

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

Atividade fungicida e secretora de macrófagos alveolares de  
camundongos susceptíveis e resistentes infectados pelo  
*P. brasiliensis*.

Adriana Pina

Tese para obtenção do grau de

**DOUTOR**

Orientadora:

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich

São Paulo  
2005

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

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

Atividade fungicida e secretora de macrófagos alveolares de  
camundongos susceptíveis e resistentes infectados pelo  
*P. brasiliensis*.

Adriana Pina

Tese para obtenção do grau de  
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich

São Paulo  
2005

DEDALUS - Acervo - CQ



30100011455

**Ficha Catalográfica**

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

Pina, Adriana

P645a Atividade fungicida e secretora de macrófagos alveolares de camundongos susceptíveis e resistentes infectados pelo *P. brasiliensis* / Adriana Pina. -- São Paulo, 2005. 118p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Calich, Vera Lúcia Garcia

1. Imunologia 2. Fungo : Doenças 3. Macrófago : Imunologia : Medicina 4. Hematologia I. T. II. Calich, Vera Lúcia Garcia, orientador.

615.37 CDD

Adriana Pina

Atividade fungicida e secretora de macrófagos alveolares de  
camundongos susceptíveis e resistentes infectados pelo  
*P. brasiliensis*.

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutora

---

Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich  
Orientadora/Presidente

PROF. DR. OSVALDO AUGUSTO BRAZIL E. SANI

Prof. Dr. (a)  
1º. examinador

PROFA. DRA. LÍGIA FERREIRA GOMES

Prof. Dr. (a)  
2º. examinador

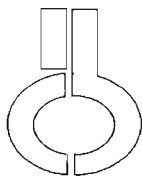
PROF. DR. MARCELO DE FRANCO

Prof. Dr. (a)  
3º. examinador

PROF. DR. CARLOS P. TABORDA

Prof. Dr. (a)  
4º. examinador

São Paulo, 01 de 12 de 2005.



**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) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail:

---

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **77** nas fls. **7** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Vera Lucia Garcia Calich, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Atividade fungicida e secretora de macrófagos elveolares de camundongos infectados pelo Paracoccidioides brasiliensis**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Adriana Pina** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.11.2004**.

São Paulo, 24 de novembro de 2004.

---

Profª. Dra. Marília C. Leite Seelaender  
Coordenadora da CEEA

---

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira  
Secretário da CEEA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia 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 do Estado de São Paulo (**FAPESP**).

## Agradecimentos

- A **Deus** por me conceder Serenidade necessária para aceitar as coisas que não se pode modificar, Coragem para modificar aquelas que posso e Sabedoria para distinguir umas das outras.
- À minha orientadora, **Dra. Vera Lúcia Garcia Calich** que SEMPRE acreditou no meu trabalho e na minha pessoa. Uma excelente pesquisadora, competente e inteligente. Uma pessoa linda por fora e por dentro. Um exemplo indiscutível. Capaz de ensinar muito e revelar suas emoções com apenas um olhar.
- À **Dra. Lúcia Helena Meloni-Bruneri (*in memorian*)** que mesmo não estando mais entre nós permanece viva em meu coração. Tenho certeza que ela me acompanhou em todo esse tempo e me deu forças para superar todas as dificuldades que enfrentei neste doutorado.
- Aos meus pais (**Antonio Fonseca Pina & Flávia Suzi Pina**), pela formação e construção da minha pessoa, moldada em seus exemplos e em seu apoio. Ensinando, educando e me fazendo crescer.
- Ao **Luiz Felipe Andrade Chocair** que sempre dividiu comigo os momentos felizes e tristes durante todo esse tempo. Percebo o grande orgulho e amor que sente por mim. Amo você! (*É NOUM*)
- A minha "irmãzinha" **Simone Bernardino** mostrou ser uma grande amiga durante todo esse tempo. O seu otimismo, carisma e bondade trouxeram alegrias e confortos nos dias em que mais precisei. Nunca vou esquecer das nossas brincadeiras (*AAArrou*), risadas, reflexões e ensinamentos. Foi muito bom conviver com você, miga Simon's!
- A **Dra. Celidéia Copi Vaz**, pela sua alegria, carinho, ensinamentos e exemplo de pesquisa.
- A **Dra. Eva Burger**, pelo seu carinho e por sempre abrir as portas do seu laboratório quando eu mais precisei.

- Ao **Dr. Carlos Pellechi Taborda, Dra. Adelaide José Vaz, Dra. Dulcinéia S.P. Abdalla**, pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação.
- Aos professores do departamento de Imunologia e de Análises Clínicas pelos ensinamentos indispensáveis na realização deste doutorado.
- Aos meus companheiros de laboratório – **Maira Felonato** (grande amiga e muito prestativa); **Celina Arruda** (excelente pesquisadora); **Flávio Vieira Loures** (inteligente e gosta de fazer pesquisa); **Rita de Cássia Valente Ferreira** (grande coração); **Angela Nichikaku, Renata Scavone, Marlene Souza Bernardes e Cláudia Silva Cunha** (sempre dispostas em querer ajudar).
- Aos meus amigos **Milton Virgulino dos Santos e Otacílio Pedro dos Santos**, pelo auxílio quando necessário.
- Aos secretários da FCF e do ICB/ USP – **Jorge Lima, Elaine, Sueli, Valéria Machado e Jotelma Ribeiro**, pela atenção e carinho em todas as horas.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pelo apoio financeiro.
- E a todos do Departamento de Imunologia e Análises Clínicas, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

PINA, A. **Atividade fungicida e secretora de macrófagos alveolares de camundongos susceptíveis e resistentes infectados pelo *P. brasiliensis***. São Paulo, 2005. 118p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Análises Clínicas - Universidade de São Paulo/USP.

Estudos em nosso laboratório caracterizaram camundongos B10.A e A/J, respectivamente, como susceptíveis e resistentes à infecção pulmonar pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. A imunidade inata desempenha papel fundamental no controle inicial dos patógenos e na regulação da resposta imune adquirida. Como os macrófagos alveolares são as primeiras células do hospedeiro a interagir com o fungo, propusemo-nos a estudar a capacidade fungicida e secretora dos macrófagos alveolares de camundongos susceptíveis e resistentes ao *P. brasiliensis* para melhor compreender a PCM pulmonar. Camundongos B10.A e A/J normais (n: 10-15) foram submetidos a lavagem bronco-alveolar (LBA) e a suspensão celular obtida ( $2 \times 10^5$  células/poço) foi pré-ativada durante a noite com IFN- $\gamma$ , IL-12 ou a combinação destas duas citocinas (50.000, 10.000 e 2.000 pg/mL) e desafiados *in vitro* com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* (relação fungo-macrófagos de 1:50). Após 72h de incubação a atividade fungicida dos macrófagos foi avaliada através da contagem do número de fungos viáveis pelo método de unidades formadoras de colônias (UFC). A produção de nitrito e de citocinas foi avaliada no sobrenadante de cultivo através da reação de Griess e ELISA, respectivamente. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EP e analisados pelo teste T-Student. Nossos resultados mostraram que os macrófagos de camundongos B10.A pré-ativados com IFN- $\gamma$ , IL-12 ou ambas as citocinas nas diferentes concentrações ensaiadas apresentaram elevada capacidade fungicida (51-97%) acompanhada de produção aumentada de NO, IL-12 e MCP-1 e baixa síntese de IL-10 e GM-CSF. Por outro lado, somente o tratamento com a mais alta concentração de IFN- $\gamma$  foi capaz de induzir atividade fungicida em macrófagos alveolares de animais A/J. A síntese de NO ocorreu sempre em baixos níveis e nos sobrenadantes dos co-cultivos observamos altos níveis de IL-10 e GM-CSF associados a baixas concentrações de IL-12 e MCP-1. A inibição da síntese de NO por aminoguanidina demonstrou que a atividade fungicida dos macrófagos de animais B10.A, mas não de A/J, era mediada por este composto. O tratamento dos macrófagos com anticorpo monoclonal anti-IL-10 não alterou a capacidade

fungicida dos macrófagos de ambas as linhagens, entretanto induziu franca produção de NO que, para animais A/J, não se traduziu em atividade microbicida aparente. Por outro lado, a neutralização de TGF- $\beta$  induziu alta capacidade fungicida das células de animais A/J, níveis aumentados de NO e TNF- $\alpha$  aliados a níveis reduzidos de IL-10. O mesmo tratamento não alterou a já elevada capacidade fungicida dos macrófagos alveolares de animais B10.A mas aumentou a produção de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$ . Em conclusão, os macrófagos alveolares de camundongos B10.A são facilmente ativáveis por IFN- $\gamma$  e IL-12, apresentam elevada capacidade fungicida, NO-dependente, sobre leveduras do *P. brasiliensis* associada com a síntese de níveis elevados de NO e IL-12. Por outro lado, os macrófagos de camundongos A/J são pobremente ativados por IFN- $\gamma$  e IL-12, produzem baixos níveis de NO, a sua capacidade fungicida, que parece ser NO-independente, pode ser aumentada pela neutralização do TGF- $\beta$  endógeno, mas não pelo tratamento com anti-IL-10.

**Palavras chave:** paracoccidiodomicose, fungo, macrófagos, camundongos susceptíveis e resistentes, imunidade inata.

## ABSTRACT

PINA, A. **Fungicidal and secretory ability of alveolar macrophages from susceptible and resistant mice infected with *P. brasiliensis***. São Paulo, 2005. 118p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Análises Clínicas - Universidade de São Paulo/USP.

Previous studies in our laboratory characterized B10.A and A/J mice as susceptible and resistant strains to pulmonary *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Innate immunity plays a fundamental role on the control of the initial growth of pathogens as well as in the acquired immunity that subsequently develops. As alveolar macrophages are the first host cells to interact with *P. brasiliensis* we decided to study the fungicidal and secretory ability of alveolar macrophages from resistant and susceptible mice to *P. brasiliensis* to better understand the pulmonary model of paracoccidioidomycosis. Normal B10.A and A/J mice (n=10-15) were submitted to bronchoalveolar lavage (BAL) and cell suspensions ( $2 \times 10^5$  cells/well) were pre-activated overnight with IFN- $\gamma$ , IL-12 or the combination of these two cytokines (50,000, 10,000 and 2,000 pg/mL). After that, macrophages were *in vitro* challenged with *P. brasiliensis* yeasts (1:50 fungus:macrophage ratio) and 72h later fungicidal activity was determined by colony forming units counts (CFU). Nitrite and cytokines production were determined in culture supernatants by Griess reaction and ELISA, respectively. Data were expressed as means  $\pm$  SE and analyzed by Student's t test. Our results showed that B10.A macrophages pre-activated with the different assayed concentrations of IFN- $\gamma$ , IL-12 or both cytokines presented elevated fungicidal ability (51-97%) concomitant with the presence of high levels of NO, IL-12 and MCP-1 and low amounts of IL-10 and GM-CSF. NO synthesis occurred in low levels but high concentrations of IL-10 and GM-CSF associated to low amounts of IL-12 and MCP-1 were detected in the co-cultures supernatants. NO synthesis inhibition by aminoguanidine clearly showed that the fungicidal ability of B10.A but not of A/J macrophages was NO-dependent. Treatment with anti-IL-10 monoclonal antibodies did not alter the fungicidal ability of macrophages from both mouse strains but enhanced NO synthesis which, however, did not alter the absent microbicidal ability of A/J macrophages. On the contrary, anti-TGF- $\beta$  treatment induced an increased fungicidal ability of A/J cells associated with enhanced levels of NO and TNF- $\alpha$  besides diminished amounts of IL-10. The same treatment did not alter the high fungicidal ability of B10.A alveolar macrophages but

increased NO, IL-12 and TNF- $\alpha$  production. In conclusion, alveolar macrophages from susceptible mice are easily activated by IFN- $\gamma$  and IL-12, present a high and NO-dependent ability to kill *P. brasiliensis* yeasts and secrete elevated levels of NO and IL-12. In contrast, alveolar macrophages from resistant mice are poorly activated by IFN- $\gamma$  and IL-12, secrete low amounts of NO and high of IL-10. Their fungicidal ability which appears to be NO-independent can be restored by neutralization of endogenous TGF- $\beta$  but not by anti-IL-10 treatment.

Keywords: paracoccidioidomycosis, fungi, macrophages, susceptible and resistant mice, innate immunity.

## ABREVIATURAS

|               |  |
|---------------|--|
| AcM           | Anticorpo monoclonal                               |
| AG            | Aminoguanidina                                     |
| ANOVA         | Análise de variância                               |
| BHI           | “Brain Heart Infusion”                             |
| D.O.          | Densidade óptica                                   |
| DMEM          | “Dubelco’s Modified Eagle’s Medium”                |
| D-PBS         | “Dubelco’s Phosphate Buffered Saline”              |
| E.P.          | Erro Padrão  |
| ELISA         | “Enzyme-linked immunosorbent assay”                |
| G-CSF         | “Granulocyte Colony-Stimulating Factor”            |
| GM-CSF        | “Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor” |
| gp-43         | Glicoproteína de 43 kDa                            |
| gp-70         | Glicoproteína de 70 kDa                            |
| HTT           | Hipersensibilidade do tipo tardio                  |
| i.p.          | Intraperitoneal                                    |
| i.t.          | Intratraqueal                                      |
| IFN- $\gamma$ | Interferon-gama                                    |
| IL-10         | Interleucina -10                                   |
| IL-12         | Interleucina -12                                   |
| IL-13         | Interleucina -13                                   |
| IL-18         | Interleucina -18                                   |
| IL-2          | Interleucina - 2                                   |
| IL-3          | Interleucina - 3                                   |
| IL-4          | Interleucina - 4                                   |
| IL-5          | Interleucina - 5                                   |
| IL-6          | Interleucina - 6                                   |
| iNOS          | Óxido-nítrico-sintase induzida                     |
| KO            | “Knock-out”  |
| L             | Levedura (fase leveduriforme do fungo)             |
| LBA           | Lavado bronco-alveolar                             |
| L-NAME        | N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina methyl ester      |
| L-NMMA        | N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina               |
| LPS           | Lipopolissacáride de bactérias gram-negativas      |
| M             | Molaridade   |
| MCP-1         | “Monocyte Chemotactic Protein”                     |
| M $\phi$      | Macrófago (s)                                      |
| MIP-2         | “Macrophage Inflammatory Protein-2”                |
| MPO           | Mieloperoxidase                                    |
| mRNA          | RNA mensageiro                                     |
| N             | Normalidade  |
| NK            | “Natural Killer”                                   |

|                        |   |
|------------------------|---|
| NO                     | Óxido nítrico                                     |
| OPD                    | Ortofenilenodiamina                               |
| p-55                   | Proteína de 55 kDa                                |
| Pb 18                  | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , isolado 18 |
| <i>P. brasiliensis</i> | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>              |
| Pb                     | <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>              |
| 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                       |
| PSA                    | Proteína Surfactante-A                            |
| r IL-12                | IL-12 recombinante                                |
| RNI                    | "Reactive Nitrogen Intermediates"                 |
| ROI                    | "Reactive Oxygen Intermediates"                   |
| s.c.                   | Subcutâneo  |
| SFB                    | Soro Fetal Bovino                                 |
| SPF                    | "Specific Patogens Free"                          |
| 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                                |
| TMB                    | Tetrametilbenzina                                 |
| TNF-α                  | "Tumor Necrosis Factor - α"                       |
| UFC                    | Unidade Formadoras de Colônias                    |

## Sumário

|  |    |
|--|----|
| Introdução.....  | 01 |
| Objetivo / Justificativa.....  | 13 |
| Material e Métodos.....  | 14 |
| Resultados.....  | 21 |
| 1- Obtenção do LBA.....  | 21 |
| 2- Cultivo dos macrófagos alveolares.....  | 21 |
| 3- Infecção dos macrófagos alveolares aderidos .....   | 22 |
| 4- Tempo de incubação dos macrófagos com o fungo .....   | 22 |
| 5- Interação fungo e macrófagos alveolares dos animais B10.A e A/J .....   | 22 |
| 6- Efeito do tratamento com IFN- $\gamma$ e IL-12 e a combinação das duas citocinas na atividade fungicida <i>in vitro</i> dos macrófagos alveolares de camundongos B10.A e A/J. |    |
| 6.1) Macrófagos alveolares de camundongos B10.A .....  | 25 |
| 6.1.1) Atividade fungicida e produção de NO .....  | 25 |
| 6.1.2) Dosagem de citocinas .....  | 28 |
| 6.2) Macrófagos alveolares de camundongos A/J .....  | 31 |
| 6.2.1) Atividade fungicida e produção de NO .....  | 31 |
| 6.2.2) Dosagem de citocinas .....  | 33 |
| 7-Efeito da AG na atividade fungicida e secretora de macrófagos infectados com o <i>P.brasiliensis</i>   |    |
| 7.1) Macrófagos de camundongos B10.A.....  | 36 |
| 7.1.1) Efeito da aminoguanidina na capacidade fungicida e na síntese de NO .....   | 36 |
| 7.1.2) Dosagem de Citocinas.....   | 37 |
| 7.2) Macrófagos de camundongos A/J .....   | 40 |
| 7.2.1) Efeito da aminoguanidina na capacidade fungicida e na síntese de NO.....  | 40 |

|  |    |
|--|----|
| 7.2.2) Dosagem de Citocinas .....  | 42 |
| 8-Efeito do tratamento <i>in vitro</i> do AcM anti-IL-10 (10 e 20 µg/mL) na atividade fungicida dos macrófagos alveolares de camundongos B10.A e A/J |    |
| 8.1) Macrófagos de camundongos B10.A .....   | 44 |
| 8.1.1) Atividade fungicida e produção de NO .....  | 44 |
| 8.1.2) Citocinas .....   | 47 |
| 8.2) Macrófagos de camundongos A/J .....   | 49 |
| 8.2.1) Capacidade fungicida e secreção de NO.....  | 49 |
| 8.2.2) Citocinas .....   | 51 |
| 9-Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com o AcM anti-TGF-β na atividade fungicida dos macrófagos alveolares de camundongos B10.A e A/J              |    |
| 9.1) Macrófagos de camundongos B10.A .....   | 53 |
| 9.1.1) Atividade fungicida e secreção de NO .....  | 53 |
| 9.1.2) Produção de citocinas de animais B10.A .....  | 55 |
| 9.2) Macrófagos de camundongos A/J .....   | 57 |
| 9.2.1) Atividade fungicida e secreção de NO.....   | 57 |
| 9.2.2) Produção de citocinas .....   | 59 |
| Resumo dos Resultados .....  | 61 |
| Discussão.....   | 69 |
| Conclusões.....  | 90 |
| Referências Bibliográficas.....  | 92 |
| Anexo  |    |



## ***Lista de Figuras***

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Interação entre <i>P. brasiliensis</i> e macrófagos alveolares de animais B10.A e A/J .....  | 24 |
| <b>Figura 2:</b> Atividade fungicida e produção de NO por macrófagos alveolares de animais B10.A tratados com IFN- $\gamma$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ + IL-12 .....                 | 27 |
| <b>Figura 3:</b> Produção de citocinas pelos macrófagos alveolares de animais B10.A tratados com IFN- $\gamma$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ + IL-12.....                               | 30 |
| <b>Figura 4:</b> Atividade fungicida e produção de NO por macrófagos alveolares de animais A/J tratados com IFN- $\gamma$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ + IL-12 .....                   | 32 |
| <b>Figura 5:</b> Produção de citocinas pelos macrófagos alveolares de animais A/J tratados com IFN- $\gamma$ , IL-12 e IFN- $\gamma$ + IL-12.....                                 | 35 |
| <b>Figura 6:</b> Efeito da aminoguanidina na capacidade fungicida e na síntese de NO pelos macrófagos alveolares de camundongos B10.A pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$ ..... | 38 |
| <b>Figura 7:</b> Produção de citocinas pelos macrófagos alveolares de animais B10.A tratados com aminoguanidina .....   | 39 |
| <b>Figura 8:</b> Efeito da aminoguanidina na capacidade fungicida e na síntese de NO pelos macrófagos alveolares de A/J pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$ .....               | 41 |
| <b>Figura 9:</b> Produção de citocinas pelos macrófagos alveolares de animais A/J tratados com aminoguanidina .....   | 43 |
| <b>Figura 10:</b> Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com o AcM anti-IL-10 na atividade fungicida e na produção de NO dos macrófagos alveolares de camundongos B10.A .....       | 46 |
| <b>Figura 11:</b> Produção de citocinas pelos macrófagos alveolares de animais B10.A tratados com AcM anti-IL-10 .....  | 48 |
| <b>Figura 12:</b> Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com o AcM anti-IL-10 na atividade fungicida e na produção de NO dos macrófagos alveolares de camundongos A/J .....         | 50 |
| <b>Figura 13:</b> Produção de citocinas pelos macrófagos alveolares de animais A/J tratados com AcM anti-IL-10 .....  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 14:</b> Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com o AcM anti-TGF- $\beta$ na atividade fungicida e secreção de NO pelos macrófagos alveolares de camundongos B10.A ..... | 54 |
| <b>Figura 15:</b> Produção de citocinas pelos macrófagos alveolares de animais B10.A tratados com o AcM anti-TGF- $\beta$ .....   | 56 |
| <b>Figura 16:</b> Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com o AcM anti-TGF- $\beta$ na atividade fungicida e secreção de NO pelos macrófagos alveolares de camundongos A/J .....   | 58 |
| <b>Figura 17:</b> Produção de citocinas pelos macrófagos alveolares de animais A/J tratados com o AcM anti-TGF- $\beta$ .....   | 60 |

# **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença crônica granulomatosa, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). 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).

O fungo 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 microscópio pode apresentar formas arredondadas ou ovaladas, ou multibrotantes, com aspecto morfológico característico de roda de leme, com diâmetro variável de 1-30 µm (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; Negróni et al., 1966 e Silva-Vergara et al., 1998). Acredita-se que micélios e conídios cresçam no solo, na água e nas plantas a temperatura ambiente e seriam as formas infectantes naturais do Pb (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 Pb 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).

A PCM é considerada moléstia não contagiosa sem notificação compulsória, sendo assim difícil estimar o número exato de casos, entretanto, é suposto que em áreas endêmicas grande número de indivíduos possam ser infectados pelo fungo pela inalação de conídios infectantes que, atingindo os pulmões podem desenvolver o foco primário ou disseminar por via linfohematogênica em diferentes órgãos ou sistemas (Restrepo, 1988; Restrepo et al., 1985).

A incidência da PCM é cerca de 13 a 87 vezes maior em homens do que em mulheres, apesar do contato do fungo ser praticamente o mesmo para ambos os sexos (Franco et al., 1987). A suspeita de que a proteção nas mulheres fosse devida à influência hormonal, foi apoiada pela observação de que a transformação do micélio (infectante) para a forma leveduriforme (doença) era inibida pelo hormônio 17- $\beta$  estradiol. O mecanismo pelo qual o 17- $\beta$  estradiol atua no Pb seria o bloqueio da síntese de proteínas que se expressam durante a transformação da fase de micélio para levedura. Deste modo, o estrógeno pode interferir na patogenicidade do fungo Pb (Loose et al., 1983). Além disso, estudos recentes demonstram que o 17- $\beta$  estradiol pode induzir *in vitro* a produção de óxido nítrico (NO) e aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos peritoneais (Hong et al., 2004).

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).

