo método de UFC. Os resultados apresentados foram obtidos em 3 experimentos independentes e como apresentavam valores muito semelhantes, foram reunidos em um único grupo. Deste modo, para as linhagens B10.A e A/J trabalhamos com um total de 37-39 animais controle tratados com IgG normal de rato e 38-42 animais tratados com o AcM RB6-8C5 anti-PMN. Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos grupos ensaiados e (\*) significa diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6) RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO TARDIO (HTT)

Grupos de 6 a 8 animais por ponto experimental, de ambas as linhagens, infectados intratraquealmente com leveduras viáveis do *P.brasiliensis* foram analisados quanto à resposta de HTT. Inoculamos 25µl do antígeno de Fava Netto em animais infectados tratados com IgG ou com o AcM RB6-8C5 e em grupos de camundongos B10.A e A/J normais, não infectados.

Pode-se verificar na figura 5 que animais B10.A tratados e não tratados, desenvolveram baixa reatividade cutânea frente ao antígeno do *P.brasiliensis* em todos os períodos analisados.

Ao contrário, animais A/J apresentaram tanto aos 15 como aos 30 e 120 dias pós-infecção, reações de HTT francamente positivas. Em ambas as linhagens não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratados com o anticorpo monoclonal RB6-8C5.

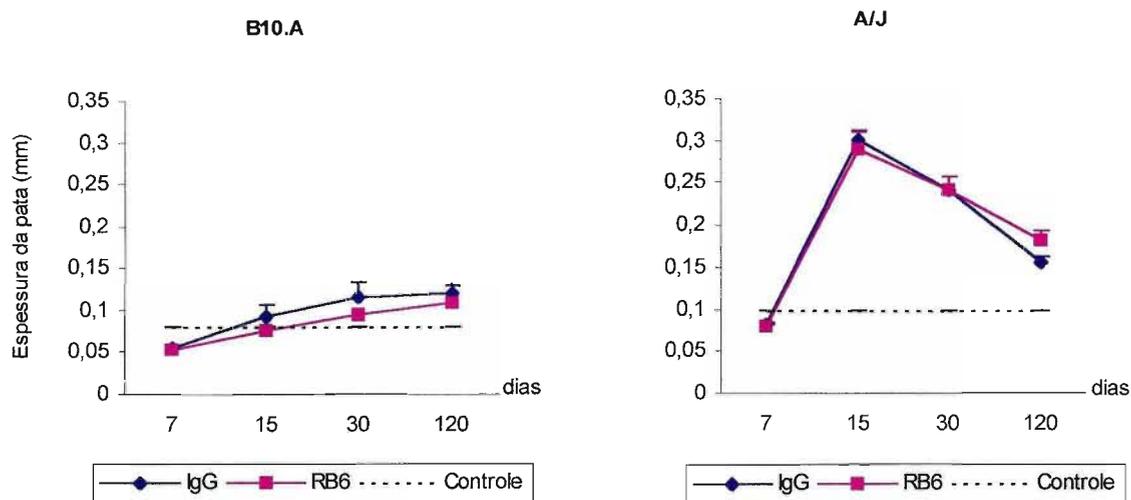


Figura 5: Efeito de tratamento com AcM anti-PMN na resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) em camundongos B10.A e A/J, infectados i.t. com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes de *P. brasiliensis* nos períodos de 7, 15, 30 e 120 dias pós-infecção. No gráfico estão apresentados os inchaços de pata de animais normais/não infectados (linha tracejada), animais infectados e tratados com IgG normal de rato e animais infectados e tratados com anticorpo monoclonal RB6-8C5 (depleção de neutrófilos). Todos os grupos de camundongos (6 a 8 animais por grupo) foram injetados subcutaneamente no coxim plantar esquerdo com  $25 \mu\text{l}$  de antígeno de Fava Netto e a medição do inchaço das patas foi feita após 24 horas com o auxílio de um espessímetro. Os resultados estão expressos como a diferença, em mm, entre as medidas feitas antes e 24 horas após a inoculação do antígeno.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos grupos ensaiados.

A linha tracejada representa a média  $\pm$  2 DP dos animais controle, não infectados (intervalo de 95% de confiança)

#### 4.7) PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*P.BRASILIENSIS*

A resposta imune humoral dos animais B10.A e A/J tratados e não tratados com AcM anti-PMN (RB6-8C5) e infectados i.t. com o fungo foi avaliada pela produção de anticorpos anti *P.brasiliensis* (Ig total e os diferentes isótipos). Assim, nos períodos indicados, os animais foram anestesiados, suas artérias e veias axilares seccionadas e coletadas amostras do sangue para obtenção do soro; as amostras foram estocadas a -20°C até o momento do teste. Os níveis de anticorpos específicos foram determinados por método imunoenzimático (ELISA) como descrito no item 3.10 de Material & Métodos.

##### 4.7.1) Níveis de Ig total anti-*P.brasiliensis*

Camundongos B10.A com 7 dias de infecção e tratados com AcM anti-PMN apresentaram título médio de  $6,922 \pm 0.24 \log_2$  e os tratados com IgG normal de rato apresentaram título de  $6.722 \pm 0.24 \log_2$ . Somente aos 15 dias de infecção, animais B10.A tratados com AcM anti-PMN apresentaram título significativamente maior que o grupo IgG ( $8,722 \pm 0.24 \log_2$  e  $6,722 \pm 0.24 \log_2$  para o grupo controle). Aos 30 e 120 dias tivemos aumento no título de anticorpos comparado aos dias 7 e 15 de infecção, porém não houve diferenças significativas entre os animais tratados ( $14,893 \pm 0.20 \log_2$  aos 30 dias e  $15,922 \pm 0.24 \log_2$  aos 120 dias de infecção) e não tratados com anti-PMN ( $13,722 \pm 0.24 \log_2$  aos 30 dias e  $16,522 \pm 0.8 \log_2$  aos 120 dias de infecção).

Camundongos A/J aos 7 dias de infecção apresentaram títulos médios de  $5,722 \pm 0.24 \log_2$  e  $5,322 \pm 0.0 \log_2$  para os animais tratados e não tratados, respectivamente. No período de 15 dias de infecção, o grupo RB6 apresentou

títulos significativamente mais altos ( $10,722 \pm 0.24 \log_2$ ) que o grupo controle ( $7,922 \pm 0.24 \log_2$ ). A produção total de anticorpos (Ig Total) aos 30 dias de infecção em animais A/J apresentou níveis de  $12,922 \pm 0.68 \log_2$  para os animais depletados de granulócitos e  $11,322 \pm 0.44 \log_2$  para os animais controle. Aos 120 dias de infecção também não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de anticorpos do grupo experimental ( $16,722 \pm 0.24 \log_2$ ) e controle ( $16,922 \pm 0.24 \log_2$ ). Assim, os títulos de anticorpos sobem com o decurso da doença, porém somente aos 15 dias os níveis de anticorpos do grupo RB6 foram maiores que no grupo IgG.

#### **4.7.2) Níveis de IgM anti-*P.brasiliensis***

Em animais B10.A foram detectados níveis muito baixos de IgM anti-*P.brasiliensis* durante os períodos de 7 dias ( $5,322 \pm 0 \log_2$  para animais controle e  $5,722 \pm 0,24 \log_2$  para animais depletados de neutrófilos) e 15 dias de infecção ( $5,322 \pm 0 \log_2$  para animais controle e  $5,722 \pm 0,24 \log_2$  para animais depletados de neutrófilos).

Para este isótipo parece não haver diferenças marcantes dos títulos de anticorpos entre os grupos analisados.

Em animais A/J não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados e não tratados com o AcM em todos os períodos de infecção pulmonar, como apresentado na figura 6.

#### **4.7.3) Níveis de IgA anti-*P.brasiliensis***

Camundongos B10.A depletados e não depletados de neutrófilos apresentaram baixos níveis de anticorpos IgA no soro aos 7 ( $5,922 \pm 0,24 \log_2$

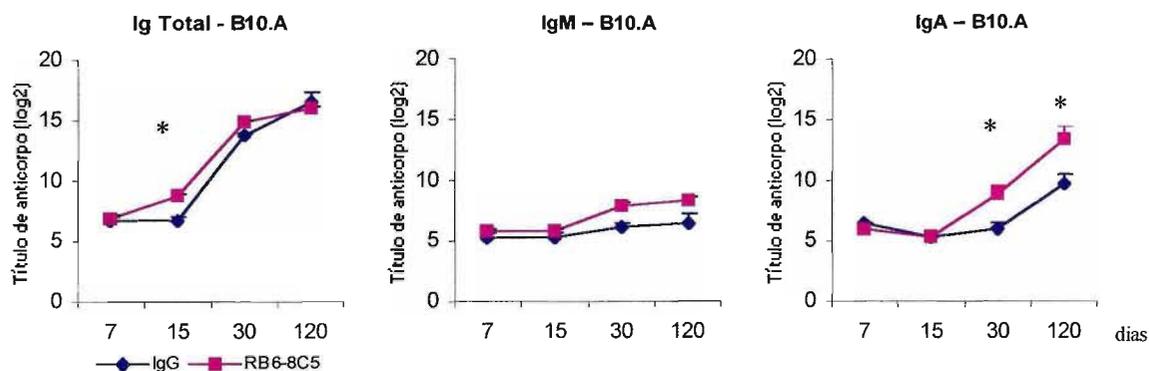
para animais depletados e  $6,322 \pm 0 \log_2$  para animais controle) e 15 dias de infecção ( $5,322 \pm 0 \log_2$  para animais depletados e não depletados).

Somente o grupo de animais depletados de neutrófilos apresentaram níveis maiores e significantes de IgA aos 30 dias ( $8,751 \pm 0,61 \log_2$ ) e 120 dias ( $13,322 \pm 1 \log_2$ ) de infecção, com relação ao grupo controle ( $5,922 \pm 0,4 \log_2$  aos 30 dias e  $9,522 \pm 0,8 \log_2$  aos 120 dias de infecção).

Parece, então, que a doença mais grave dos animais tratados com AcM é acompanhada por maiores títulos de IgA.

Em animais A/J não foi encontrada diferença significativa nos níveis de anticorpos entre os grupos controle e os grupos tratados com AcM anti-PMN em todos os tempos de infecção. Podemos observar que aos 120 dias foi verificado nível mais alto de anticorpos IgA em relação aos outros períodos de infecção, porém não foi encontrada diferença entre o grupo controle ( $11,522 \pm 0,2 \log_2$ ) e o experimental ( $11,722 \pm 0,24 \log_2$ ).

### Animais B10.A



### Animais A/J

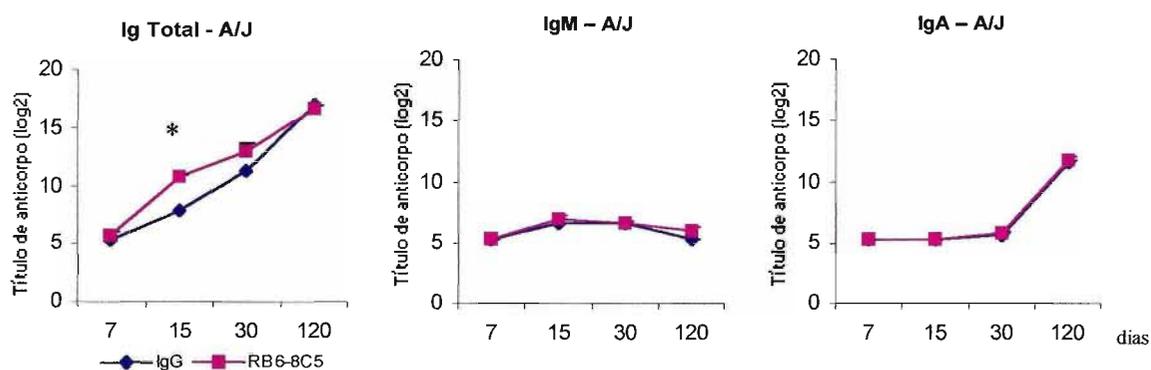


Figura 6: Títulos de anticorpos específicos Totais e das classes IgM e IgA anti-*P.brasiliensis* nos soros de camundongos B10.A (superior) e A/J (inferior) tratados ou não com o AcM anti-PMN e infectados com o *P.brasiliensis* por via i.t. aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando a técnica de ELISA. Grupos de 5 a 6 animais de cada linhagem foram tratados com IgG normal de rato pela via intraperitoneal nos tempos -1, 2 e 5 dias da infecção pulmonar (controle) e grupos de 5 a 7 animais foram tratados com AcM anti-PMN (RB6-8C5) pela via intraperitoneal nos mesmos tempos.

Os resultados representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos obtidos para os grupos ensaiados nos diversos tempos de infecção. (\*) indica diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$  – Tukey).

#### 4.7.4) Níveis de IgG1 anti-*P.brasiliensis*

Com 7 dias de infecção animais B10.A depletados e não depletados de neutrófilos apresentaram níveis baixos de IgG1 ( $5,722 \pm 0.24 \log_2$  para animais controle e  $5.322 \pm 0 \log_2$  para animais depletados). Os títulos de anticorpos aumentaram com o passar do tempo (figura 7).

Com 15 dias pós-infecção o grupo RB6 apresentou títulos equivalentes ao grupo IgG ( $13,322 \pm 0 \log_2$  e  $12,122 \pm 0.2 \log_2$ , respectivamente). Aos 30 dias, animais B10.A não depletados apresentaram título médio de anticorpos de  $16.52 \pm 0.20 \log_2$ . Já os animais depletados de células PMN apresentaram níveis significativamente maiores, indicando a maior gravidade da doença ( $18.75 \pm 0.21 \log_2$ ). Aos 120 dias de infecção os níveis de anticorpos IgG1 eram equivalentes nos dois grupos de animais de ( $15.32 \pm 0.85 \log_2$  para o grupo IgG e  $16.52 \pm 0.20 \log_2$  para o grupo RB6). Em conclusão, o título de IgG1 em animais B10.A é significativamente maior em animais tratados com AcM anti-PMN, somente aos 30 dias de infecção.

Para os camundongos A/J, títulos equivalentes do IgG1 foram observados entre os grupos RB6 e IgG. Na figura 7 pode-se verificar que aos 7 dias de infecção o grupo IgG apresentaram título médio de  $5,322 \pm 0 \log_2$  e o grupo RB6 apresentou título de  $6,122 \pm 0.2 \log_2$ . No período de 15 dias de infecção os animais A/J controle apresentaram títulos médios de  $5,722 \pm 0.4 \log_2$ , já os animais depletados de granulócitos apresentaram títulos de  $7,922 \pm 0.24 \log_2$ . As diferenças observadas não foram significativas.

Aos 30 dias de infecção os animais A/J apresentaram níveis de  $13,922 \pm 1,33 \log_2$  para o grupo controle e  $14,122 \pm 1,39 \log_2$  para o grupo de animais

experimental. Com 120 dias de infecção notamos no gráfico 7 que não houve diferenças em relação ao título de IgG1 ( $16,722 \pm 0,4 \log_2$  para o grupo controle e  $16,522 \pm 0,20 \log_2$  para o grupo de animais depletados). Portanto, para o isótipo IgG1 não houve diferenças entre os grupos tratados e controles nos períodos aqui analisados.

#### **4.7.5) Níveis de IgG2b anti-*P.brasiliensis***

Podemos observar na figura 7 que, aos 7 dias de infecção, os animais B10.A controle ( $5,322 \pm 0 \log_2$ ) e depletados ( $5,922 \pm 0,24 \log_2$ ) apresentaram níveis baixos de anticorpos no soro. Aos 15 dias o título de anticorpos aumentam com relação aos 7 dias de infecção, mas não apresentou diferenças significativas entre animais do grupo controle ( $10,922 \pm 0,68 \log_2$ ) e do grupo RB6 ( $13,322 \pm 0 \log_2$ ).

Os títulos de anticorpos aumentam com o progredir da doença. Animais controle apresentaram título de  $13,722 \pm 1,29 \log_2$  e  $17,922 \pm 0,6 \log_2$ , respectivamente aos 30 e 120 dias de infecção. Em animais depletados de granulócitos, os títulos de anticorpos também aumentaram com o tempo de infecção ( $11,607 \pm 0,57 \log_2$  aos 30 dias e  $17,322 \pm 0,32 \log_2$  aos 120 dias de infecção).

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de anticorpos IgG2b entre os grupos de animais controle e os grupos de animais tratados com o AcM, em todos os períodos analisados.

Não houve diferença nos níveis de IgG2b ao início da infecção entre os grupos de animais A/J tratados e não tratados com AcM anti-PMN ( $5,322 \pm 0 \log_2$ ). Diferença entre os grupos foi observada aos 15 dias de infecção, quando o grupo RB6 apresentou títulos significativamente maiores ( $9,522 \pm 0,49 \log_2$ ) que o seu controle ( $6,522 \pm 0,73 \log_2$ ).

Aos 30 dias também observamos aumento nos níveis de anticorpos nos animais depletados ( $13,122 \pm 0,97 \log_2$ ) em relação aos animais controle ( $11,122 \pm 0,2 \log_2$ ), porém este aumento não mostrou-se significativo pela análise estatística ( $0,05 < p < 0,10$ ). Já no tempo de 120 dias de infecção, não houve diferença de títulos médios entre o grupo tratado ( $13,322 \pm 0 \log_2$ ) e não tratado com anti-PMN ( $13,122 \pm 0,2 \log_2$ ).

#### **4.7.6) Níveis de IgG2a anti-*P.brasiliensis***

Como pode ser verificado na figura 8, os animais B10.A depletados e não depletados de células PMN apresentaram níveis equivalentes de anticorpos IgG2a. Para ambos os grupos observou-se o título médio de  $5,322 \pm 0 \log_2$  aos 7 dias de infecção. Aos 15 dias foram observados títulos mais altos de anticorpos, tanto em animais controle ( $6,122 \pm 0,20 \log_2$ ), como nos animais depletados de granulócitos ( $7,922 \pm 0,24 \log_2$ ).

Aos 30 dias os animais B10.A apresentaram títulos maiores com relação aos 7 e 15 dias de infecção, entretanto, não houve diferenças nos títulos de anticorpos entre os animais controle ( $10,522 \pm 0,73 \log_2$ ) e os depletados ( $10,75 \pm 0,52 \log_2$ ). O mesmo acontece aos 120 dias de infecção ( $14,522 \pm 0,37 \log_2$  para o grupo IgG e  $15,322 \pm 0,55 \log_2$  para o grupo RB6).

Logo ao início de infecção observamos títulos baixos de anticorpos IgG2a em animais A/J tratados ( $5,322 \pm 0 \log_2$ ) e não tratados com AcM anti-PMN ( $5,322 \pm 0 \log_2$ ), como apresentado na figura 8. Os níveis de IgG2a sobem com o decurso da doença e o grupo RB6 apresentou níveis maiores que o grupo IgG aos 15 e 30 dias pós-infecção. Após 15 dias de infecção notamos, que o título de anticorpos aumentou tanto nos animais controle ( $8,922 \pm 0,24 \log_2$ ) e como nos tratados ( $11,722 \pm 0,24 \log_2$ ). Os animais controle apresentaram título médio de  $10,122 \pm 0,73 \log_2$  e  $15,122 \pm 0,2 \log_2$ , respectivamente aos 30 e 120 dias de infecção pulmonar. Já os animais

depletados apresentaram título médio de  $14,522 \pm 0,58 \log_2$  e  $16,722 \pm 0,24 \log_2$  aos 30 e 120 dias de infecção.

Como pode ser verificado na figura 8, e confirmado pela análise estatística, camundongos da linhagem A/J produzem níveis mais elevados de anticorpos do isótipo IgG2a que os animais B10.A.

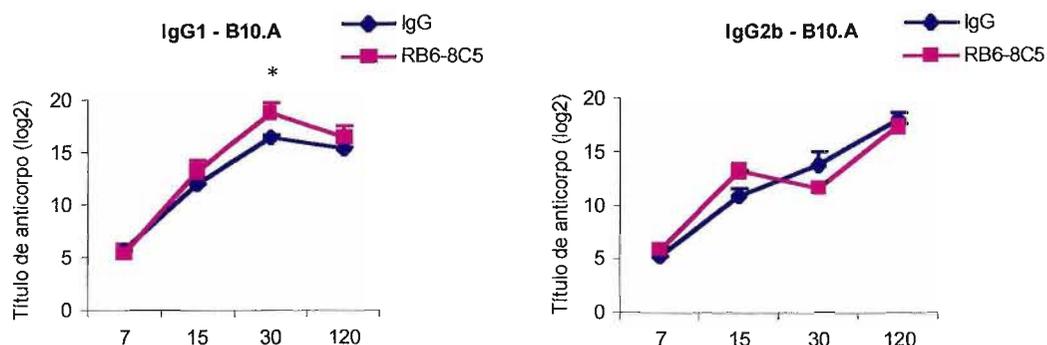
#### **4.7.7) Níveis de IgG3 anti-*P.brasiliensis***

Observamos na figura 8, que em 7 e 15 dias de infecção, animais B10.A depletados e não depletados de neutrófilos apresentaram os mesmos níveis de anticorpo IgG3 ( $5,322 \pm 0 \log_2$ ). Já aos 30 e 120 dias de infecção os animais controle apresentaram, respectivamente, títulos médios de  $7,922 \pm 0,87 \log_2$  e  $10,522 \pm 0,49 \log_2$ . Os animais depletados de granulócitos apresentaram títulos médios de  $6,607 \pm 0,18 \log_2$  e  $11,322 \pm 0,32 \log_2$ , respectivamente aos 30 e 120 dias de infecção. Assim, a depleção de células PMN diminuiu os níveis de anticorpos IgG3 somente aos 30 dias do experimento e essa diferença foi estatisticamente significativa.

Não houve diferenças nos níveis de IgG3 ao início da infecção entre os grupos de animais A/J tratados e não tratados ( $5,322 \pm 0 \log_2$ ). Aos 15 dias, verificamos que os animais depletados apresentaram níveis de IgG3 significativamente maiores ( $6,922 \pm 0,24 \log_2$ ) que os animais controle ( $5,322 \pm 0 \log_2$ ).