A maioria dos indivíduos infectados usualmente desenvolve infecção pulmonar 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 ou juvenil (FJ) 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 com idade inferior aos 30 anos (Franco et al., 1989; Brummer et al., 1993) e os pacientes apresentam predomínio de citocinas do padrão Th2, altos níveis de anticorpos específicos e de IgE, eosinofilia e resposta imune celular suprimida (Mota et al., 1985; Benard et al., 1997). Nesta mesma linha, trabalho desenvolvido por Mamoni et al (2002) também mostrou que pacientes com FJ desenvolvem níveis aumentados de IgG4, IgE, IgA e TGF- $\beta$ .

Por outro lado, a forma crônica ou adulta (FA) 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). Pacientes com a FA menos grave apresentam níveis elevados de citocinas do padrão Th1 (IFN- $\gamma$ ) além de anticorpos específicos IgG2 e IgA (imunoglobulina de mucosa), sugerindo certo controle da infecção e doença menos grave (Baida et al., 1999).

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.

Usando um modelo de infecção intraperitoneal (i.p.) de PCM, Calich et al. (1985) demonstraram que havia diferenças significantes na susceptibilidade ao fungo entre várias linhagens isogênicas de camundongos: A/Sn foi caracterizada como a mais resistente enquanto que animais B10.A mostraram-se altamente susceptíveis à infecção pelo Pb. Cano et al. (1995) desenvolveram um modelo de PCM pulmonar empregando as mesmas linhagens de camundongos, mas utilizando a via intratraqueal (i.t.) de infecção. Foi verificado que camundongos A/Sn desenvolvem PCM crônica, benigna e restrita aos pulmões enquanto que animais B10.A desenvolvem doença disseminada e progressiva.

Os resultados obtidos sobre a PCM até o momento sugerem que a resistência à doença está associada à atividade de linfócitos T, macrófagos (M $\phi$ ) e células B mediadas por interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (Cano et al., 1995).

Trabalho desenvolvido por Souto et al. (2000) demonstrou que a PCM experimental induzida por via intravenosa era mais grave em camundongos C57BL/6 cujos genes para o IFN- $\gamma$  ou para o gene p55 do receptor do TNF- $\alpha$  haviam sido nocauteados por recombinação homóloga. Camundongos C57BL/6 selvagens apresentaram doença mais controlada e granulomas organizados, enquanto que a infecção nos animais deficientes para IFN- $\gamma$  e para o receptor de TNF- $\alpha$  foi mais grave (especialmente nos animais IFN- $\gamma$  KO), induziu mortalidade precoce e apresentou-se sob forma de lesões disseminadas e desorganizadas.

O IFN- $\gamma$  pode ativar diversas células da imunidade natural e adquirida; por exemplo, em infecção fúngica, Salkowski & Balish (1991) demonstraram que o IFN- $\gamma$  aumenta a atividade de células NK (“Natural Killer”) durante a infecção criptocócica e que o tratamento com o anticorpo monoclonal (AcM) anti-IFN- $\gamma$  prejudicava a eliminação do fungo dos pulmões, baço e fígado.

Em nosso modelo experimental Cano et al. (1998) demonstraram que a depleção *in vivo* do IFN- $\gamma$  por AcM agravou a doença, tanto de animais susceptíveis como resistentes ao fungo. Em animais depletados houve aumento da carga fúngica pulmonar, disseminação precoce para o fígado e baço, prejuízo da imunidade celular resultando em respostas de hipersensibilidade tardia diminuídas ou ausentes, e a produção de níveis mais elevados de anticorpos dos isótipos IgG1 e IgG2b.

O IFN- $\gamma$  exerce um papel protetor na PCM através do controle da multiplicação de fungos por fagócitos, 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 Pb em camundongos, e sua ação parece ser exercida através da atividade anti-fúngica dos M $\phi$  que produzem NO, um potente mediador da morte do fungo. O IFN- $\gamma$  pode também ativar e aumentar a atividade fungicida de leucócitos PMN, que, entretanto, exercem sua atividade através de radicais reativos do oxigênio (Brummer et al., 1994).

O sistema mononuclear fagocítico constitui um importante mecanismo efetor na imunidade natural e adquirida contra vários patógenos. No nosso modelo experimental de infecção i.p., Kashino et al. (1995) demonstraram que os M $\phi$  desempenham um papel fundamental na defesa de hospedeiros susceptíveis e resistentes ao Pb. O bloqueio *in vivo* dos M $\phi$  por tratamento com carvão coloidal aumentou a mortalidade e a gravidade das lesões tanto de animais susceptíveis como resistentes ao fungo.

Estudando mais a PCM, tanto no modelo i.p. como na PCM pulmonar, verificou-se que a infecção pelo Pb leva a diferentes graus de ativação macrofágica que depende do padrão genético da linhagem de camundongo empregada. Assim, na infecção i.p., durante o primeiro mês da doença induzida pelo isolado virulento Pb18, M $\phi$  de animais resistentes apresentam atividade



aumentada de espraiamento no vidro e de produção de peróxido de hidrogênio (Calich, 1994). Por outro lado, Mø de animais susceptíveis não apresentam estas atividades. Os Mø de ambas as linhagens, entretanto, apresentam expressão aumentada de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (revisto por Calich et al., 1994).

No modelo de infecção pulmonar, Cano et al. (1995) demonstraram que Mø alveolares de camundongos resistentes produzem altos níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a partir do segundo mês de infecção, enquanto que esta população celular de animais susceptíveis não o faz. Entretanto, em elegante trabalho Brummer (1994) demonstrou que a atividade fungicida sobre o Pb desenvolvida por Mø murinos (BALB/c) ativados não podia ser abolida por tratamento com superóxido dismutase, catalase ou azida sódica, sugerindo que o mecanismo fungicida era independente dos produtos da explosão respiratória, portanto independentes do oxigênio.

Trabalho desenvolvido por Popi et al. (2002) explicou um pouco mais a influência da molécula glicoprotéica gp-43 (principal componente antigênico do fungo) na interação *in vitro* do *P. brasiliensis* com os Mø. Resultados mostraram que o índice de atividade fungicida dos Mø peritoneais de camundongos B10.A e A/Sn contra o fungo esteve reduzida quando foi adicionada a glicoproteína gp-43 em diferentes concentrações (25, 50, 75, 100 e 150  $\mu\text{g/mL}$ ). Assim, esse antígeno que é o mais importante indutor da produção de anticorpos na PCM teria um efeito desativador de Mø.

Matos Grosso et al. (2003) estudaram a influência da molécula glicoproteica gp-70 na interação *in vitro* do Pb com os Mø. A gp-70 está localizada no compartimento intracelular do fungo Pb e se encontra no soro de cerca de 96% dos pacientes com PCM. Os resultados mostram que a gp-70 inibe a capacidade fagocítica de Mø peritoneais *in vitro* e a liberação de NO e  $H_2O_2$ . Para melhor definir a função da gp-70 na PCM experimental foi analisado o efeito da imunização passiva de camundongos durante a infecção com Pb usando um AcM anti-gp-70. Este tratamento levou a diminuição de fungos recuperados no pulmão, sugerindo que a proteína facilita o estabelecimento fúngico e a progressão da lesão na infecção primária.

Algumas vezes, os Mø residentes não são capazes de destruir patógenos e necessitam da ativação por meio de células T helper (Th), através de citocinas que ativam a sua função de células efetoras.

Muitos trabalhos já relataram que Mø peritoneais e alveolares quando ativados por IFN- $\gamma$  apresentam atividade microbicida aumentada contra diversos patógenos, entre eles o Pb (Brummer et al., 1988; Cano et al., 1992; Mody et al., 1991; Brummer et al., 1994). Ao contrário do sistema murino, o IFN- $\gamma$  não ativa a capacidade fungicida dos Mø humanos contra o *Histoplasma capsulatum* (Fleischmann et al., 1990; Newman & Gootee, 1992). As citocinas que ativam Mø humanos para inibir o crescimento intracelular do *H. capsulatum* são: GM-CSF, IL-3 e M-CSF (Newman & Gootee, 1992).

Os Mø murinos quando ativados por LPS, IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  produzem dois tipos de produtos reativos caracterizados por suas atividades citotóxicas: intermediários reativos do oxigênio (ROI) e intermediários reativos do nitrogênio (RNI) (Drapier et al., 1994; Nathan, 1987).

O NO, um dos mais importantes RNI, é gerado pela oxidação de um dos nitrogênios da molécula do aminoácido L-arginina (Hibbs et al., 1987; 1988). A enzima iNOS é a responsável pela produção de NO e está envolvida tanto em processos inflamatórios como infecciosos (Macmicking et al., 1997). Não há evidências de que a iNOS de Mø possa ser expressa sem a ação prévia de citocinas (como o IFN- $\gamma$ ) e produtos microbianos como o LPS.

Diversos modelos experimentais têm demonstrado que o NO é a molécula responsável pelo efeito citotóxico exercido por Mø, sobre uma grande variedade de microrganismos e parasitas tais como *Schistosoma mansoni* (James & Glaven, 1989), *Leishmania major* (Bogdan et al., 1991; Green et al., 1993; Liew et al., 1990; Mauël et al., 1991), *Trypanosoma cruzi* (Muñoz-Fernandes et al., 1992; Norris et al., 1995), *Plasmodium falciparum* e *P.chabaudi* (Clark et al., 1992; Taylor-Robinson et al., 1993), e diversos fungos como o *Criptococcus neoformans* (Granger et al., 1990), o *H. capsulatum* (Lane et al., 1994; Nakamura et al., 1994) e a *Candida albicans* (Blasi et al., 1995). Entretanto, o NO não parece estar envolvido na atividade fungicida de Mø alveolares murinos e humanos contra outros fungos tais como, *Aspergillus fumigatus* (Michaliszyn et al., 1995; Taramelli et al., 1996) e *Pneumocystis carinii* (Shellito et al., 1996).

Em um modelo de infecção *in vitro* de M $\phi$  peritoneais por conídios de Pb, Gonzalez et al. (2000) recentemente demonstraram que o NO induzido pela ativação macrofágica por IFN- $\gamma$  participa da inibição da transformação dos esporos em células leveduriformes e da atividade fungicida. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Bocca et al. (1998) que demonstraram que o tratamento *in vivo* com um inibidor de NO agrava a doença de camundongos (C57BL/6) infectados pelo Pb. 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).

No modelo de infecção i.p., o nosso grupo demonstrou comportamentos diferentes de M $\phi$  peritoneais infectados *in vitro* com o Pb. Assim, M $\phi$  de animais resistentes produzem altos níveis de TNF- $\alpha$  porém a secreção de NO é reduzida. Ao contrário, M $\phi$  de camundongos susceptíveis estimulados por leveduras vivas do fungo produzem níveis elevados de NO e baixos ou praticamente ausentes de TNF- $\alpha$ . Como o NO tem dupla função na PCM (induz a atividade fungicida dos M $\phi$ , mas leva à supressão da linfoproliferação), experimentos de depleção *in vivo* de NO foram realizados com camundongos resistentes e susceptíveis ao fungo. A doença mostrou-se mais grave em ambas as linhagens. Além disso, utilizando camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes para o gene de NO-Sintase 2 foi verificado que a ausência de síntese de NO é acompanhada por infecção muito grave com lesões disseminadas e ricas em fungos em ativo brotamento em vários órgãos (Nascimento et al., 2002).

As citocinas são potentes reguladoras da função macrofágica. As chamadas pró-inflamatórias desempenham importante papel na indução da atividade microbicida dos fagócitos, e entre elas estão incluídas o IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$ , o GM-CSF, a IL-12, e a IL-18. As citocinas anti-inflamatórias como o TGF- $\beta$ , a IL-10 e a IL-4 desempenham atividade desativadora de M $\phi$  e a sua produção desbalanceada leva a infecções graves, principalmente aquelas produzidas por patógenos intracelulares (Mosmann et al., 1991; Hoft et al., 2000; Reiner et al., 1995; Scott et al., 1998).

A resposta imune em algumas situações pode apresentar-se polarizada dependendo da ativação preferencial de distintas subpopulações linfocitárias.

Linfócitos do padrão Th1, CD4<sup>+</sup>, secretam IFN- $\gamma$  e IL-2 enquanto que aqueles com fenótipo Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Bottomly, 1988; Cher et al., 1987; Mosmann et al., 1986; Mosmann et al., 1989; Romagnani et al., 1991). O protótipo de resposta imune polarizada contra patógenos é aquela desenvolvida por camundongos resistentes e susceptíveis à infecção pelo protozoário *L. major*. Camundongos resistentes do genótipo C57BL/6 apresentam ativação preferencial de células Th1 e a infecção evolui para a cura, com M $\phi$  ativados que impedem a progressão da doença. Camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c, por outro lado, ativam preferencialmente linfócitos Th2 que, por impedirem a ativação eficiente de M $\phi$ , desenvolvem leishmaniose disseminada e fatal (Bogdan et al., 1991; Reiner et al., 1995; Nabors et al., 1995).

Muitas patologias experimentais e humanas seguem o padrão polarizado de ativação Th1/Th2. A asma e a resposta imune contra helmintos são situações de ativação preferencial de células Th2 enquanto que algumas doenças auto-imunes e a resistência imunológica a bactérias intracelulares e fungos seguem um fenótipo Th1 (Bottomly, 1988; Cher et al., 1987; Mosmann et al., 1986; Mosmann et al., 1989; Romagnani et al., 1991).

A resposta imune protetora contra fungos patogênicos como *C. albicans*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *A. fumigatus* e *Coccidioides immitis* está associada à produção de IFN- $\gamma$  e IL-12, citocinas estas envolvidas tanto na ativação macrofágica para a função fungicida como na função de dirigir uma resposta imune adquirida para um padrão Th1 (Buchanan et al., 1993., Murphy, 1993; Murphy et al., 1998; Romani et al., 1995; Romani et al., 1991; Wu-Hsieh et al., 1987; Zhou et al., 1995). Por outro lado, se ao início da resposta imune natural há a síntese preferencial de IL-4 (e também IL-10 ou TGF- $\beta$ ) a ativação de clones com padrão Th2 se estabelece e, em algumas situações pode causar imunopatologia ou susceptibilidade a infecções (Romani et al., 1995; Romani et al., 1991; Magee et al., 1995).

Estudamos o padrão de produção de citocinas na PCM experimental de camundongos susceptíveis e resistentes. No modelo de infecção i.p., células de linfonodos de camundongos resistentes estimuladas por antígeno solúvel do fungo produzem altos níveis de IFN- $\gamma$  acompanhados da secreção de IL-2. Citocinas Th2 (IL-10 e IL-4) são produzidas em fases mais tardias da doença. Ao

contrário, linfócitos de animais susceptíveis não sintetizam IL-2 e IFN- $\gamma$ , iniciam a síntese de IL-10 em período mais precoce e a IL-5 aparece como marcadora da ativação Th2 (Calich & Kashino, 1998; Kashino et al., 2000). Quando a via de infecção é a i.t., tanto citocinas Th1 como Th2 aparecem nos homogenatos de pulmão (de ambas as linhagens) obtidos na quarta e oitava semanas pós-infecção. Nestes períodos da doença os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 são mais altos nos camundongos susceptíveis, porém as citocinas Th2 parecem predominar, uma vez que somente estes animais desenvolvem infecção progressiva concomitante com ativação ausente de M $\phi$  pulmonares (Cano et al., 1998).

As citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  exercem um efeito protetor contra a doença. Como citado anteriormente, a depleção *in vivo* desta última citocina exacerba a doença tanto de camundongos susceptíveis como resistentes (Cano et al., 1998). Além disso, o tratamento de animais susceptíveis com IL-12 recombinante leva a doença menos grave, com síntese de níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  ao início da infecção e produção de anticorpos específicos assim como de citocinas Th1 e Th2 em quantidades menores em fases mais tardias da doença. A IL-12 exógena apesar de diminuir a carga fúngica nos órgãos de disseminação (fígado e baço), induz aumento evidente do infiltrado inflamatório pulmonar. A depleção de IL-12 endógena por AcM específicos leva a doença mais grave tanto nos animais susceptíveis como nos resistentes. Confirmando o efeito protetor da IL-12 na PCM, verificamos que a doença em camundongos IL-12 KO é extremamente grave e leva à morte precoce dos animais (Calich et al., 1998; Deepe et al., 2000; Murphy et al., 1994).

A IL-4 parece ter um efeito antagônico na PCM pulmonar. A sua neutralização *in vivo* induz aumento da carga fúngica pulmonar em camundongos B10.A, porém doença menos grave nos pulmões de camundongos C57BL/6 (Arruda et al., 2004). Utilizando camundongos geneticamente deficientes para os genes da IL-4 (C57BL/6 IL-4 KO) verificamos que a ausência de IL-4 determina cargas fúngicas menores no pulmão e fígado, porém não altera o número de fungos viáveis no baço (Calich et al., 1998; Deepe et al., 2000; Pina et al., 2004).

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).

Cano et al. (2000) mostraram o papel importante das células T CD8<sup>+</sup> na PCM experimental. Os resultados mostram que a depleção destas células induz a lesões mais graves e disseminada para ambas as linhagens.

O estudo de citocinas pulmonares na depleção de células T CD8<sup>+</sup> de camundongos resistentes mostrou diminuição nos níveis de IL-2 concomitante com aumento nos níveis de IL-4, indicando um comportamento do tipo 1 dessas células. Em camundongos B10.A, entretanto, ocorreu aumento de IL-10 e IFN- $\gamma$ , indicando a presença de células T CD8<sup>+</sup> do tipo 1 e 2 (Chiarella, 2003).

O estudo de citocinas no curso de PCM pulmonar demonstra que na fase de imunidade adquirida as do tipo 1 ou pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2) estão associadas com fenômenos imunológicos imunoprotetores enquanto que IL-4 e IL-10 (principalmente esta última) parecem determinar doenças mais graves e progressivas. Este fato também foi demonstrado em pacientes. A PCM infecção representa o pólo Th1 com síntese de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 e imunidade celular desenvolvida. Os pacientes com a forma juvenil representam o pólo Th2, pois há a síntese de IL-5, IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  em níveis bastante elevados, além de ausência de imunidade celular. Nos indivíduos com a PCM crônica (que representam cerca de 90% do total de doentes) não há um perfil típico. Parece haver tendência Th2 nos casos mais graves (Mamoni et al., 2001).

Uma visão em conjunto do modelo de PCM estabelecido em nosso laboratório indica que os M $\phi$  são importantes células efetoras da imunidade protetora contra o fungo e que o NO é um mediador de grande importância neste processo. Por outro lado, as citocinas exercem um papel imunomodulador da doença e parecem ser determinantes do padrão protetor ou não protetor da resposta imune adquirida. Como os M $\phi$  têm importância fundamental nos fenômenos de imunidade natural e adquirida ao fungo, pretendemos neste projeto melhor estudar o comportamento destas células frente à infecção pelo Pb. Com

este projeto foi possível verificar que há um comportamento típico de Mø alveolares de camundongos B10.A e A/J que estão associados aos fenótipos de susceptibilidade e resistência dessas linhagens.

## **OBJETIVOS**



## OBJETIVO

O propósito do presente trabalho foi o de caracterizar a atividade fungicida de MØ alveolares de animais susceptíveis e resistentes ao Pb e correlacioná-la com a produção *in vitro* de NO e citocinas pró e anti-inflamatórias.

## JUSTIFICATIVAS

Este estudo se justifica, pois no modelo de resistência e susceptibilidade de hospedeiro ao Pb nunca foi previamente caracterizada a atividade fungicida e secretora de MØ alveolares.

Para este estudo utilizamos vários moduladores da ativação macrofágica, (IFN- $\gamma$ , IL-12, combinação das duas citocinas, inibidor do NO - aminoguanidina e AcM anti-IL-10 e anti-TGF- $\beta$ ) no intuito de compreender os mecanismos efetores das primeiras células que entram em contato com o fungo após a infecção i.t. Além disso, estes estudos poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos genéticos da resistência e susceptibilidade ao Pb, uma vez que o comportamento dos mediadores da imunidade natural influencia de maneira importante os fenômenos de imunidade adquirida que se estabelecem subsequentemente.

## **MATERIAL & MÉTODOS**

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais.

Camundongos isogênicos machos das linhagens A/J (resistentes) e B10.A (susceptíveis) ao Pb, (Calich et al., 1985), foram utilizados, ao atingirem 8 a 10 semanas de idade. Esses animais são criados sob condições SPF ("Specific Pathogen Free") no Biotério de camundongos isogênicos do Depto. de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e mantidos no biotério de animais de experimentação do referido Departamento.

### Lavado Bronco-Alveolar.

Os animais normais foram submetidos a um processo de obtenção de lavado bronco-alveolar (LBA), segundo a metodologia descrita por Sugar et al. (1983). Os animais foram sacrificados e dissecados, a cavidade torácica aberta e a traquéia cateterizada. Os pulmões foram então lavados com injeções de 1 ou 1,5 ml de meio "Dulbelco's Modified Eagle's Medium" pH 7,2 (DMEM, Sigma). O número total de células do LBA foi determinado por contagem em câmara de Neubauer após a mistura de 10  $\mu$ l da suspensão celular a 90  $\mu$ l de cristal violeta 0,05% em ácido acético a 30%. Os resultados foram expressos em valores absolutos do número de células/animal.

As células foram ajustadas para  $4 \times 10^5$ /ml e utilizadas nos ensaios de atividade fungicida, produção de citocinas e NO. Um volume de 0,50 ml de células foi dispensado em cada orifício de placas de cultivo de 24 poços (Costar, Cambridge, Mass). As culturas foram incubadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> por duas horas. Células não aderentes foram removidas por aspiração, a monocamada

aderente lavada com meio DMEM. O número de células não aderentes, determinado por contagem em câmara hemocitométrica, foi subtraído do número de células pulmonares incubadas. Este valor permitiu que ajustássemos convenientemente a relação células fungo/Mø utilizado nos diversos ensaios.

#### Tratamento das culturas de Mø.

Monocamadas de Mø alveolares foram incubados durante a noite à 37° C em 5 % CO<sub>2</sub>-95% de ar tendo sido tratados previamente com meio DMEM (pH 7,2) contendo antibióticos, glutamina e 10% de SFB (soro fetal bovino) contendo diferentes concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-12 – Pharmingen (50.000, 10.000, 2.000 pg/mL) e a combinação de diversas concentrações de ambas as citocinas. Os Mø também foram tratados com o AcM 2A5-anti-IL-10 do tipo IgG (10 e 20  $\mu$ g/mL); com o AcM anti-TGF- $\beta$  - Pharmingen (20  $\mu$ g/mL) e um inibidor da NOS2, a aminoguanidina – AG (SIGMA) na concentração de 1mM/mL.

#### Infecção dos Mø alveolares.

Leveduras viáveis do fungo (Pb18 – cepa virulenta) foram suspensas em 1ml de meio DMEM suplementado com 10% SFB contendo 30% (vol/vol) de soro fresco de camundongo como fonte de complemento (foram usados os soros dos mesmos camundongos sacrificados para obtenção do LBA). Para que ocorresse o processo de opsonização pelo sistema complemento, as leveduras foram incubadas com soro fresco a 37°C por 20 min. (Calich et al., 1979). Os Mø foram então infectados com a suspensão de leveduras na relação Pb-Mø de 1:50 por um período de 2 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado e os fungos que não foram aderidos ou fagocitados são removidos por 2 lavagens com meio DMEM (0,2 mL).

As co-culturas de Mø alveolares e fungos foram incubadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> com o meio suplementado por 72 horas. Após o período de incubação os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -70°C para determinação da presença de NO e citocinas.

Para alguns experimentos as co-culturas foram realizadas sobre lamínulas redondas em placas de cultura de 24 poços (0,5 mL/poço). Após 2h de incubação com o fungo o sobrenadante foi removido, incluindo as leveduras não aderidas ou não fagocitadas e as lamínulas foram coradas com Wright-Giemsa (Diff-Quik; American Scientific Products, McGraw Park, IL). Uma média de 200 Mø foi contada para determinar a porcentagem de células com fungos aderidos e/ou ingeridos. Usamos este critério em função do tamanho e aspecto morfológico do fungo que muitas vezes impede a correta discriminação entre fungos aderidos e aqueles internalizados (Calich et al., 1979).

#### Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Depois da incubação das culturas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> por 72 horas, as células em suspensão foram colhidas por aspiração e as células aderentes lavadas com água destilada estéril para que ocorresse a lise dos Mø. O homogenato de cada lavagem foi recolhido até completar um volume de 1 ml para cada orifício. Este material foi centrifugado por 10 minutos, a 750 xg, a 4°C e ressuspenso em um volume adequado de DMEM simples. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento foi ressuspendido em 0,5 mL de PBS e a suspensão obtida foi plaqueada (100 µl/placa) em meio BHI suplementado ("Brain Heart Infusion"), meio especial para recuperação de Pb viáveis (Singer-Vermes et al., 1989). As placas foram incubadas a 37°C e contadas as colônias diariamente até que nenhum aumento em UFC fosse observado. A atividade fungicida foi calculada em porcentagem, através da seguinte fórmula:  $[100 - (UFC_{\text{experimental}} \times 100 / UFC_{\text{controle}})]$ .

### Determinação de NO.

A concentração de NO nos sobrenadantes de cultura foi medida com o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% diidrocloreto de naftiletilenodiamina, 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Um volume de 50 µl do sobrenadante da cultura foi adicionado a um volume igual do reagente de Griess; depois de incubar em temperatura ambiente por 10 minutos, foi determinada a absorbância em equipamento Labsystems Multiskan MCC/340 em comprimento de onda de 490 nm. A concentração de NO foi determinada usando curva padrão padronizada com diferentes concentrações de nitrito de sódio (Ding et al., 1988).

### Determinação de contaminação por LPS

Os AcM e o meio DMEM foram analisados quanto à presença de LPS como contaminante. Os ensaios foram realizados utilizando-se o kit de detecção "*Limulus ameobocyte*" (SIGMA). Os AcM anti-IL-10 e anti-TGF-β e o meio DMEM apresentaram valores menores que 0,015 EU/mL.

### Dosagens das citocinas: ELISA para quantificação de IL-12, TNF-α, IL-10, GM-CSF, MCP-1 e TGF-β.

Foram obtidos sobrenadantes nas diversas condições experimentais e a presença de citocinas analisada por ELISA de captura utilizando-se pares de AcM para cada citocina murina ("Pharmingen ou RD Systems"). As concentrações determinadas em nosso laboratório para cada um dos AcM primário e secundário no ELISA, contra cada citocina, estão mostradas na tabela a seguir:

| <b>Citocinas</b> | <b>AcM de captura</b> | <b>AcM de detecção biotinilado</b> |
|------------------|-----------------------|------------------------------------|
| IL-12            | C15.6 (6 µg/ml)       | C17.8 (2 µg/ml)                    |
| TNF- $\alpha$    | G281-2626 (10 µg/mL)  | MP6-XT3 (2 µg/mL)                  |
| IL-10            | JES5-2A5 (2 µg/ml)    | SXC-1 (1 µg/ml)                    |
| MCP-1            | MO53290 (9 µg/mL)     | MO50803 (1 µg/mL)                  |
| GM-CSF           | MPI-22E9 (6 µg/mL)    | MPI-31G6 (3 µg/mL)                 |
| TGF- $\beta$     | MAB240 (4 µg/mL)      | BAF 240 (100 ng/mL)                |

As condições ótimas para o ELISA, comuns a todas as interleucinas e quimiocinas estão apresentadas a seguir:

- 1) sensibilização das placas (fundo chato, Difco) com 100 µl/poço do AcM primário na concentração determinada, diluído em solução de bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 5,0. As placas foram incubadas por 24 horas a 4°C;
- 2) bloqueio dos sítios livres com 200 µl/poço de gelatina ("Difco") a 1% (m/v) em PBS, pH 7,0, por 2 horas à temperatura ambiente;
- 3) adição da citocina recombinante ("Pharmingen") seguindo uma diluição seriada em meio DMEM com 10% de SFB v/v para obtenção de uma curva-padrão, e adição das amostras, em triplicata, nos demais poços;
- 4) adição de 100 µl/poço do AcM secundário biotinilado na concentração desejada, diluído em meio PBS com 10% de SFB; segue-se incubação por 45 minutos à temperatura ambiente;
- 5) incubação com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase ("Vectastain ABC Elite, Vector Lab".) diluído em tampão PBS, pH=7,5 e 0,1% de Tween 20 v/v (Sigma);

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

- 6) reação com o substrato (100  $\mu$ l/poço) constituído de 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% ("Merck") diluídos em solução composta por 2,8 ml de tampão fosfato de sódio 0,2 M, 2,2 ml de ácido cítrico 0,1M, pH=5,0 e 10 ml de H<sub>2</sub>O, adicionado de 10 mg do revelador ortofenilenodiamina (OPD, Merck). Incubação por 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz;
- 7) interrupção da reação enzimática pela adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 4 N (100  $\mu$ l/poço);
- 8) leitura das densidades ópticas em leitor automático (VERSAMAX – Molecular Devices Corporation) em comprimento de onda de 492 nm.

As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear feita para a curva-padrão obtida com o padrão adequado de citocina recombinante ("Pharmingen").

#### Dosagem de TGF- $\beta$

- 1) Sensibilização das placas com o AcM primário na concentração determinada, diluído em PBS, pH 7,4. As placas foram incubadas por 24 horas a temperatura ambiente.
- 2) Bloqueio com 300  $\mu$ l de PBS contendo 5% de tween 20, 5% de sucrose e 0,05% NaN<sub>3</sub> por 1 hora a temperatura ambiente.
- 3) Adição da citocina recombinante ("Pharmingen") após a diluição seriada em meio diluente (1,4% soro delipidado + 0,05% T/20 em Tris, pH 7,3 – 20 mM Trizma base, 150 mM, NaCl ). Incubação por 2 horas a temperatura ambiente.
- 4) Adição de 100  $\mu$ l/poço do AcM secundário biotinilado na concentração desejada, diluído em meio apropriado; segue-se incubação por 2 horas a temperatura ambiente.
- 5) Incubação por 20 minutos a temperatura ambiente com espreptavidina HRP (R&D Systems, catalog # DY998).



- 6) Reação com o substrato (100 µl/poço) constituído de uma mistura 1:1 do reagente A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o reagente B (tetrametilbenzidina) – “R&D Systems”, catalog # DY999 (20 -30 minutos a temperatura ambiente).
- 7) Interrupção da reação enzimática pela adição de 1M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 µl/poço);
- 8) Leitura das densidades ópticas em leitor automático (VERSAMAX – Molecular Devices Corporation) em comprimento de onda de 450 nm.

Tratamento das amostras para caracterizar o TGF-β ativo:

- a) Diluição das amostras a 1/5 em tampão D-PBS, pH 7,36
- b) Adicionar 1 µl de HCl 1N/ 50 µl de amostra diluída (o pH irá para 3,0 )
- c) Repouso a temperatura ambiente por 15 minutos
- d) Neutralização das amostras com 1 µl de NaOH 1N/ 50 µl de amostra (pH irá para 7,5) e empregar.

### Análise Estatística dos dados

Nos experimentos *in vitro* (UFC, NO e citocinas), os grupos de MØ infectados (*in vitro*) tratados com citocinas e seus respectivos controles (MØ infectados) foram analisados por test T-Student, método não pareado (Graphpad-Prism-Software version 2.01).

Os experimentos com mais de 2 amostras foram analisados por ANOVA seguido de método de múltiplas comparações de acordo com Tukey.

Resultados de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### **1) Obtenção do Lavado Bronco-Alveolar (LBA)**

Os animais B10.A e A/J normais foram submetidos a um processo de obtenção de LBA (1,5 mL de meio DMEM). O número total de células foi determinado em câmara de Neubauer e obtivemos cerca de  $2,5 \times 10^5$  células/mL de cada animal.

### **2) Cultivo dos MØ alveolares**

No projeto inicial pretendíamos utilizar suspensões de células do LBA ajustadas para  $1 \times 10^6$  células/mL. Um volume de 0,20 mL de células seria dispensado em uma placa de cultivo de 96 poços.

Após vários ensaios, foi decidido dispensar 0,5 mL de células totais contendo  $2 \times 10^5$  por poço (placa de cultivo de 24 poços) devido a escassez de células obtidas. Tal procedimento também proporcionou a obtenção de volumes menores de sobrenadante, porém suficientes para avaliar a produção de algumas citocinas e de NO.

Após 2 horas de incubação a  $37^\circ\text{C}$  em 5% de  $\text{CO}_2$  as células não aderentes foram removidas e o seu número foi subtraído do número total de células pulmonares incubadas. Obtivemos aproximadamente  $1 \times 10^5$  células aderentes por poço.

### **3) Infecção dos Mø alveolares aderidos**

Após vários ensaios realizados, só foi possível avaliar se existe ou não a atividade fungicida ou fungistática dos Mø alveolares numa relação Pb-Mø de 1:50. Em relações maiores de fungo e Mø observamos a lise das monocamadas devido ao crescimento incontrolado do fungo (dados não mostrados).

### **4) Tempo de incubação dos Mø com o fungo**

Inicialmente foi proposto co-cultivar os Mø com todas as leveduras de Pb por 48 ou 72 horas. Porém, após vários ensaios verificamos que, mesmo com a relação Pb-Mø de 1:50, não era possível avaliar a atividade dos Mø devido à grande replicação de fungos nestes períodos e a conseqüente destruição da monocamada de Mø.

Baseado nestes dados foi decidido cultivar os Mø com o fungo por um período de 2 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após este tempo, o sobrenadante foi desprezado e os parasitas extracelulares ou não aderidos foram removidos por 2 a 3 lavagens com meio DMEM (0,2 mL).

Os Mø, tratados ou não com citocinas, com fungos aderidos ou fagocitados eram então incubados com meio suplementado por um período adicional de 72 horas.

### **5) Interação entre fungos e Mø alveolares dos animais B10.A e A/J (2 horas de co-cultivo)**

Os Mø alveolares de animais B10.A e A/J foram infectados com leveduras viáveis do fungo (relação Pb/Mø de 1:50) sobre lamínulas redondas em placa de cultura de 24 poços.

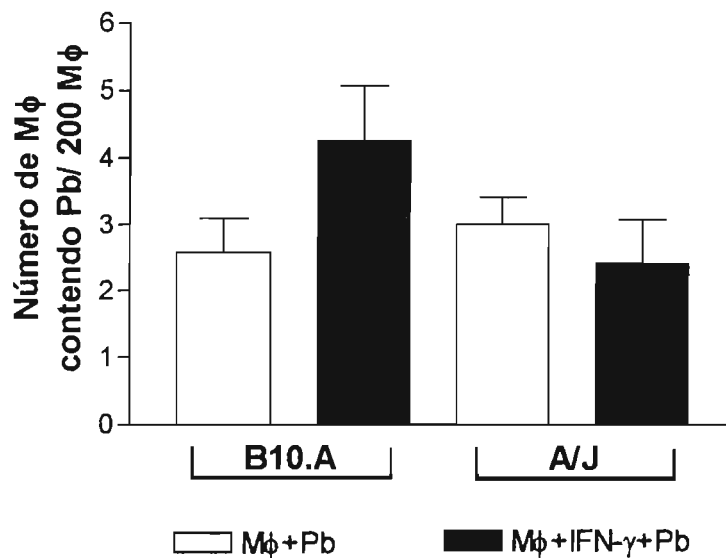
Vale lembrar que as leveduras eram opsonizadas com o soro dos mesmos camundongos utilizados em cada experimento.

Após 2 horas de incubação a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub> o sobrenadante foi removido e as lamínulas foram coradas e examinadas ao microscópio óptico comum.

Uma média de 200 Mø foi contada para determinar o número de fungos aderidos e/ou ingeridos após esse tempo de incubação.

Os resultados mostram que o número de leveduras aderidas aos Mø de B10.A é similar ao observado com Mø de animais A/J (2,5±0,53 e 3,0±0,41, respectivamente). Quando ativamos os Mø de ambas as linhagens com IFN- $\gamma$  antes do desafio com Pb também não houve diferenças significativa entre os grupos (B10: 4,2  $\pm$  0,82 e A/J: 2,4  $\pm$  0,67). Assim, não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos e linhagens.

Os dados mostram que os Mø alveolares de animais B10.A e A/J se comportam de maneira semelhante durante as primeiras 2 horas de infecção com leveduras viáveis do fungo Pb (Figura 1).



**Figura 1:** Mφ alveolares de animais B10.A e A/J ( $2 \times 10^5$  células/poço) ativados ou não com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  foram co-cultivados com leveduras viáveis do *P.brasiliensis* em uma relação fungo/Mφ de 1:50 sobre lamínulas redondas em uma placa de cultura de 24 poços. Após 2 horas de incubação, o sobrenadante de cultivo foi desprezado e as lamínulas foram coradas e examinadas em imersão (ocular 10x, objetiva 100x). Uma média de 200 Mφ foi contada e analisado o número de Mφ com leveduras aderidas e/ou ingeridas - interação Pb: Mφ. Os dados representam a Média e EP.

**6) Efeito do tratamento com IFN- $\gamma$  e IL-12 e a combinação das duas citocinas na atividade fungicida *in vitro* dos M $\phi$  alveolares de camundongos B10.A e A/J. Infecção dos M $\phi$  com o fungo em uma relação Pb-M $\phi$  de 1:50**

*“Devido à necessidade de manipular grande número de animais para obter número suficiente de M $\phi$  alveolares, os dados de camundongos B10.A foram obtidos em experimentos realizados em ocasiões diferentes daquele com animais A/J. Por esta razão serão apresentados em separado.”*

**6.1) M $\phi$  Alveolares de Camundongos B10.A**

6.1.1) Atividade fungicida e produção de NO

Podemos observar na figura 2 que os M $\phi$  alveolares ( $1 \times 10^5$  células aderidas/poço) ativados com diferentes concentrações de IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas citocinas e infectados com  $2 \times 10^3$  de leveduras viáveis (proporção de 1:50) levaram a diminuição significativa do número de fungos recuperados demonstrando atividade fungicida evidente quando comparados aos M $\phi$  controle.

Quando os M $\phi$  foram ativados com IFN- $\gamma$  houve diminuição do número de fungos recuperados em todas as concentrações da citocina (50.000 =  $147,5 \pm 2,5$ ; 10.000 =  $140 \pm 0,2$  e 2.000 =  $258 \pm 121$  fungos recuperados). Estes grupos apresentaram atividade fungicida de 80 a 89% quando comparados com os M $\phi$  não ativados com citocinas ( $1.297 \pm 201$ ).

O mesmo fenômeno acontece quando tratamos os M $\phi$  com 50.000 pg/mL de IL-12 ( $260 \pm 5,8$  fungos recuperados e com 89% de atividade fungicida). Nas concentrações de 10.000 e 2.000 pg/mL a capacidade fungicida dos M $\phi$  foi reduzida para 59 e 51%, respectivamente.

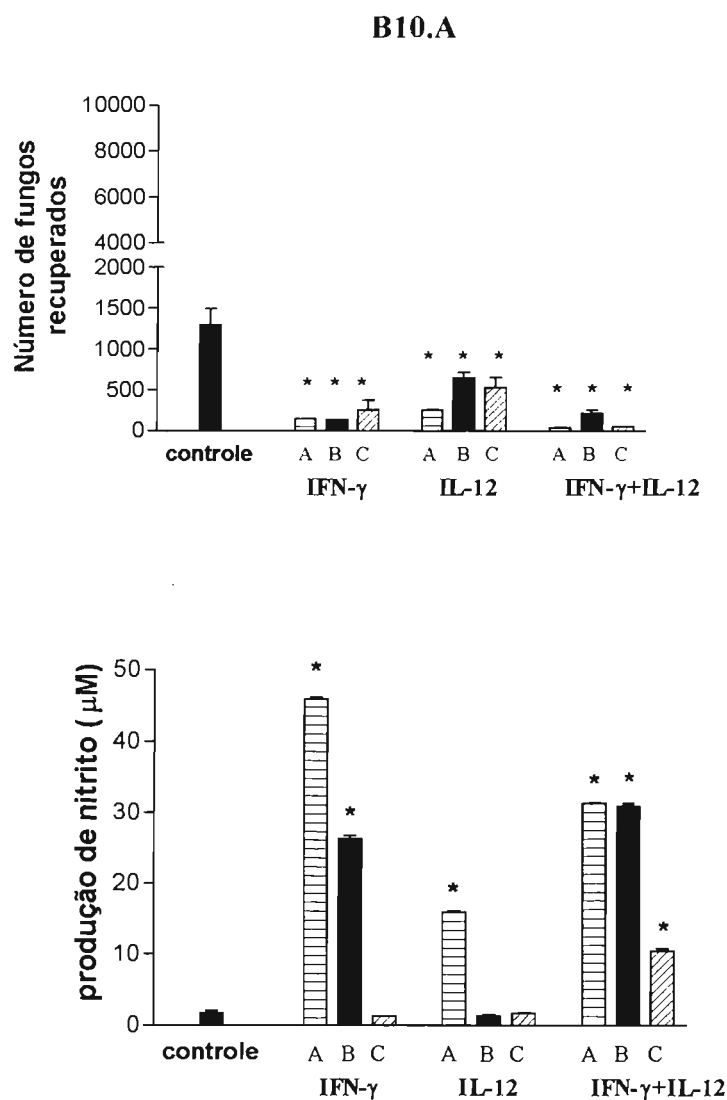
Podemos observar no gráfico (2) que a combinação de IFN- $\gamma$  e IL-12 promove uma grande diminuição no número de fungos com as concentrações de 50.000 ( $42 \pm 4,4$ ), 10.000 ( $220 \pm 40$ ) e 2.000 ( $53 \pm 2,5$ ). A atividade fungicida dos grupos está entre 83 a 97% quando comparada com a dos M $\phi$  controle.

Os M $\phi$  ativados com 50.000 e 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  produzem mais NO ( $46 \pm 0,24$  e  $26 \pm 1,26$   $\mu$ M) comparados aos M $\phi$  controle ( $1,7 \pm 0,37$   $\mu$ M) e quando comparados aos tratados com as doses mais altas de IL-12 ( $16 \pm 0,25$  e  $1,3 \pm 0,18$   $\mu$ M). O mesmo acontece quando os M $\phi$  são ativados com a combinação das duas citocinas (IFN- $\gamma$ +IL-12) na concentração de 50.000 ( $31 \pm 0,18$   $\mu$ M), 10.000 ( $31 \pm 0,36$   $\mu$ M).

Podemos observar então que, a presença de IFN- $\gamma$  leva a aumentos na produção de NO pelos M $\phi$  alveolares de B10.A aderidos e infectados com o fungo. Notamos que existe uma correlação positiva entre a produção de NO e a capacidade fungicida dos M $\phi$ .

A concentração de 2.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e IL-12 induz nos M $\phi$  infectados níveis baixos de NO ( $1,26 \pm 0,13$  para os M $\phi$  ativados com IFN- $\gamma$  e  $1,69 \pm 0,12$  para os M $\phi$  ativados com IL-12). Entretanto, quando os M $\phi$  são estimulados com a combinação dessas duas citocinas e na concentração de 2.000 pg/mL, notamos que existe um efeito sinérgico com níveis mais elevados de NO ( $10,5 \pm 0,34$   $\mu$ M). Este efeito sinérgico parece também se expressar na atividade fungicida elevada observada quando os M $\phi$  foram tratados com doses baixas de ambas as citocinas.





**Figura 2:** Macrófagos alveolares de animais **B10.A** normais foram cultivados "overnight" com IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas citocinas em diferentes concentrações, 50.000 (A), 10.000 (B) e 2.000 pg/mL (C). Os macrófagos foram infectados por 2h com leveduras viáveis (proporção 1:50). Após 72h de incubação dos macrófagos infectados foi avaliado o número de fungos viáveis recuperados pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e o sobrenadante do cultivo foi (0,5 mL) para a dosagem de nitritos. O grupo controle é representado pelos macrófagos infectados com o fungo. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. Este experimento é representativo de um dentre 3 realizados com resultados equivalentes. (\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle (M $\phi$ +Pb).

### 6.1.2) Citocinas

A figura (3) mostra os níveis da quimiocina MCP-1 no sobrenadante de cultivo dos M $\phi$  com o fungo.

Os níveis de MCP-1 são mais altos e significativos em M $\phi$  controle ( $319 \pm 55$  pg/mL) quando comparados aos M $\phi$  tratados com 50.000 ( $46 \pm 26,6$  pg/mL), 10.000 ( $181 \pm 4,22$  pg/mL) e 2.000 pg/mL ( $168,67 \pm 8,14$  pg/mL) de IFN- $\gamma$ .

Quando os M $\phi$  são estimulados com IL-12 na concentração de 50.000 pg/mL, temos níveis significativamente elevados de MCP-1 ( $463 \pm 0,59$  pg/mL) quando comparados aos dos M $\phi$  controle ( $319 \pm 55$  pg/mL) e às outras concentrações de IL-12 ( $272 \pm 17,48$  para 10.000 e  $327 \pm 0$  para 2.000 pg/mL).

Já os M $\phi$  ativados com 50.000 ( $173 \pm 2,88$  pg/mL) e 10.000 ( $122 \pm 10,68$ ) pg/mL de IL-12 com IFN- $\gamma$  apresentaram níveis baixos de MCP-1 quando comparados aos M $\phi$  controle ( $319 \pm 55$  pg/mL). Parece que houve um efeito predominante do IFN- $\gamma$  sobre a IL-12 na regulação da síntese de MCP-1.

Comparando os M $\phi$  ativados com IFN- $\gamma$  com os não ativados, observamos que somente a concentração de 50.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  levou ao aumento significativo da produção de IL-12 ( $75 \pm 14,87$  pg/mL).

Não foram encontradas alterações nos níveis de IL-12 para os M $\phi$  ativados em todas as concentrações desta mesma citocina com relação aos M $\phi$  controle ( $16 \pm 2,78$  pg/mL).