O mesmo fenômeno ocorreu aos 120 dias da doença ( $10,722 \pm 0,24 \log_2$  para o grupo RB6 e  $9,522 \pm 0,2 \log_2$  para o grupo IgG), mas não aos 30 dias quando os títulos foram equivalentes.

### Animais B10.A



### Animais A/J

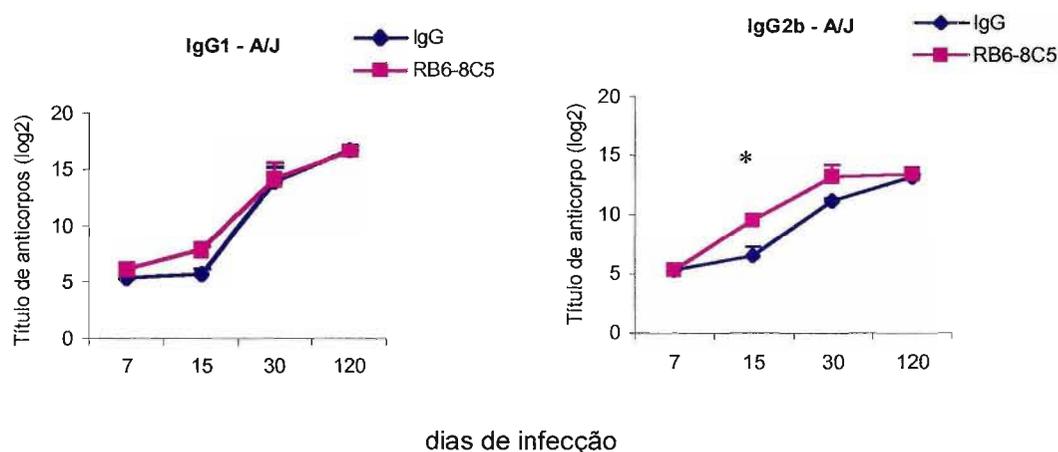
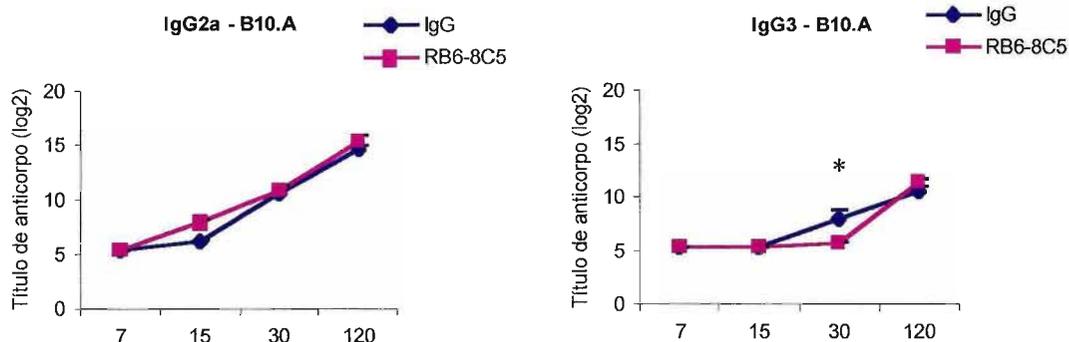
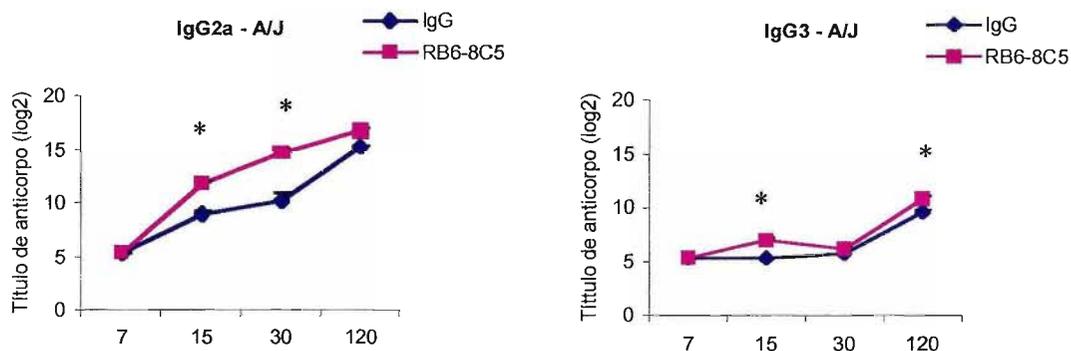


Figura 7: Títulos dos isótipos IgG1 e IgG2b anti-*P.brasiliensis* nos soros de camundongos B10.A (superior) e A/J (inferior) tratados ou não tratados com o AcM anti-PMN e infectados com *P.brasiliensis* por via i.t. aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando a técnica de ELISA. Grupos de 5 a 6 animais de cada linhagem foram tratados com IgG normal de rato pela via i.p. nos tempos -1, 2 e 5 dias da infecção pulmonar (controle) e grupos de 5 a 7 animais foram tratados com AcM anti-PMN (RB6-8C5) pela via i.p. nos mesmos tempos. Os resultados representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos obtidos para os grupos ensaiados nos diversos tempos de infecção.

(\*) indica diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$  – Tukey).

Animais B10.AAnimais A/J

dias de infecção

Figura 8: Títulos dos isótipos IgG2a e IgG3 anti-*P.brasiliensis* nos soros de camundongos B10.A (superior) e A/J (inferior) tratados ou não tratados com o AcM anti-PMN e infectados com *P.brasiliensis* por via i.t. aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando a técnica de ELISA. Grupos de 5 a 6 animais de cada linhagem foram tratados com IgG normal de rato pela via intraperitoneal nos tempos -1, 2 e 5 dias pós-infecção pulmonar (controle) e grupos de 5 a 7 animais foram tratados com AcM anti-PMN (RB6-8C5) pela via i.p. nos mesmos tempos.

Os resultados representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos obtidos para os grupos ensaiados nos diversos tempos de infecção. (\*) indica diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$  – Tukey).

#### 4.8) DOSAGEM DE CITOCINAS NOS HOMOGENATOS DOS PULMÕES

As dosagens de citocinas foram feitas em material proveniente de animais B10.A e A/J depletados e não depletados de granulócitos e infectados i.t. aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção com leveduras viáveis do *P.brasiliensis*.

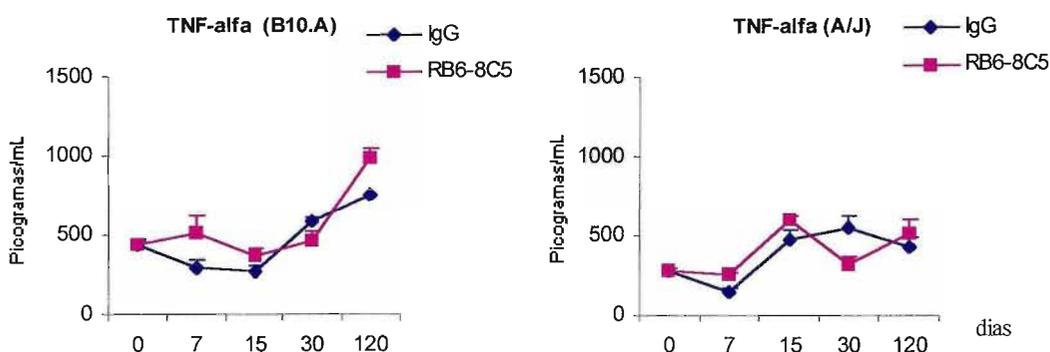
Neste procedimento os pulmões, assim como outros órgãos, eram colhidos logo após o sacrifício dos animais, pesados e, de maneira estéril, eram macerados em um volume de 5ml de PBS. Após a separação do sobrenadante, o macerado era semeado em meio adequado para o crescimento do fungo.

Os sobrenadantes dos macerados de pulmões – os homogenatos – eram separados, aliquotados e mantidos a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem das citocinas.

##### 4.8.1) TNF- $\alpha$

De maneira geral, podemos verificar que animais das linhagens B10.A e A/J submetidos ou não ao tratamento não apresentaram diferenças significativas nos níveis de TNF- $\alpha$ . No entanto, pode-se verificar em camundongos B10.A (figura 9) que os níveis de TNF- $\alpha$  vão aumentando com o decorrer da infecção. Em animais A/J pode-se notar em ambos os grupos, aumento aos 15 dias que se manteve nos tempos posteriores analisados.

Análise comparativa entre os grupos equivalentes de ambas as linhagens revelou que animais B10.A tratados com IgG apresentaram níveis significativamente maiores que animais A/J, aos 120 dias de infecção.



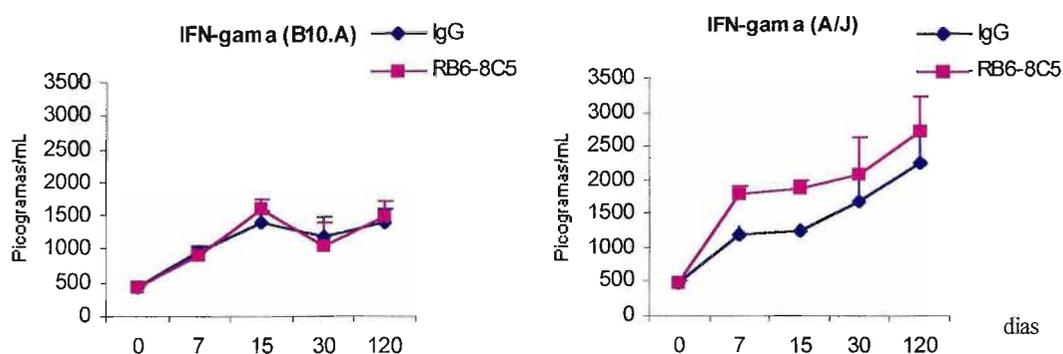
**Figura 9:** Níveis de TNF- $\alpha$  em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

#### 4.8.2) IFN- $\gamma$

A análise estatística dos dados mostrou que os fatores tratamento, tempo de infecção e linhagem não influenciaram significativamente na produção do IFN- $\gamma$  (figura 10). Assim, animais B10.A infectados com o fungo e submetidos ou não ao tratamento com AcM anti-PMN apresentaram níveis equivalentes do IFN- $\gamma$  no pulmão em todos os períodos de infecção analisados.

Os animais A/J depletados de granulócitos apresentaram níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  quando comparado ao grupo controle (análise geral). Entretanto, a análise estatística não foi capaz de apontar diferenças individualizadas para os grupos, nos vários tempos estudados.



**Figura 10:** Níveis de IFN- $\gamma$  em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos encontrados para os grupos ensaiados nos diversos tempos pós-infecção.

#### 4.8.3) Interleucina 12 (IL-12)

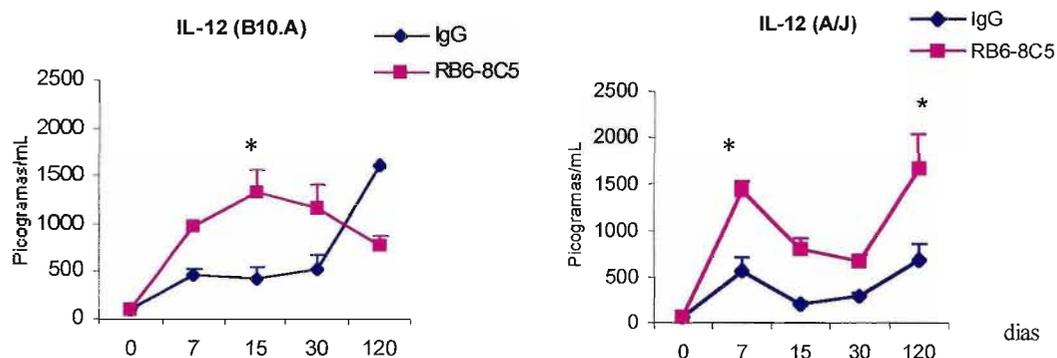
Pelos resultados apresentados na figura 11, pode-se notar que, os animais da linhagem B10.A tratados com AcM anti-PMN, apresentaram um pico de produção de IL-12 aos 15 dias pós-infecção, sendo significativamente maior que do grupo controle .

Aos 120 dias houve uma inversão na produção de IL-12. Os animais controle apresentaram um valor maior de IL-12 quando comparado ao dos animais tratados com anti-PMN. Essa diferença é significativa em relação aos demais tempos da infecção ( $p < 0.05$ ), mas não em relação ao grupo RB6.

Os animais A/J infectados e que foram submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN neutrófilos apresentaram aumentos significativos nos níveis de IL-12 logo na primeira semana de infecção (7 dias) se comparados aos animais

controle. Aos 15 e 30 dias, os níveis de IL-12 diminuíram tanto para os animais tratados como para os não tratados com o AcM. Já aos 120 dias houve um novo aumento de IL-12, principalmente nos animais depletados, havendo diferença estatística entre os grupos.

Ao comparar as linhagens entre si (submetidas ao mesmo tratamento) verificamos que animais B10.A do grupo IgG apresentaram níveis maiores de IL-12 que o grupo A/J IgG aos 120 dias de infecção ( $p < 0.05$ ). Quando a comparação entre linhagens foi feita com os grupos RB6 observamos níveis mais elevados de IL-12 nos animais A/J aos 120 dias da doença ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11:** Níveis de IL-12 em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P. brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

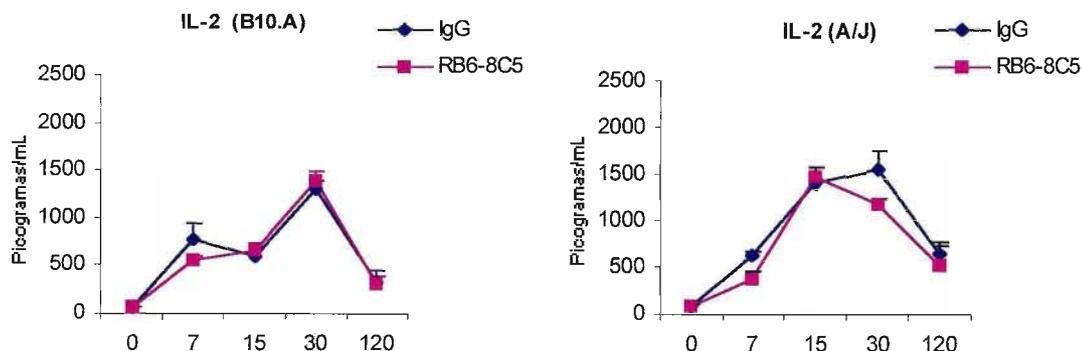
Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção. (\*) indica diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$  – Tukey).

#### 4.8.4) Interleucina 2 (IL-2)

Pelos resultados apresentados na figura 12, pode-se notar que os animais B10.A, tratados ou não com AcM anti-PMN, apresentaram níveis equivalentes de IL-2 no pulmão, em todos os períodos analisados.

Em animais A/J também não houve diferenças significativas nos níveis de IL-2 entre os grupos experimentais e os grupos controle.

Um achado interessante é que a concentração desta citocina no pulmão oscila muito conforme o tempo de infecção para ambas as linhagens. Comparando os níveis de IL-2 entre as linhagens, verificamos que os animais A/J controle e os depletados de neutrófilos apresentaram concentrações significativamente mais elevadas aos 15 dias de infecção, com relação aos animais B10.A controle e depletados de neutrófilos.

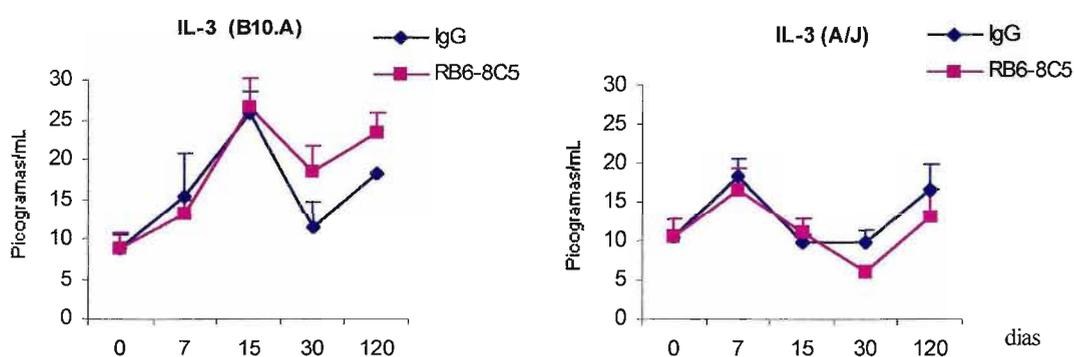


**Figura 12:** Níveis de IL-2 em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

#### 4.8.5) Interleucina 3 (IL-3)

Como pode ser observado na figura 13, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos RB6 e IgG de ambas as linhagens, em todos os períodos estudados. Ocorreram oscilações de concentração em ambas as linhagens em relação ao tempo de infecção. Não foram detectadas diferenças entre linhagens.



**Figura 13:** Níveis de IL-3 em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

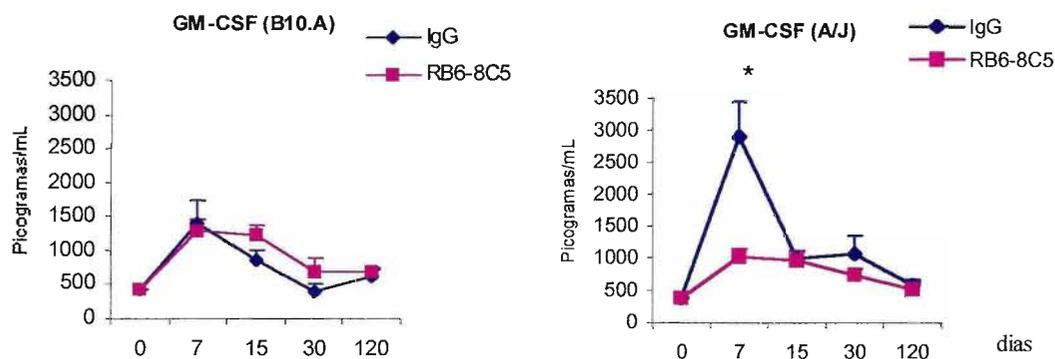
#### 4.8.6) GM-CSF

Os níveis de GM-CSF (figura 14) em animais B10.A que receberam AcM anti-PMN são equivalentes aos dos animais que receberam somente IgG em

todos os tempos de infecção. Não houve, portanto, diferença estatística quando foram analisados os fatores tratamento e tempo.

O grupo IgG da linhagem A/J apresentou níveis significativamente mais elevados de GM-CSF aos 7 dias de infecção quando comparado ao grupo RB6. Com o decorrer do tempo de infecção não houve diferença entre os grupos.

Fazendo uma comparação entre as duas linhagens de animais infectados e tratados com IgG normal de rato, podemos observar um aumento significativo nos níveis de GM-CSF no sobrenadante de pulmão de animais A/J aos 7 dias de infecção. Apartir deste ponto não foram encontradas diferenças significativas nos níveis desta citocina pulmonar entre animais B10.A e A/J. Já animais infectados e depletados de PMN neutrófilos de ambas as linhagens não apresentaram diferenças no comportamento de produção de GM-CSF.



**Figura 14:** Níveis de GM-CSF em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

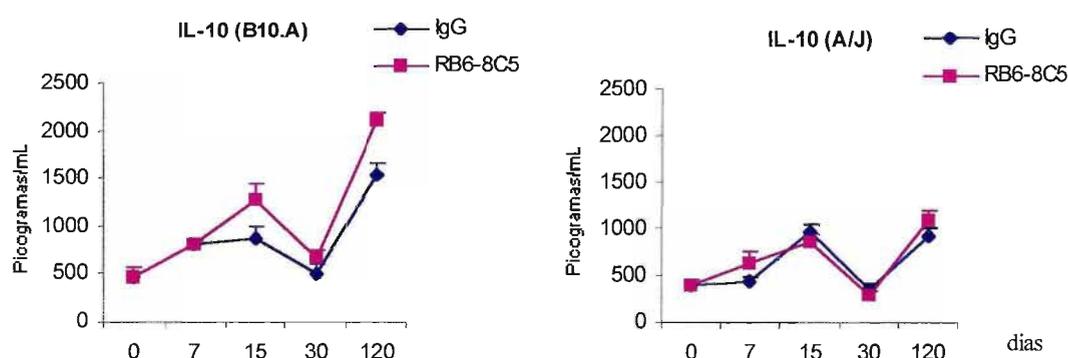
Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

(\*) indica diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$  – Tukey).

#### 4.8.7) Interleucina 10 (IL-10)

Os perfis das médias de concentração de IL-10 para as duas linhagens são mostrados na figura 15. Comparações múltiplas pelo método de Tukey mostraram diferenças temporais na produção de IL-10 dentro do mesmo tratamento, para os animais da linhagem B10.A. Contudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados e não tratados com o AcM anti-PMN, para ambas as linhagens em quaisquer dos tempos examinados.

Um achado interessante foi a diferença encontrada no nível de IL-10 para os animais B10.A, que apresentaram aumento significativo desta citocina em relação aos animais A/J (depletados ou não de neutrófilos) aos 120 dias de infecção.