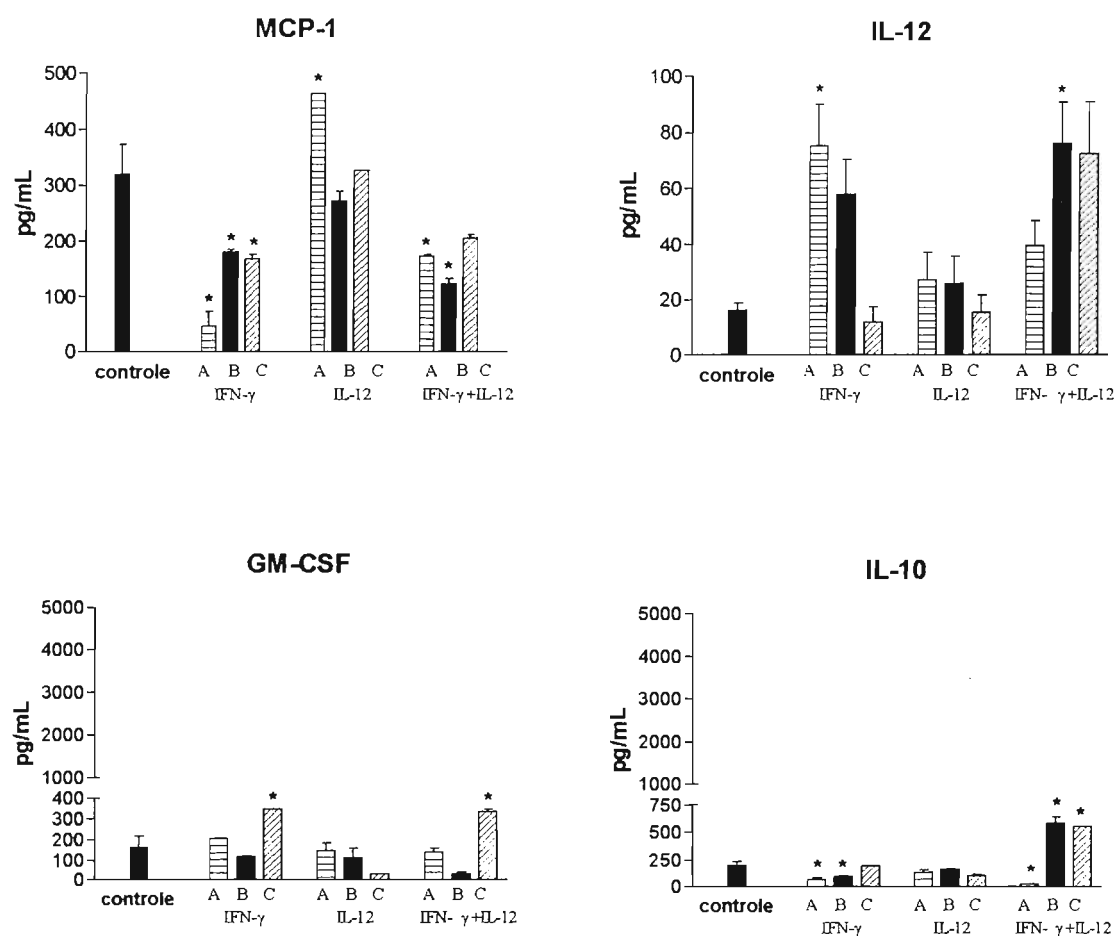
No entanto, quando ativamos os M $\phi$  com 10.000 pg/mL de IL-12+IFN- $\gamma$  conseguimos aumento significativo de IL-12 ( $76 \pm 14,5$  pg/mL) quando comparado aos M $\phi$  não ativados ( $16 \pm 2,78$  pg/mL).

Os níveis de GM-CSF no sobrenadante de cultura de M $\phi$  infectados estiveram elevados significativamente apenas quando estimulados com IFN- $\gamma$  em baixa dose e em combinação com IL-12 na concentração de 2.000 pg/mL ( $344,79 \pm 0,7$  e  $334 \pm 12,58$  pg/mL) quando comparados aos M $\phi$  controle ( $163 \pm 53,7$  pg/mL).

Pelos resultados apresentados na figura 3, pode-se notar que os M $\phi$  infectados e ativados previamente com 50.000 ( $67 \pm 17,6$  pg/mL) e 10.000 ( $93,7 \pm 5,46$  pg/mL) de IFN- $\gamma$  apresentaram níveis diminuídos e significativos de IL-10 quando comparados aos M $\phi$  controle ( $202,9 \pm 31,2$  pg/mL).

Ao comparar os grupos de tratamentos dos M $\phi$  com o grupo controle verificamos que os M $\phi$  ativados com (IFN- $\gamma$ +IL-12) na concentração de 50.000 pg/mL apresentaram níveis menores e significativos ( $67 \pm 17,7$  e  $23 \pm 0,7$  pg/mL) de IL-10.

Podemos notar também que os M $\phi$  infectados e ativados com IL-12 apresentaram níveis equivalentes de IL-10 no sobrenadante de cultivo às 72 horas quando comparado aos M $\phi$  controles. Porém de maneira inesperada, ocorreu o aumento de IL-10 quando os M $\phi$  foram tratados com IL-12+IFN- $\gamma$  na concentração de 10.000 ( $583,8 \pm 55,5$  pg/mL) e 2.000 pg/mL ( $431,6 \pm 2,97$  pg/mL), sendo significativos quando comparados ao controle e aos outros grupos ativados.



**Figura 3:** Produção de citocinas por macrófagos alveolares cultivados ou não com 50.000 (A), 10.000 (B) e 2.000 pg/mL (C) de IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas citocinas. Os animais B10.A tiveram suas células alveolares colhidas e ajustadas para  $2 \times 10^5$  células/0,5 mL por poço. Trabalhando somente com macrófagos aderidos ( $1 \times 10^5$ /poço) foi realizado o co-cultivo de 2 horas com os fungos (relação levedura-macrófagos de 1:50). Após 72h de cultivo dos macrófagos infectados foi colhido o sobrenadante para a dosagem da quimiocina MCP-1, fator de crescimento (GM-CSF) e das interleucinas (IL-12 e IL-10). Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. Este experimento é representativo de um dentre 3 realizados com resultados equivalentes. (\*) diferença estatística em relação ao grupo cultivado em ausência de ativação com citocinas (controle).

## **6.2) Mø Alveolares de camundongos A/J**

### 6.2.1) Atividade fungicida e produção de NO

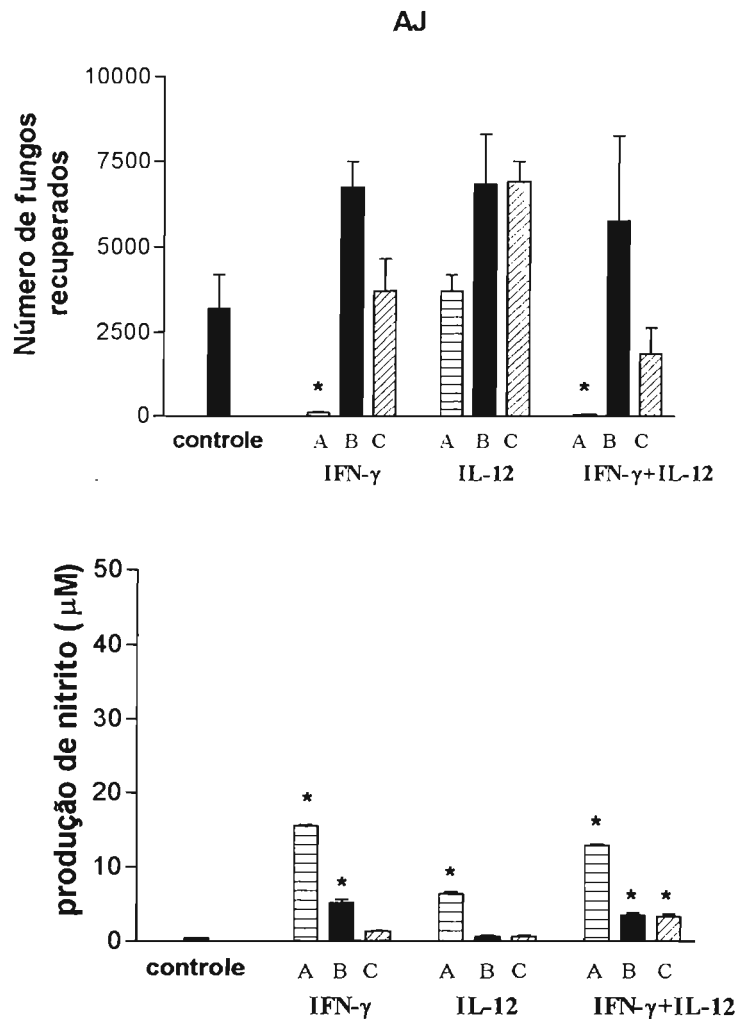
Quando os Mø de camundongos A/J foram previamente estimulados com IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas citocinas nas concentrações de 10.000 e 2.000 pg/mL não ocorreram diferenças significativas quando comparado aos controles. Entretanto, os Mø estimulados com 50.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e em conjunto com a IL-12 na mesma concentração apresentaram capacidade fungicida de 97 e 99%, com uma evidente diminuição de fungos recuperados. Assim a atividade fungicida de A/J parece ser regulada positivamente por altas doses de IFN- $\gamma$  mas não de IL-12.

A figura 4 mostra que a estimulação dos Mø com 50.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  ( $15,501 \pm 0,24 \mu\text{M}$ ), IL-12 ( $6,4 \pm 0,26 \mu\text{M}$ ) ou a combinação das duas ( $12,9 \pm 0,19 \mu\text{M}$ ) levou a aumentos significantes de NO quando comparado aos Mø não ativados ( $0,49 \pm 0,002 \mu\text{M}$ ).

Quando a estimulação dos Mø foi com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  sozinho e em combinação com a IL-12 ocorreram a níveis elevados e significativos de NO ( $5,15 \pm 0,445$  e  $3,502 \pm 0,365 \mu\text{M}$  respectivamente).

A concentração de 2.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e IL-12 não foram bons indutores da produção de NO ( $1,298 \pm 0,13$  e  $0,648 \pm 0,121$ , respectivamente). Porém, quando os macrófagos foram estimulados com baixas concentrações das duas citocinas simultaneamente houve um efeito sinérgico ( $3,295 \pm 0,34 \mu\text{M}$ ). Este dado apresentou diferença significativa em comparação com os Mø controle ( $0,49 \pm 0,002 \mu\text{M}$ ).

Em confronto com os dados da atividade microbicida pode-se concluir que somente o tratamento com altas doses de IFN- $\gamma$  altera o comportamento de Mø de camundongos A/J, apesar dos outros tratamentos terem também elevado à síntese de NO, que, porém, não foi suficiente para matar o fungo.



**Figura 4:** Macrófago alveolares de animais A/J normais ( $1 \times 10^5$ /mL) foram cultivados "overnight" com IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas citocinas em diferentes concentrações, 50.000 (A), 10.000 (B) e 2.000 pg/mL (C). Os macrófagos foram infectados por 2h com  $2 \times 10^3$  leveduras viáveis (relação levedura-macrófagos de 1:50). Após 72h de incubação, foi avaliado o número de fungos recuperados pelo método de Unidade Formadoras de Colônias (UFC) e o sobrenadante do cultivo foi colhido (0,5 mL) para a dosagem de nitritos. o grupo controle é representado pelos macrófagos infectados com o fungo. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. Este experimento é representativo de um dentre 3 realizados com resultados equivalentes. (\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle (M $\phi$ +Pb).

### 6.2.2) Dosagem de Citocinas

Os níveis de MCP-1 dos M $\emptyset$  normais e infectados com o fungo apresentaram-se em torno de  $7,028 \pm 0,041$  pg/mL.

Os M $\emptyset$  previamente ativados com IFN- $\gamma$  (50.000, 10.000 e 2.000 pg/mL) apresentaram níveis baixos de MCP-1 e foram significativamente menores que os níveis revelados pelos M $\phi$  controle.

Todas as concentrações de IL-12 também levaram à diminuição significativa nos níveis de MCP-1. Como esperado, o mesmo fenômeno ocorreu quando as células foram tratadas com IFN- $\gamma$  + IL-12 em todas as concentrações utilizadas (Fig. 5).

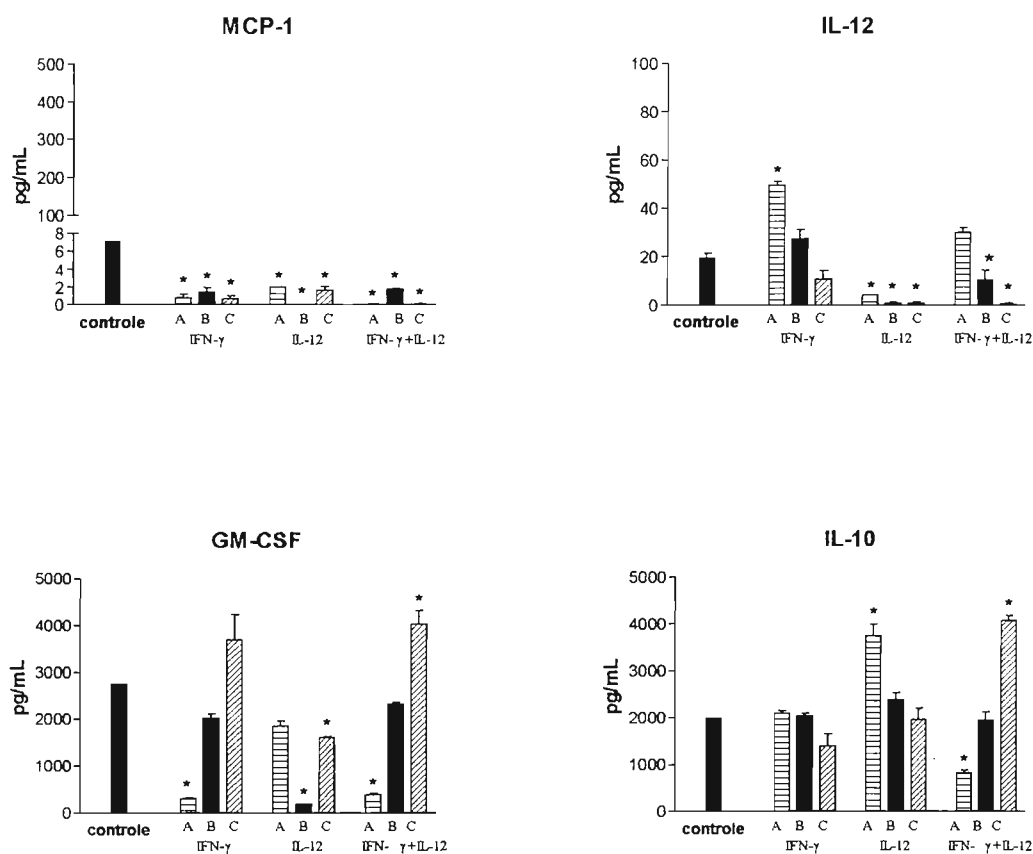
O sobrenadante do cultivo de M $\emptyset$  ativados com 50.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  apresentou pronunciado e significativo aumento de IL-12 ( $49,6 \pm 1,6$  pg/mL) quando comparado ao grupo controle ( $19,12 \pm 2,235$  pg/mL). Redução significativa dos níveis de IL-12 foi encontrada em M $\emptyset$  previamente ativados com 50.000 ( $4,089 \pm 0,14$  pg/mL), 10.000 ( $0 \pm 0$  pg/mL) e 2.000 ( $0 \pm 0$  pg/mL) de IL-12. Quando ambas as citocinas foram usadas em conjunto, as doses de 10.000 e 2.000 pg/mL levaram a reduções significativas nos níveis de IL-12. Como o IFN- $\gamma$  aumenta os níveis de IL-12 e a própria IL-12 parece induzir negativamente a sua própria síntese, na situação de estimulação com ambas as citocinas parece prevalecer o efeito da IL-12.

Como pode ser visto na figura 5, os níveis de GM-CSF estão diminuídos para os M $\emptyset$  previamente ativados com 50.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  ( $301,5 \pm 19,34$  pg/mL); 10.000 ( $200 \pm 2,11$  pg/mL) e 2.000 ( $1603,5 \pm 35,21$  pg/mL) de IL-12 e para os M $\emptyset$  tratados com 50.000 de IFN- $\gamma$ +IL-12 ( $383 \pm 28,3$  pg/mL) quando comparados aos M $\phi$  controle ( $2752 \pm 5,99$  pg/mL). Entretanto, quando os M $\emptyset$  são ativados com a combinação das duas citocinas na concentração de 2.000 pg/mL, níveis pronunciados e significantes de GM-CSF ( $4.029,4 \pm 293,87$  pg/mL) foram detectados nos sobrenadantes em comparação aos obtidos de M $\phi$  controle.

Quanto à síntese de IL-10, pudemos verificar que somente os Mø ativados com 50.000 pg/mL de IL-12 ( $3.744,94 \pm 245,95$  pg/mL) e 2.000 de (IL-12+INF- $\gamma$ ) ( $4.070,19 \pm 115$  pg/mL) apresentam níveis elevados de produção de IL-10 quando comparados aos Mø controles ( $1.986 \pm 0,925$  pg/mL).

Nossos dados revelaram também que a estimulação dos Mø com 50.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ + IL-12 levou à redução significativa na produção de IL-10 ( $823 \pm 56$  pg/mL) no sobrenadante de cultivo.





**Figura 5:** Produção de citocinas por macrófagos alveolares cultivados ou não com 50.000 (A), 10.000 (B) e 2.000 pg/mL (C) de IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas citocinas. Os animais A/J tiveram suas células alveolares colhidas e ajustadas para  $2 \times 10^5$  células/0,5 mL por poço. Trabalhando somente com macrófagos aderidos ( $1 \times 10^5$ /poço) foi realizado o co-cultivo de 2 horas com os fungos (relação levedura-macrófagos de 1:50). Após 72h de cultivo dos macrófagos infectados foi colhido o sobrenadante para a dosagem da quimiocina MCP-1, fator de crescimento (GM-CSF) e das interleucinas (IL-12 e IL-10). Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. Este experimento é representativo de um dentre 3 realizados com resultados equivalentes. (\*) diferença estatística em relação ao grupo cultivado em ausência de ativação com citocinas (controle).

## **7) Efeito da aminoguanidina (AG) na atividade fungicida e secretora de Mø infectados com o Pb.**

### **7.1) Mø de camundongos B10.A**

#### **7.1.1) Efeito da AG na capacidade fungicida e na síntese de NO pelos Mø alveolares pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$ .**

Os Mø alveolares de camundongos B10.A foram incubados “overnight” com IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL – concentração mínima ideal para estimular os Mø) em combinação com um inibidor de síntese de NO, AG na concentração de 1mM/poço. Logo depois, estes Mø foram infectados com o fungo por 2 horas (2.000 fungos/poço), em uma relação Pb-Mø de 1:50. O tratamento com AG foi mantido durante as 72 horas de co-cultivo.

Quando o grupo de Mø foi previamente ativado com IFN- $\gamma$ , observamos diminuição significativa de fungos correspondendo a um efeito fungicida de 37% ( $768 \pm 36$  de fungos recuperados quando comparado ao grupo controle ( $1.222 \pm 61$ ). Já os grupos de Mø infectados ( $1.012 \pm 133$ ) e pré-ativados com IFN- $\gamma$  ( $848 \pm 112$ ) quando tratados com o inibidor de NO por 72 horas não apresentaram diferenças significativas entre si. Logo, a AG aboliu o efeito fungicida induzido pelo IFN- $\gamma$  (Fig. 6).

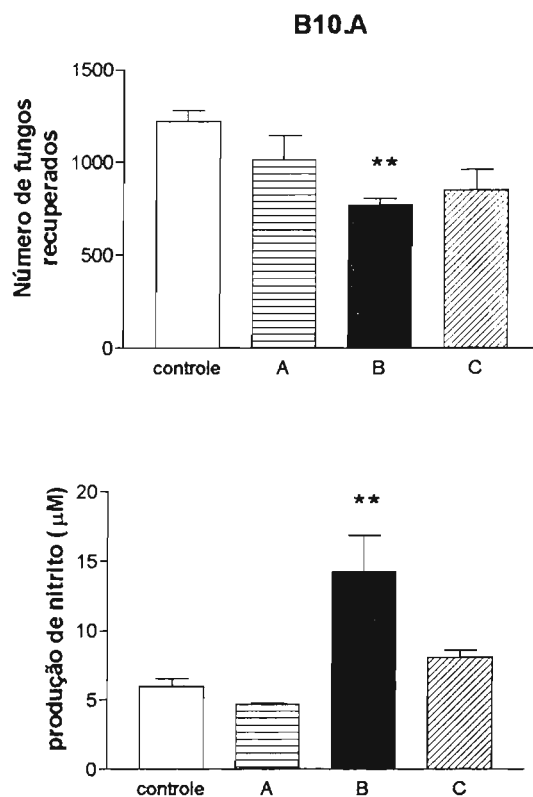
Na mesma figura 6, notamos que o grupo de Mø de animais B10.A tratados com AG e mantido durante todo o cultivo na concentração de 1mM não apresentou diminuição nos níveis de NO quando comparado aos níveis observados nos sobrenadantes de Mø somente infectados e não submetidos a nenhum tratamento.

Já os Mø pré-ativados com IFN- $\gamma$  e infectados apresentaram níveis elevados e significativos de NO ( $14 \pm 3 \mu\text{M}$ ) quando comparado ao grupo controle ( $6 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ). O tratamento contínuo com AG por 72 horas de incubação aboliu o aumento de NO ( $8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ) induzido pelo IFN- $\gamma$ .

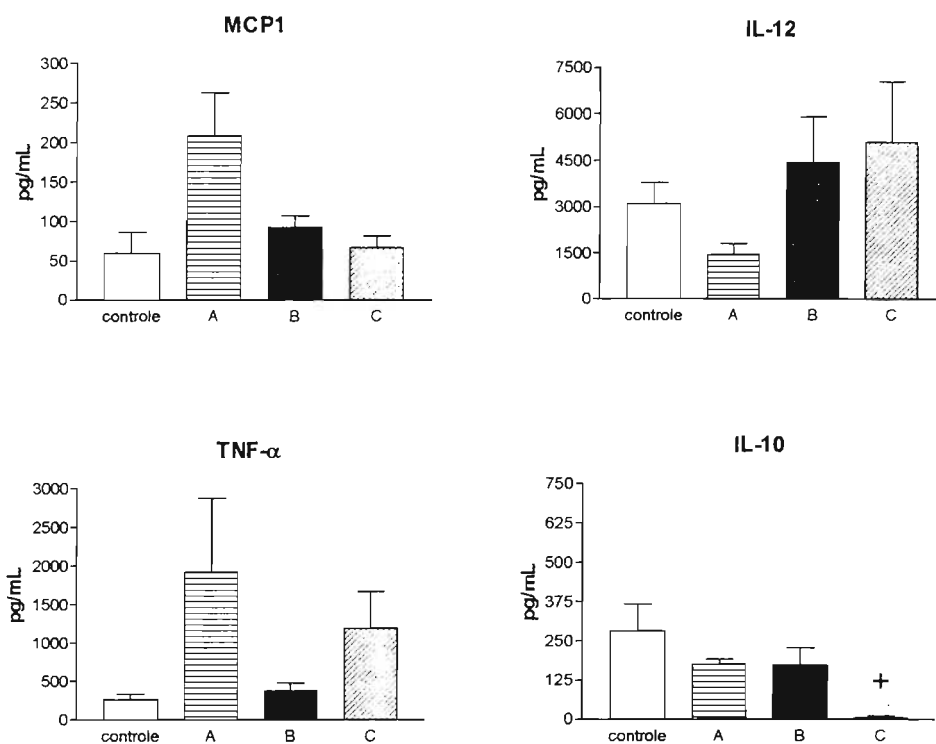
Os valores obtidos no grupo C ( $8 \pm 1$ ), tratados com AG, foram intermediários entre aqueles observados com Mø controle ( $6 \pm 0,6$ ) e nos Mø ativados por IFN- $\gamma$  ( $14 \pm 3$ ). Assim, não diferiram de ambos os grupos e este fato traduziu-se por recuperação de número intermediário de fungos que não diferiu do controle de Mø normais e dos ativados pelo IFN- $\gamma$ . Logo, a inibição de NO pela AG inibiu a atividade fungicida de Mø alveolares de camundongos B10.A.

### 7.1.2) Citocinas

Na figura 7, pode-se notar que o tratamento dos Mø de animais B10.A com o inibidor de NO não alterou a produção das citocinas estudadas. Somente os níveis de IL-10 apresentaram-se reduzidos nos sobrenadantes de Mø pré-ativados e tratados com AG durante as 72 horas de incubação com o fungo.



**Figura 6:** Macrófagos alveolares de animais **B10.A** normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ ou 1mM de AG e infectado com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliado o número de fungos viáveis pelo método de Unidades formadoras de Colônias (UFC) e o sobrenadante do cultivo foi colhido (0,5 mL) para a dosagem de nitritos. *Grupo controle* (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), *Grupo A* (M $\phi$  tratados com AG antes e depois da infecção com o fungo), *Grupo B* (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), *Grupo C* (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +AG e novamente com AG após o desafio com o fungo). (\*\*) diferente significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ )



**Figura 7:** Macrófagos alveolares de animais **B10.A** normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ ou 1mM de AG e infectado com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliada no sobrenadante de cultivo dos macrófagos a produção de algumas citocinas, tais como: MCP-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10. *Grupo controle* (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), *Grupo A* (M $\phi$  tratados com AG antes e depois da infecção com o fungo), *Grupo B* (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), *Grupo C* (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +AG e novamente com AG após o desafio com o fungo). (+) diferença significativa quando comparado ao grupo B (M $\phi$  infectados e previamente ativados com IFN- $\gamma$ )  $p < 0,05$

## **7.2) Mø de camundongos A/J**

### **7.2.1) Efeito da AG na capacidade fungicida e na síntese de NO pelos Mø alveolares pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$ .**

Os Mø de camundongos A/J infectados e tratados com AG antes e depois do desafio com o fungo apresentaram resultados equivalentes em relação ao número de fungos recuperados ( $940 \pm 277$ ) quando comparado aos Mø controle ( $943 \pm 25$  de fungos).

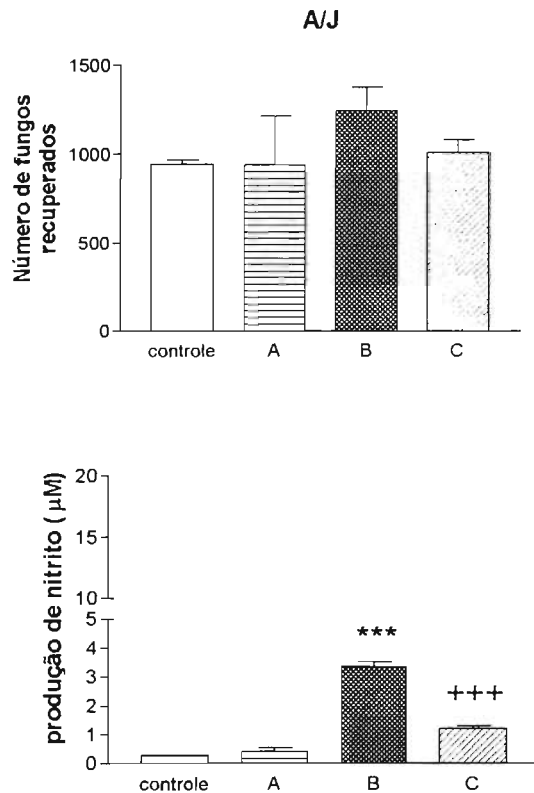
A adição de AG na cultura de Mø estimulados com IFN- $\gamma$  levou a resultados similares em relação ao número de fungos recuperados durante as 72 horas de incubação ( $1.143 \pm 176$  para o grupo de Mø previamente ativado com IFN- $\gamma$  e  $1.010 \pm 71$  para o grupo de Mø ativados e tratados com AG antes e depois do desafio com o fungo).

Logo, Mø de camundongos A/J não apresentaram atividade fungicida com a dose de IFN- $\gamma$  usada e a AG não alterou este comportamento (Fig. 8).

Os Mø de camundongos A/J infectados e tratados com AG produzem níveis muito baixos de NO e equivalentes aos de Mø controle, como observado na figura 8.

A pré-ativação com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  em Mø infectados de animais A/J induziu níveis um pouco maiores e significativos de NO ( $3 \pm 0 \mu\text{M}$ ) quando comparados aos Mø controle ( $0,3 \pm 0 \mu\text{M}$ ). Entretanto, quando estes Mø foram ativados com IFN- $\gamma$  em combinação com AG houve diminuição significativa de NO ( $1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ ).

Assim, pôde-se verificar que os baixos níveis de NO produzidos por Mø de camundongos A/J podem ser modulados por AG; entretanto, o NO parece não estar envolvido na atividade fungicida dos Mø, talvez devido à sua baixa concentração.



**Figura 8:** Macrófagos alveolares de animais *A/J* normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ ou 1mM de AG e infectado com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliada a produção de nitrito no sobrenadante de cultivo. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. *Grupo controle* (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), *Grupo A* (M $\phi$  tratados com AG antes e depois da infecção com o fungo), *Grupo B* (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), *Grupo C* (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +AG e novamente com AG após o desafio com o fungo). (\*\*\*) diferente significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,0001$ ), (+++) diferença significativa quando comparado ao grupo B (M $\phi$  infectados e previamente ativados com IFN- $\gamma$ )  $p < 0,0001$

### 7.2.2) Citocinas

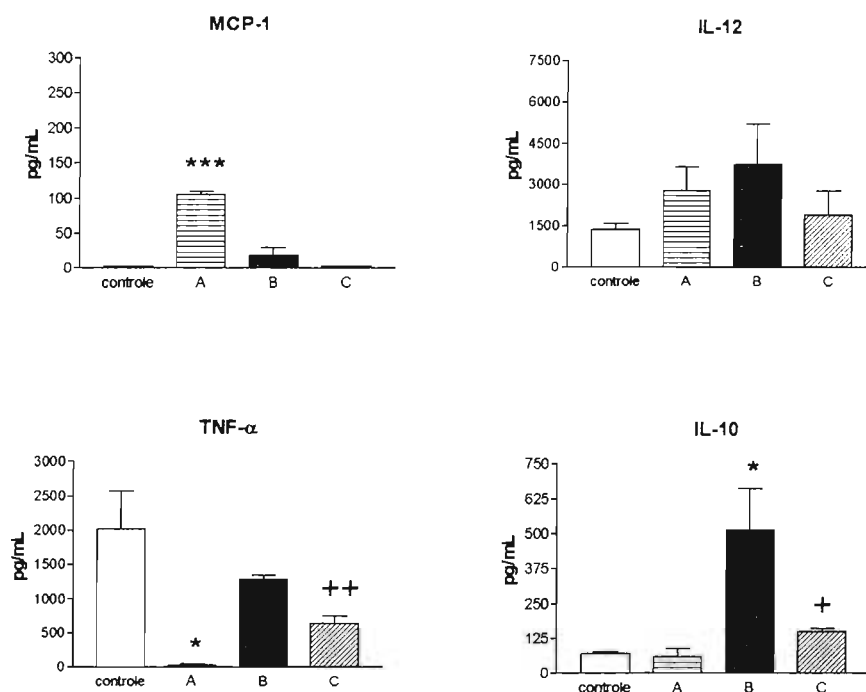
Na figura 9 pode-se notar que o tratamento dos M $\phi$  de animais A/J com o inibidor de NO não alterou a produção de IL-12 quando comparada aos seus respectivos grupos controle.

A análise estatística dos dados mostrou que o tratamento com AG leva à síntese diminuída de TNF- $\alpha$  em relação aos controles ativado ou não por IFN- $\gamma$ .

O grupo de M $\phi$  previamente ativado com IFN- $\gamma$  apresentaram níveis mais altos e significativos de IL-10 ( $515 \pm 146$  pg/mL) quando comparado ao grupo de M $\phi$  controle ( $69 \pm 6$  pg/mL). A concentração de IL-10 diminuiu quando os M $\phi$  foram acrescidos de AG durante as 72 horas de incubação ( $146 \pm 12$  pg/mL) como observado na figura 9.

A AG também aumentou a síntese de MCP-1 por M $\phi$  infectados com o fungo.





**Figura 9:** Macrófagos alveolares de animais A/J normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ ou 1mM de AG e infectado com leveduras viáveis de *P.brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliada no sobrenadante de cultivo dos macrófagos a produção de algumas citocinas, tais como: MCP-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10. *Grupo controle* (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), *Grupo A* (M $\phi$  tratados com AG antes e depois da infecção com o fungo), *Grupo B* (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), *Grupo C* (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +AG e novamente com AG após o desafio com o fungo). (\*) diferente significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (\*\*\*)  $p < 0,0001$  (+) diferença significativa quando comparado ao grupo B (M $\phi$  infectados e previamente ativados com IFN- $\gamma$ )  $p < 0,05$  (++)  $p < 0,001$

## **8) Efeito do tratamento *in vitro* com o AcM anti IL-10 (10 e 20 µg/mL) na atividade fungicida dos Mø alveolares de camundongos.**

### **8.1) Mø alveolares de camundongos B10.A**

#### ***8.1.1) Atividade fungicida e produção de NO por Mø alveolares.***

Como a IL-10 é uma citocina desativadora de Mø e observamos atividades fungicidas distintas em células de camundongos B10.A e A/J, nos perguntamos se essa diferença poderia ser atribuída à maior síntese de IL-10 por Mø de camundongos A/J. Para tanto os co-cultivos foram tratados com duas concentrações diferentes do AcM anti-IL-10.

Nossos resultados mostram que os Mø quando infectados com o fungo (proporção 1:50) por 2 horas permitiram a recuperação de cerca de  $1.365 \pm 427$  fungos após 72 horas de co-cultivo (grupo de Mø controle). Resultado equivalente foi observado quando os Mø infectados foram previamente tratados com o AcM anti-IL-10 (10 µg/mL) durante todo o cultivo (72h) e apresentaram uma média de  $998 \pm 97$  de leveduras viáveis (Fig. 10).

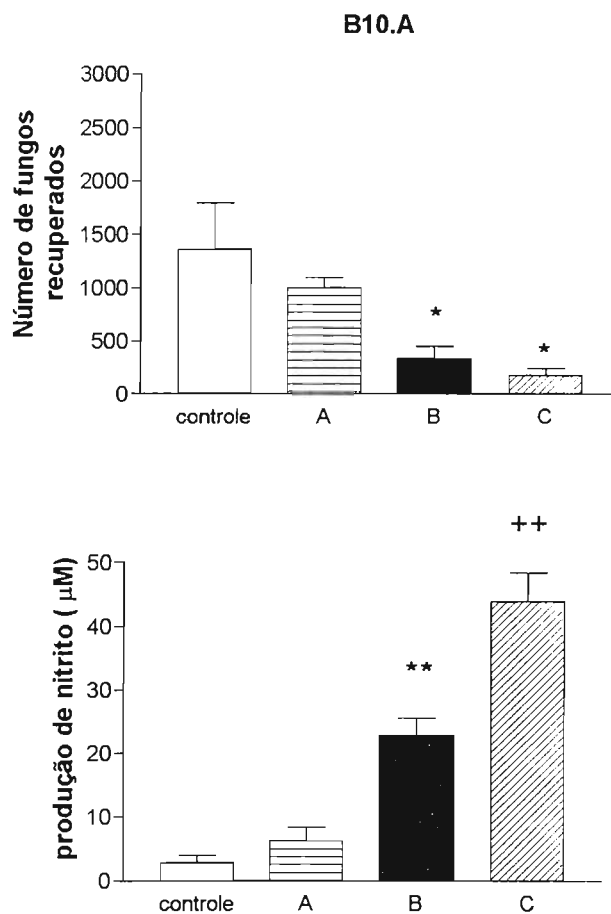
A ativação dos Mø com IFN- $\gamma$  previamente ao desafio com o fungo levou à aumentos significativos da atividade fungicida (76%), com  $335 \pm 118$  de fungos recuperados no cultivo de 72 horas. Esses Mø previamente ativados com IFN- $\gamma$  foram submetidos ao tratamento com o AcM anti-IL-10 e como resultado não ocorreram diferenças em relação ao número de fungos recuperados quando comparado ao controle de Mø ativados com IFN- $\gamma$ . Assim, o AcM anti-IL-10 não abole a atividade fungicida induzida pela ativação de Mø de camundongos B10.A com o IFN- $\gamma$  (Fig. 10).

A produção de nitritos também foi analisada. Nossos resultados revelaram (Fig.10) que os Mø infectados e tratados com anti-IL-10 (10 µg/mL) produziram níveis equivalentes de NO quando comparados aos dos Mø controle. Entretanto, a ativação dos Mø com IFN- $\gamma$  levou a níveis mais elevados e significativos de NO ( $23 \pm 3$  µM) quando comparado ao grupo controle ( $3 \pm 1$  µM).

Além disso, o tratamento dos M $\phi$  com IFN- $\gamma$  e anti-IL-10 levou a níveis ainda mais elevados e significativos ( $44 \pm 4 \mu\text{M}$ ) de NO quando comparados aos dos M $\phi$  ativados com IFN- $\gamma$  ( $23 \pm 3 \mu\text{M}$ ).

Logo, o AcM anti-IL-10 regula a síntese de NO indicando que a produção de IL-10 induzida pela interação M $\phi$ +fungo+IFN- $\gamma$  regula parcialmente a secreção de NO. O aumento de NO, entretanto, não se traduziu em aumento significativo da atividade microbicida.

Experimento realizado com o aumento da concentração de anti-IL-10 para 20  $\mu\text{g/mL}$  na culturas dos M $\phi$  apresentou resultados equivalentes aos observados com 10  $\mu\text{g/mL}$  (dados não mostrados). Assim, a neutralização de IL-10 não alterou a atividade microbicida dos M $\phi$  de camundongos B10.A.



**Figura 10:** Macrófagos alveolares de animais **B10.A** normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ ou 10  $\mu$ g/mL do AcM anti-IL-10 e infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliado o número de fungos viáveis pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e o sobrenadante do cultivo foi colhido (0,5 mL) para a dosagem de nitritos. *Grupo controle* (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), *Grupo A* (M $\phi$  tratados com anti-IL-10 antes e depois da infecção com o fungo), *Grupo B* (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), *Grupo C* (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +anti-IL-10 e novamente com o AcM após o desafio com o fungo). (\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) (\*\*)  $p < 0,001$  (++) diferença significativa quando comparado ao grupo B ( $p < 0,001$ )

### 8.1.2) Citocinas

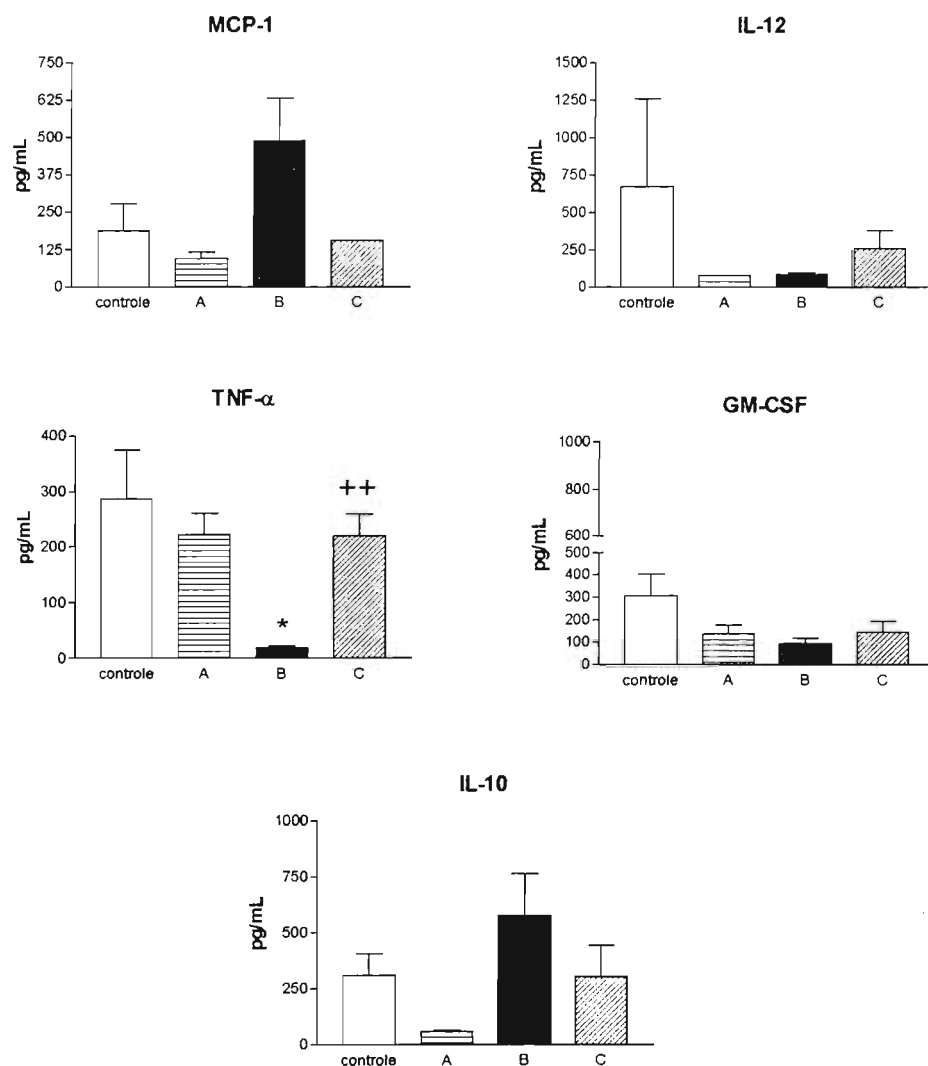
Os níveis de MCP-1, IL-12, GM-CSF e IL-10 não apresentaram diferenças significante entre os M $\phi$  infectados tratados ou não com AcM anti-IL-10 em todas as condições experimentais empregadas (Fig.11).

Pode-se observar que a ativação dos M $\phi$  com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  levou à níveis reduzidos e significativos de TNF- $\alpha$  ( $19 \pm 4$  pg/mL) quando comparado aos dos M $\phi$  controle ( $287 \pm 86,6$  pg/mL). Mais uma vez o NO parece regular negativamente a síntese de TNF- $\alpha$ .

Quando os M $\phi$  foram pré-ativados com IFN- $\gamma$  e feito o tratamento com anti-IL-10 foram produzidos  $220 \pm 40$  pg/mL de TNF- $\alpha$ . Assim, o tratamento com anti-IL-10 aumentou a síntese de TNF- $\alpha$  que foi inibida pela ação do IFN- $\gamma$ . Parece então que o IFN- $\gamma$  induz a secreção de NO que inibe a síntese de TNF- $\alpha$ ; também induz a síntese de IL-10 que controla negativamente a síntese de TNF- $\alpha$  e NO.

O experimento com dose elevada de anti-IL-10 (20  $\mu$ g/mL) também levou a produção aumentada de TNF- $\alpha$  para os M $\phi$  pré-ativados com IFN- $\gamma$  ( $4.651 \pm 284$ ) quando comparado ao grupo de M $\phi$  infectados e somente ativados com IFN- $\gamma$  ( $2.758 \pm 161$ ) (dados não mostrados).

As concentrações médias de IL-10 não sofreram alterações significativas em todos os grupos estudados (Fig. 11). Em contraste, os M $\phi$  pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$  quando tratados com dose maior do AcM apresentaram redução significativa nos níveis de IL-10 ( $535 \pm 479$  e  $550 \pm 556$ ) quando comparados aos seus respectivos controles ( $2.508 \pm 516$ ;  $2.425 \pm 311$ ).



**Figura 11:** Macrófagos alveolares de animais B10.A normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ ou 10  $\mu$ g/mL do AcM anti-IL-10 e infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliada no sobrenadante de cultivo dos macrófagos a produção de algumas citocinas, tais como: MCP-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-10. Grupo controle (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), Grupo A (M $\phi$  tratados com anti-IL-10 antes e depois da infecção com o fungo), Grupo B (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), Grupo C (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +anti-IL-10 e novamente com o AcM após o desafio com o fungo). (\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e (++) diferença significativa quando comparado ao grupo B ( $p < 0,001$ )

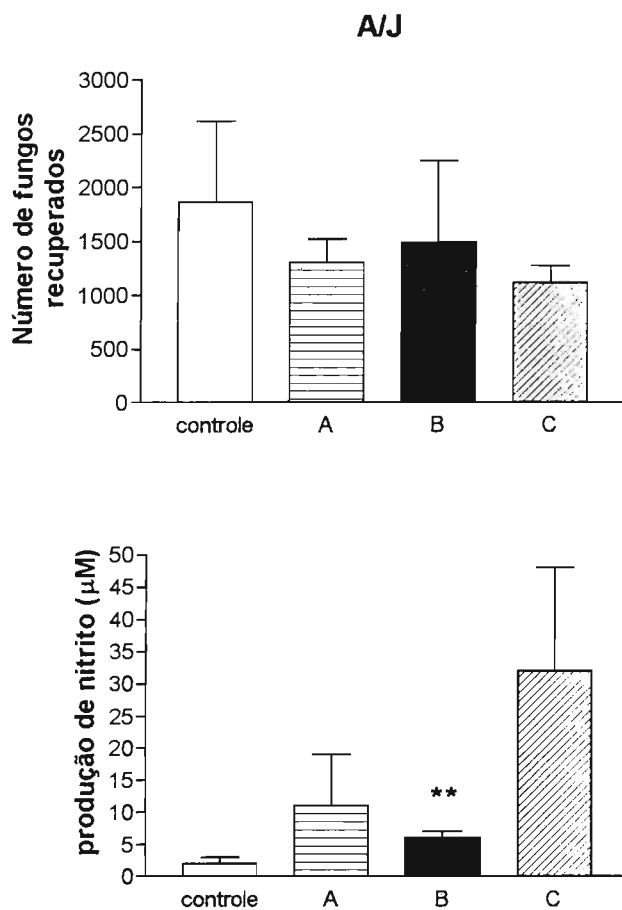
## **8.2) Mø de animais A/J**

### 8.2.1) Capacidade Fungicida e secreção de NO pelos Mø alveolares

Pode-se observar na figura (12) que o tratamento com o AcM anti-IL-10 na concentração de 10 µg/mL não alterou a capacidade fungicida de Mø ativados ou não pelo IFN-γ.

A concentração de 10.000 pg/mL de IFN-γ para estimular os Mø resultou em níveis um pouco elevados porém significativos de NO ( $6 \pm 1$  µM) quando comparado aos Mø controle ( $2 \pm 1$  µM). Entretanto, quando estes Mø previamente ativados foram tratados com o AcM anti-IL-10 apresentaram níveis de NO equivalentes aos Mø somente ativados com IFN-γ (Fig. 12). O mesmo fenômeno ocorreu no experimento realizado com a adição de 20 µg/mL de anti-IL-10 no cultivo de Mø (dados não mostrados).

Assim, estes resultados indicam que a síntese de baixas concentrações de NO pelos Mø de camundongos A/J é pouco influenciada pela presença de IL-10.