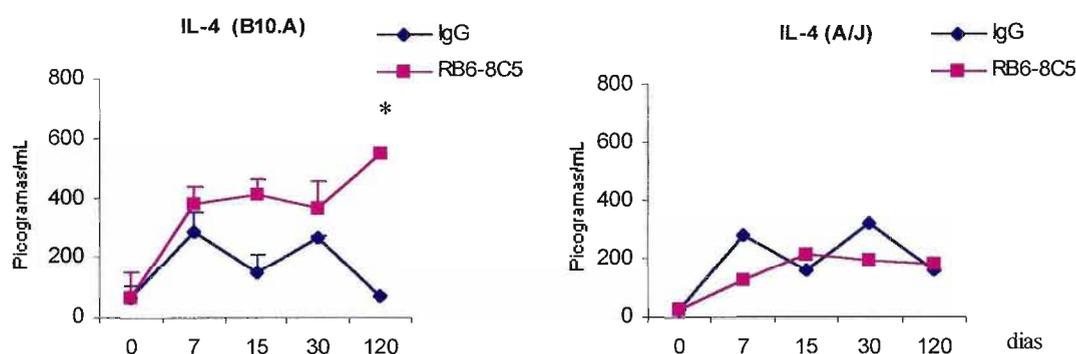


**Figura 15:** Níveis de IL-10 em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

#### 4.8.8) Interleucina 4 (IL-4)

Como podemos observar na figura 16, os níveis de IL-4 em homogenatos de pulmão, aos 120 dias pós-infecção, apresentaram concentrações médias maiores em animais B10.A tratados com RB6-8C5, comparados aos animais controle e aos camundongos A/J depletados ou não de granulócitos.



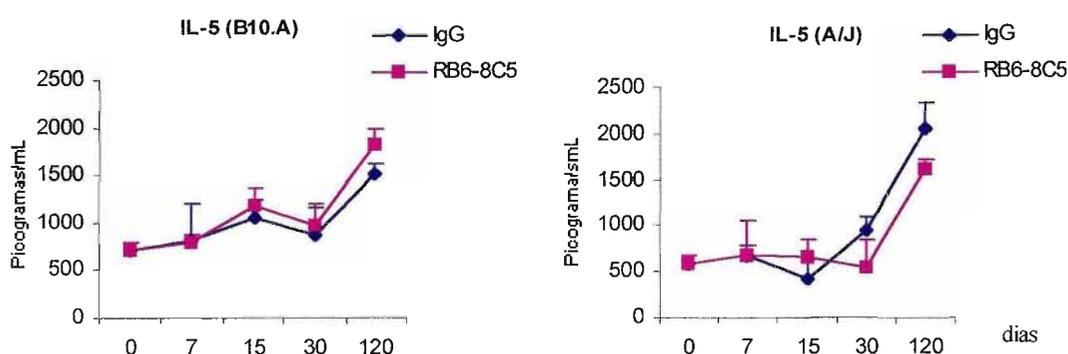
**Figura 16:** Níveis de IL-4 em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção. (\*) indica diferença estatística entre os tratamentos ( $p < 0,05$  – Tukey).

#### 4.8.9) Interleucina 5 (IL-5)

Nenhuma diferença na produção de IL-5 foi encontrada para os animais A/J e B10.A (figura 17).

É importante ressaltar que a produção de IL-5 foi aumentando com o decorrer do tempo de infecção, chegando a valores máximos aos 120 dias tanto para os animais A/J como para os animais B10.A independentemente do tratamento recebido.



**Figura 17:** Níveis de IL-5 em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (controle) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. Dosagens realizadas em homogenatos de pulmões (6 a 8 animais por grupo) aos 7, 15, 30 e 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

#### 4.9) DOSAGEM DE CITOCINAS NOS HOMOGENATOS DE FÍGADO

Como pode ser observado na figura 4, o grau de infecção no fígado foi muito intensa aos 120 dias de infecção somente em animais susceptíveis (B10.A) depletados de granulócitos ( $5,518 \pm 0,136 \log_{10}$  de UFC), enquanto que os camundongos controle apresentaram  $1,991 \pm 0,947 \log_{10}$  de UFC. Animais resistentes (A/J) não apresentaram aumento intenso da carga fúngica no fígado

aos 120 dias de infecção, tanto em animais depletados ( $0,073 \pm 0,073 \log_{10}$ ) como os animais controle ( $0,173 \pm 0,175 \log_{10}$ ).

Esses resultados nos sugeriram que seria interessante a dosagem de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, IL-3 e GM-CSF) e anti-inflamatórias (IL-10, IL-4 e IL-5) no homogenato de fígado de animais B10.A e A/J aos 120 dias de infecção. Nestas dosagens incluímos um novo grupo, denominado “controle” que se refere aos homogenatos obtidos de fígado de camundongos normais, não infectados.

#### **4.9.1) TNF- $\alpha$**

Os animais B10.A infectados e tratados com AcM anti-PMN apresentaram níveis significativamente maiores de TNF- $\alpha$  aos 120 dias de infecção, comparado ao seu controle. Em animais A/J não se pôde apontar diferenças entre os grupos (figura 18).

Ao compararmos as linhagens verificamos aumento significativo de TNF- $\alpha$  em animais A/J tratados com IgG, quando comparados aos animais B10.A do mesmo grupo. No entanto, os animais B10.A e A/J depletados de neutrófilos não apresentaram diferenças significativas nos níveis de TNF- $\alpha$  no fígado, aos 120 dias de infecção.

#### **4.9.2) IFN- $\gamma$**

Como pode ser verificado na figura 18, a produção de IFN- $\gamma$  por animais B10.A infectados e depletados células PMN foi significativamente maior que no grupo IgG.

Em animais da linhagem A/J, o grupo IgG apresentou níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  ( $p < 0,05$ ) que os grupos controle e RB6.

Comparando níveis de IFN- $\gamma$  entre as duas linhagens de animais submetidos ao tratamento com IgG pôde-se observar que os animais A/J apresentaram níveis mais elevados e significantes, comparados aos dos animais B10A.

#### **4.9.3) Interleucina 12 (IL-12)**

Animais B10.A depletados de granulócitos apresentaram níveis significativamente maiores de IL-12, quando comparados aos grupos controle e IgG (figura 18). Em animais A/J não encontramos diferenças na produção de IL-12 entre os grupos.

Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens, quando tratamentos equivalentes foram comparados.

#### **4.9.4) Interleucina 2 (IL-2)**

A análise estatística mostrou aumento significativo de IL-2 no fígado em animais A/J infectados e tratados com IgG, quando comparados aos animais tratado com o AcM (figura 19). Em animais B10.A esta diferença de tratamento não foi encontrada, visto que, animais depletados e não depletados de células PMN apresentaram o mesmo comportamento quanto à produção de IL-2.

Um achado interessante foram as diferenças encontradas entre as linhagens de animais, nos grupos tratados com IgG. Animais A/J apresentaram níveis significativamente aumentados de IL-2 no fígado, quando comparados aos dos animais B10.A.

#### **4.9.5) Interleucina 3 (IL-3)**

A IL-3 apresenta-se em baixas concentrações e não foram observadas diferenças entre animais B10.A depletados ou não de leucócitos PMN. O mesmo acontece com os animais A/J, não há diferenças entre os grupos de tratamento.

Comparando as duas linhagens, não foram detectadas diferenças significativas entre grupos de tratamentos equivalentes.

#### **4.9.6) GM-CSF**

Animais B10.A tratados com o AcM apresentaram níveis mais elevados de GM-CSF no fígado aos 120 dias de infecção, quando comparados aos grupos IgG e controle (figura 19).

Nos animais A/J, o grupo IgG apresentou valores significativamente aumentado de GM-CSF quando comparado aos grupos controle e RB6.

A comparação entre linhagens demonstrou que camundongos A/J tratados com IgG apresentaram valores significativamente mais elevados de GM-CSF que os do mesmo grupo da linhagem B10.A.

#### **4.9.7) Interleucina 10 (IL-10)**

Os animais de ambas linhagens, submetidos à infecção i.t. com *P.brasiliensis* e tratados ou não com AcM apresentaram níveis equivalentes de IL-10 em homogenatos de fígado aos 120 dias de infecção (figura 20).

Comparações feitas entre linhagens e tratamentos equivalentes também não mostraram diferenças significativas.

#### **4.9.8) Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 5 (IL-5)**

Os níveis de IL-4 e IL-5 em homogenatos de fígado (figura 20) de animais B10.A e A/J não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Mas ao compararmos ambas as linhagens, tratadas com IgG ou o AcM RB6, pudemos verificar um aumento significante destas citocinas em animais A/J.

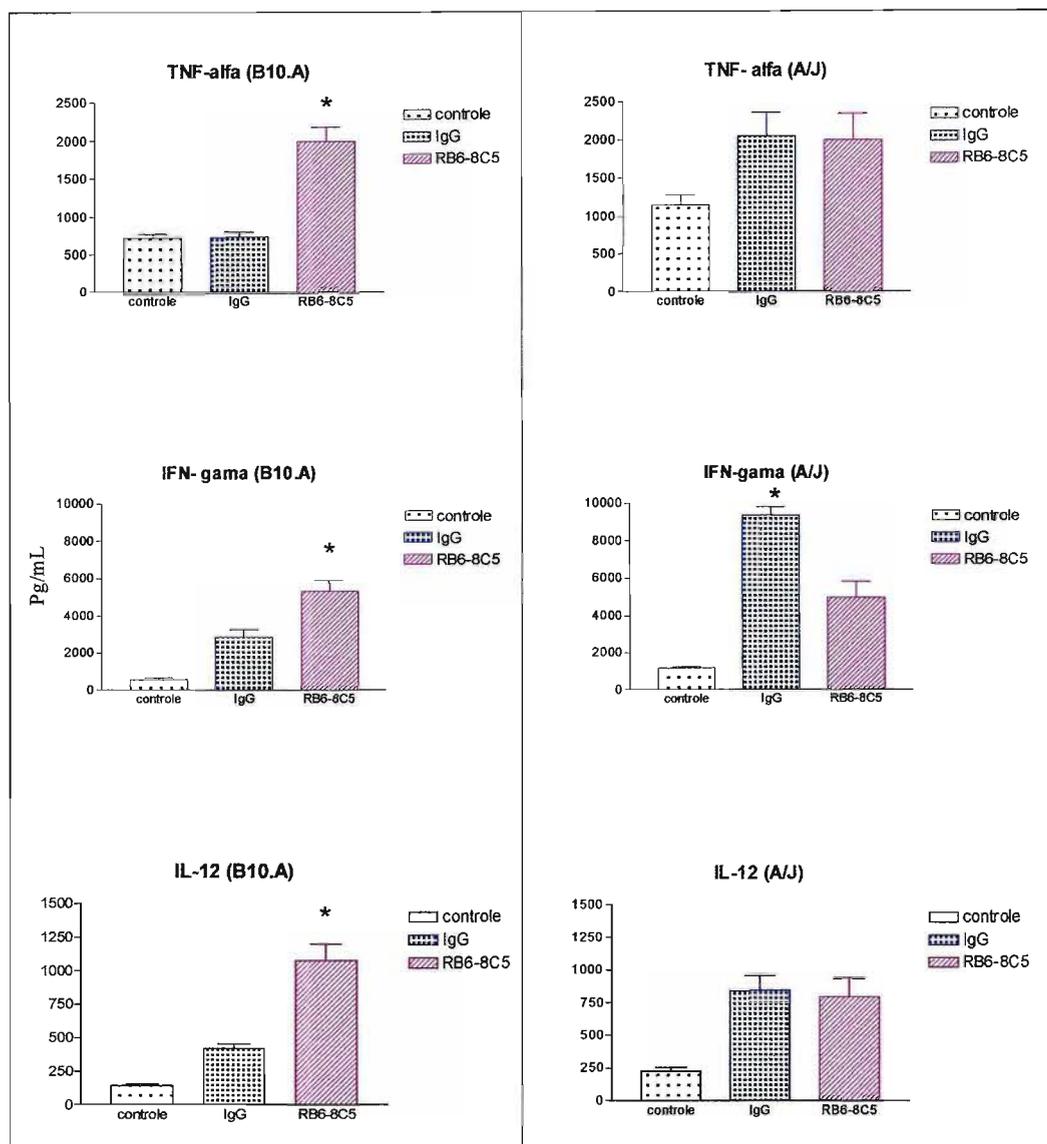


Figura 18: Níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12 em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (IgG) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. O grupo controle refere-se a homogenatos obtidos de camundongos normais, não infectados. Dosagens realizadas em homogenatos de fígado (6 a 8 animais por grupo) aos 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA. Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

(\*) indica diferença estatística entre os tratamentos (Tukey)

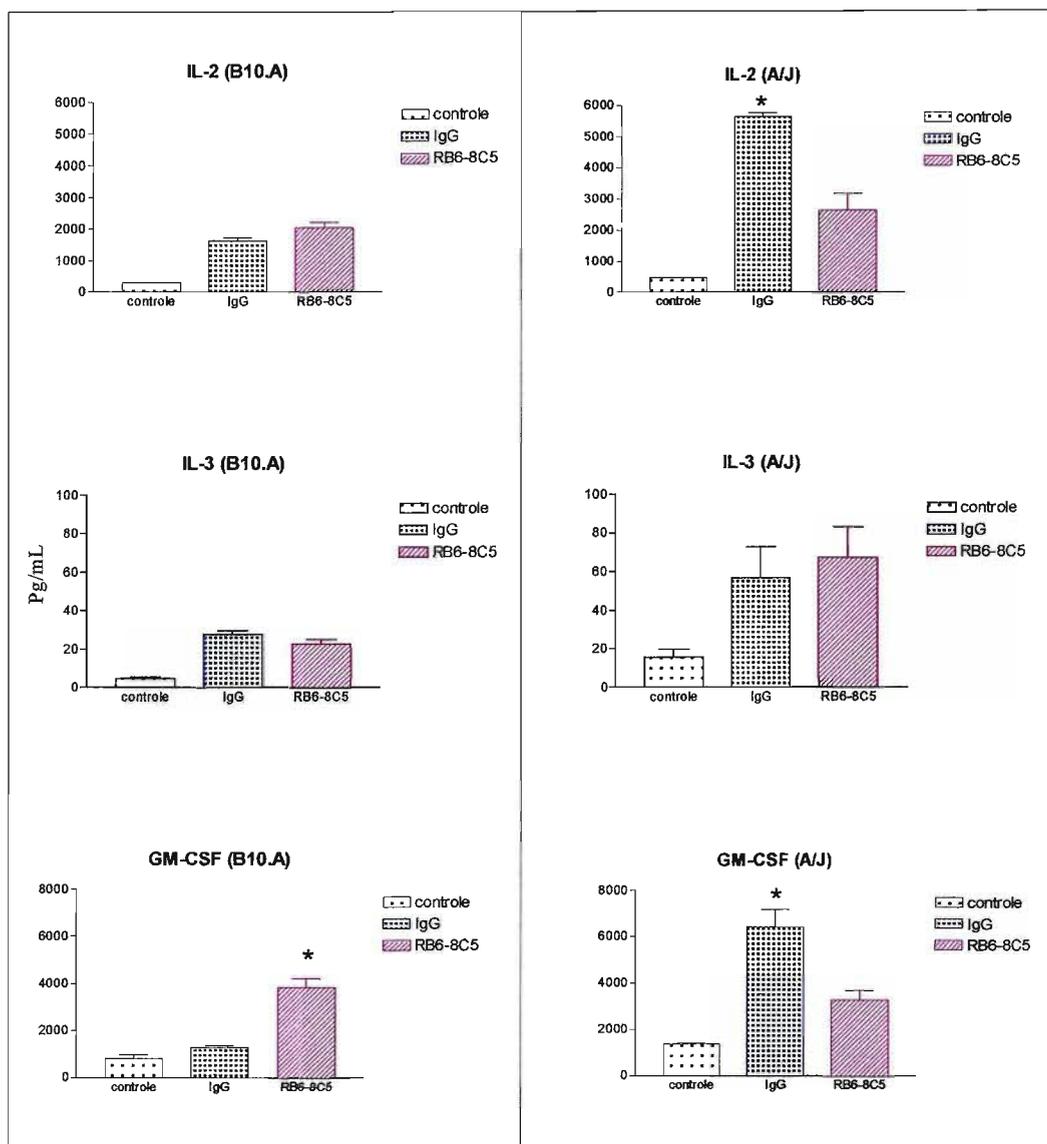


Figura 19: Níveis de IL-2, IL-3 e GM-CSF em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (IgG) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. O grupo controle refere-se a homogenatos obtidos de camundongos normais, não infectados. Dosagens realizadas em homogenatos de fígado (6 a 8 animais por grupo) aos 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

(\*) indica diferença estatística entre os tratamentos (Tukey)

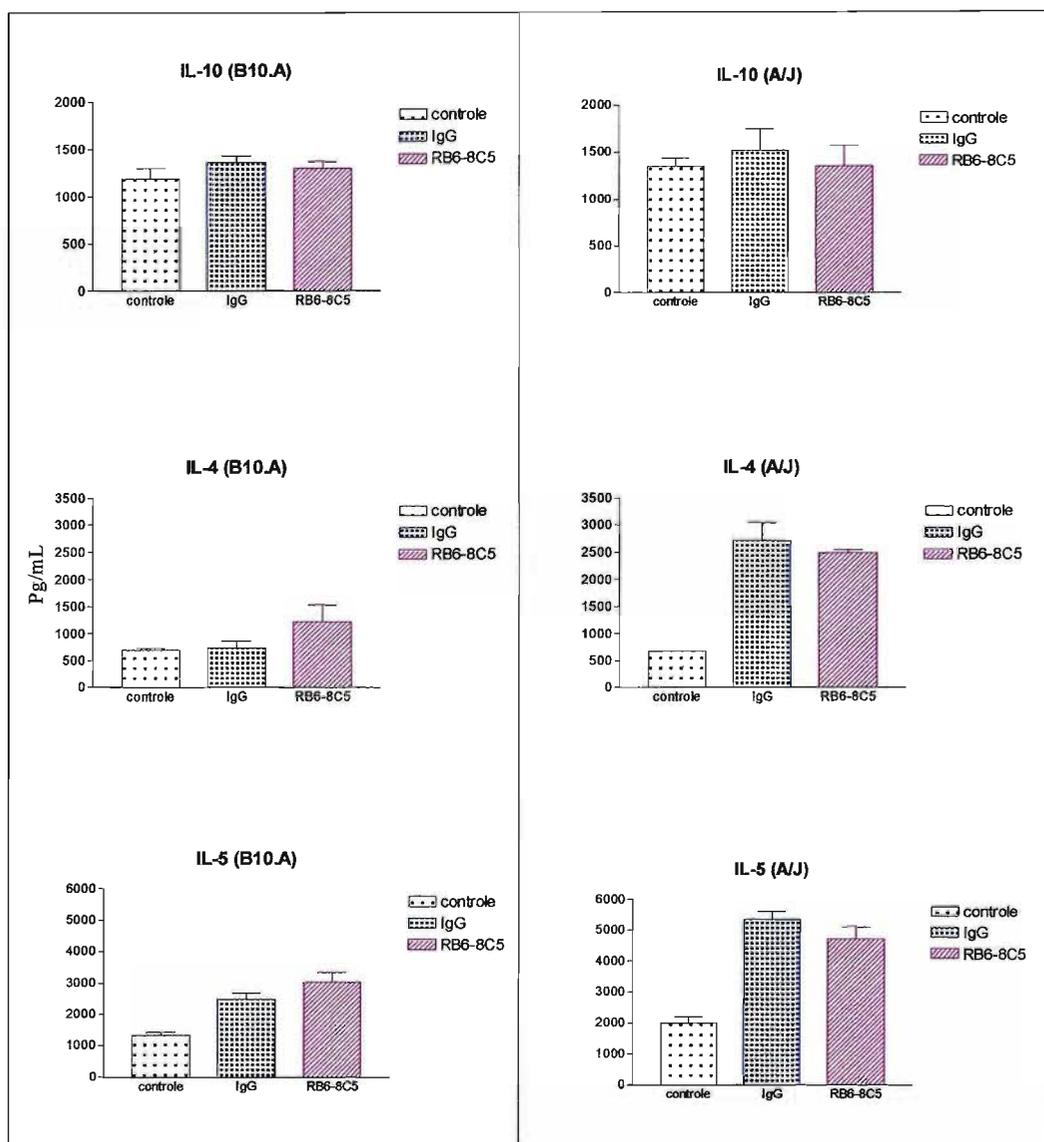


Figura 20: Níveis de IL-10, IL-4 e IL-5 em animais B10.A e A/J infectados por via i.t. com *P. brasiliensis*, submetidos ao tratamento com AcM anti-PMN (RB6-8C5) ou IgG normal de rato (IgG) via i.p. nos dias -1, 2 e 5 de infecção pulmonar. O grupo controle refere-se a homogenatos obtidos de camundongos normais, não infectados. Dosagens realizadas em homogenatos de fígado (6 a 8 animais por grupo) aos 120 dias de infecção, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos nos diversos tempos pós-infecção.

(\*) indica diferença estatística entre os tratamentos (Tukey)

## 5- RESULTADOS (II)

### Influência dos leucócitos PMN na Imunidade Adquirida ao *P.brasiliensis*.

#### 5.1) PROTOCOLOS E GRUPOS DO EXPERIMENTO DE IMUNOPROTEÇÃO

##### A) B10.A – IT

Animais B10.A inoculados com o fungo *P.brasiliensis* apenas pela via i.t., ou seja, solução salina foi inoculada pela via s.c. e os animais não receberam nenhum tipo de tratamento durante a infecção pulmonar.

##### B) B10.A- SCIT- IgG

Animais B10.A inoculado pelas vias s.c. e i.t. com o fungo *P.brasiliensis* e submetidos ao tratamento com IgG normal de rato intraperitonealmente nos tempos -1, 2 e 5 dias da infecção pulmonar.

##### C) B10.A- SCIT- RB6-8C5

Animais B10.A inoculados pelas vias s.c. e i.t. com o fungo *P.brasiliensis* que receberam como tratamento o AcM anti- PMN (RB6-8C5) nos tempos -1, 2 e 5 dias da infecção pulmonar.

#### 5.2) GRAVIDADE DA DOENÇA

Grupos de animais B10.A previamente inoculados ou não pela via s.c. com o *P.brasiliensis* e 15 dias após desafiados com o mesmo fungo pela via i.t. foram sacrificados aos 60 dias de infecção pulmonar.

Um grupo foi inoculado com salina pela via s.c., e infectado 15 dias após com o *P.brasiliensis* (B10.A-IT), outro foi inoculado com *P.brasiliensis* pela via s.c., tratado com IgG normal de rato e desafiado pela via i.t. com o fungo (B10.A-SCIT-IgG) e finalmente, o terceiro grupo foi pré inoculado com o fungo pela via s.c., tratado com AcM anti-PMN e desafiado com o *P.brasiliensis* pela via i.t. (B10.A-SCIT-RB6-8C5).

Seus órgãos (pulmões, fígado e baço) foram retirados, pesados, homogeneizados, plaqueados em ágar-BHI-suplementado, e calculado o  $\log_{10}$  do número de UFC/g de tecido.

Para o grupo de animais B10.A – IT (figura 21) foi observado um grande número de fungos viáveis no pulmão ( $6,146 \pm 0,084 \log_{10}$ ) e grande colonização do fígado ( $2,926 \pm 0,249 \log_{10}$ ) e baço ( $3,049 \pm 0,278 \log_{10}$ ).

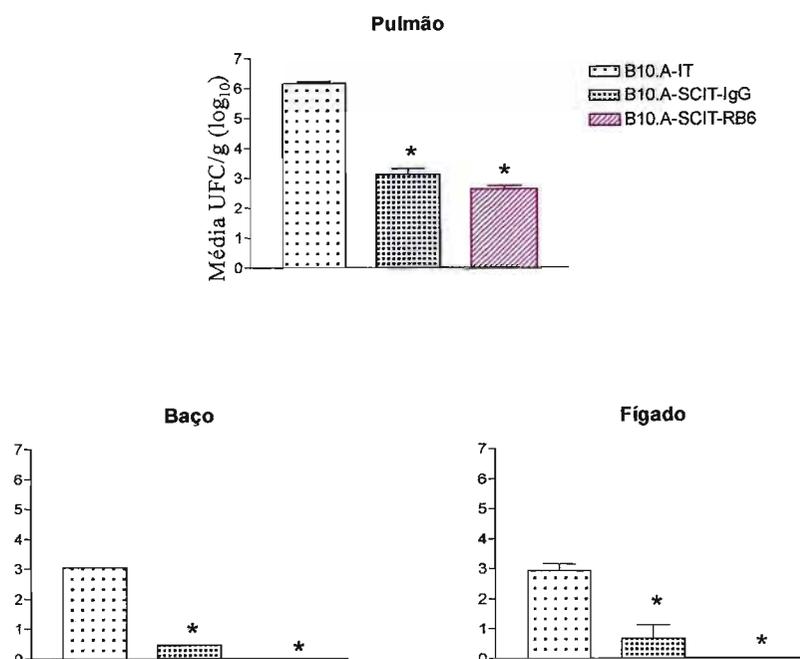
Já o grupo de animais B10.A- SCIT- IgG (vacinados-controle) apresentou número significativo menor de fungos no pulmão ( $3,110 \pm 0,187 \log_{10}$ ). Encontramos uma discreta disseminação para o fígado ( $0,661 \pm 0,462 \log_{10}$ ) e baço ( $0,455 \pm 0,462 \log_{10}$ ).

Camundongos vacinados, tratados com o AcM anti-PMN (B10.A-SCIT-RB6) apresentaram no pulmão baixo grau de infecção ( $2,627 \pm 0,102 \log_{10}$ ) e não houve disseminação para o fígado e baço aos 60 dias de infecção (figura 21).

Como esperado, animais pré-imunizados controlaram mais a doença, caracterizando um fenômeno de proteção pulmonar e menor disseminação para o fígado e baço (Arruda, 1999).

O grupo vacinado e depletado de leucócitos PMN apresentou o menor número de fungos viáveis nos pulmões e total ausência de disseminação para o fígado e baço. Apesar desse valor ser menor que o observado no grupo vacinado, a análise estatística demonstrou que a depleção de células PMN não alterou a imunoproteção conferida pela pré-inoculação do fungo pela via subcutânea.

Logo, os leucócitos PMN não parecem participar nos fenômenos de imunidade adquirida que conferem proteção à paracoccidioidomicose pulmonar.



**Figura 21:** Número de UFC em pulmões, fígado e baço em animais B10.A infectados com leveduras viáveis de *P.brasiliensis* aos 60 dias de infecção (n= 5 a 6 camundongos para cada grupo experimental). O grupo (**B10.A-IT**) foi inoculado pela via s.c. com salina e após 15 dias foi desafiado com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes de *P.brasiliensis* por via intratraqueal. O grupo (**B10.A-SCIT-IgG**) foi inoculado por via s.c. com  $5 \times 10^6$  leveduras de *P.brasiliensis* e desafiado 15 dias após com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes por via i.t. Estes animais receberam IgG por via i.p. nos tempos -1, 2 e 5 dias da infecção pulmonar (controle da proteção). O grupo de camundongos (**B10.A-SCIT-RB6**) foi inoculado por via s.c. com  $5 \times 10^6$  leveduras de *P.brasiliensis* e desafiado 15 dias após com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes por via i.t. Estes animais receberam AcM anti-PMN (RB6-8C5) por via i.p. nos tempos -1, 2 e 5 dias da infecção pulmonar. Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos grupos ensaiados. (\*)  $p < 0,05$  – diferente do grupo B10.A-IT

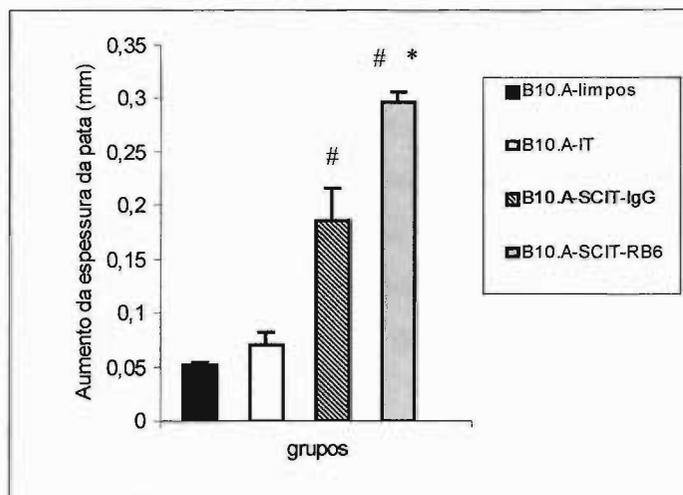
### 5.3) IMUNIDADE CELULAR (HTT)

Na figura 22 observamos a reação de HTT dos animais inoculados ou não com o fungo *P.brasiliensis* por via s.c. e após 15 dias desafiados com o mesmo fungo por via intratraqueal e tratados ou não com AcM anti-PMN.

O grupo de animais B10.A-SCIT-RB6 apresentou os níveis mais elevados de resposta de HTT, comparado aos outros grupos experimentais.

A inoculação s.c. prévia do fungo promoveu nos animais susceptíveis uma resposta aumentada e significativa em relação aos controles normais (limpos) e aos animais que receberam inoculação s.c. prévia de salina (controle-IT).

De acordo com a análise estatística realizada, a depleção de leucócitos PMN ao tempo do desafio i.t. com o fungo aumentou as reações cutâneas de HTT quando comparado àquela dos animais que não foram depletados de células PMN.



**Figura 22:** Resposta de Hipersensibilidade do tipo tardio em animais B10.A inoculados por via i.t. com o *P.brasiliensis*, protegidos ou não por prévia inoculação s.c. do mesmo fungo. Cinco a seis camundongos, em cada grupo, foram inoculados pela via SC com  $5 \times 10^6$  leveduras (B10.A-SCIT-IgG e B10.A-SCIT-RB6-8C5) ou com salina (B10.A-IT) e desafiados 15 dias após com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes por via i.t. Foram então submetidos ao teste do coxim plantar no tempo de 60 dias de infecção. Todos os grupos de camundongos foram injetados subcutaneamente no coxim plantar esquerdo com 25 $\mu$ l de antígeno de Fava Netto e a medida do inchaço das patas foi feita após 24 horas com o auxílio de um espessímetro. Os resultados estão expressos como a diferença, em mm, entre as medidas feitas antes e 24 horas após a inoculação do antígeno. Foi utilizado como controle negativo da reação, animais limpos e não infectados com o fungo *P.brasiliensis* e submetidos à inoculação do antígeno no coxim plantar (8 camundongos). Valores apresentados como  $M \pm EP$ .

# - significa diferença estatística em relação ao controle (B10.A-limpos) e em relação ao grupo de animais não protegidos (B10.A-IT).

\*- significa diferença estatística em relação ao tratamento com IgG normal de rato (B10.A-SCIT-IgG).

#### 5.4) IMUNIDADE HUMORAL (ANTICORPOS E IMUNOPROTEÇÃO)

Os diferentes isótipos de anticorpos anti-*P.brasiliensis* foram quantificados no soro recolhido após 60 dias do desafio i.t.

Em relação ao nível de anticorpos totais (figura 23) o que se pode observar é que não há diferença nos títulos médios entre os grupos B10.A-IT ( $14.7 \pm 0.76 \log_2$ ), B10.A-SCIT-IgG ( $14.3 \pm 0.96 \log_2$ ), e B10.A-SCIT-RB6 ( $15.3 \pm 0 \log_2$ ) aos 60 dias de infecção.

O mesmo acontece com a produção de anticorpo IgM anti *P.brasiliensis*, isto é, não houve diferença de títulos médios entre os grupos ( $8.12 \pm 0.50 \log_2$  para o grupo B10.A-IT e  $8.52 \pm 0.38 \log_2$  para o grupo B10.A-SCIT-IgG, e  $7.72 \pm 0.25 \log_2$  para o grupo B10.A-SCIT-RB6). A produção de anticorpo IgA anti *P.brasiliensis* não variou entre os grupos protegidos e não protegidos com o fungo ( $9.32 \pm 0 \log_2$  para o grupo B10.A-IT,  $9.12 \pm 0.32 \log_2$  para o grupo B10.A-SCIT e  $8.32 \pm 0 \log_2$  para o grupo B10.A-SCIT-RB6).

A produção de IgG1 foi significativamente maior nos grupos B10.A-SCIT tratados com IgG e AcM anti-PMN (títulos médios de  $16.32 \pm 0 \log_2$ ) do que no grupo B10.A-IT que apresentou título médio de  $15.52 \pm 0.20 \log_2$ .

A inoculação s.c. prévia do fungo promove nos animais B10.A uma diminuição significativa no título de anticorpos IgG2a e IgG2b aos 60 dias de infecção (B10.A-IT apresentaram títulos médios de IgG2a de  $14.92 \pm 0.41 \log_2$  e  $14.92 \pm 0.51 \log_2$  de IgG2b). Já os animais B10.A-SCIT-IgG apresentaram valores de  $10.52 \pm 1.13 \log_2$  de IgG2a e  $11.92 \pm 0.41 \log_2$  de anticorpos IgG2b. O grupo de animais B10.A-SCIT-RB6 apresentou título de  $11.72 \pm 0.69 \log_2$  para IgG2a e  $12.12 \pm 0.20 \log_2$  para IgG2b.

Os níveis de anticorpo IgG3 anti *P.brasiliensis* não variou significativamente entre os grupos imunoprottegidos com o fungo ( $9.32 \pm 0 \log_2$

para o grupo B10.A-SCIT-IgG e  $9.72 \pm 0.41 \log_2$  para o grupo B10.A-SCIT-RB6) e não protegidos ( $11.12 \pm 1.09 \log_2$  para B10.A-IT).

Assim, a imunoproteção (menor carga fúngica pulmonar e menor disseminação do fungo) está associada, com níveis mais baixos de anticorpos anti-*P.brasiliensis* dos isótipos IgG2a e IgG2b e níveis mais elevados de IgG1.

### 5.5) DOSAGEM DE CITOCINAS NOS HOMOGENATOS DE PULMÃO

Homogenatos de pulmões foram obtidos após 60 dias do desafio i.t. e analisados como descrito anteriormente.

Pelos resultados apresentados na figura 24, pode-se notar que, os animais infectados, submetidos ou não à prévia inoculação com o fungo e tratados ou não com o AcM apresentaram níveis equivalentes de todas as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, GM-CSF) no pulmão aos 60 dias de infecção. No entanto, houve aumento significativo dos níveis de IL-3 para o grupo de animais B10.A-SCIT-RB6, quando comparado ao grupo B10.A-SCIT-IgG ( $p < 0,001$ ) e ao grupo B10.A-IT ( $p < 0,01$ ).

Nenhuma diferença foi encontrada quanto a produção das citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, IL-5) entre os grupos analisados.

Assim, o tratamento com o AcM anti-PMN alterou somente a produção de IL-3 no sítio da infecção.

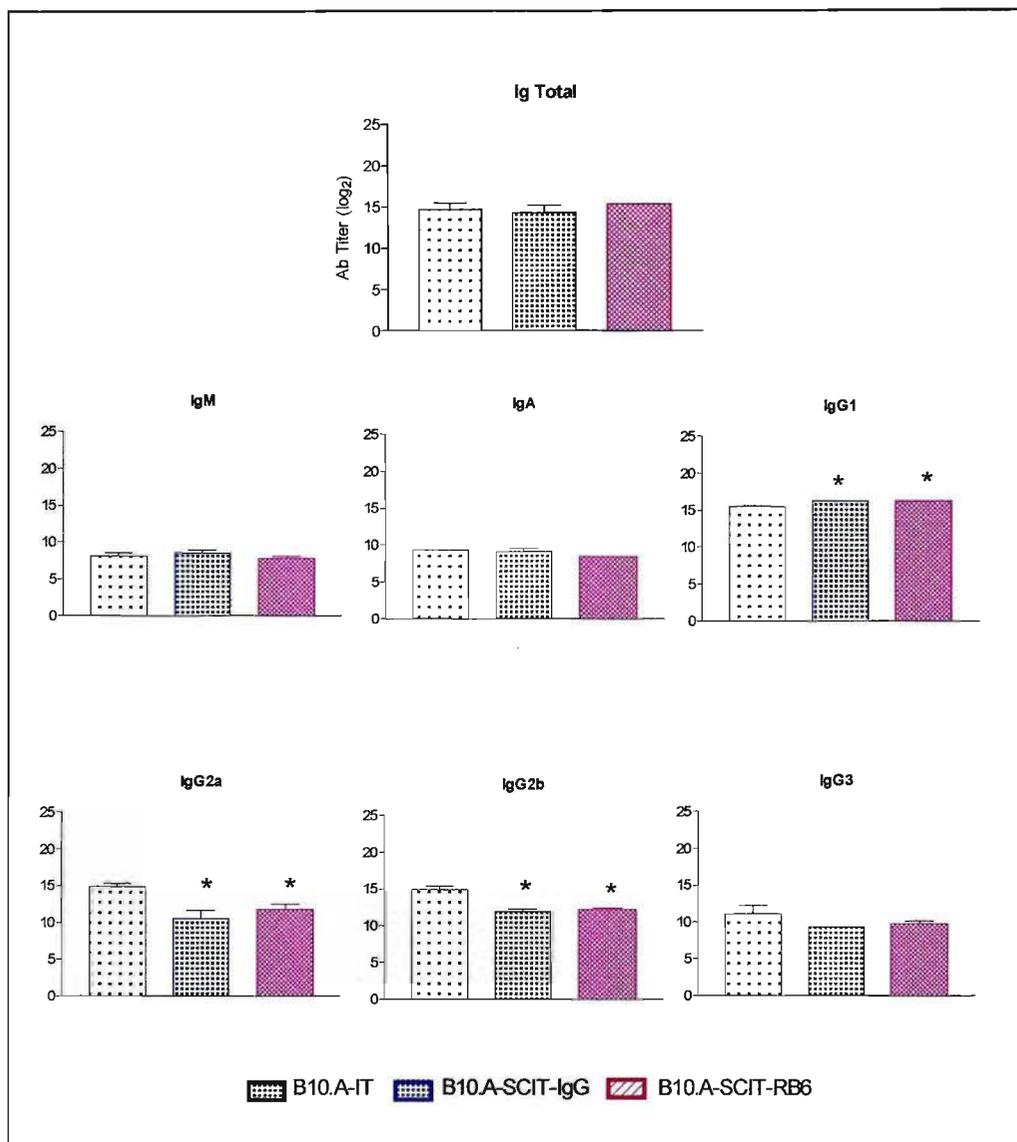


Figura 23: Títulos dos anticorpos específicos Totais e das classes IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em animais B10.A infectados por via i.t. com *P.brasiliensis*, submetidos ou não à prévia inoculação subcutânea com o mesmo fungo. Os camundongos (n= 5 a 6 animais por grupo) foram inoculados por via s.c. com  $5 \times 10^6$  leveduras ou salina e desafiados 15 dias após com  $1 \times 10^6$  células leveduriformes por via i.t. e receberam como tratamento apenas salina ou IgG ou AcM anti-PMN (RB6-8C5) por via i.p. nos tempos -1, 2 e 5 dias pós-infecção pulmonar. (\*)  $p < 0,05$  em relação ao grupo B10.A-IT

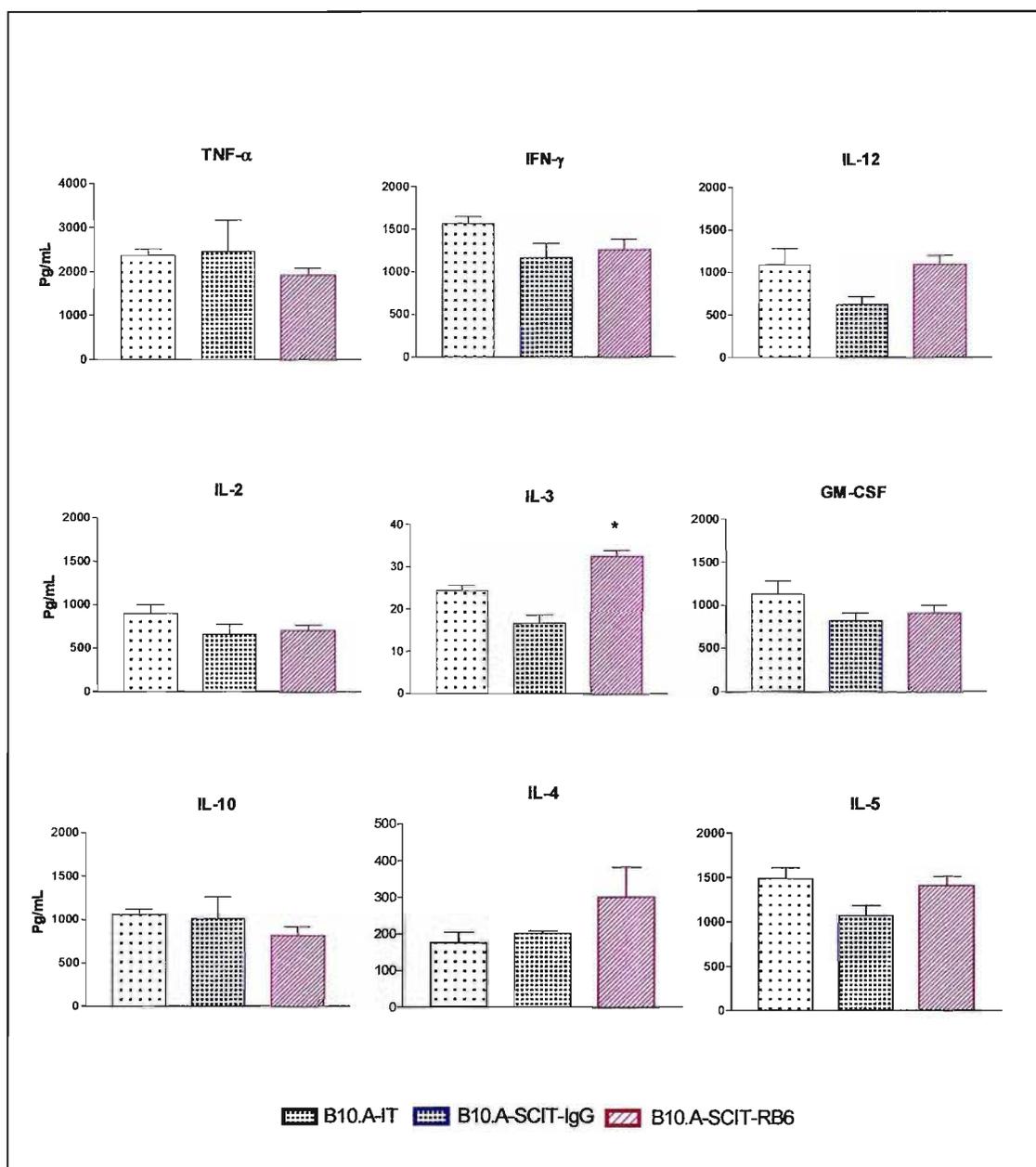


Figura 24: Níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, IL-3 e GM-CSF) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-4, IL-5) em animais B10.A infectados por via i.t. com o *P. brasiliensis*, submetidos ou não à prévia inoculação s.c. com o mesmo fungo e tratados ou não com o AcM anti-PMN (RB6-8C5). Dosagens realizadas em homogenatos de pulmão de 5-7 animais por grupo, utilizando-se a técnica de ELISA.

Os pontos representam as Médias  $\pm$  EP dos títulos, aos 60 dias de infecção.