**Figura 12:** Macrófagos alveolares de animais A/J normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ou 10  $\mu$ g/mL do AcM anti-IL-10 e infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliado o número de fungos viáveis pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e o sobrenadante do cultivo foi colhido (0,5 mL) para a dosagem de nitritos. Grupo Controle (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), Grupo A (M $\phi$  tratados com anti-IL-10 antes e depois da infecção com o fungo), Grupo B (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ) e o Grupo C (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +anti-IL-10 e novamente com o AcM após o desafio com o fungo) (\*\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ )

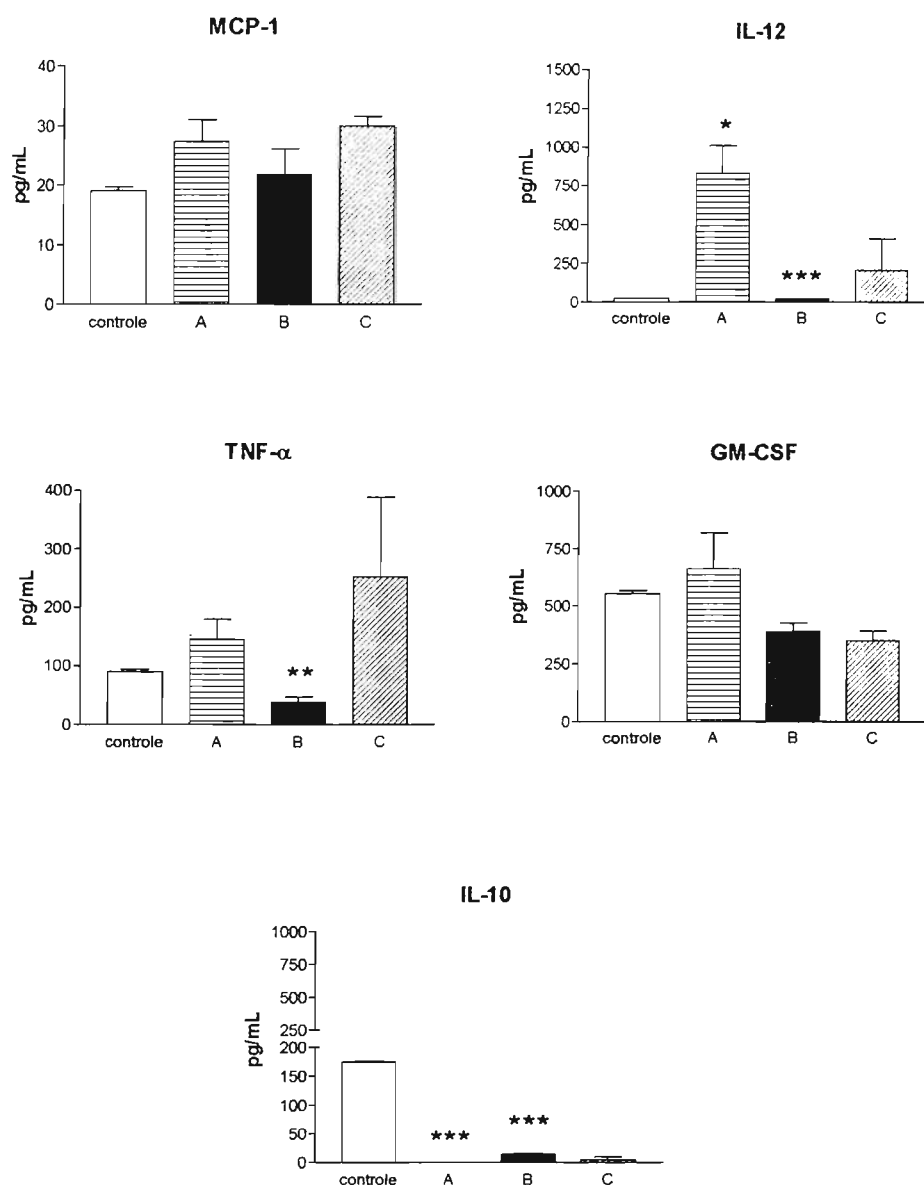


## 8.2.2) Citocinas

A análise estatística dos dados (Fig. 13) mostrou que os M $\phi$  tratados com anti-IL-10 apresentaram níveis mais elevados e significativos de IL-12 ( $833 \pm 180$  pg/mL) quando comparado aos M $\phi$  controle ( $26 \pm 1$  pg/mL).

Adicionando anti-IL-10 à cultura de M $\phi$  previamente ativados não houve alteração na concentração de IL-12 nos sobrenadantes de cultura em relação à obtida com M $\phi$  tratados por IFN- $\gamma$ .

O tratamento com 10  $\mu$ g/mL de anti-IL-10 não alterou as concentrações de TNF- $\alpha$ , GM-CSF e MCP-1. O mesmo ocorreu com a outra dose de AcM empregada. Por outro lado, o anti-IL-10 (10 e 20  $\mu$ g/mL) foi capaz de inibir a síntese de IL-10 induzida pelo fungo (Fig. 13).



**Figura 13:** Macrófagos alveolares de animais A/J normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ou 10  $\mu$ g/mL do AcM anti-IL-10 e infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliada no sobrenadante de cultivo dos macrófagos a produção de algumas citocinas, tais como: MCP-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-10. *Grupo Controle* ( $M\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), *Grupo A* ( $M\phi$  tratados com anti-IL-10 antes e depois da infecção com o fungo), *Grupo B* ( $M\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ) e o *Grupo C* ( $M\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +anti-IL-10 e novamente com o AcM após o desafio com o fungo)

(\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ )

(\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*)  $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle

## **9) Efeito do tratamento *in vitro* com o AcM anti-TGF- $\beta$ na atividade fungicida dos M $\phi$ alveolares de camundongos B10.A e A/J.**

Resultados anteriores mostraram que a adição do AcM anti-IL-10 na cultura de M $\phi$  pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$  não modulou a síntese de NO e tampouco a atividade fungicida de M $\phi$  de camundongos B10.A e A/J. Resolvemos então neutralizar outra importante citocina inibidora de M $\phi$ .

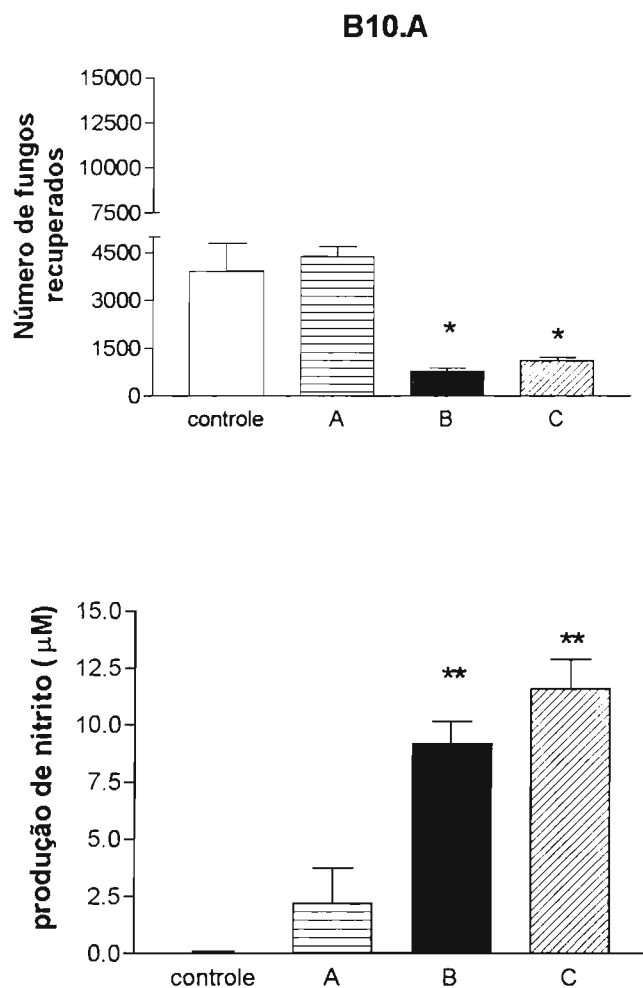
Deste modo, foi utilizado o AcM anti-TGF- $\beta$  (20  $\mu$ g/mL) como tratamento dos M $\phi$  e avaliada a sua capacidade fungicida quando infectados com o fungo Pb.

### **9.1) M $\phi$ de camundongos B10.A**

#### 9.1.1) Atividade fungicida e secreção de NO pelos M $\phi$ alveolares

Os resultados da figura (14) mostram que após 72 horas de incubação, os M $\phi$  de animais B10.A normais e não tratados com IFN- $\gamma$  quando tratados com 20  $\mu$ g do AcM anti-TGF- $\beta$  não apresentaram alterações na atividade fungicida comparados aos seus controles. Podemos observar também na figura 14 que a pré-ativação dos m $\phi$  com IFN- $\gamma$  levou a 97% de atividade fungicida.

Nossos resultados também revelaram que os M $\phi$  infectados pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$  quando tratados com o anti-TGF- $\beta$  produziram níveis de NO equivalentes aos dos controles. Deste modo, parece que o TGF- $\beta$  não modula a atividade fungicida e nem a produção de NO dos M $\phi$  de animais B10.A normais e previamente ativados com IFN- $\gamma$ .



**Figura 14:** Macrófagos alveolares de animais **B10.A** normais cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ou 20  $\mu$ g/mL do AcM anti-TGF- $\beta$  e infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliado o número de fungos viáveis pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e foi avaliada a produção de nitrito no sobrenadante de cultivo. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. *Grupo Controle* (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), *Grupo A* (M $\phi$  tratados com o AcM antes e depois da infecção com o fungo), *Grupo B* (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ) e o *Grupo C* (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +anti-TGF- $\beta$  e novamente com o AcM após o desafio com o fungo). (\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) e (\*\*)  $p < 0,001$  (quando comparado ao grupo controle).

### 9.1.2) Produção de citocinas de animais B10.A

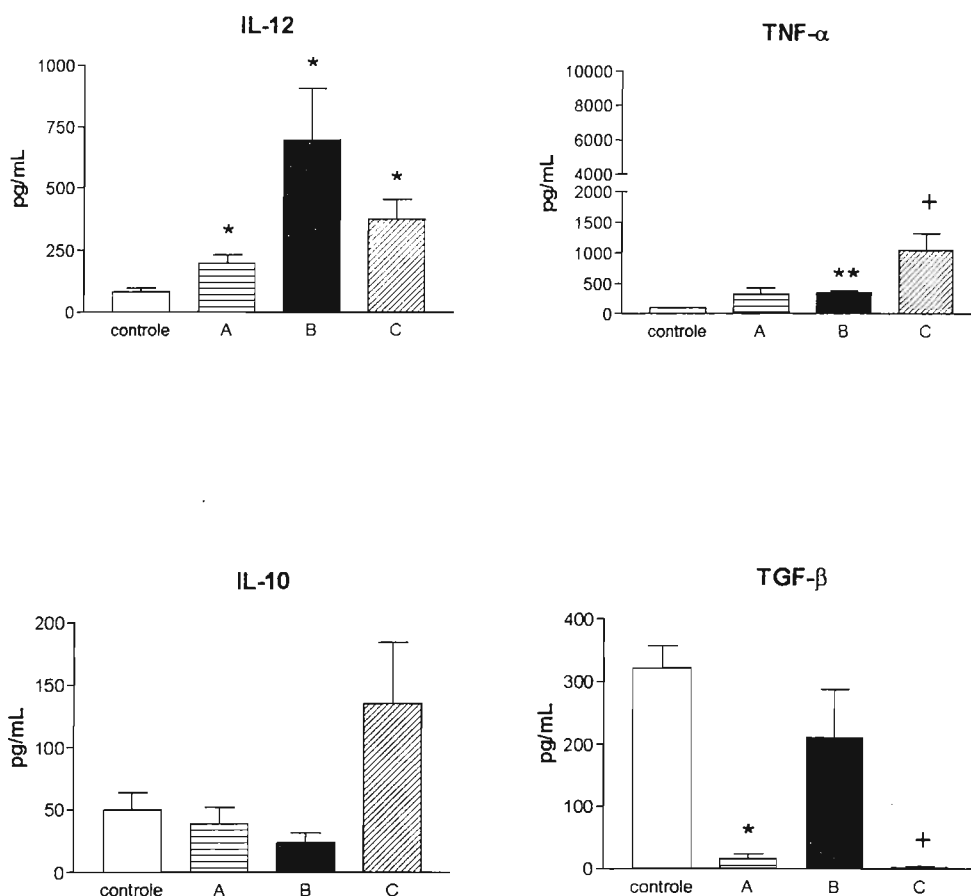
A figura 15 demonstra que níveis de IL-12 apresentaram-se significativamente mais elevados para o grupo de M $\phi$  infectados e tratados com anti-TGF- $\beta$  às 72 horas de incubação ( $197 \pm 35$ ) quando comparado ao grupo controle ( $82 \pm 16$ ).

A prévia estimulação dos M $\phi$  com IFN- $\gamma$  também levou a aumentos significativos de IL-12 ( $697 \pm 209$ ). Porém, o tratamento destes M $\phi$  com anti-TGF- $\beta$  não alterou significativamente os níveis de IL-12 ( $376 \pm 79$ ).

A produção de TNF- $\alpha$  apresentou-se elevada em M $\phi$  previamente estimulados com IFN- $\gamma$  ( $349 \pm 29$ ) comparado aos M $\phi$  controle ( $88 \pm 12$ ). A adição do anti-TGF- $\beta$  neste grupo de M $\phi$  levou à produção ainda mais elevada de TNF- $\alpha$  ( $1.042 \pm 278$ ). Deste modo, a produção de TNF- $\alpha$  pelos M $\phi$  pré-ativados com IFN- $\gamma$  é inibida por TGF- $\beta$  (Fig. 15).

Como esperado, o tratamento com anti-TGF- $\beta$  diminuiu os níveis de TGF- $\beta$  endógeno, assim como aquele estimulado por IFN- $\gamma$ .

Pudemos observar também que as concentrações médias de IL-10 não sofreram alterações significativas em todos os grupos estudados de animais B10.A (Fig. 15).



**Figura 15:** Macrófagos alveolares de animais B10.A normais cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ou 20  $\mu$ g/mL do AcM anti-TGF- $\beta$  e infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliada no sobrenadante de cultivo dos macrófagos a produção de algumas citocinas, tais como: IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10 e TGF- $\beta$ . Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. Grupo Controle (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), Grupo A (M $\phi$  tratados com o AcM antes e depois da infecção com o fungo), Grupo B (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), Grupo C (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +anti-TGF- $\beta$  e novamente com o AcM após o desafio com o fungo).

(\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ )

(\*\*)  $p < 0,001$

(+) diferença significativa quando comparado ao grupo B ( $p < 0,05$ )

## **9.2) Mø de camundongo A/J**

### 9.2.1) Atividade fungicida e secreção de NO pelos Mø alveolares

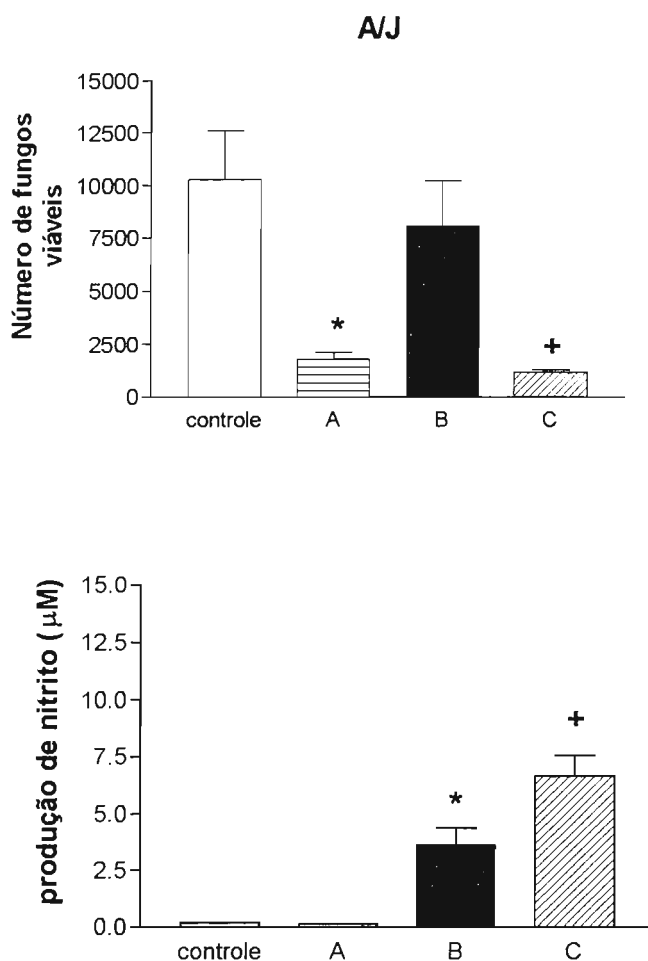
O grupo de Mø de animais A/J infectados e tratados com o AcM anti-TGF- $\beta$  (Fig.16) apresentou 83% de capacidade fungicida, com redução significativa no número de fungos recuperados ( $1.763 \pm 329$ ) quando comparado ao grupo não tratado com o AcM ( $10.273 \pm 2.329$ ).

De acordo com vários experimentos realizados, vimos que a pré-ativação dos Mø com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  de animais A/J não leva a aumentos da atividade fungicida. Entretanto, quando estes Mø previamente ativados por IFN- $\gamma$  foram tratados com o anti-TGF- $\beta$  durante o cultivo apresentaram cerca de 86% de atividade fungicida (Fig. 16).

Logo, o TGF- $\beta$  inibe a ação de Mø normais e ativados por IFN- $\gamma$  em sua capacidade fungicida frente ao Pb.

Os Mø infectados e pré-ativados com IFN- $\gamma$  apresentaram níveis relativamente elevados e significativos de NO ( $3,6 \pm 0,7$ ) quando comparados ao grupo controle ( $0 \pm 0$ ). O tratamento com o AcM levou a níveis ainda mais elevados ( $6,7 \pm 0,9$ ).

Então, a citocina TGF- $\beta$  além de impedir a atividade microbicida, abole a produção de NO pelos Mø de camundongos A/J. É interessante destacar que em Mø não ativados a neutralização de TGF- $\beta$  propicia atividade fungicida (83%), mas esta não parece ser mediada por NO, uma vez que os níveis deste mediador não se alteram com o tratamento.



**Figura 16:** Macrófagos alveolares de animais A/J normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ou 20  $\mu$ g/mL do AcM anti-TGF- $\beta$  e infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliado o número de fungos viáveis pelo método de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). O sobrenadante do cultivo foi colhido (0,5 mL) para a dosagem de nitritos. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. Grupo Controle (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), Grupo A (M $\phi$  tratados com anti-TGF- $\beta$  antes e depois da infecção com o fungo), Grupo B (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), Grupo C (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +anti-TGF- $\beta$  e novamente com o AcM após o desafio com o fungo).

(\*) diferença significativa quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ )

(+) diferença significativa quando comparado ao grupo B ( $p < 0,05$ )



### 9.2.2) Produção de citocinas:

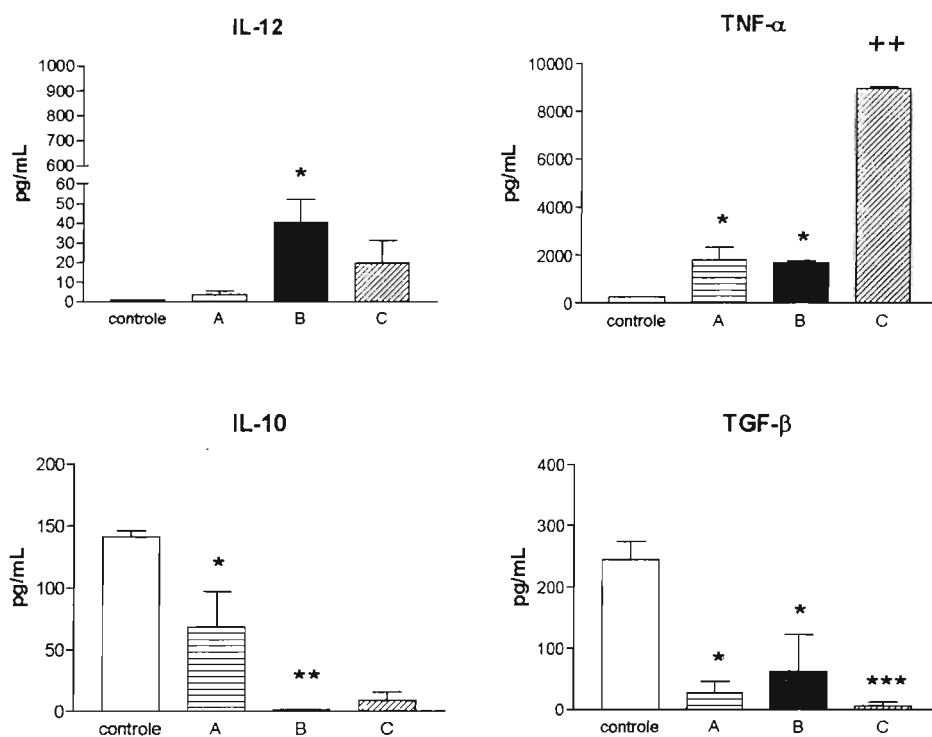
A análise estatística dos dados mostrou que o grupo de M $\phi$  pré-ativados com IFN- $\gamma$  de animais A/J produziu níveis mais elevados de IL-12 ( $40,5 \pm 12$ ). Entretanto, a adição do anti-TGF- $\beta$  na cultura de M $\phi$  pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$  não alterou a produção de IL-12 (Fig. 17).

Na figura 17 verifica-se também que os M $\phi$  de animais A/J infectados e tratados com o AcM produziram níveis mais elevados e significativos de TNF- $\alpha$  ( $1.798 \pm 522$ ) que o grupo controle ( $246 \pm 43$ ). Em concordância, os M $\phi$  previamente ativados com IFN- $\gamma$  em combinação com o AcM também apresentaram aumentos nos níveis de TNF- $\alpha$  ( $8.955 \pm 100$ ) quando comparados ao seu grupo controle ( $1.695 \pm 73$ ).

Níveis reduzidos de IL-10 foram encontrados em M $\phi$  infectados e tratados com o AcM ( $68 \pm 28$ ) quando comparado ao grupo controle ( $141 \pm 4,6$ ). Já o tratamento com o AcM no grupo de M $\phi$  pré-ativado com IFN- $\gamma$  levou a produção de níveis equivalentes de IL-10.

O tratamento com o AcM levou a inibição de TGF- $\beta$  para os grupos de M $\phi$  infectados ( $26 \pm 19$ ) quando comparado aos M $\phi$  controle ( $244 \pm 30$ ).

Níveis reduzidos de TGF- $\beta$  também foram produzidos pelos M $\phi$  pré-ativados com IFN- $\gamma$  ( $63 \pm 59$ ). Entretanto, a adição do AcM para este grupo de M $\phi$  não levou a alterações significativas.