(\*)  $p < 0,001$  comparado ao grupo B10.A-SCIT-IgG e  $p < 0.01$  comparado ao grupo B10.A-IT

## **RESUMO DOS RESULTADOS**

## 6- RESUMO DOS RESULTADOS

## I- Depleção de leucócitos PMN na fase de imunidade natural da doença

	B10.A (susceptível)		A/J (resistentes)	
	IgG	RB6	IgG	RB6
<b>% depleção de neutrófilos</b>	-	95%		96%
<b>Média de sobrevivida (dias)</b>	239,5	158,0 #	> 350,0	>350,0
<b>HTT</b>	anergia	anergia	alta	alta
<b>Carga fúngica:</b>				
<b>Pulmão</b>	M±EP (log <sub>10</sub> )			
7 dias PI	5,04 ± 0,08	5,72 ± 0,12 *	5,21 ± 0,04	6,11 ± 0,06 *
15 dias PI	5,44 ± 0,10	6,14 ± 0,05 *	5,60 ± 0,08	5,66 ± 0,10
30 dias PI	5,81 ± 0,18	6,57 ± 0,14 *	5,65 ± 0,18	5,91 ± 0,05
120 dias PI	5,83 ± 0,23	5,92 ± 0,20	5,71 ± 0,131	5,79 ± 0,12
<b>Fígado</b>				
7 dias PI	0,49 ± 0,14	1,03 ± 0,24	0,87 ± 0,18	1,513 ± 0,29
15 dias PI	1,28 ± 0,19	1,64 ± 0,17	0,17 ± 0,17	0,517 ± 0,23
30 dias PI	0,57 ± 0,35	2,27 ± 0,21 *	0 ± 0	0 ± 0
120 dias PI	1,99 ± 0,94	5,51 ± 0,13 *	0,17 ± 0,17	0,07 ± 0,07
<b>Baço</b>				
7 dias PI	0,15 ± 0,15	0,40 ± 0,21	0 ± 0	0,68 ± 0,35
15 dias PI	0,36 ± 0,24	1,83 ± 0,29 *	0 ± 0	0,21 ± 0,21
30 dias PI	0,44 ± 0,44	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
120 dias PI	1,97 ± 0,51	4,73 ± 0,22 *	0,27 ± 0,28	0,15 ± 0,150
<b>Acs específicos</b>		↑ Ig total (15 dias) * ↑ IgG1, IgG3, IgA (30 dias) * ↑ IgA (120 dias) *		↑ IgT, IgG2b, IgG2a e IgG3 (15 dias) * ↑ IgG2a (30 dias) * ↑ IgG3 (120 dias) *
<b>Citocinas no Pulmão</b>		↑ IL-12 (15 dias) * ↑ IL-4 (120 dias) *		↑ IL-12 e IFN-γ (7 e 120 dias) ↓ GM-CSF (7 dias)
<b>Citocinas no Fígado</b>		↑ IL-12, GM-CSF, IFN-γ e TNF-α *		↓ GM-CSF, IFN-γ, IL-2 *

(#) Análise de curvas de sobrevivida pelo método de Logrank. (\*) indica diferença estatística entre os respectivos grupos depletados e não depletados de neutrófilos. Análise de variância com 2 fatores (tratamento e tempo) seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. PI = Pós-Infecção.

## II- Depleção de leucócitos PMN na fase de imunidade adquirida da doença

<b>Animais B10.A</b>			
	<b>Não imunizados</b>	<b>Imunizados</b>	
		<b>IgG</b>	<b>RB6</b>
<b>% de depleção</b>	-	-	93%
<b>HTT</b>	anergia	0,186 ± 0.03	↑ 0,297 ± 0.01
<b>Carga fúngica no Pulmão (60 dias PI)</b>	* 6,15 ± 0.08 UFC/log <sub>10</sub>	3,11 ± 0.18 UFC/log <sub>10</sub>	2,62 ± 0.10 UFC/log <sub>10</sub>
<b>Carga fúngica no fígado (60 dias PI)</b>	* 2,93 ± 0.22 UFC/log <sub>10</sub>	0.66 ± 0.45 UFC/log <sub>10</sub>	0 ± 0 UFC/log <sub>10</sub>
<b>Carga fúngica no baço (60 dias PI)</b>	* 3,05 ± 0.27 UFC/log <sub>10</sub>	0,46 ± 0.45 UFC/log <sub>10</sub>	0 ± 0 UFC/log <sub>10</sub>
<b>Acs específicos (60 dias PI)</b>	↑ IgG2a e IgG2b e ↓ IgG1*		
<b>Citocinas no pulmão (60 dias PI)</b>			↑ IL-3 *

(\*) p < 0,05 em relação a ambos os grupos imunizados

(↑) aumento em relação ao grupo imunizado não depletado

## **DISCUSSÃO**

## 7- DISCUSSÃO

Estudos utilizando modelos experimentais têm como finalidade tentar esclarecer a patologia humana. No homem, estudos epidemiológicos, histológicos, imunológicos, hematológicos e clínicos têm possibilitado verificar as características das diversas formas e evolução de várias doenças.

Dentro desta perspectiva, e considerando que a paracoccidiodomicose é, provavelmente, adquirida pela via respiratória (Gonzalez-Ochoa, 1956 apud Wanke & Londero, 1994; Restrepo, 1985) estudamos a importância de leucócitos PMN utilizando duas linhagens de camundongos isogênicos inoculados pela via intratraqueal com o isolado virulento do fungo (Pb18).

Os leucócitos PMN neutrófilos são fundamentais na resposta imune natural e podem fazer a interação entre as respostas imunológicas inata e adquirida. Estas células quando na circulação apresentam relativamente um curto tempo de vida (Squier et al., 1995; Williams, W.J. et al., 1990) e morrem através de um processo de apoptose (Newman et al., 1982; Savill et al., 1989). Já foi documentado que IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , G-CSF e glicocorticoides aumentam o tempo de vida dos neutrófilos (Colotta et al., 1992; Dalhoff et al., 1998; Klebanoff et al., 1986; Williams, G.T. et al., 1990; Brach et al., 1992).

De maneira genérica, sabe-se que macrófagos, neutrófilos e eosinófilos ao serem ativados aumentam o consumo de oxigênio e liberam espécies ativas de oxigênio tais como ânion superóxido, radical hidroxila, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, além de cloroaminas e enzimas como mieloperoxidase e outras. A liberação desses componentes pode resultar em morte de microorganismos como bactérias, protozoários e fungos (Verrastro, 1996; Rapaport, 1990).

Vários trabalhos estudando a PCM humana e a experimental tem sugerido a importância dos leucócitos PMN nos mecanismos de resistência à infecção pelo *P.brasiliensis*. Nenhum trabalho, entretanto, abordou a caracterização da função destas células em modelo *in vivo* de infecção pulmonar. Estes fatos levaram-nos a estudar o efeito da depleção de leucócitos PMN na doença experimental de camundongos geneticamente resistentes e susceptíveis ao fungo. Esta tese demonstra que os leucócitos têm papel relevante nos mecanismos de imunidade natural e não na adquirida e que o grau de proteção conferido por estas células depende do patrimônio genético do hospedeiro.

Inicialmente caracterizamos o comportamento dos leucócitos PMN no sangue periférico de animais infectados e tratados com IgG normal de rato (controle) e animais infectados e tratados com AcM anti-PMN (RB6-8C5).

O AcM RB6-8C5 (IgG2b de rato) foi usado para depletar neutrófilos e eosinófilos maduros de camundongos como descrito por Tepper et al. 1992, Hestdal et al. 1991 e Fleming et al. 1993. O AcM reconhece o antígeno (Gr-1 ou Ly-6G), presente na superfície de células PMN, mas não de células MMN (monomorfonucleares – linfócitos e macrófagos), de acordo com Tepper et al. 1992 e Conlan et al. 1994.

Em nosso trabalho, pudemos verificar a grande eficiência do tratamento com o AcM. Assim, antes da inoculação do fungo, os animais tratados com o AcM RB6-8C5 apresentavam uma diminuição de cerca 95% para B10.A e 96% para A/J nos seus leucócitos sanguíneos.

A depleção manteve-se aos 6 dias após a infecção. Em ambas as linhagens, observou-se nos animais infectados e tratados com IgG um aumento do número de células PMN (2.976 células/mm<sup>3</sup> para 4.518 células/mm<sup>3</sup> em B10.A e de 3.663 células/mm<sup>3</sup> para 10.174 células/mm<sup>3</sup> em A/J) confirmando o efeito indutor de neutrofilia da infecção pelo fungo (Meloni-Bruneri et al. 1996).

Vários trabalhos demonstraram que o AcM pode apresentar reações com Ly-6G, um epítipo também encontrado em subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> e

macrófagos (Czuprynski et al., 1994; Montes de Oca et al., 2000; Fleming et al., 1993; Buendía et al., 1999), o que explicaria a diminuição de linfócitos em nossos resultados apresentados na figura 2. Em ambas as linhagens houve diminuição significativa de linfócitos, porém o efeito foi mais evidente e persistente na linhagem susceptível de camundongos. A doença mais grave de animais B10.A do que aquela dos camundongos A/J poderia ser atribuída aos diferentes graus de leucopenia induzidos pelo AcM RB6. Talvez este fato tenha realmente contribuído, porém alguns dados obtidos em nosso trabalho vão contra esta interpretação. Assim, o tratamento com o AcM não alterou as reações de HTT que representam uma medida do grau de imunidade celular; por outro lado o tratamento pouco alterou a produção de citocinas e anticorpos específicos e não alterou os comportamentos de susceptibilidade e resistência dos camundongos B10.A e A/J, respectivamente. Um outro forte argumento a favor da interpretação da depleção de leucócitos PMN como o agente indutor de doença mais grave é o de que, nos experimentos de imunidade adquirida a depleção de PMN, que leva à concomitante diminuição de linfócitos, não alterou o padrão de imunoproteção desenvolvido por animais B10.A. Em conclusão, acreditamos que a doença mais grave induzida pelo tratamento com o AcM deve-se à diminuição da atividade fungicida e imunoreguladora conferida pelo afluxo de leucócitos PMN e não por alteração fundamental dos processos imunológicos mediados por linfócitos.

Analisamos a sobrevivência de animais susceptíveis e resistentes tratados ou não com o AcM e desafiados com o fungo. Como mostrado na Figura 3, a queda da sobrevivência de camundongos B10.A depletados de granulócitos iniciou-se em torno de 128 dias, com uma média de sobrevivência de  $158,0 \pm 36,22$  dias.

Somente um animal da linhagem A/J do grupo tratado com AcM morreu no período de 400 dias de observação. No grupo somente infectado, não foram observadas mortes. A morte precoce do animal A/J pode ser atribuída aos tratamentos concomitantes com o AcM e o fungo. Animais A/J somente

inoculados com o AcM ou somente infectados não apresentaram esta morte precoce (dados não apresentados).

A análise estatística da mortalidade demonstrou que somente para a linhagem susceptível, a depleção de leucócitos PMN altera significativamente a sobrevivência dos animais infectados. Este experimento também demonstra que animais A/J continuam a comportar-se como resistentes e B10.A como susceptíveis, independentemente do tratamento. Isto é, o tratamento com o AcM não fez com que a linhagem resistente se comportasse como susceptível e vice-versa.

A análise do grau da infecção de animais B10.A e A/J depletados de granulócitos, acompanhada pela cultura dos seus órgãos (UFC), revelou infecção micótica bastante ativa nos pulmões de ambas as linhagens no período de 7 dias de infecção.

Nos animais B10.A a doença se tornou progressiva, com aumento da carga fúngica pulmonar nos dias 15, 30 e 120 pós-infecção. Em todos os tempos analisados houve uma infecção mais grave nos animais tratados com o AcM.

Aos 120 dias de infecção observa-se uma disseminação extrapulmonar muito intensa nos animais B10.A depletados ( $5,518 \pm 0,136 \log_{10}$  no fígado e  $4,735 \pm 0,221 \log_{10}$  no baço), enquanto que os animais controle controlam mais a disseminação ( $1,991 \pm 0,947 \log_{10}$  no fígado e  $1,977 \pm 0,515 \log_{10}$  no baço). Estes dados nos permitem afirmar que a doença dos animais depletados é mais grave, fato este não observado com animais da linhagem resistente. Deste modo, verificamos que em todos os períodos analisados, a infecção dos animais B10.A tratados com o AcM é mais grave do que a dos não tratados.

Os camundongos A/J mostraram comportamento bastante diferente. Observamos grande diferença do número de fungos (cerca de  $1 \log_{10}$ ) nos

pulmões de animais tratados aos 7 dias de infecção. Esta diferença desapareceu nos outros períodos analisados.

Outro fato interessante é o evidente controle do crescimento fúngico no fígado e baço de animais resistentes, observado aos 30 dias de infecção. Em resumo, o tratamento com o AcM parece ter agravado a doença dos animais resistentes somente ao início da infecção (7 dias) e esse efeito deixa de existir nos outros períodos analisados.

A depleção de células PMN diminuiu os mecanismos de defesa somente no início da infecção de animais resistentes. Em animais susceptíveis os mecanismos de defesa sem a participação dos granulócitos levaram a uma doença persistentemente mais grave.

O fato acima descrito é muito interessante e demonstra comportamentos diferentes de uma célula envolvida nos mecanismos de imunidade natural (os leucócitos PMN) dependendo do patrimônio genético do hospedeiro. Este fato não havia sido descrito na literatura, porém trabalho publicado recentemente (Farah et al., 2001) demonstra fato equivalente. Assim, Farah et al. (2001) mostraram que animais BALB/c e CBA/CaH depletados de células PMN e infectados via oral com  $10^8$  células viáveis de *C.albicans* apresentaram infecções mais grave às 24 horas, porém nos dia 4 e 6 pós-infecção somente os animais BALB/c mantinham-se a maior gravidade da doença. Além da depleção de leucócitos PMN os animais também foram submetidos à inativação de macrófagos, demonstrando que os animais CBA/CaH apresentaram um quadro infeccioso bem mais dramático, quando comparado ao seu grupo controle e aos animais BALB/c. Assim, diferentes populações de células fagocíticas desempenham funções mais ou menos importantes frente a um mesmo patógeno dependendo do padrão genético do indivíduo infectado.

Trabalho desenvolvido por Gesztesi et al. (1999) mostrou que animais B10.A e A/Sn depletados de células PMN e submetidos à infecção com  $10^6$  leveduras viáveis do fungo *P.brasiliensis* em uma de suas patas apresentaram diminuição na resposta de HTT e aumento nos níveis de anticorpo anti-gp43.

Neste modelo, que também utilizou os animais susceptíveis e resistentes ao *P.brasiliensis*, o tratamento com o AcM RB6 não alterou o número de fungos na lesão subcutânea e confirmou trabalho prévio de nosso laboratório que demonstrou que a infecção de camundongos A/J e B10.A é auto-limitada e evolui para a cura (Arruda, tese de mestrado, 1993).

No nosso trabalho não verificamos alteração na imunidade celular (reações de HTT) nos animais tratados com o AcM. O tratamento levou a doença persistentemente mais grave nos animais B10.A que somente infectados já eram anérgicos nesta reação. Por outro lado, o tratamento de camundongos A/J agrava a infecção somente na primeira semana de observação e não altera as reações positivas de HTT. Assim, o tratamento com o anticorpo anti-PMN não modificou o padrão de reações de imunidade celular previamente caracterizado para estas linhagens.

Os anticorpos séricos podem ser usados como marcadores da ativação do sistema imune. Em doenças infecciosas crônicas em geral, e na paracoccidiodomicose em particular, a produção de altos títulos de anticorpos associada à imunidade celular comprometida caracteriza as formas graves, disseminadas da doença enquanto que níveis baixos de anticorpos e imunidade celular preservada caracterizam as formas localizadas, benignas (Camargo & Cano, 1994; Benard, 1997).

As citocinas exercem profundo efeito regulador do padrão isotípico dos anticorpos secretados (revisado por Snapper et al., 1997). Trabalhos elegantes demonstraram que o IFN- $\gamma$  induz a síntese de IgG2a enquanto que a IL-4 promove a mudança ("switching") para os isótipos IgG1 e IgE. Em adição, IFN- $\gamma$  e IL-4 se antagonizam mutuamente quando à ativação de linfócitos B (Snapper et al., 1987; Coffman et al., 1986). Por outro lado, IgG2a pode também ser regulada positivamente por IFN- $\alpha$  (Finkelman et al., 1991). Há relatos que demonstraram que a secreção do isótipo IgG2b é estimulada pelo TGF- $\beta$

(McIntyre et al., 1993), enquanto que a síntese de IgA é positivamente controlada por TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-5 (Snapper et al., 1997).

A principal fonte de citocinas reguladoras da ativação de linfócitos B são os linfócitos T auxiliares (Th) que podem diferenciar-se nas populações Th1 (secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-2) ou Th2 (secretoras de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (Mosmann et al., 1986; Bottomly, 1988; Cher et al., 1987; Schmitt et al., 1991; Romagnani, 1991). Há vários trabalhos que demonstram que a resposta imune humoral regulada preferencialmente por linfócitos Th1 desenvolve-se com a produção de altos títulos de IgG2a, IgG2b e IgG3 (Finkelman et al., 1990; DeKruyff et al., 1993; HayGlass et al., 1991), enquanto que IgG1 e IgE são marcadores da ativação preferencial de células Th2 (Kolbe et al., 1991; Finkelman et al., 1990).

Essa visão “clássica” da regulação isotípica deve, entretanto, ser aceita com cuidado. Como mostrado anteriormente, IgG2a pode ter sua síntese induzida por IFN- $\alpha$  e não IFN- $\gamma$  e refletir o grau de infecção viral, por exemplo. Da mesma maneira, existem duas subpopulações de IgG1, uma com atividade anafilática e regulada por IL-4 e outra sem atividade anafilática regulada por IL-12 e IFN- $\gamma$  (Faquim-Mauro et al., 1999). O isótipo IgG2b também pode ser associado a duas situações diversas da resposta imune: a sua síntese aumentada pode ser atribuída a uma resposta Th1, portanto ativadora de macrófagos (HayGlass et al., 1991), como por TGF- $\beta$ , uma citocina que exerce potente função na desativação de macrófagos (Germann et al., 1995; McIntyre et al., 1993).

Na paracoccidiodomicose experimental de camundongos isogênicos há a produção de todos os isótipos de imunoglobulinas, fato este que indica a ativação de células tanto do padrão Th1 como Th2. Entretanto, camundongos A/J produzem níveis mais elevados de isótipos regulados por células Th1 (IgG2a e IgG3) enquanto que camundongos B10.A produzem níveis mais

elevados de IgG2b e IgA, regulados por TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-5 (Cafalli-Favati, 1993; Cano et al., 1995a).

Na PCM humana também há relatos de síntese preferencial de IgG4 e IgE (IL-4 regulados) na formas graves da doença (Baida et al., 1999; Mamoni et al., 2001).

Em conclusão, a produção em níveis elevados de um certo isótipo pode ser utilizada como marcador ou indicador da ativação preferencial de uma certa subpopulação Th. Além das discrepâncias acima apontadas, deve-se também levar em conta que muitas citocinas são secretadas por outras populações celulares como linfócitos T CD8<sup>+</sup>, macrófagos e também por células B.

Considerando a resposta imune humoral, ficou claro que os padrões de isótipos dos anticorpos anti-*P.brasiliensis* produzidos pelos animais B10.A e A/J foram diversos. Animais A/J produziram altos títulos de IgG2a e IgG3 (regulados por IFN- $\gamma$ ) que foram significativamente maiores do que os dos animais susceptíveis; os anticorpos específicos dos animais B10.A estavam principalmente distribuídos entre os isótipos IgG1 (regulado por IL-4) e IgG2b (regulado por TGF- $\beta$ ). Este fato já havia sido caracterizado para a infecção intratraqueal (Cano et al., 1995a).

Uma visão geral da produção de anticorpos específicos em nosso modelo experimental revela que o tratamento com o AcM não alterou drasticamente o perfil de anticorpos produzidos, tendo, entretanto, levado a algumas alterações pontuais.

Os animais B10.A depletados apresentaram níveis elevados de Ig total aos 15 dias e IgG1 (IL-4 regulada) e IgG3 (regulados por IFN- $\gamma$ ) aos 30 dias de infecção pulmonar. No período mais tardio da doença (120 dias), os animais depletados apresentaram níveis mais elevados de IgA, um isótipo cujo “switch” é regulado por TGF- $\beta$ , IL-5 e IL-10 (revisado por Snapper et al., 1997).

Em resumo, a doença mais grave dos animais B10.A esteve principalmente associado a aumentos na produção de isótipos regulados por

citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) ou por citocinas desativadoras de macrófagos (TGF- $\beta$ , não avaliada em nossos experimentos). Houve um aumento pontual de IgG3 e talvez este fato esteja associado à maior produção de IL-12 pulmonar, um agente indutor de IFN- $\gamma$ , aos 15 dias da doença.

Em camundongos A/J, com 7 dias de infecção não houve alterações marcantes quanto à produção de nenhum dos isótipos entre os grupos tratado e não tratado. Aos 15 dias de infecção, animais depletados apresentaram aumento de anticorpos específicos (Ig total, IgG2b, IgG3 e principalmente IgG2a) em relação ao grupo controle e aos 7 dias de infecção. Aos 30 dias houve produção mais intensa de IgG2a quando comparada ao grupo controle. Aos 120 dias, somente os níveis de IgG3 nos animais depletados suplantaram aqueles encontrados nos camundongos controle.

É interessante o paralelismo entre o agravamento da doença de camundongos resistentes aos 7 dias do experimento e o aumento dos isótipos IgG2a, IgG2b e IgG3, além da Ig total, aos 30 dias. A literatura demonstra que respostas imunológicas com predomínio da população Th1 levam à síntese aumentada destas três sub-classes de IgG (Finkelman et al., 1990; DeKruyff et al., 1993; HayGlass et al., 1991). O fato por nós observado parece indicar uma prevalência ou maior atividade de citocinas Th1 nos animais resistentes. De fato, ao dosar as citocinas pulmonares verificamos um aumento persistente (no curso de toda a doença) de IFN- $\gamma$  e de IL-12 aos 7 e 120 dias pós-infecção. Assim, o tratamento de depleção de leucócitos PMN apesar de não alterar o padrão de resistência de animais A/J, induziram padrões de resposta imune mais dirigidos a um perfil Th1 ou de produção de mediadores pró-inflamatórios. Em animais A/J, os leucócitos PMN exerceriam uma função bloqueadora ou inibidora parcial de resposta Th1.

A análise dos dados de quantificação de anticorpos específicos demonstra claramente três fatos anteriormente observados neste modelo experimental:

- a) animais susceptíveis e resistentes produzem anticorpos específicos anti-*P.brasiliensis* que se distribuem entre todas as classes e sub-classes de imunoglobulinas;
- b) o curso da doença leva ao aparecimento de maiores títulos de anticorpos;
- c) a doença mais grave está associada com títulos mais altos de anticorpos.

Fatores genéticos do hospedeiro e a virulência da amostra do fungo levam ao desenvolvimento de respostas do tipo celular Th1 ou Th2. Células T helper CD4<sup>+</sup> regulam o mecanismo efetor da resposta imune através da produção de padrões distintos de citocinas. Células do tipo Th1 produzem IL-2 e IFN- $\gamma$  e preferencialmente ativam macrófagos. As células do tipo Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que contribuem para o aumento da imunidade humoral ou para a supressão da imunidade celular (Mosmann et al., 1991).

Na criptococose, há associação entre linfocinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) com o desenvolvimento de reações de HTT (Murphy et al., 1993; Buchanan et al., 1993; Crowle, 1975). A resposta imune protetora ao *Histoplasma capsulatum* também é dependente de citocinas ativadoras de macrófagos, tais como, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Zhou et al., 1995; Wu-Hsieh et al., 1987).

Trabalho elegante de Magee et al. (1995) mostrou que camundongos resistentes (DBA/2) à infecção pulmonar por *Coccidioides immitis* apresentaram níveis elevados de IFN- $\gamma$  e os camundongos susceptíveis (BALB/c) apresentaram níveis altos de IL-4. O tratamento com IFN- $\gamma$  exógeno levou à melhora nos animais susceptíveis e a administração do AcM anti-IFN- $\gamma$  nos animais resistentes provocou à piora da doença. Quando o tratamento dos animais susceptíveis foi feito com o AcM neutralizante de IL-4, verificou-se que houve melhora da doença, sugerindo que na coccidioidomicose a resposta

imune celular estava associada com a resistência e proteção, enquanto que a IL-4 diminuía a imunidade protetora desses animais.

Na paracoccidiodomicose, há uma intensa resposta humoral e depressão da resposta imune celular, sugerindo infecção crônica com padrão Th2 (Calich, et al., 1994). Na paracoccidiodomicose experimental induzida por via i.p., animais resistentes desenvolvem uma resposta tipo Th1, com produção preferencial do IgG2a, reação de HTT persistente e eficiência na ativação de macrófagos. Já os animais susceptíveis desenvolvem uma resposta que tende ao padrão Th2, com anticorpos IgG2b e IgA, anergia nas reações de HTT e ativação ineficiente de macrófagos (Cafalli-Favatti, 1993; Cano et al., 1995a; Fazioli et al., 1994; Calich et al., 1988). Neste mesmo modelo experimental Kashino et al. (2000) demonstraram que camundongos resistentes sintetizam IFN- $\gamma$  e IL-12 enquanto que animais susceptíveis produzem baixos níveis de citocinas e, quando o fazem, há a secreção preferencial de IL-5 e IL-10.

Trabalho desenvolvido por Karhawi et al. (2000) mostrou que células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM quando estimulados com o antígeno de *P.brasiliensis* (PbAg) apresentaram produção de IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A síntese de IFN- $\gamma$ , entretanto, mostrou-se suprimida em pacientes com a forma ativa da doença. O fungo *P.brasiliensis* é ingerido por macrófagos humanos e murinos onde multiplicam-se e esta replicação é inibida por IFN- $\gamma$  (Moscardi-Bacchi et al., 1994; Brummer et al., 1988). O papel da IL-10 na PCM ainda não está muito bem esclarecido. A citocina TNF- $\alpha$  exerce papel importante no controle da doença (Souto et al., 2000) e é produzida principalmente por macrófagos, que regula ativamente a produção de IFN- $\gamma$ .

O IFN- $\gamma$  exerce um papel protetor na PCM, como previamente demonstrado por diversos pesquisadores (Brummer, 1994; Cano et al., 1998; Moscardi-Bacchi et al., 1994). Então, esta citocina parece ser o principal mediador da resistência contra infecções causadas por *P.brasiliensis* em

camundongos, e sua ação parece ser exercida através da atividade anti-fúngica dos macrófagos que produzem óxido nítrico (NO), um potente mediador da morte do *P.brasiliensis*.

Pacientes com PCM crônica apresentam níveis elevados de IL-10 e TNF- $\alpha$  no soro (Fornari et al., 2001). Benard et al. (2001) mostraram que células mononucleares do sangue periférico (PBMC), quando estimulados *in vitro* com gp43 (antígeno de *P.brasiliensis*) produziam várias citocinas. Pacientes com a forma crônica e aguda da doença apresentaram baixos níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  e produção de níveis consideráveis de IL-10. Quando PBMC de indivíduos saudáveis com HTT positiva foram estimuladas com o antígeno gp-43 apresentaram níveis elevados de IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$ . Assim, o balanço das citocinas Th1 e Th2 parece estar relacionado com a gravidade da doença.

As citocinas pró-inflamatórias têm efeito estimulador sobre células fagocíticas. Assim, quando os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) do sangue periférico humano foram estimulados com IFN- $\gamma$  e GM-CSF apresentaram maior atividade anti-fúngica contra o *P.brasiliensis* (Kurita et al., 2000).

Neste trabalho caracterizamos a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias nos pulmões dos animais susceptíveis e resistentes depletados ou não de granulócitos em todos os períodos de infecção estudados. A depleção de células PMN alterou em alguns períodos o padrão de citocinas pulmonares em ambas as linhagens.

O grupo de animais B10.A tratados com o AcM anti-PMN apresentou concentrações elevadas de IL-12 no período inicial da doença (7, 15 e 30 dias), mas somente aos 15 dias pôde-se apontar diferença significativa com relação ao grupo não tratado.

Em todo o curso da doença, animais A/J tratados apresentaram níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  pulmonar. Além disso, a IL-12 foi encontrada significativamente elevada aos 7 e 120 dias de infecção em animais depletados.

É muito interessante o fato de citocinas pró-inflamatórias, ativadoras de macrófagos, aparecerem em quantidade mais elevadas nos animais que não puderam contar com a população de leucócitos PMN no processo de imunidade natural contra o *P.brasiliensis*. A literatura documenta que a ativação de macrófagos e neutrófilos por IFN- $\gamma$  leva a uma atividade de fungicida e fungistática evidente (Brummer et al., 1988; Cano et al., 1992; Kurita et al., 1999a, 1999b), porém, em nosso trabalho, o novo ambiente pulmonar, mais ativador de fagócitos, não foi suficiente para compensar o efeito protetor desempenhado pelos leucócitos PMN e a sua diminuição resultou em doença mais grave nos pulmões de animais de ambas as linhagens.

Após afluir aos sítios de inflamação o destino dos leucócitos PMN é a morte celular programada (revisto por Nwakoby et al., 2001). A literatura documenta que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos induz a secreção preferencial de mediadores anti-inflamatórios.

Trabalho elegante desenvolvido por Fadok et al. (1998), mostrou que macrófagos humanos quando fagocitam neutrófilos apoptóticos têm a produção de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , bem como leucotrienos C4 e tromboxano B2 diminuídos. Em contraste, a produção de TGF- $\beta$ 1, prostaglandinas E2 e PAF aumentavam. A citocina TGF- $\beta$ 1 contribui para a inibição de citocinas pró-inflamatórias, sendo considerada um potente mediador da desativação de macrófagos.

Nosso trabalho sugere que a infecção por *P.brasiliensis* de animais tratados com o AcM pode ter dado origem a um infiltrado celular menos rico em células apoptóticas, decorrente do menor afluxo de leucócitos PMN, e à prevalência de citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e IFN- $\gamma$ ) no sítio da infecção. Análise histopatológica das lesões pulmonares (em andamento) poderá dar subsídios a esta interpretação.

É importante destacar que animais A/J não depletados (controle) apresentaram níveis elevados de GM-CSF no pulmão aos 7 dias de infecção, comparados aos animais depletados e aos animais B10.A independente do tratamento. É curioso o fato de que os animais A/J depletados não apresentaram aumento da produção de GM-CSF equivalente à do seu grupo controle; porém, se analisarmos os dados da contagem de leucócitos PMN no sangue periférico aos 6 dias de infecção (figura 1) notamos números elevados de neutrófilos nos animais controle, o que se associa positivamente ao aumento de GM-CSF no pulmão. Nos animais depletados, entretanto, há evidente aumento de neutrófilos aos 14 dias da doença sem o correspondente aumento de GM-CSF.

É possível que a baixa detecção do fator GM-CSF no pulmão de animais A/J depletados aos 7 dias de infecção possa estar associada ao consumo desta citocina, ou que o GM-CSF ou G-CSF responsável pela neutrofilia dos animais tratados tenha sido produzido em outro local, como a medula, baço ou fígado.

Seria interessante dosar o GM-CSF em camundongos depletados de células PMN, mas que não fossem infectados com o fungo. Assim poderíamos analisar as concentrações de fatores de crescimento induzidas nestes animais com o objetivo de melhor entender a regulação de produção de leucócitos PMN desencadeada pelo tratamento com o anticorpo monoclonal. Recentemente, a IL-18 inicialmente descoberta como um fator indutor de IFN- $\gamma$  (Okamura et al., 1995), tem sido apontada como uma citocina que induz a produção de GM-CSF em células osteoclásticas e a produção de IL-6 em células mononucleares do sangue periférico (Udagawa et al., 1997).

Em nosso trabalho, a disseminação extrapulmonar do fungo para o fígado e baço inicia-se aos 7 dias da doença, indicando o desenvolvimento da doença sistêmica. O comprometimento hepático é também relativamente freqüente na PCM crônica humana (revisado por Martinez, 1994). No nosso modelo, é marcante a involução das cargas fúngicas hepáticas e esplênicas em

camundongos resistentes e o crescente aumento de leveduras viáveis nestes órgãos de camundongos susceptíveis. A depleção de leucócitos PMN potencia este fato somente em animais B10.A.

Também realizamos o estudo das citocinas em homogenatos de fígado aos 120 dias, visto que os animais B10.A depletados apresentaram disseminação intensa ( $5,51 \pm 0,13 \log_{10}$ ), comparada à dos animais controle ( $1,99 \pm 0,94$ ) e dos animais A/J depletados ( $0,07 \pm 0,07 \log_{10}$ ) ou não ( $0,17 \pm 0,17 \log_{10}$ ) de células PMN.

Os animais B10.A depletados apresentaram níveis elevados de IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no fígado quando comparados aos animais não depletados. Já em animais A/J depletados, os níveis das citocinas GM-CSF, IFN- $\gamma$  e IL-2 no fígado aos 120 dias apresentaram-se diminuídas quando comparadas aos animais controle.

Antes de comentar os efeitos da depleção do neutrófilos nas citocinas hepáticas seria interessante analisar comparativamente o padrão destes mediadores no fígado de camundongos B10.A e A/J infectados e tratados com IgG (figura 18). Os animais resistentes, que desenvolvem progressivamente a cura das lesões de disseminação apresentam valores mais altos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2 e GM-CSF do que os camundongos B10.A. Todos estes mediadores são do tipo Th1 ou ativadores de macrófagos. Assim, animais resistentes parecem desenvolver mecanismos de imunidade celular (reações de HTT também são positivas) que conferem proteção contra o crescimento fúngico. Vale, entretanto observar que as citocinas IL-4 e IL-5 também aparecem em níveis mais elevados em animais A/J, porém pode-se especular nesta linhagem, um predomínio de citocinas ativadoras sobre as inativadoras neste sítio de infecção.

Fato inesperado foi observado ao dosar as citocinas no fígado de camundongos B10.A. A maior carga fúngica estava associada a níveis mais elevados de IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mediadores esses já descritos

como imunoprotetores na PCM (Kurita et al., 1999a, 1999b, 1993; Souto et al., 2000; Cano et al., 1998). Neste tempo da doença, a presença destas citocinas imunoprotetoras não foi suficiente para controlar o crescimento fúngico. Além disso, neste tempo pós-infecção os camundongos B10.A mantiveram-se como anérgicos nas reações de HTT. Uma possível explicação para tal situação seria a produção concomitante de altos níveis de TGF- $\beta$  ou PGE2 (não dosados) que suplantariam os efeitos das citocinas ativadoras.

Uma interpretação alternativa para os nossos resultados de citocinas hepáticas seria a de que maiores cargas fúngicas estariam associadas com a presença de concentrações mais altas de citocinas pró-e anti-inflamatórias. Corroboram com esta interpretação os aumentos dos níveis de citocinas em camundongos B10.A (carga fúngica progressiva) e diminuição em animais A/J (decréscimo da carga fúngica). Entretanto, ao analisarmos comparativamente as citocinas hepáticas de camundongos A/J e B10.A verificamos que a ausência de fungo no fígado dos animais resistentes estava associada a valores mais elevados de citocinas. Talvez o estudo cinético das citocinas hepáticas pudesse trazer alguma informação que explicasse o crescimento fúngico neste órgão, uma vez que a análise em um tempo isolado permite somente uma visão parcial e em desacordo com os paradigmas da resposta imune contra fungos e bactérias intracelulares (proteção associada com respostas Th1 e citocinas ativadoras de macrófagos).

A análise em conjunto da produção de citocinas em nosso modelo experimental levou a constatação de fatos surpreendentes. A presença das citocinas descritas como imunoprotetoras na PCM em animais B10.A não levou à melhora da doença pulmonar e tampouco, controlou o crescimento fúngico nos outros órgãos. Poderíamos especular que os animais que não puderam contar com a população granulocítica no início da infecção apresentavam maior ativação de macrófagos. Estas células participam dos mecanismos de imunidade protetora contra o fungo e o óxido nítrico (NO) é um mediador de

grande importância neste processo (Gonzalez et al., 2000; Kashino et al., 1995; Moscardi-Bacchi et al., 1994; Cano et al., 1992; Bocca et al., 1998;).

Trabalho recente realizado *in vitro* por Gonzalez et al., 2000 demonstrou que o NO induzido pela ativação macrofágica mediado por IFN- $\gamma$  participa da inibição da transformação dos esporos em células leveduriformes e aumenta a atividade fungicida. Entretanto, no curso da doença, o NO também induz imunossupressão que se manifesta por diminuição da linfoproliferação e da expressão de antígenos de classe II (Bocca et al., 1998; 1999). Além disso, trabalho desenvolvido por Nascimento (2000) mostrou que macrófagos peritoneais de animais B10.A infectados *in vitro* com leveduras viáveis do fungo *P.brasiliensis* produzem níveis elevados de NO e baixos ou praticamente ausentes de TNF- $\alpha$ . Ao contrário, macrófagos de camundongos A/J secretam altos níveis de TNF- $\alpha$  e baixos de NO. Assim, o ambiente pulmonar e hepático nos animais depletados, mais rico em citocinas pró-inflamatórias, poderia induzir a grande produção de NO e conseqüente agravamento da doença por inibição da ativação linfocitária.

Em nosso trabalho será de grande interesse avaliar os níveis de NO produzidos por ambas as linhagens na situação de depleção ou não de células PMN. Este dado, talvez possa explicar a maior gravidade da doença em animais B10.A associada à grande produção de IL-12. Gazzinelli et al. (1996) descreveu situação experimental semelhante ao nosso modelo; níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias foram encontrados em camundongos nocaute de IL-10 e infectados com a cepa avirulenta de *T.gondii*. Descrevem aumento de citocinas ativadoras de macrófagos que, entretanto levou à diminuição de sobrevivência dos animais devido a intensa infiltração celular e necrose hepática.

Em certas infecções fúngicas há demonstrações evidentes da participação dos leucócitos PMN nos mecanismos de controle da doença e, às vezes, nos processos imunorregulatórios que levam às formas mais brandas da doença. Na candidíase, a neutropenia é um fator de fundamental importância

no processo de disseminação do fungo para as vísceras. Além dos leucócitos PMN, o padrão de imunidade adaptativa na candidíase sistêmica tem sido correlacionado com as populações de linfócitos T CD4 ativados. O padrão Th1 tem sido associado a mecanismos protetores que privilegiam a imunidade celular enquanto que o padrão Th2 com quadros graves e disseminados da doença (revisado por Romani et al., 1995).

O grupo da Dra. Luigina Romani tem demonstrado uma associação entre os mecanismos de imunidade natural mediados por leucócitos PMN e da imunidade adaptativa que se estabelece em modelos experimentais que utilizam camundongos resistentes e susceptíveis e cepas de *C.albicans* com diversos graus de virulência (Romani et al., 1997a e 1997b). Assim, verificou-se que células PMN são importantes no controle da infecção primária e secundária por *C.albicans*. Demonstrou-se que neutrófilos têm a capacidade de secretar IL-12 e IL-10 em resposta *in vitro* contra o fungo, e que isolados virulentos induzem a secreção preferencial de IL-10 enquanto que a síntese de IL-12 é induzida por cepas avirulentas (Romani et al., 1997a; 1997b). Neste contexto, seria interessante analisar o padrão de citocinas secretado por leucócitos isolados de camundongos resistentes e susceptíveis ao *P.brasiliensis*.

Neste trabalho analisamos também a influência dos leucócitos PMN em animais B10.A vacinados por via s.c. e desafiados por via i.t. Um grupo de animais protegidos foi depletado de leucócitos PMN e outro não, antes do desafio intratraqueal.

Ambos os grupos de animais protegidos apresentaram uma redução de carga fúngica pulmonar e houve disseminação pequena ou ausência de disseminação para o fígado e baço aos 60 dias do desafio intrapulmonar. Não foram observadas diferenças marcantes na gravidade da doença entre os grupos depletado e não depletado, sugerindo que as células PMN não têm grande participação no controle da carga fúngica quando estes animais estão

imunoprottegidos contra o *P.brasiliensis*. Em outras palavras, os leucócitos PMN parecem não ser importantes na imunidade adquirida protetora ao fungo.

Nossos dados confirmam a proteção dos animais B10.A induzida pela pré-imunização com o fungo, resultando na melhora da doença; além disso, o tratamento com o AcM anti-PMN parece ter melhorado a doença dos animais imunoprottegidos, pois este grupo apresentou menor carga fúngica pulmonar e nenhum caso de crescimento fúngico no fígado e baço. Este quadro é um pouco menos grave que aquele apresentado pelo grupo vacinado e apenas tratado com IgG normal de rato. A análise estatística, entretanto, não mostrou diferenças significativas entre os dois grupos previamente vacinados.

Este experimento também demonstrou que a resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) estava aumentada nos animais da linhagem B10.A previamente imunizados pela via subcutânea. O tratamento prévio evitou a anergia, caracteristicamente exibida por esses animais após a inoculação i.t.. Estes dados apresentam concordância com o achado anterior de proteção no modelo i.p. (Arruda, 1993) e no modelo i.t. (Arruda, 1999), isto é, a imunoproteção é acompanhada por evidentes aumentos nas respostas de HTT.

No presente trabalho também foi interessante a caracterização de respostas de HTT significativamente mais elevadas nos animais imunoprottegidos e depletados de leucócitos PMN quando comparados aos seus controles também imunoprottegidos. Mais uma vez detecta-se a atividade anti-inflamatória dos leucócitos PMN, cuja presença, em nossos experimentos, esteve associado a reações diminuídas de HTT. Estas reações são sabidamente mediadas por linfócitos do tipo Th1 e macrófagos ativados (Cher & Mosmann, 1987; Arruda, tese de doutorado, 1999).

Pappagianis et al. (1960), já haviam observado na coccidioidomicose a associação entre proteção e inoculação do agente infeccioso por via s.c.. Além disso, Cox et al. (1988) associaram essa proteção à resposta positiva de HTT.

Para os animais B10.A, a positividade da resposta de HTT parece estar associada ao fenômeno de proteção e sua expressão é regulada pelas populações TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (Arruda, 1999).

Trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório (Arruda, 1999) demonstrou a presença de níveis de anticorpos totais maiores nas primeira e segunda semanas de infecção para o grupo B10.A-SCIT com relação ao grupo controle (B10.A-IT). Este aumento precoce era feito principalmente às custas dos isótipos IgG1 e IgG2b. Na oitava semana de infecção, entretanto, o título do isótipo IgG2a era menor quando comparado àquele do grupo IT. Nossos dados também revelam produção diminuída de IgG2a e IgG2b em animais imunoprotetidos, quando comparados aos animais não protegidos aos 60 dias (8 semanas) de infecção pulmonar, porém não houve diferenças entre os dois grupos imunoprotetidos.

Não é bem conhecido o papel desempenhado pelos anticorpos na PCM, e usualmente altos títulos estão associados a quadros graves da doença (Fava Netto, 1961 e 1972; Correa & Giraldo, 1972; Restrepo et al., 1982; Biagioni et al., 1984). A imunoproteção de camundongos B10.A é acompanhada por títulos menores de anticorpos, talvez refletindo a menor gravidade da doença. A depleção de leucócitos PMN, entretanto, não alterou de maneira significativa a carga fúngica assim como o perfil de anticorpos anti-*P.brasiliensis* desenvolvidos em uma resposta secundária ao fungo.

Nosso trabalho mostrou de maneira bastante clara que os leucócitos PMN são células imunoprotetoras na PCM pulmonar, mas a sua ação depende do padrão genético do hospedeiro. Demonstrou também que estas células participam muito ativamente dos mecanismos protetores de imunidade natural, mas não na fase da imunidade adquirida contra o fungo *P.brasiliensis*.

A diminuição de leucócitos PMN se traduz em algumas alterações nos níveis de citocinas e anticorpos produzidos por camundongos susceptíveis e resistentes; estas alterações, entretanto, não foram suficientes para mudar o

padrão de susceptibilidade e resistência de camundongos B10.A e A/J, respectivamente.

Como comentário final deve-se informar que estão sendo analisados histopatologicamente os diversos órgãos obtidos nas diversas situações e tempos experimentais aqui descritos. Esta análise trará, por certo, novas informações que permitirão um entendimento mais seguro do efeito da depleção *in vivo* de leucócitos PMN na PCM pulmonar.