**Figura 17:** Macrófagos alveolares de animais A/J normais foram cultivados ou não "overnight" com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e/ou 20  $\mu$ g/mL do AcM anti-TGF- $\beta$  e infectados com leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em uma proporção de 1:50. Após 72 horas de incubação foi avaliada no sobrenadante de cultivo dos macrófagos a produção de algumas citocinas, tais como: IL-12, TNF- $\alpha$ , GM-CSF e MCP-1. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 3 a 5 poços por grupo. Grupo Controle (M $\phi$  infectados com o fungo *in vitro*), Grupo A (M $\phi$  tratados com anti-TGF- $\beta$  antes e depois da infecção com o fungo), Grupo B (M $\phi$  infectados e previamente ativados com 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ ), Grupo C (M $\phi$  previamente tratados com IFN- $\gamma$ +anti-TGF- $\beta$  e novamente com o AcM após o desafio com o fungo) (\* ) p<0,05, (\*\* ) p<0,001 e (\*\*\*) p<0,0001 - diferença significativa quando comparado ao grupo controle. (++) diferença significativa quando comparado ao grupo B (p<0,001)

## **RESUMO DOS RESULTADOS**

Efeito da atividade fungicida dos Mφ alveolares de camundongos B10.A previamente ativados com IL-12 e IL-12 e a combinação das duas citocinas e infectados com o fungo em uma relação Pb - Mo de 1:50.

| <b>B10.A</b><br>(média ± erro padrão) | <b>Número de fungos recuperados</b> | <b>Atividade fungicida (%)</b> | <b>Produção de NO (µM)</b> | <b>MCP-1</b> | <b>IL-12</b> | <b>GM-CSF</b> | <b>IL-10</b> |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| Mφ + Pb                               | 1.297 ± 201                         | –                              | 1,7 ± 0,3 µM               | –            | –            | –             | –            |
| Mφ+Pb+IFN-γ (50.000pg/mL)             | 147 ± 2,5 (*)                       | 89 (*)                         | 46 ± 0,2 µM (*)            | ↓ (*)        | ↑ (*)        | –             | ↓ (*)        |
| Mφ + IFN-γ +Pb (10.000 pg/mL)         | 140 ± 0,2 (*)                       | 89 (*)                         | 26 ± 1,2 µM (*)            | –            | –            | –             | ↓ (*)        |
| Mφ + IFN-γ + Pb (2.000 pg/mL)         | 258 ± 121 (*)                       | 80 (*)                         | 1,2 ± 0,1 µM               | ↓ (*)        | –            | ↑ (*)         | –            |
| Mφ+IL-12+Pb (50.000)                  | 260 ± 5,8 (*)                       | 89 (*)                         | 16 ± 0,3 µM (*)            | ↑ (*)        | –            | –             | –            |
| Mφ + IL-12 +Pb (10.000)               | 647 ± 72 (*)                        | 59 (*)                         | 1,3 ± 0,2 µM               | –            | –            | –             | –            |
| Mφ + IL-12 + Pb (2.000)               | 533 ± 125 (*)                       | 51 (*)                         | 1,7 ± 0,1 µM               | –            | –            | –             | –            |
| Mφ + (IFN-γ+IL-12) +Pb (50.000)       | 42 ± 4,4 (*)                        | 97 (*)                         | 31 ± 0,2 µM (*)            | ↓ (*)        | –            | –             | ↓ (*)        |
| Mφ +(IFN-γ+IL-12) +Pb (10.000)        | 220 ± 40 (*)                        | 83 (*)                         | 31 ± 0,4 µM (*)            | ↓ (*)        | ↑ (*)        | –             | ↑ (*)        |
| Mφ + (IFN-γ+IL-12) +Pb (2.000)        | 53 ± 2,5 (*)                        | 96 (*)                         | 10,5 ± 0,3 µM (*)          | –            | –            | ↑ (*)         | ↑ (*)        |

(\*) diferença estatística quando comparado aos Mφ + Pb (controle)

Efeito da atividade fungicida dos Mφ alveolares de camundongos A/J previamente ativadas com IFN-γ e IL-12 e a combinação das duas citocinas e infectadas com o fungo em uma relação Pb-Mo de 1:50.

| A/J<br>(média ± erro padrão)    | Número de fungos recuperados | Atividade fungicida (%) | Produção de NO (μM) | MCP-1 | IL-12 | GM-CSF | IL-10 |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------|-------|-------|--------|-------|
| Mφ + Pb                         | 3.208 ± 980                  | -                       | 0,5 ± 0,0 μM        | -     | -     | -      | -     |
| Mφ+Pb+IFN-γ (50.000pg/mL)       | 105 ± 13 (*)                 | 97 (*)                  | 15,5 ± 0,2 μM (*)   | ↓ (*) | ↑ (*) | ↓ (*)  | -     |
| Mφ + IFN-γ +Pb (10.000 pg/mL)   | 6.750 ± 952                  | -                       | 5 ± 0,4 μM (*)      | ↓ (*) | -     | -      | -     |
| Mφ + IFN-γ + Pb (2.000 pg/mL)   | 3.708 ± 952                  | -                       | 1,3 ± 0,1 μM        | ↓ (*) | -     | -      | -     |
| Mφ+IL-12+Pb (50.000)            | 3.708 ± 480                  | -                       | 6 ± 0,2 μM (*)      | ↓ (*) | ↓ (*) | -      | ↑ (*) |
| Mφ + IL-12 +Pb (10.000)         | 6.833 ± 1.481                | -                       | 0,6 ± 0,2 μM        | ↓ (*) | ↓ (*) | ↓ (*)  | -     |
| Mφ + IL-12 + Pb (2.000)         | 6.917 ± 583                  | -                       | 0,6 ± 0,1 μM        | ↓ (*) | ↓ (*) | ↓ (*)  | -     |
| Mφ + (IFN-γ+IL-12) +Pb (50.000) | 42 ± 2,5 (*)                 | 99 (*)                  | 13 ± 0,2 μM (*)     | ↓ (*) | -     | ↓ (*)  | ↓ (*) |
| Mφ + (IFN-γ+IL-12) +Pb (10.000) | 5.720 ± 2.504                | -                       | 3,5 ± 0,4 μM (*)    | ↓ (*) | -     | -      | -     |
| Mφ + (IFN-γ+IL-12) +Pb (2.000)  | 1.875 ± 753                  | -                       | 3,3 ± 0,3 μM (*)    | ↓ (*) | ↓ (*) | ↑ (*)  | ↑ (*) |

(\*) diferença estatística quando comparado aos Mφ + Pb (controle)

**Caracterização da atividade fungicida e secretora de Mo de animais B10.A tratados ou não com AG.**

| <b>B10.A</b><br>(média ± erro padrão) | <b>Número de fungos recuperados</b> | <b>Atividade fungicida (%)</b> | <b>Produção de NO (µM)</b> | <b>MCP-1</b> | <b>IL-12</b> | <b>TNF-α</b> | <b>GM-CSF</b> | <b>IL-10</b> |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| Mφ + Pb                               | 1.222 ± 61                          | –                              | 6 ± 1 µM                   | –            | –            | –            | –             | –            |
| Mφ + AG + Pb<br>(p.p)                 | 1.012 ± 133                         | –                              | 5 ± 0 µM                   | –            | –            | –            | –             | –            |
| Mφ + IFN-γ + Pb                       | 768 ± 36<br>(**)                    | 37%<br>(**)                    | 14 ± 3 µM<br>(**)          | –            | –            | –            | –             | –            |
| Mφ + IFN-γ + AG + Pb<br>(p.p)         | 848 ± 112                           | –                              | 8 ± 1 µM                   | –            | –            | –            | –             | ↓ (+)        |

(\*) diferença estatística quando comparado aos Mφ + Pb

(+) diferença estatística quando comparado aos Mφ + IFN-γ + Pb

(p.p) tratamento dos Mφ com AG antes e depois do desafio com o fungo

**Caracterização da atividade fungicida e secretora de M $\phi$  de animais A/J tratados ou não com AG.**

| <b>A/J</b><br>(média $\pm$ erro padrão)     | <b>Número de fungos recuperados</b> | <b>Atividade fungicida (%)</b> | <b>Produção de NO (<math>\mu</math>M)</b> | <b>MCP-1</b>     | <b>IL-12</b> | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>IL-10</b>     |
|---|-------------------------------------|--------------------------------|---|------------------|--------------|--------------------------------|------------------|
| M $\phi$ + Pb                               | 943 $\pm$ 25                        | –                              | 0,3 $\pm$ 0,0 $\mu$ M                     | –                | –            | –                              | –                |
| M $\phi$ + AG + Pb<br>(p.p)                 | 940 $\pm$ 277                       | –                              | 0,4 $\pm$ 0,1 $\mu$ M                     | $\uparrow$ (***) | –            | $\downarrow$ (*)               | –                |
| M $\phi$ + IFN- $\gamma$ + Pb               | 1.143 $\pm$ 176                     | –                              | 3 $\pm$ 0,2 $\mu$ M<br>(***)              | –                | –            | –                              | $\uparrow$ (*)   |
| M $\phi$ + IFN- $\gamma$ + AG + Pb<br>(p.p) | 1.010 $\pm$ 71                      | –                              | 1 $\pm$ 0,1 $\mu$ M<br>(+++)              | –                | –            | $\downarrow$ (+++)             | $\downarrow$ (+) |

(\*) diferença estatística quando comparado aos M $\phi$  + Pb

(+) diferença estatística quando comparado aos M $\phi$  + IFN- $\gamma$  + Pb

(p.p) tratamento dos M $\phi$  com AG antes e depois do desafio com o fungo

**Caracterização da atividade fungicida e secretora de M $\phi$  de animais B10.A infectados e tratados ou não com o AcM anti-IL-10 (10  $\mu$ g/mL)**

| <u><b>B10.A</b></u>                         | <b>Número de fungos recuperados</b> | <b>Atividade fungicida (%)</b> | <b>Produção de NO (<math>\mu</math>M)</b> | <b>MCP-1</b> | <b>IL-12</b> | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>GM-CSF</b> | <b>IL-10</b> |
|---|-------------------------------------|--------------------------------|---|--------------|--------------|--------------------------------|---------------|--------------|
| M $\phi$ + Pb                               | 1.365 $\pm$ 427                     | –                              | 3 $\pm$ 1 $\mu$ M                         | –            | –            | –                              | –             | –            |
| M $\phi$ + anti-IL-10 + Pb (p.p)            | 998 $\pm$ 97                        | –                              | 6 $\pm$ 2 $\mu$ M                         | –            | –            | –                              | –             | –            |
| M $\phi$ + IFN- $\gamma$ + Pb               | 335 $\pm$ 118 (*)                   | 76% (*)                        | 23 $\pm$ 3 $\mu$ M (**)                   | –            | –            | ↓ (*)                          | –             | –            |
| M $\phi$ + IFN- $\gamma$ + anti-IL-10 (p.p) | 175 $\pm$ 70 (*)                    | 87% (*)                        | 44 $\pm$ 4 $\mu$ M (++)                   | –            | –            | ↑(++)                          | –             | –            |

(\*) diferença estatística quando comparado aos M $\phi$  + Pb

(+) diferença estatística quando comparado aos M $\phi$  + IFN- $\gamma$  + Pb

(p.p) tratamento dos M $\phi$  com AcM anti-IL-10 antes e depois do desafio com o fungo



**Caracterização da atividade fungicida de *Mφ* infectados ( $2 \times 10^3$  fungos) de animais A/J tratados ou não com o AcM anti-IL-10 (10 µg/mL)**

| A/J<br>(média ± erro padrão)          | Número de<br>fungos<br>recuperados | Atividade<br>fungicida (%) | Produção de NO<br>(µM) | MCP-1 | IL-12   | TNF-α  | GM-<br>CSF | IL-10   |
|---------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------|-------|---------|--------|------------|---------|
| Mφ + Pb                               | 1.863 ± 753                        | –                          | 2 ± 1 µM               | –     | –       | –      | –          | –       |
| Mφ + anti-IL-10 + Pb<br>(p.p)         | 1.308 ± 213                        | –                          | 11 ± 8 µM              | –     | ↑(*)    | –      | –          | ↓ (***) |
| Mφ + IFN-γ + Pb                       | 1.493 ± 754                        | –                          | 6 ± 1 µM<br>(*)        | –     | ↓ (***) | ↓ (**) | –          | ↓ (***) |
| Mφ + IFN-γ + anti-IL-10<br>+ Pb (p.p) | 1.118 ± 162                        | –                          | 32 ± 16 µM             | –     | –       | –      | –          | –       |

(\*) diferença estatística quando comparado aos Mφ + Pb (p.p) tratamento dos Mφ com AcM anti-IL-10 antes e depois do desafio com o fungo

**Caracterização da atividade fungicida de *M. infestans* de animais B10.A tratados ou não com o AcM anti-TGF- $\beta$  (20  $\mu$ g/mL)**

| <b>B10.A</b><br>(média $\pm$ erro padrão)               | Número de fungos recuperados | Atividade fungicida (%) | Produção de NO ( $\mu$ M) | IL-12          | TNF- $\alpha$   | IL-10 | TGF- $\beta$     |
|---|------------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|-------|------------------|
| M $\phi$ + Pb   | 3.900 $\pm$ 900              | –                       | 0 $\pm$ 0 $\mu$ M         | –              | –               | –     | –                |
| M $\phi$ + anti-TGF- $\beta$ + Pb (p.p)                 | 4.373 $\pm$ 315              | –                       | 2 $\pm$ 1,5 $\mu$ M       | $\uparrow$ (*) | –               | –     | $\downarrow$ (*) |
| M $\phi$ + IFN- $\gamma$ + Pb                           | 782 $\pm$ 111 (*)            | 97 (*)                  | 9 $\pm$ 0,9 $\mu$ M (**)  | $\uparrow$ (*) | $\uparrow$ (**) | –     | –                |
| M $\phi$ + IFN- $\gamma$ + anti-TGF- $\beta$ + Pb (p.p) | 1.117 $\pm$ 84 (*)           | 71 (*)                  | 12 $\pm$ 1,3 $\mu$ M (**) | –              | $\uparrow$ (+)  | –     | $\downarrow$ (+) |

(\*) diferença estatística quando comparado aos M $\phi$  + Pb

(+) diferença estatística quando comparado aos M $\phi$  + IFN- $\gamma$  + Pb

(p.p) tratamento dos M $\phi$  com AcM anti-TGF- $\beta$  antes e depois do desafio com o fungo

Caracterização da atividade fungicida de *Mφ* infectados de animais A/J tratados ou não com o AcM anti-TGF- $\beta$  (20  $\mu$ g/mL)

| <u>A/J</u><br>(média $\pm$ erro padrão)                 | Número de fungos recuperados | Atividade fungicida (%) | Produção de NO ( $\mu$ M) | IL-12          | TNF- $\alpha$    | IL-10             | TGF- $\beta$     |
|---|------------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------|------------------|-------------------|------------------|
| M $\phi$ + Pb   | 10.273 $\pm$ 2.329           | -                       | 0 $\pm$ 0 $\mu$ M         | -              | -                | -                 | -                |
| M $\phi$ + anti-TGF- $\beta$ + Pb (p.p)                 | 1.763 $\pm$ 329 (*)          | 83 (*)                  | 0 $\pm$ 0 $\mu$ M         | -              | $\uparrow$ (*)   | $\downarrow$ (*)  | $\downarrow$ (*) |
| M $\phi$ + IFN- $\gamma$ + Pb                           | 8.075 $\pm$ 2.136            | -                       | 3,6 $\pm$ 0,7 $\mu$ M (*) | $\uparrow$ (*) | $\uparrow$ (*)   | $\downarrow$ (**) | $\downarrow$ (*) |
| M $\phi$ + IFN- $\gamma$ + anti-TGF- $\beta$ + Pb (p.p) | 1.156 $\pm$ 107 (+)          | 86 (+)                  | 6,7 $\pm$ 0,9 $\mu$ M (+) | -              | $\uparrow$ (+++) | -                 | -                |

(\*) diferença estatística quando comparado aos M $\phi$  + Pb

(+) diferença estatística quando comparado aos M $\phi$  + IFN- $\gamma$  + Pb

(p.p) tratamento dos M $\phi$  com AcM anti-TGF- $\beta$  antes e depois do desafio com o fungo

## **DISCUSSÃO**

## DISCUSSÃO

Normalmente a infecção por fungos nas micoses sistêmicas ocorre através das vias respiratórias (Bustamante et al., 1985; Restrepo, et al., 1986; Mc Ewen et al., 1987; Miller et al., 1991) e a ação em concerto das respostas imune inata e adaptativa do pulmão é o fenômeno mais importante para a defesa do hospedeiro.

Os macrófagos, neutrófilos e as células “Natural Killer” (NK) são as células centrais da imunidade natural. Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares presente em grandes quantidades no sangue e ausentes em tecidos normais. Eles migram rapidamente para os tecidos inflamados ou infectados.

No trabalho de mestrado mostramos de maneira bastante clara que os leucócitos polimorfonucleares (PMN) são células imunoprotetoras na PCM pulmonar, mas a sua ação depende do padrão genético do hospedeiro. Demonstramos também que estas células participam muito ativamente dos mecanismos protetores da imunidade natural, mas não na fase de imunidade adquirida contra o fungo Pb (Pina, 2002).

Em uma infecção, o número de Mø no tecido afetado aumenta muito em virtude da migração de monócitos do sangue para o local. Essa migração se dá mais tardiamente que a dos neutrófilos.

Os Mø são células centrais da imunidade natural e adquirida e são responsáveis por numerosos processos imunológicos, metabólicos e inflamatórios, tanto em condições normais como patológicas. Além de suas funções primárias, como a fagocitose, os Mø podem produzir vários produtos secretórios, incluindo citocinas que mobilizam outras células residentes no tecido (Gordon, 1998).

Estudos com animais de experimentação mostram que os Mø alveolares exercem papel importante como primeira linha de defesa do pulmão contra o

fungo *C. neoformans* (Weinberg et al., 1987; Miller et al., 1991). Além disso, estudos mostram também que células PMN e monócitos podem matar *C. neoformans in vitro* (Karaovi et al., 1977 e Levitz et al., 1991), principalmente quando ativados com GM-CSF (Nassar et al., 1994).

Trabalho recente de Vonk et al. (2002) mostrou que a capacidade dos Mø para ingerir os blastoconídios de *C. albicans* superou significativamente a capacidade das células PMN. Entretanto, os leucócitos PMN apresentaram maior capacidade fungicida quando comparados aos Mø. Vale a pena ressaltar que outros trabalhos confirmaram este fenômeno (Baccarini et al., 1983; Vechiarelli et al., 1985).

A ativação dos Mø deve ser controlada e seguida de um processo de desativação para prevenir efeitos danosos provocados pela produção de mediadores que exacerbam a resposta inflamatória tornando-a lesiva aos tecidos. Kubota et al. (2001) estudaram o comportamento dos Mø alveolares durante a candidíase disseminada. Camundongos BALB/c foram depletados de Mø alveolares 2 horas antes da infecção intravenosa com  $10^7$  leveduras de *C. albicans*. A depleção levou às 24 horas pós-infecção a aumento do número de fungos no pulmão, acompanhado da diminuição de proteína inflamatória-2 de Mø (MIP-2) e da atividade de mieloperoxidase (MPO). Estes animais depletados sobreviveram por mais tempo quando comparado aos animais controle devido à diminuição do afluxo de células mononucleares e polimorfonucleares para o sítio da infecção.

Além de suas funções primárias como a fagocitose, os Mø alveolares podem produzir uma gama de mediadores envolvidos com a resposta inflamatória. De fato, Mø podem recrutar os neutrófilos ao local da infecção através de mediadores como as quimiocinas. Kooguchi et al. (1998) utilizando lipossomos contendo clodronato dissódico, induziram a eliminação de 95% dos Mø alveolares de camundongos infectados por via i.t. com *Pseudomonas aeruginosa*. A deleção ocasionou diminuição nos níveis de quimiocinas, como a MIP-2 e CINC/GRO ("Cytokines-Induced Neutrophil Chemoattractant"), responsáveis pelo recrutamento dos neutrófilos e ocasionou o agravamento da

doença. Estes dados estão de acordo com diversos estudos que sugerem que a presença precoce de neutrófilos no local da infecção tem um importante papel na prevenção de infecções fúngicas, principalmente nas fases iniciais da doença (Romani et al., 1997; Pina, 2002).

Na resistência ao Pb, Mø peritoneais residentes fagocitam células leveduriformes do fungo, mas não são capazes de matá-las. Entretanto, Mø peritoneais ou pulmonares murinos ou mesmo monócitos tratados com IFN- $\gamma$  são capazes de inibir a replicação das leveduras e esta inibição pode ser abolida com a adição de anticorpos contra a citocina IFN- $\gamma$  (Brummer et al., 1993; Moscardi-Bachi et al., 1994).

Em nosso trabalho estudamos a atividade fungicida dos Mø alveolares de camundongos susceptíveis e resistentes ao Pb. Os Mø foram previamente ativados ou não com diversas concentrações de citocinas do tipo 1 (IFN- $\gamma$  e IL-12) e infectados em uma relação Pb-Mø de 1:50.

Este trabalho demonstrou a grande ativação dos Mø alveolares de camundongos B10.A com citocinas do tipo 1. As doses de 50.000, 10.000 e 2.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas citocinas levaram a grande atividade fungicida dos Mø e produção de níveis significantes de NO. Pôde-se notar um efeito mais marcante do IFN- $\gamma$  do que da IL-12. De maneira diferente, os Mø de camundongos A/J exercem atividade fungicida somente quando ativados por 50.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  e em combinação com IL-12.

A literatura é plena de trabalhos que afirmam que a ativação da NO-sintase só ocorre com a ação concomitante de dois estímulos. Entretanto, há trabalhos na literatura que mostram que o IFN- $\gamma$  sozinho pode ativar Mø murinos (Liew et al., 1991; Green et al., 1990; Verdot et al., 1996) para produzir altos níveis de NO (Cooper et al., 1995; O'Brien et al., 1996).

Frankova & Zidek (1998) estudaram a produção de NO pelos Mø peritoneais de camundongos C57BL/6 tratados com diferentes concentrações de IFN- $\gamma$  (2,5; 10; 25; 50 e 100 U/mL) e TNF- $\alpha$  (100; 250; 500; 1000 e 2000 pg/mL). Os resultados demonstraram aumento gradativo da produção de NO pelos Mø

peritoneais conforme o aumento da concentração de IFN- $\gamma$  empregada. Em contraste, M $\phi$  ativados com a citocina TNF- $\alpha$ , mesmo em elevadas concentrações, foram ineficazes para a produção de NO.

Em nosso trabalho mostramos que os M $\phi$  de animais A/J mesmo ativados com altas doses de IFN- $\gamma$  (50.000 e 10.000 pg/mL) não apresentaram níveis tão elevados de NO ( $15,5 \pm 0,24$  e  $5,15 \pm 0,45$   $\mu$ M) como observado com células de animais B10.A ( $46 \pm 0,24$  e  $26 \pm 1,26$   $\mu$ M).

No modelo de infecção i.p., o nosso grupo demonstrou comportamentos diferentes de M $\phi$  peritoneais infectados *in vitro* com o Pb. Assim, M $\phi$  de animais resistentes produzem altos níveis de TNF- $\alpha$  porém a secreção de NO é reduzida. Ao contrário, M $\phi$  de camundongos susceptíveis estimulados por leveduras vivas do fungo produzem níveis elevados de NO e baixos ou praticamente ausentes de TNF- $\alpha$ . Como o NO tem dupla função na PCM (ativa a atividade fungicida dos M $\phi$ , mas induz supressão da linfoproliferação), foram realizados experimentos de depleção *in vivo* de NO. A doença mostrou-se mais grave em ambas as linhagens. Além disso, utilizando camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes para o gene de NO-sintase 2 verificou-se que a ausência de síntese de NO é acompanhada por infecção muito grave com lesões disseminadas e ricas em fungos em ativo brotamento em vários órgãos (Nascimento et al., 2002).

Nossos experimentos realizados com células na razão 1:50 demonstraram comportamentos bastante diversos de M $\phi$  alveolares normais de animais susceptíveis e resistentes ao Pb. Este dado é original e explica resultados inesperados observados anteriormente no modelo de infecção i.t. pelo Pb (Cano et al., 1995).

Na descrição deste modelo em 1995, verificamos que camundongos B10.A (susceptíveis) ao início da infecção (até 8 semanas pós-infecção) restringem o crescimento fúngico no pulmão enquanto que camundongos resistentes permitem a multiplicação intrapulmonar de leveduras. Esse quadro só é revertido após oito semanas, quando camundongos A/J começam a controlar a multiplicação fúngica no pulmão e não permitem o crescimento do patógeno no baço e fígado; ao contrário, na oitava semana pós-infecção camundongos B10.A perdem o controle do crescimento fúngico pulmonar e permitem a disseminação para fígado e baço. Estes fenômenos mais tardios parecem ser manifestações da imunidade celular



adquirida altamente eficiente nos camundongos A/J que desenvolvem evidentes reações de HTT enquanto que camundongos B10.A mostram-se anérgicos nestas reações.