## **CONCLUSÕES**

## - CONCLUSÕES

- As células PMN exercem papel importante na resistência à infecção pelo fungo *P.brasiliensis*.
- A depleção de leucócitos PMN na fase de imunidade natural da resposta imune diminuiu os mecanismos de defesa ao início da infecção de camundongos resistentes e durante todo o curso da doença de camundongos susceptíveis.
- A depleção de células PMN não altera as reações de HTT e os padrões relativos de susceptibilidade e resistência de camundongos B10.A e A/J.
- A eficiência imunoprotetora dos leucócitos PMN depende do padrão genético do hospedeiro.
- Em ambas as linhagens, a depleção de leucócitos PMN acarreta maior produção de anticorpos específicos. Em camundongos resistentes os aumentos são feitos às custas de isótipos regulados por células Th1 (IgG2a, IgG2b e IgG3) enquanto que nos animais susceptíveis há aumento de IgG1 (IL-4 regulada), IgA (regulada por TGF- $\beta$ , IL-5 e IL-10) e IgG3 (regulada por IFN- $\gamma$ ).
- A depleção de células PMN altera o padrão de citocinas pulmonares em ambas as linhagens. Em tempos precoce há aumento de IL-12 (B10.A e A/J)

e IFN- $\gamma$  (A/J), demonstrando que o afluxo normal de leucócitos PMN leva a uma produção diminuída de citocinas pró-inflamatórias. Em fases tardias da doença a depleção de células PMN induz a maior produção de IL-4 e IL-12 em animais B10.A e somente de IL-12 em camundongos A/J.

- Em camundongos susceptíveis a maior carga fúngica hepática associada à depleção de leucócitos PMN induziu grande produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Em animais A/J a ausência de fungos no fígado induziu a menor presença das citocinas GM-CSF, IFN- $\gamma$  e IL-2. Assim, os níveis de citocinas pró-inflamatórias no fígado estão positivamente associadas ao grau de infecção.
- Os leucócitos PMN não exercem função imunoprotetora na fase adquirida da resposta imune à infecção com o fungo *P.brasiliensis*. A depleção de leucócitos PMN não alterou o padrão de produção de anticorpos e citocinas pulmonares dos animais imunoprotetidos. Entretanto, induziu aumentos significativos nas reações de HTT e de IL-3 pulmonar.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBORNOZ, M.C.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v.9, p.248-253, 1971.

ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.5, p.125-141, 1930.

APPELBERG, R., CASTRO, A.G., SILVA, M.T. Neutrophils as effector cells of T-cell-mediated, acquired immunity in murine listeriosis. **Immunology**, v.83, p.302-307, 1994.

APPELBERG, R., ORME, M., PINTO DE SOUZA, M.I., SILVA, M.T. *In vitro* effects of interleukin-4 on interferon- $\gamma$ -induced macrophage activation. **Immunology**, v.76, p.553-559, 1992.

ARRUDA, C. Caracterização da infecção subcutânea pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em camundongos isogênicos: uma via que pode induzir proteção ou exacerbação da doença. São Paulo, 1993. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).

ARRUDA, C. Paracoccidioidomicose pulmonar experimental – Imunoproteção induzida pela inoculação subcutânea prévia do fungo. São Paulo, 1999. 124p. (Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas - USP).

ARRUDA, C., FAZIOLI, R.A., KASHINO, S.S., NASCIMENTO, F.R.F., ROCHA, K.C., COSTA, T.A., RUSSO, M., CALICH, V.L.G. *In vivo* treatment with r-IL-

- 12 protects susceptible mice from *Paracoccidioides brasiliensis* pulmonary infection whereas *in vivo* neutralization of IL-4 does not alter disease outcome. In: INTERNATIONAL MEETING ON CYTOKINES/REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA, 21, Angra dos Reis, 1996. **Livro de resumos**. Rio de Janeiro: SBI, 1996. abstr. 09-04.
- ATHENS, J.W. Granulocytes-neutrophils. In: LEE, G.R., BITHELL, T.C., FOERSTER, J., ATHENS, J.M., LUKENS, J.N. **Wintrobe's clinical hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K.I., CAMARGO, Z.P., GOMES, G.M., FRANCO, M., MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novencinctus*) captured in an endemic area of Paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.58, n.4, p.505-512, 1998.
- BAIDA, H., BISELLI, P.J.C., JUVENALE, M., DEL NEGRO, G.M.B., MENDES-GIANNINI, M.J.S., DUARTE, A.J.S., BENARD, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microb. Infect.**, New York, v.1, p.273-278, 1999.
- BAINTON, D.F. Morphology of neutrophils, eosinophils, and basophils. In: WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J. **Hematology**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p.753-765.
- BANNERMAN, R.M. Hematology. In: FOSTER, H.L., SMALL, J.D., FOX, J.G. eds. **The mouse in biomedical research**. New York: Academic Press, 1983. v.3, p.291-311. (American College of Laboratory Animal Medicine Series).

- BAUGHMAN, R.P., KIM, C.K., VINEGAR, A., HENDRICKS, D.E., SCHMIDT, D.J., BULLOCK, W.E. The pathogenesis of experimental pulmonary histoplasmosis. Correlatives studies of histopathology, bronchoalveolar lavage, and respiratory function. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.134, p.771-776, 1986.
- BERLINER, M.D., RECA, M.E. Vital staining of *Histoplasma capsulation* with Janus Green B. **Sabouraudia**, v.5, p.26-29, 1966.
- BENARD, G., MENDES-GIANNINI, M.J.S., JUVENALE, M., MIRANDA, E.T., DUARTE, A.J.S. Immunosuppression in Paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.175, p.1263-1267, 1997.
- BENARD, G., ROMANO, C.C., CACERE, C.R., JUVENALE, M., MENDES-GIANNINI, M.J., DUARTE, A.J. Imbalance of IL-2, IFN- $\gamma$  and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v.13, n.4, p.248-252, 2001.
- BERTRAM, T.A., CANNING, P.C., TOTH, J.A. Preferential inhibition of primary granule release from bovine neutrophils by *Brucella abortus*. **Infect. Immun.**, v.52, p.285-292, 1986.
- BIAGIONI, L., SOUZA, M.J., CHAMMA, L.G., MENDES, R.P., MARQUES, S.A., 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.**, v.78, p.617-621, 1984.

- BOCCA, A.L., HAYASSHI, E.E., PINHEIRO, A.G., FURIANETTO, A.B., CAMPANELLI, A.P., CUNHA, F.Q., FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, Bethesda, v.161, p.3056-3063, 1998.
- BOCCA, A.L., SILVA, M.F., SILVA, C.L., CUNHA, F.Q., FIGUEIREDO, F. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p.280-287, 1999.
- BOLL, I., KUHN, A. Granulocytopoiesis in human bone marrow cultures studies: by means of kinematography. **Blood**, v.26, p.449-470, 1965.
- BOPP, C. Algumas considerações sobre a micose de Lutz no Rio Grande do Sul. **An. Fac. Med. Porto Alegre**, Porto Alegre, v.15, p.97-123, 1955.
- BOS, J.D., KAPSENBERG, M.L. The skin immune system: progress in cutaneous biology. **Immunol. Today**, v.14, p.75-78, 1993.
- BOTTOMLY, K. A functional dichotomy in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. **Immunol. Today**, v.9, n.9, p.268-274, 1988.
- BRACH, M.A., VOS, S., GRUSS, H.J., HERMANN, F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. **Blood**, v.80, p.2920-2924, 1992.
- BRITO, T., FURTADO, J.S., CASTRO, R.M., MANINI, M. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis

- (South American blastomycosis). **Virchows Archiv. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, v.361, p.129-138, 1973.
- BRUMMER, E., CASTAÑEDA, E., RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p.89-117, 1993.
- BRUMMER, E., HANSON, L.H., STEVENS, D.A. Gamma-interferon activation of macrophages for killing *Paracoccidioides brasiliensis*: evidence for non oxidative mechanisms. **Int. J. Immunopharmacol.**, v.10, p.945-952, 1988.
- BRUMMER, E., KURITA, N., YOSHIDA, S., NISHIMURA, K., MIYAJI, M. A basis for resistance of *Blastomyces dermatitidis* killing by human neutrophils: inefficient generation of myeloperoxidase system products. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30, p.233-243, 1992.
- BRUMMER, E., SUGAR, A.M., STEVENS, D.A. Immunological activation of polymorphonuclear neutrophils for fungal killing: studies with murine cells and *B. dermatitidis* "in vitro". **J. Leuk. Biol.**, v.36, p.505-520, 1984.
- BUENDÍA, A.J., OCA, R.M., NAVARRO, J.A., SÁNCHEZ, J., CUELLO, F., SALINAS, J. Role of polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci* – induced abortion. **Infect. Immun.**, v.67, p.2110-2116, 1999.
- BUCHANAN, K.L., MURPHY, J.W. Characterization of cellular infiltrates and cytokine production during the expression phase of the anticryptococcal delayed-type hypersensitivity response. **Infect. Immun.**, v.61, p.2854-2865, 1993.

- BURGER, E., SINGER-VERMES, L.M., CALICH, V.L.G. The role of C5 in experimental murine Paracoccidioidomycosis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.152, n.2, p.425, 1985.
- BUSTAMANTE, B., MCEWEN, J.G., TABARES, A.M., ARANGO, M., RESTREPO, A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *P. brasiliensis*. **Sabouraudia**, v.23, p.407-414, 1985.
- CAFALLI-FAVATI, C. Expressão de moléculas de classe II do CPH, produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e caracterização isotópica de anticorpos em camundongos susceptíveis e resistentes ao *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, 1993. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas – USP).
- CALICH, V.L.G., KIPNIS, T.L., MARIANO, M., FAVA NETO, C., DIAS, W.D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* “*in vitro*”: Its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.12, p.20-30, 1979.
- CALICH, V.L.G., FAZIOLI, R.A., TEIXEIRA, H.C., RUSSO, M., SINGER-VERMES, L.M., BURGER, E., VAZ, C.A.C. Mechanisms of host resistance to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Iberica Micol.**, Barcelona, v.5, suppl., p.154-159, 1988. [Congress of International Society of Human and Animal Mycology, 10, Barcelona, 1988].
- CALICH, V.L.G. Mecanismos de resistência do hospedeiro à infecção experimental pelo *P.brasiliensis*. São Paulo, 1993. 112p. (Tese de Livre Docência – Instituto de Ciências Biomédicas - USP).
- CALICH, V.L.G., SINGER-VERMES, L.M., RUSSO, M., VAZ, C.A.C., BURGER, E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.F., LACAZ,

- C.S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC, 1994. p.151-173.
- CALICH, V.L.G., BURGER, E., KASHINO, S.S., FAZIOLI, R.A., SINGER-VERMES, L.M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect. Immun.**, v.55, p.1919-1923, 1987.
- CALICH, V.L.G., SINGER-VERMES, L.M., SIQUEIRA, A.M., BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v.66, p.585-594, 1985.
- 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.**, v.29, p.31-38, 1991.
- CAMARGO, Z.P., CANO, L.E. Humoral immunity. In: FRANCO, M.F., LACAZ, C.S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G., eds. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC, 1994. p.187-197.
- CANO, L.E., ARRANGO, R., SALAZAR, M.E., BRUMMER, E., STEVENS, D.A., RESTREPO, A. Killing of *P.brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30, p.161-168, 1992.
- CANO, L.E., SINGER-VERMES, L.M., VAZ, C.A., RUSSO, M., CALICH, V.L.G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of the infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v.63, p.1777-1783, 1995a.

- CANO, L.E. Paracoccidioidomicose Pulmonar Experimental: Caracterização do modelo de infecção intratraqueal em camundongos resistentes e susceptíveis; participação do IFN- $\gamma$ , células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na resistência ao fungo. São Paulo, 1995b. 191p. (Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas – USP).
- 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<sup>+</sup> T cells *in vivo* impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v.68, n.1, p.352-359, 2000.
- CANO, L.E., KASHINO, S.S., ARRUDA, C., ANDRÉ, D., XIDIEH, C.F., SINGER-VERMES, L.M., VAZ, C.A., BURGER, E., CALICH, V.L.G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v.66, p.800-806, 1998.
- CASSATELLA, M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol. Today**, v.16, p.21-26, 1995.
- CASTAÑEDA, E., BRUMMER, E., PERLMAN, A.M., McEWEN, J.G., STEVENS, D.A.A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency and the effect of siderophores. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.26, p.351-358, 1988.
- CHEN, L., WATANABE, T., WATANABE, H., SENDO, F. Neutrophil depletion exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. **Eur. J. Immunol.**, v.31, p.265-275, 2001.

- CHER, D., MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T-cell clone. II Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. **J. Immunol.**, Bethesda, v.138, n.11, p.3688-3694, 1987.
- CHIARELLA, A., CALICH, V.L.G. Effect of in vivo depletion of T CD4<sup>+</sup> cells in the pulmonary infection of susceptible (B10.A) and resistant (A/J) mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. In: MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF IMMUNOLOGY, 26, Campos do Jordão, 2001. **Abstracts**. SBI, 2001. p.131.
- COELHO, K.I.R., DeFAVERI, J., REZKALLAH-IWASSO, M.T., PERAÇOLI, M.T., MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycose experimental. In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C.S., FIORILLI, A.M., eds. **Paracoccidioidomycose blastomicose sul americana**. São Paulo: Sarvier, 1982. p.69-84.
- COELHO, K.I.R., DeFAVERI, J., REZKALLAH-IWASSO, M.T., PERAÇOLI, M.T.S. Experimental paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.F., LACAZ, C.S., RESTREPO, A., Del NEGRO, G., eds. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC, 1994. p.87-108.
- COFFMAN, R.L., CARTY, J. A T cell activity that enhances policlonal IgE production and its inhibition by Interferon- $\gamma$ . **J. Immunol.**, Bethesda, v.136, n.3, p.949-954, 1986.
- COLIGAN, J.E., KRUISBEEK, A.M., MARGULIES, D.H., SHEVACH, E.M., STROBER, W. Cytokines and their cellular receptors. In: **CURRENT protocols in Immunology**. New York: Greene, Wiley-Interscience, 1991. cap.6.

- COLOTTA, F., POLENTARUTTI, N., SOZZANI, S., MONTOVANI, A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by by cytokines and bacterial products. **Blood**, v.80, p.2012-2020, 1992.
- CONLAN, J.W., NORTH, R.J. Neutrophils are essential for early anti-listeria defence in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. **J. Exp. Med.**, v.179, p.259-268, 1994.
- CONLAN, J.W. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infection of mice by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Yersinia enterocolitica*. **Infect. Immun.**, v.65, v.2, p.630-635, 1997.
- CORREA, A., GIRALDO, R. Study of immune mechanisms in paracoccidioidomycosis Changes in immunoglobulins (IgG, IgM and IgA). **Pan Am. Health Organ. Sci. Publ.**, v.254, p.245-250, 1972.
- COX, R.A., KENNEL, W., BONCYK, L., MURPHY, J.W. Induction and expression of cell-mediated immune responses in inbred mice infected with *Coccidioides immitis*. **Infect. Immun.**, v.56, p.13-17, 1988.
- CROWLE, A.J. Delayed hypersensitivity in the mouse. **Adv. Immunol.**, v.20, p.197-264, 1975.
- CZUPRYNSKI, C.J., BROWN, J.F., MAROUSHEK, N., WAGNER, R.G., STEIMBER, H. Administration of anti-granulocyte mAb RB6-8C5 impairs the resistance of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immunol.**, Bethesda, v.152, p.1837-1846, 1994.

- DALE, D.C. Neutrophilia. In: WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J. **Hematology**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p.824-827.
- DALHOFF, K., HANSEN, F., DROMANN, D., SCHAAF, B., ARIES, S.P., BRAUN, J. Inhibition of neutrophil apoptosis and modulation of the inflammatory response by granulocyte colony-stimulating factor in healthy and ethanol-treated human volunteers. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, p.891-895, 1998.
- DANCEY, J.T., DEUBELBEISS, K.A., HARKER, L.A., FINCH, C.A. Neutrophil kinetics in man. **J. Clin. Invest.**, v.58, p.705-715, 1976.
- DAVIES, B., EDWARDS, S.W. Chemiluminescence of human bloodstream monocytes and neutrophils: an unusual oxidant (s) generated by monocytes during the respiratory burst. **J. Biol. Chem.**, Birmingham, v.7, p.229-238, 1992.
- DEKRUYFF, R.H., RIZZO, L.V., UMETSU, D.T. Induction of immunoglobulin synthesis by CD4<sup>+</sup> T cell clones. **Semin. Immunol.**, v.5, n.6, p.421-430, 1993.
- DEUBELBEISS, K.A., DANCEY, J.T., HARKER, L.A., FINCH, C.A. Neutrophil kinetic in dog. **J. Clin. Invest.**, v.55, p.833-839, 1975.
- DJEU, J.Y., BLANCHARD, D.K., HALKIAS, D., FRIEDMAN, H. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, Bethesda, v.137, p.2980-2984, 1986.

- DJEU, J.Y. Cytokines and anti-fungal immunity. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.319, p.217-223, 1992.
- ESSER, C.H., RADBRUCH, A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. **Annu. Rev. Immunol.**, v.8, p.717-735, 1990.
- FADOK, V.A., BRATTON, D.L., KONOWAL, A., FRESS, P.W., WESTCOTT, J.Y., HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. **J. Clin. Invest.**, v.101, n.4, p.890-898, 1998.
- FAQUIM-MAURO, E.L., COFFMAN, R.L., ABRAHAAMSOHN, I.A., MACEDO, M.S. Cutting Edge: Mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, Bethesda, v.163, n.7, p.3572-3576, 1999.
- FARAH, C.S. ELAHI, S., PANG, G., GOTJAMANOS, T., SEYMOUR, G.J., CLANCY, R.L., ASHMAN, R.B. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. **Infect. Immun.**, v.69, n.10, p.6110-6118, 2001.
- FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp. São Paulo**, São Paulo, v.18, p.197-254, 1955.
- FAVA NETTO, C., RAPHAEL, A. A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.3, p.161-165, 1961.

FAVA NETTO, C., CASTRO, R.M., GONÇALVES, A.P. Ocorrência familiar de blastomicose sul-americana. A propósito de 14 casos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.7, p.332-336, 1965.

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*, se necessário ao preparo do antígeno. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.11, p.177-181, 1969.

FAVA-NETTO, C. Estudos quantitativos sobre fixação de complemento na blastomicose sul-americana com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp.**, v.18, p.197-254, 1955.

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

FERREIRA, C.F.A. Características imunopatológicas da Paracoccidioidomicose experimental murina induzida por via intravenosa. São Paulo, 1993. 85p. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).

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.**, v.28, p.253-256, 1990.

- FIALHO, A.S. Patogenia da blastomicose pulmonar, Rev. Med. Municip., 10-79, 1947. Apud: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC, 1994. p.131-132.
- FINKELMAN, F.D., HOLMES, J., KATONA, I.M., URBAN, J.F.J., BECKMANN, 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.**, v.,8, p.303-333, 1990.
- FINKELMAN, F.D., SVETIC, A., GRESSER, I., SNAPPER, C., HOLMES, J., TROTTA, P.P., KATONA, I.M., GAUSE, W.C. Regulation by interferon- $\alpha$  of immunoglobulin isotype selection and lymphokine production in mice. **J. Exp. Med.**, v.174, p.1179-1188, 1991.
- FLEMING, J.T., FLEMING, M.L., MALEK, T.R. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. **J. Immunol.**, Bethesda, v.151, p.2399-2408, 1993.
- FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia**, v.25, p.5-18, 1987.
- FRANCO, M.F., MENDES, R.P., MOSCARDI-BACCHI, M., REZKALLAH-IVASSO, M.T., MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Bull. Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, v.4, p.185-221, 1989.
- FRANCO, M.F., PERAÇOLI, M.T.S., SOARES, A.M.V.C., MONTENEGRO, M.R., MENDES, R.P., MEIRA, D.A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Trop. Med. Mycol.**, v.5, p.115, 1993.

- GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HIENY, S., SCHARTON-KERSTEN, T., CHEEVER, A., KÜHN, R., MÜLLER, W., TRINCHIERI, G., SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4<sup>+</sup> T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ . **J. Immunol.**, Bethesda, v.157, p.798-805, 1996.
- GERMANN, T., BONGARTZ, M., DLUGONSKA, H., HESS, H., SCMITT, E., KOLBE, L., KOLSCH, E., PODLASKI, F.J., GATELY, M.K., RÜDE, E. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses *in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, v.25, p.823-829, 1995.
- GESZTESI, J-L., AMORIM DIAS, M.A., SOUZA, A.R., ALMEIDA, S.R., LOPES, J.D., MARIANO, M. Subcutaneous infection of mice with *Paracoccidioides brasiliensis* induces a peculiar pattern of inflammatory and immune responses. **Mycopathologia**, v.145, n.1, p.7-14, 1999.
- 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**, São Paulo, v.35, n.3, p.227-235, 1993.
- GOIHMAN-YAHR, M., ROTHENBERG, A., ROSQUETE, R., AVILA-MILLAN, E., ALBORNOZ, M.C., DE GÓMEZ, M.H., SAN MARTÍN, B., OCANTO, A., PEREIRA, J., MOLINA, T. A novel method for estimative killing ability and digestion of *Paracoccidioides brasiliensis* by phagocytic cell *in vitro*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.23, p.245-251, 1985.

- GOLDANI, L.Z., MARTINE, R., LANDELL, G.A., MACHADO, A.A., COUTINHO, V. Paracoccidioidomycosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Mycopathologia**, v.105, p.71-74, 1989.
- GONZALEZ, A., GREGORI, W., VELEZ, D., RESTREPO, A., CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect. Immun.**, v.68, p.2546-2552, 2000.
- GONZALEZ-OCHOA, A., SOTO, L.D. Blastomycosis sudamericana. Casos mexicanos, *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Méx.)*, 17, 97, 1957. Apud: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC, 1994. p.131-146.
- GONZÁLEZ-OCHOA, A. Clasificación clínica de las micosis. **Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.**, v.16, p.1, 1956.
- GONZÁLEZ-OCHOA, A. Theories regarding the portal of *Paracoccidioides brasiliensis*: a brief review. **Pan. Am. Organ. Sci. Publ.**, v.254, p.278-280, 1972.
- HAYGLASS, K.T., STEFURA, B.P. Anti-interferon gamma treatment blocks the ability of glutaraldehyde-polymerized allergens to inhibit specific IgE responses. **J. Exp. Med.**, v.173, n.2, p.279-285, 1991.
- HESTDAL, K., RUSCETT, F.W., IHLE, J.N., JACOBSEN, S.E.W., DUBOIS, C.M., KOOP, W.C., LONGO, D.L., KELLER, J.R. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. **J. Immunol.**, Bethesda, v.147, p.22-28, 1991.

- HO, J.L., HE, S.H., RIOS, M.J., WICK, E.A. Interleukin-4 inhibits human macrophage activation by tumor necrosis factor, granulocyte-monocyte colony-stimulation factor, and interleukin-3 for antileishmanial activity and oxidative burst capacity. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.165, p.344-351, 1992.
- JANCAR, S. Imunidade Natural e Inflamação. In: Calich, V., Vaz, C. **Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p.11-29.
- KARHAWI, A.S., COLOMBO, A.L., SALOMAO, R. Production of IFN- $\gamma$  is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.**, v.38, n.3, p.225-229, 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**, v.92, p.173-178, 1985.
- KASHINO, S.S., CALICH, V.L.G., SINGER-VERMES, L.M., ABRAHAMSOHN, P.A., BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v.99, p.119-128, 1987.
- KASHINO, S.S., FAZIOLI, R.A., MOSCARDI-BACCHI, M., FRANCO, M., SINGER-VERMES, L.M., BURGER, E., CALICH, V.L.G. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v.130, p.131-140, 1995.
- KASHINO, S.S., SINGER-VERMES, L.M., CALICH, V.L.G., BURGER, E. Alterations in the pathogenicity of one *Paracoccidioides brasiliensis* isolate do not correlate with its *in vitro* growth. **Mycopathologia**, v.111, p.173-180, 1990.

- KASHINO, S.S., FAZIOLI, R.A., CAFALLI-FAVATI, C., MELONI-BRUNERI, L.H., VAZ, C.A.C., BURGER, E., SINGER, L.M., CALICH, V.L.G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- $\gamma$  production. **J. Interf. Cyt. Res.**, v.20, p.89-97, 2000
- KLEBANOFF, S.J., VADAS, M.A., HARLAN, J.M., SPARKS, L.H., GAMBLE, J.R., AGOSTI, J.M., WALTERSDORPH, A.M. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, Bethesda, v.136, p.4220-4225, 1986.
- KOLBE, L., HEUSSER, C., KOLSCH, E. Antigen dose-dependent regulation of B epsilon-memory cell expression. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v.95, n.2/3, p.202-206, 1991.
- KOWANKO, I.C., FERRANTE, A., HARVEY, D.P., CARMAN, K.L. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor augments neutrophil killing of *Torulopsis glabrata* and stimulates neutrophil respiratory burst and degranulation. **Clin. Exp. Immunol.**, v.83, p.225-230, 1991.
- KURITA, N., SANO, A., COELHO, K.I., TAKEO, K., NISHIMURA, K., MIYAJI, M. An improved culture medium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.31, n.3, p.201-205, 1993.
- KURITA, N., ORADA, M., ITO, E., MIYAJI, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.37, p.261-267, 1999a.

- KURITA, N., BISWAS, S.K., ORADA, M., SANO, A., NISHIMURA, K., MIYAJI, M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.37, p.19-24, 1999b.
- KURITA, N., ORADA, M., MIYAJI, M., ITO, E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v.38, p.177-182, 2000.
- LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
- LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge on Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M.F., LACAZ, C.S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC, 1994. p.1-11.
- LACAZ, C.S., ZAMITH, V.A., DEL NEGRO, G., SIQUIERA, A.M. Aspectos clínicos gerais. In: FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomicose**. São Paulo: Sarvier, 1982. p.141-147.
- LEVITZ, S.M., FARREL, T.P. Human neutrophil degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*. **J. Leuk. Biol.**, v.47, p.170-175, 1990.
- LIMA, G.M.A., VALLOCHI, A.L., SILVA, U.R., BEVILACQUA, E.M.A., KIFFER, M.M.F., ABRAHAMSOHN, I.A. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to *Leishmaniasis cutaneous*. **Immunol. Lett.**, v.64, p.145-151, 1998.

- LLOYD, A.R., OPPENHEIM, J.J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. **Immunol. Today**, v.13, p.169-172, 1992.
- 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**, Washington, v.80, p.7659-7663, 1983.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. **Brasil-Med.**, v.22, p.121-124, 1908.
- MACKINNON, J.E. Geographical distribution and prevalence of paracoccidioidomycosis. **Pan. Am. Health Org. Sci. Publ.**, v.254, p.45-52, 1972.
- MACKINNON, J.E. Pathogenesis of south american blastomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.53, p.487-494, 1959.
- MAGEE, D.M., COX, R.A. Roles of gamma interferon and interleukin-4 in genetically determined resistance to *Coccidioides immitis*. **Infect. Immun.**, v.63, n.9, p.3514-3519, 1995.
- MALONEY, M.A., PATT, H.M. Granulocyte transit from bone marrow to blood. **Blood**, v.31, p.195-201, 1968.
- 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.**, v.65, n.3, p.237-241, 2001.
- MARTINEZ, R. Digestive tract lesions. In: FRANCO, M.F., LACAZ, C.S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC, 1994. p.289-302.
- 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.**, v.25, p.165-175, 1987.
- McINTYRE, T.M., KLINMAN, D.R., ROTHMAN, P., LUGO, M., DASCH, J.R., MOND, J.J., SNAPPER, C.M. Transforming growth factor  $\beta$ 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. **J. Exp. Med.**, v.177, p.1031-1037, 1993.
- MCKINNEY, M.M.; PARKINSON, A. A simple non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.96, p.71-78, 1987.
- MELONI-BRUNERI, L.H., CAMPA, A., ABDALA, D.S.P., CALICH, V.L.G., LENZI, H.L., BURGER, E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P.brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J. Leuk. Biol.**, v.59, p.526-533, 1996.
- MENDES-GIANNINI, M.J.L., CAMARGO, M.E., LACAZ, C.S., FERREIRA, A.W. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, , v.20, p.103-108, 1984.

- MONTES DE OCA, R., BUENDÍA, A.J., RÍO, L.D., SÁNCHEZ, J., SALINAS, J., NAVARRO, J.A. Polymorphonuclear neutrophils are necessary for the recruitment of CD8<sup>+</sup> cells in the liver in a pregnant mouse model of *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. **Infect. Immun.**, v.68, n.3, p.1746-1751, 2000.
- MOSER, S.A., LYON, F.L., DOMER, J.E., WILLIAMS, J.E. Immunization of mice by intracutaneous inoculation with viable virulent *Cryptococcus neoformans*: immunological and histopathological parameters. **Infect. Immun.**, v.35, p.685-696, 1982.
- MOSCARDI-BACCHI, M., BRUMMER, E., STEVENS, D.A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J. Med. Microbiol.**, v.40, p.159-164, 1994.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, Bethesda, v.136, n.7, p.2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T.R., SCHUMAKER, J.H., STREET, N.F., BUD, R., O'GARRA, A., BOND, M.W., MOORE, K.W.M., SHER, A., FIORENTINO, D.F. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4<sup>+</sup>T cells. **Immunol. Rev.**, v.123, p.209-229, 1991.
- MOTA, N.G.S., REZKALLAH-IWASSO, M.T., PERAÇOLI, M.T.S., AUDI, R.C., MENDES, R.P., MARCONDES, J., MARQUES, S.A., DILLON, N.L., FRANCO, M.F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical

forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.79, p.765-772, 1985.

MUCHMORE, H.G., MCKOWN, B.A., MOHR, J.A. Una creciente campanã contra la paracoccidioidomicosis. Efectos de las hormonas esteroides sobre la proliferacion de *Paracoccidioides brasiliensis*. **Bol. Of. Sanit. Pan. Am.**, v.1, p.55-60, 1974.

MURPHY, J.W. Cytokine profiles associated with induction of the anticytotoxic cell-mediated immune response. **Infect. Immun.**, v.61, p.4750-4759, 1993.

MUZYKA, B.C. Host factors affecting disease transmission. **Dent. Clin. N. Am.**, v.40, p.263-275, 1996.

NAIFF, R.D., FERREIRA, L.C., BARRET, T.B., NAIF, M.F., ARIAS, J.R. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dazpus novemcinctus*) in the State of Para. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.28, n.1, 19-27, 1986.

NASCIMENTO, F.R.F. Ativação de células peritoneais por células tumorais, ativadores policlonais ou fungos. São Paulo, 2000. 118p. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas – USP).

NAUSEEF, W.M., METCALF, J.A., ROOT, R.K. Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. **Blood**, v.61, n.3, p.483-492, 1983.

NAUSEEF, W.M. Myeloperoxidase deficiency. **Hematol. Pathol.**, v.4, n.4, p.165-178, 1990.

- NEGRONI, R. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. **Prensa Med.**, v.53, p.2831-2832, 1966.
- NEWMAN, S.L., HENSON, J.E., HENSON P.M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J. Exp. Med.**, v.156, p.430-442, 1982.
- NEWMAN, S.L., GOOTEE, L., GABAY, J.E. Human neutrophil-mediated fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. Localization of fungistatic activity to the azurophil granules. **J. Clin. Invest.**, v.92, n.2, p.624-631, 1993.
- NEWMAN, S.L., GOOTEE, L., GABAY, J.E., SELSTED, M.E. Identification of constituents of human neutrophils azurophil granules that mediate fungistasis against *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, v.68, n.10, p.5668-5672, 2000.
- NWAKOBY, I.E., REDDY, K., PASTEL, P., SHAH, N., SHARMA, S., BHASKARAN, M., GIBBONS, N., KAPASI, A.A., SINGHAL, P.C. Fas-Mediated apoptosis of neutrophils in sera of patients with infections. **Infect. Immun.**, v.69, n.5, p.3343-3349, 2001.
- OKAMURA, H., TSUTSUI, H., KOMATSU, T., YUTSUDO, M., HAKURA, A., TANIMOTO, T., TORIGOE, K., OKURA, T., NUKADA, Y., HATTORI, K., AKITA, K., NAMBA, M., TANABE, F., KONISHI, K., FUKUDA, S., KURIMOTO, M. Cloning of a new cytokine that induces interferon- $\gamma$  production by T cells. **Nature**, London, v.378, p.88-91, 1995.
- PAHO. Paracoccidioidomycosis. **Scient. Publ.**, p.254, 1972.

- PAPPAGIANIS, D., LEVINE, H.B., SMITH, C.E., BERMAN, R.J., KOBAYASHI, G.S. Immunization of mice with viable *Coccidioides immitis*. **J. Immunol.**, Bethesda, v.86, p.28-34, 1960.
- PEDROSA, J., SAUNDERS, B.M., APPELBERG, R., ORME, I.M., SILVA, M.T., COOPER, A.M. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. **Infect. Immun.**, v.68, p.577-583, 2000.
- PUPO, J. A. Evolução e formas clínicas da blastomicose sul-americana (paracoccidioidomicose). **J. Bras. Med.**, v.9, p.967-974, 1965.
- QUESENBERRY, P.J. Hematopoietic stem cells, progenitors cells, and cytokines. In: WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLEV, A.J. **Hematology**. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p.211-228.
- RAPAPORT, S. **Introdução à hematologia**. 2.ed. São Paulo: Rocca, 1990. p.157-167.
- RESTREPO, A., MCEWEN, J.G., SALAZAR, M.E. The mycelial form of *P.brasiliensis*. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 10, Barcelona, 1988. **Proceedings**. Barcelona: ISHAM, 1988. p.143-148.
- RESTREPO, A. Imunidade humoral. In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C.S., FIORILLI, A.M., eds. **Paracoccidioidomicose blastomicose sul americana**. São Paulo: Sarvier, 1982. p.127-133.
- RESTREPO, A., VÉLEZ, H. Efectos de la fagocitosis *in vitro* sobre *Paracoccidioides brasiliensis*, **Sabouraudia**, v.13, p.10-21, 1975.

- RESTREPO, A. Procedimientos serológicos en la paracoccidioidomicosis. **Adel. Microbiol. Enferm. Infec.**, Buenos Aires, v.3, p.183-211, 1984.
- RESTREPO, A., ROBLEDO, M., GUTIERREZ, F., SANCLEMENTE, M., CASTANEDA, E., CALLE G. Paracoccidioidomycosis (South american blastomycosis). **Am. J. Trop. Hyg.**, v.19, p.68-76, 1970.
- RESTREPO, A., JIMÉNEZ, B.E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.12, p.279-281, 1980.
- RESTREPO, A.M. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v.23, p.323-334, 1985.
- RESTREPO, B.I., MCEWEN, J.G., SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. Mycological development of the conidia produced by *P. brasiliensis* mycelial form. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.24, p.337-339, 1986.
- RICHARDSON, M.D., BROWNLIE, C.E.D., SHANKLAND, E.S. Enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* by GM-CSF – activated human neutrophils. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30, p.433-441, 1992.
- ROILIDES E., DIMITRIADOU-GEORGIADOU, A., SEIN, T., KADILTSOGLU, I., WALSH, T.J. Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. **Infect. Immun.**, v.66, p.5999-6003, 1998.
- ROILIDES, E., UHLIG, K., VENZON, D., PIZZO, P.A., WALSH, T.J. Enhancement of oxidative response and damage caused by human

- neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte colony-stimulating factor and gamma interferon. **Infect. Immun.**, v.61, n.4, p.1185-1193, 1993.
- ROMAGNANI, S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. **Immunol. Today**, v.12, n.8, p.256-257, 1991.
- ROMANI, L., MENCACCI, A., CENCI, E., SPACCAPELO, R., DEL SERO, G., NICOLETTI, I., TRINCHIERI, G., BISTONI, F., PUCCETTI, P. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. **J. Immunol.**, Bethesda, v.158, p.5349-5356, 1997a.
- ROMANI, L., MENCACCI, A., CENSI, E., DEL SERO, G., BISTONI, F., PUCCETTI, P. An immunoregulatory role neutrophils in CD4<sup>+</sup> T heper subset selection in mice with candidiasis. **J. Immunol.**, Bethesda, v.158, p.2356-2362, 1997b.
- ROMANI, L.; HOWARD, D.H. Mechanisms of resistance to fungal infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v.7, n.4, p.517-523, 1995.
- ROSEN, G.M., POU, S., RAMOS, C.L., COHEN, M.S., BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. **FASEB J.**, Bethesda, v.9, p.200-209, 1995.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v.20, p.315-328, 1947.
- SALAZAR, M.E., RESTREPO, A., STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v.56, p.711-713, 1988.

- SANO, A., DEFAVERI, J., TANAKA, R., YOKOYAMA, K., KURITA, N., FRANCO, M., COELHO, K.I., BAGAGLI, E., MONTENEGRO, M.R., MIYAJI, M., NISHIMURA, K. Pathogenicities and gp43kDa gene of three *Paracoccidioides brasiliensis* isolates originated from a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Mycopathologia**, v.144, p.61-65, 1998/1999a.
- SANO, A., TANAKA, R., YOKOYAMA, K., FRANCO, M., BAGAGLI, E., MONTENEGRO, M.R., MIKAMI, Y., MIYAJI, M., NISHIMURA, K. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Mycopathologia**, v.143, p.169, 1998/1999b.
- SAVILL, J.S., WYLLIE, A.H., HENSON, J.E., WALPORT, M.J., HENSON, P.M., HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. **J. Clin. Invest.**, v.83, n.3, p.865-875, 1989a.
- SAVILL, J.S., HENSON, P.M., HASLETT, C. Phagocytosis of aged neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. **J. Clin. Invest.**, v.84, n.5, p.1518-1527, 1989b.
- SCHAFFNER, A. *In vitro* susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. **J. Clin. Invest.**, v.78, p.511-524, 1986.
- SCHMITT, E., BEUSCHER, H.U., HUELS, C., MONTEYNE, P., VAN BRANDWIJK, R., VAN SNICK, J., RUEDE, E. IL-1 serves as a secondary signal for IL-9 expression. **J. Immunol.**, Bethesda, v.147, n.11, p.3848-3854, 1991.

SIHMA & CIB In: COLOQUIO INTERNACIONAL SOBRE LA PARACOCIDIOIDOMICOSIS. **Programa y resúmenes**. Medellín: Corporación Investigaciones Biológicas, 1986.

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. **Med. Mycol.**, v.36, p.37-42, 1998.

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.**, v.30, p.261-264, 1992.

SINGER-VERMES, L.M., CALDEIRA, C.D., BURGER, E., CALICH, V.L.G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v.94, p.75-79, 1993.

SINGER-VERMES, L.M., BURGER, E., CALICH, V.L.G., MODESTO-XAVIER, L.H., SAKAMOTO, T.N., SUGIZAKI, M.F., MEIRA, D.A., MENDES, R.P. Pathogenicity and immunogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in the human disease and in an experimental murine model. **Clin. Exp. Immunol.**, v.97, p.113-119, 1994.

SNAPPER, C.M., PAUL, W.E. Interferon- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, Washington, v.236, p.944-946, 1987.

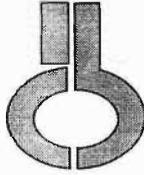
SNAPPER, C.M., MARCU, K.B., ZELAZOWSKI, P. The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility". **Immunity**, v.6, p.217-223, 1997.

- SQUIER, M.K.T., SEHERT, A.J., COHEN, J.J. Apoptosis in leukocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v.57, p.2-10, 1995.
- SOARES, E.G., IABUKI, K. Blastomicose sul-americana acompanhada desde a lesão de inoculação até o óbito. Apresentação de um caso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, 10, Curitiba, Paraná, 1974. **Resumos**.
- SOUTO, J.T., FIGUEIREDO, A.F., PFEFFER, K., ROSSI, M.A., SILVA, J.S. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, v.156, n.5, p.1811-1820, 2000.
- SPENCER, H.D., COZAD, C.G. Role of delayed hypersensitivity in blastomycosis of mice. **Infect. Immun.**, v.7, p.329-334, 1973.
- STEINBECK, M.J., ROTH, J.A. Neutrophil activation by recombinant cytokines. **Rev. Infect. Dis.**, v.2, p.549-568, 1989.
- SULLIVAN, G.W., CARPER, H.T., MANDELL, G.L. The effect of three human recombinant hematopoietic growth factors (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-3) on phagocyte oxidative activity. **Blood**, v.81, p.1863-1970, 1993.
- TEPPER, R.I., COFFMAN, R.L., LEDER, P. An eosinophil-dependent mechanism for the anti-tumor effect of interleukin-4. **Science**, Washington, v.257, n.5069, p.548-551, 1992.
- UDAGAWA, N., HORWOOD, N.-J., ELLIOTT, J., MACKAY, A., OWENS, J., OKAMURA, H., KURIMOTO, M., CHAMBERS, T.J., MARTIN, T.J.,

- GILLESPIE, M.T. Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. **J. Exp. Med.**, v.185, p.1005-1012, 1997.
- VAZ, C. A. C., FAZIOLI, R.A., BURGER, E. Specific immune response in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 10, Barcelona, 1988. **Proceedings**. Barcelona: ISHAM, 1988.
- VERRASTRO, T. **Hematologia e hemoterapia**. Rio de Janeiro, 1996. p. 83-175.
- VERDRENGH, M., TARKOWSKI, A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *S.aureus*. **Infect. Immun.**, v.65, p.2517-2521, 1997.
- VERDRENGH, M., TARKOWSKI, A., MÖLNE, L. Role of neutrophil leukocytes in cutaneous infection caused by *Staphylococcus aureus*. **Infect. Immun.**, v.68, p.6162-6167, 2000.
- WALKER, R.I., WILLEMZE, R. Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis. **Rev. Infect. Dis.**, v.2, p.282-292, 1980.
- WANKE, B., LONDERO, A.T. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.F., LACAZ, C.S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC, 1994. p.109-117.
- WILLIAMS, W.J., BEUTLER, E., ERSLER, A.J., LICHTMAN, M.J. **Hematology**. 4.ed. New York: McGraw-Hill, 1990.

- WILLIAMS, G.T., SMITH, C.A., SPOONER, E., DEXTER, T.M., TAYLOR, D.R.  
Hematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by  
suppressing apoptosis. **Nature**, London, v.343, p.76-79, 1990.
- WINTERBOURN, C.C., VAN DEN BERG, J.J.M., ROLTMAN, E., KUIPERS,  
F.A. Chlorination formation from insaturated fatty acids reacted with  
hypochlorous acid. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.296, p.547-555, 1992.
- WRIGHT, D.G. The neutrophil as secretory organ of host defense, p.212. In:  
GALLIN, J.I., FAUCI, A.S., eds. **Advances in host defense mechanisms**.  
New York: Raven Press, 1982.
- WU-HSIEH, B.A., HOWARD, D.H. Inhibition of the intracellular growth of  
*Histoplasma capsulatum* by recombinant murine gamma interferon. **Infect.**  
**Immun.**, v.55, n.4, p.1014-1016, 1987.
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 2.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1984. 718p.
- ZHOU, P., SIEVE, M.C., BENNETT, J., KWON-CHUNG, K.J., TEWARI, R.P.,  
GAZZINELLI, R.T., SHERR, A., SEDER, R.A. IL-12 prevents mortality in  
mice infected with *Histoplasma capsulatum* through induction of IFN- $\gamma$ . **J.**  
**Immunol.**, Bethesda, v.155, p.785-795, 1995.

**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](mailto:icbsedir@icb.usp.br)

---

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 032/2000, sobre o projeto intitulado “Efeito da depleção de células PMN na infecção murina pulmonar com leveduras de *P.brasiliensis* – Modelo intratraqueal” sob a responsabilidade Adriana Pina está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de 06/04/2000

(We certify that the protocol nº 032/2000 about “Effect of PMN cells depletion on the murine pulmonary infection with *P.brasiliensis* yeast cells – Intratracheal model” with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 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