Um Mø ativado difere do residente em vários aspectos, como mudanças morfológicas, expressão de receptores na superfície celular, aumento de reagentes oxidativos e nitrogenados, aumento da atividade microbicida e aumento na produção de citocinas, tais como: IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF- $\alpha$ . Em geral, Mø ativados fagocitam e matam microorganismos mais eficientemente que Mø residentes (Langermans et al., 1992).

Há trabalhos na literatura que demonstram que Mø alveolares ativados por LPS não possuem a capacidade de síntese de IL-10 (Salez et al., 2001). Esta inibição de síntese de IL-10 foi atribuída à proteína surfactante-A (PSA) presente nos alvéolos (Chabot et al., 2003). Porém, monócitos recém recrutados para os alvéolos têm capacidade de síntese de IL-10 (durante os três primeiros dias) e inativam esta habilidade ao interagir com a PSA dos alvéolos (Salez et al., 2001).

Em nosso trabalho verificamos que os Mø alveolares de animais A/J infectados com 2.000 fungos (Mø controle) apresentaram níveis mais elevados de IL-10 do que os B10.A. Para estes Mø não foram observadas atividade fungicida e nem produção de NO. Talvez em camundongos A/J exista maior número de monócitos recém migrados do que nos alvéolos de camundongos B10.A justificando a maior produção de IL-10.

Os experimentos que utilizaram várias doses de IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas citocinas também revelaram diferenças significantes quanto ao nível de citocinas produzidas pelos Mø de ambas as linhagens.

Os Mø de camundongos B10.A infectados com 2.000 fungos e ativados com IFN- $\gamma$  (50.000 e 10.000 pg/mL) apresentaram 80 e 89% de atividade fungicida acompanhada de níveis reduzidos de IL-10 e elevadas concentrações de NO e IL-12. O tratamento com várias concentrações de IL-12 não levou a nenhuma diferença significativa nos níveis de todas as citocinas quando comparado aos controles, exceto a estimulação com 50.000 pg/mL que levou ao inesperado aumento de MCP-1. A combinação de IFN- $\gamma$  + IL-12 em alta dose para

estimular previamente os Mø levou a 97% de atividade fungicida, níveis elevados de NO e níveis reduzidos de IL-10 e MCP-1.

O tratamento dos Mø de animais A/J também revelou resultados interessantes. A dose de 50.000 pg/mL de IFN- $\gamma$  levou a níveis reduzidos de MCP-1, GM-CSF e níveis elevados de IL-12 acompanhados de 97% de atividade fungicida e produção de NO. Para as outras doses (10.000 e 2.000 pg/mL), não ocorreram diferenças significativas na produção de citocinas, exceto a supressão de MCP-1 quando comparado aos Mø controle.

Quando a estimulação foi feita com diversas concentrações de IL-12, os Mø de A/J produziram níveis reduzidos de MCP-1, GM-CSF e de IL-12 concomitantes com níveis significativamente elevados da citocina IL-10. Este novo balanço de citocinas que parece privilegiar a ação da IL-10 não induziu quantidades aumentadas de NO nem atividade fungicida dos Mø.

É curioso como os Mø de animais A/J estimulados com as diversas concentrações de IFN- $\gamma$ , IL-12 e a combinação das duas levaram à supressão da quimiocina MCP-1 após 72 horas de incubação quando comparados com os Mø controle. Em Mø de animais B10.A foi observada a diminuição da quimiocina MCP-1 quando estimulados com altas doses de IFN- $\gamma$  e em combinação com IL-12.

A quimiocina MCP-1 é produzida por uma variedade de células que estimulam o recrutamento de monócitos e células T para um compartimento inflamatório, e é importante em modelos experimentais de formação de granulomas (Flory et al., 1993).

Acredita-se que mecanismo de produção reduzida de MCP-1 para os Mø infectados e pré-ativados com IFN- $\gamma$  deve-se ao aumento dos níveis de NO produzidos por esses Mø. Em concordância, o trabalho do grupo de Raychaudhuri et al. (1999) demonstrou que o NO estimula a ativação de I $\kappa$ B, um fator inibidor de NF- $\kappa$ B, diminuindo assim a atividade desse fator de transcrição para a síntese de quimiocinas. Com isso, o recrutamento celular para o sítio da infecção estaria

prejudicado pela produção exacerbada de NO, com posterior redução na formação de granulomas no decorrer da doença.

Wu He et al. (2003) resolveram investigar a produção de MCP-1 no pulmão de ratos durante vários estágios de infecção com *C. neoformans*. A produção da MCP-1 no sobrenadante de pulmão esteve elevada durante o primeiro e segundo mês de infecção. Traynor et al. (2002) também mostraram a importância da quimiocina MCP-1, quando camundongos deficientes em CCR-2 (receptor para MCP-1) exibiram deficiência no recrutamento de monócitos em resposta à criptococose.

Analisando os nossos dados, observamos que os níveis de MCP-1 produzidos por Mø de camundongos B10.A infectados com 2.000 fungos e sem nenhuma prévia estimulação com citocinas apresentaram-se elevados ( $319 \pm 55$  pg/mL) quando comparados com os níveis obtidos com Mø de animais A/J ( $7,0 \pm 0,041$  pg/mL). Estes resultados nos levam a supor que os Mø de camundongos B10.A têm a possibilidade de recrutar grande número de células inflamatórias na tentativa de conter a multiplicação do Pb ao início da infecção pulmonar. Um grande afluxo inicial de células inflamatórias para o pulmão pode ser eficiente quanto à contenção da multiplicação do Pb, entretanto pode levar à lesão do parênquima pulmonar.

Estudos recentes *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a citocina IL-12 exerce um papel importante na defesa imune do hospedeiro contra a *Micobacterium avium* e a deficiência desta citocina está associada com a progressão acelerada da doença (Castro et al., 1995; Bermudez et al., 1995). Wagner et al. (2002) investigaram se a infecção por *M. avium* dos Mø humanos *in vitro* causaria a produção de IL-12 e se a sua estimulação com o IFN- $\gamma$  também levaria à produção de IL-12. Os resultados mostraram que os Mø estimulados e infectados com a bactéria durante 24, 48 e 72 horas apresentaram grande produção de IL-12 quando comparados aos Mø infectados e não estimulados com o IFN- $\gamma$ .

De maneira semelhante ao trabalho de Wagner et al. (2002), os nossos resultados também mostraram níveis elevados de IL-12 pelos Mø de animais

B10.A e A/J infectados com o fungo e estimulados com IFN- $\gamma$  nas concentrações de 50.000 pg/mL. É importante destacar que, os M $\phi$  de animais B10.A produzem níveis bem mais elevados desta citocina quando comparados aos M $\phi$  de animais A/J (figuras 15 e 17).

A combinação das duas citocinas (IL-12 + IFN- $\gamma$ ) na concentração de 50.000 pg/mL para ativar os M $\phi$  de ambas as linhagens apresentou resultados muito interessantes. Foi possível detectar diminuição de IL-10 e MCP-1, aumento da produção de NO e diminuição de fungos recuperados quando comparado aos M $\phi$  controle. Assim, IL-10 e MCP-1 parecem ser marcadores negativos da atividade fungicida.

De maneira semelhante, o trabalho de Hogaboam et al. (1997) demonstrou que o NO pode agir como um modulador da produção de citocinas, pois a sua inibição leva a aumentos de IL-4, IL-10 e MCP-1.

Estudos na PCM mostram que altos níveis de NO podem exercer uma ação inibitória na produção de TNF- $\alpha$ , uma importante citocina no desenvolvimento da resposta imune do tipo Th1. Tal ação leva à associação dos altos níveis de NO e susceptibilidade ao Pb (Nascimento et al., 2002).

Sabe-se que o NO inibe a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais vasculares, prejudicando deste modo o extravasamento de leucócitos da luz do vaso para o tecido lesado (De Caterina et al., 1995; Cayatte et al., 1997). A presença de TNF- $\alpha$  estimula a expressão dessas moléculas, aumentando assim o recrutamento celular responsável para a formação de granulomas (Hamacher et al., 1994; Resnick et al., 1993).

Trabalho desenvolvido por Parise-Fortes et al. (2000) mostrou que M $\phi$  peritoneais de hamsters infectados pela via intratesticular com leveduras de Pb durante 16 semanas apresentaram aumento na produção de TNF- $\alpha$ . Postulou-se que o papel do TNF- $\alpha$  na PCM de hamsters envolve não somente o aumento de resistência, mas também a aumento da patogenicidade.

Trabalho elegante de Ogle et al. (1994) mostrou que M $\phi$  alveolares de ratos produzem mais TNF- $\alpha$  do que outras populações celulares tais como células de Kupffer, M $\phi$  peritoneais e esplênicos. Níveis elevados de TNF- $\alpha$  também foram

detectados em sobrenadantes de monócitos de pacientes com PCM (Calvi et al., 2003). Neste trabalho, os monócitos de pacientes quando ativados com 1000 U/mL de IFN- $\gamma$  apresentaram aumento da atividade fungicida contra a cepa virulenta (Pb18) e avirulenta (Pb265) do fungo e apresentaram no sobrenadante elevadas concentrações de TNF- $\alpha$  após 18 horas de incubação. Estes mesmos autores também estudaram a importância do TNF- $\alpha$  no mecanismo fungicida de M $\phi$  contra o Pb. Os M $\phi$ , além de serem estimulados com IFN- $\gamma$  e desafiados com o fungo, foram acrescidos de um AcM anti-TNF- $\alpha$  na cultura de células. Surpreendentemente, os monócitos infectados apresentaram baixa atividade fungicida e um valor elevado de fungos recuperados. Postulou-se então, que o TNF- $\alpha$  tem grande participação no mecanismo de "killing" do fungo Pb por M $\phi$  humanos.

Muitos trabalhos indicam que o TNF- $\alpha$  ativa M $\phi$  peritoneais após a pré-ativação com IFN- $\gamma$ , resultando no efeito microbicida contra *Listeria monocytogenes* (Langermans et al., 1992), *Toxoplasma gondii* (Langermans et al., 1992), *L. major* (Greem et al., 1990) e *H. capsulatum* (Wu Hsieh et al., 1992).

De acordo com todos esses trabalhos citados anteriormente, fica evidente a participação fundamental do TNF- $\alpha$  na PCM. Nossos resultados mostram que os M $\phi$  alveolares de camundongos A/J são bons produtores de TNF- $\alpha$  quando comparados aos de animais B10.A. A produção elevada de NO inibe a síntese de TNF- $\alpha$  apenas para os M $\phi$  alveolares de animais susceptíveis. Este resultado está de acordo com o trabalho de Nascimento et al. (2002), que também mostrou inibição desta citocina pelos M $\phi$  peritoneais quando em altos níveis de produção de NO.

Em nosso trabalho pudemos verificar que os M $\phi$  normais de B10.A e A/J ( $1 \times 10^5$ /poço) quando infectados *in vitro* com  $4 \times 10^3$  leveduras por 2 horas não conseguiram inibir a replicação do fungo durante 72 horas de incubação e a atividade fungicida e fungistática dos M $\phi$  alveolares foram ineficazes para esta relação fungo e M $\phi$  de 1:25 (dados não mostrados).

Quando a infecção dos Mø foi realizada em uma relação de 1:50, ou seja, ( $2 \times 10^3$  leveduras para  $1 \times 10^5$  Mø) pudemos verificar atividade fungistática dos Mø de animais A/J e principalmente dos camundongos B10.A.

É possível que a molécula gp43 esteja envolvida no mecanismo de escape do Pb das atividades fungicidas ou fungistáticas na infecção *in vitro* com os Mø alveolares.

Trabalho desenvolvido por Popi et al. (2002) explicou um pouco mais a influência da molécula gp-43 na interação *in vitro* com os Mø. Os resultados mostraram que o índice de atividade fungicida dos Mø peritoneais de camundongos B10.A e A/Sn contra o fungo esteve reduzida quando foi adicionada a glicoproteína gp-43 em diferentes concentrações (25, 50, 75, 100 e 150 µg/mL). Assim, esse antígeno, grande indutor da produção de anticorpos, teria um efeito desativador sobre os Mø.

Considerando que *in vivo* os Mø não entram em contato com IFN- $\gamma$  antes de a infecção ocorrer, analisamos um outro protocolo experimental onde a infecção com o fungo precede o processo de ativação por IFN- $\gamma$  (dados não apresentados). Assim, os Mø foram incubados com o fungo (relação 1:50) e depois estimulados com IFN- $\gamma$ .

Os resultados mostram que os Mø de B10.A continuam apresentando grande atividade fungicida (89 e 90%) quando tratados com 50.000 e 10.000 pg/mL de IFN- $\gamma$ . Já os Mø de animais A/J não apresentam atividade fungicida quando tratados com IFN- $\gamma$  em todas as concentrações.

Em conclusão, pudemos observar que os Mø de ambas as linhagens tratados com dose alta de IFN- $\gamma$  antes ou depois do desafio com o fungo apresentaram produção aumentada de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO. Há, entretanto diferenças marcantes quanto à concentração das citocinas e NO quando os resultados de camundongos A/J são comparados com os de B10.A. Assim, Mø de camundongos B10.A são bons produtores de IL-12 enquanto que os de A/J o são em relação a TNF- $\alpha$  e IL-10.

A IL-12 é uma citocina importante de resposta imune inata, pois é capaz de ativar células inflamatórias, mas também é potente direcionador e ativador da resposta adquirida do tipo Th1.

A IL-12 é essencial na defesa contra patógenos intracelulares, tais como *Legionella pneumophyla* (Bhardwaj et al., 1996; Cooper et al., 1995; Heinzl et al., 1993; Nash et al., 1988). Esta citocina exerce papel importante no desenvolvimento na imunidade celular mediada por células Th1 contra diversos patógenos (Hsieh et al., 1993), levando à produção de IFN- $\gamma$  (Trinchieri et al., 1993), que pode ativar M $\phi$  e monócitos a inibir o crescimento de *L. pneumophyla* (Bhardwaj et al., 1986; Cooper et al., 1995; Hsieh et al., 1993; Nash et al., 1988).

Na PCM experimental, mostrou-se que camundongos nocauteados da citocina IL-12 quando infectados pela via i.t. com leveduras viáveis do Pb apresentaram doença mais grave, com aumento de fungos no pulmão e grande disseminação para o fígado e baço. A análise histopatológica confirmou a gravidade da doença e mostrou lesões não organizadas com numerosos fungos no pulmão (Deepe et al., 2000). De acordo este trabalho, acreditamos que a falta da citocina IL-12 não estimula as células NK à produção de IFN- $\gamma$ , que é uma citocina de grande importância na PCM (Brummer et al., 1994; Cano et al., 1998; Souto et al., 2000) e desta forma os M $\phi$  tornam-se menos ativados e com baixa produção de NO.

Em nossos resultados os M $\phi$  alveolares de animais B10.A e não de A/J, são grandes produtores da citocina IL-12 e facilmente ativados por IFN- $\gamma$ . Assim, os M $\phi$  produzem níveis elevados de NO e por consequência dessa ativação, a morte do fungo.

Para avaliar a importância do NO na capacidade fungicida dos M $\phi$  alveolares de camundongos resistentes e principalmente dos susceptíveis utilizamos outro protocolo experimental.

Os M $\phi$  infectados (relação levedura-M $\phi$  de 1:50) foram previamente ativados ou não com IFN- $\gamma$  em combinação com AG (inibidor de NO) na concentração de 1mM/mL. Nossos resultados revelaram que o acréscimo da AG na cultura de M $\phi$  de animais B10.A aboliu a capacidade fungicida aumentada de

Mø ativados por IFN- $\gamma$ . Nos grupos tratados com AG os resultados de UFC foram intermediários aos dois controles (M $\phi$ +Pb e M $\phi$ +Pb+IFN- $\gamma$ ) indicando o efeito inibidor da AG na atividade fungicida. Resultado equivalente foi obtido com relação à síntese de NO. Pode-se concluir que para camundongos B10.A a síntese de NO induzida por IFN- $\gamma$  é importante para os mecanismos fungicidas de Mø alveolares.

Quando as citocinas foram estudadas observou-se com Mø normais uma tendência a aumento de TNF- $\alpha$  e com Mø ativados por IFN- $\gamma$  uma concomitante diminuição de IL-10 induzida pela AG, o que explicaria o resultado intermediário de número de fungos obtido neste grupo.

Esse achado é algo semelhante ao trabalho de Nascimento et al (2002) que utilizaram o modelo de infecção i.p. de Pb em animais resistentes e susceptíveis e verificaram que o uso da AG *in vitro* aumentava expressivamente a produção de TNF- $\alpha$  por Mø de animais susceptíveis. Concluíram que o NO inibia a produção de TNF- $\alpha$  que é essencial para o controle da disseminação do Pb (Souto et al., 2001).

Trabalho de Hogaboam et al. (1998) mostra que o NO também age como um modulador da produção de citocinas, pois a sua inibição leva a aumentos de IL-4, IL-10 e MCP-1. Camundongos tratados com L-NAME e AG apresentaram intenso granuloma com grande deposição de colágeno e níveis elevados de IL-4, IL-10, MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  e níveis reduzidos de eotaxina e IL-12. Este trabalho mostrou que o NO regula a deposição da matriz extracelular no granuloma pulmonar através da modulação de citocinas e quimiocinas.

Os Mø infectados de animais resistentes e pré-ativados com IFN- $\gamma$  produzem quantidades bastante pequenas de NO. Quando tratados com IFN- $\gamma$  e AG (1 mM) apresentaram, entretanto, níveis ainda mais reduzidos e significativos na produção de NO. A capacidade fungicida desses Mø se manteve inalterada quando comparada ao grupo de Mø controle, mais uma vez demonstrando a pequena habilidade de Mø de camundongos de animais resistentes em causar a morte do Pb. Os baixos níveis de NO produzidos não são suficientes para matar o fungo e a inibição pela AG não altera este quadro.



A análise da síntese de citocinas revelou aumentos expressivos de TNF- $\alpha$  em M $\phi$  pré-ativados com IFN- $\gamma$  e tratados com AG. Houve também diminuição de síntese de IL-10. Este resultado é oposto àquele obtido com M $\phi$  de camundongos B10.A. Em animais B10.A o tratamento com AG leva a aumentos de TNF- $\alpha$  e diminuição de IL-10.

Philippe et al. (2003), demonstraram que o NO não tem papel primordial na morte de conídios de *A. fumigatus* nos estágios iniciais da fagocitose. Talvez neste período pós-infecção a ação de ROI produzidos por células fagocitárias possa ter substituído o efeito fungicida mediado por NO. Em nosso modelo experimental em camundongos A/J talvez o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tenha algum efeito regulador do crescimento fúngico.

Estudos na PCM murina mostram que altos níveis de NO podem exercer uma ação inibitória na produção de TNF- $\alpha$ , e conseqüente anergia da resposta imune celular. Tal ação poderia estar associada à susceptibilidade de camundongos B10.A ao Pb (Nascimento et al., 2002; Bocca et al., 1998).

Investigação utilizando *L. major* demonstrou que na falta de NOS2, os animais desenvolviam significativo aumento da resposta de linfócitos TCD4<sup>+</sup> quando comparados com o grupo controle; além disso, altas concentrações de NO, inibiam a síntese de IL-12 por M $\phi$  ativados reprimindo, portanto, indiretamente a expressão da imunidade mediada por linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Niedbala et al. 1999).

Usando camundongos NOS2 KO, Doherty e Sher (1997) mostraram que o crescimento do *M. avium* não aumentou na ausência de NO, sugerindo o papel negativo deste composto que induz a supressão da função de linfócitos T. De forma semelhante, Karupiah et al. (1998) verificaram que animais NOS2 KO mostravam resistência aumentada à infecção pelo vírus da influenza A. Estes autores mostraram que o aumento da resistência estava associado com a produção de IFN- $\gamma$  por M $\phi$  alveolares e que os animais que possuíam o gene interrompido para iNOS apresentavam menor inflamação e conseqüentemente menor patologia pulmonar.

Em nosso trabalho mostramos que os Mø de animais A/J mesmo ativados com altas doses de IFN- $\gamma$  não apresentaram níveis tão elevados de NO como observado com células de animais B10.A. Vale a pena lembrar que os Mø alveolares de animais A/J produziram níveis pronunciados e significantes de IL-10 durante as 72 horas de infecção com o fungo Pb.

A citocina anti-inflamatória IL-10 originalmente descrita como “fator inibidor da produção de citocinas” é um potente inibidor da função microbicida de Mø ativados e leva à supressão simultânea da produção de NO (Gazzinelli et al., 1992). Fato correlato foi observado em trabalho desenvolvido por Holan et al. (2002) que mostraram que células esplênicas estimuladas com aloantígeno na presença de um inibidor de iNOS produziram níveis consideravelmente mais elevados de IL-4 e IL-10 do que as células estimuladas na ausência do inibidor de iNOS.

Apesar da IL-10 regular negativamente a indução de iNOS por IFN- $\gamma$  em Mø murino (Cunha et al., 1992) a sua ausência geneticamente determinada levou a PCM menos grave e impediu a disseminação do fungo Pb para diversos órgãos em camundongos C57Bl/6 (Alves & Calich, dados não publicados). Em contraste, Brown et al. (1999) mostrou a importância da IL-10 no controle da infecção por *Borrelia burgdorferi*. Em camundongos susceptíveis (C3H/HeN) a infecção de Mø por *B. burgdorferi* induz altos níveis de TNF- $\alpha$ , NO e IL-6 quando comparados aos Mø de camundongos resistentes (C57BL/6) que por sua vez, produziram níveis elevados de IL-10. Estes dados foram confirmados quando camundongos IL-10<sup>-/-</sup> desenvolveram doença progressiva, diferentemente ao observado com os camundongos C57BL/6 controles. A ausência de IL-10 pode traduzir-se por patologia tissular devido ao excesso de mediadores pró-inflamatórios.

Uma abordagem interessante e complementar em nosso trabalho foi o estudo do efeito da inibição de IL-10 endógena por AcM anti-IL-10 nos mecanismos microbicidas e de síntese de citocinas por Mø de camundongos B10 e A/J ativados ou não por IFN- $\gamma$ .

Nossos resultados mostram que a adição do AcM anti-IL-10 (10  $\mu$ g/mL) no cultivo de Mø de camundongos B10.A não alterou a capacidade fungicida dos Mø

ativados ou não por IFN- $\gamma$ . Entretanto, os níveis de NO tornaram-se mais elevados e significativos para os M $\phi$  previamente ativados com IFN- $\gamma$  e tratados com o AcM anti-IL-10. Logo, em animais B10.A a capacidade fungicida não é afetada pela neutralização de IL-10, porém esse tratamento aumenta a síntese de NO e de TNF- $\alpha$ . Logo a IL-10 é uma citocina reguladora tanto da síntese de NO como de TNF- $\alpha$  mas não da atividade fungicida de M $\phi$ . Por outro lado, pode-se supor que M $\phi$  de camundongos B10.A não sintetizem altos níveis de TNF- $\alpha$  devido à ação inibitória da IL-10.

Os M $\phi$  de camundongos A/J, ativados ou não e tratados com anti-IL-10 apresentaram capacidade fungicida similar quando comparados aos M $\phi$  não tratados com anti-IL-10, entretanto, os níveis de NO aumentaram significativamente com a neutralização da IL-10. Este resultado mostra-nos que a atividade fungicida dos M $\phi$  resistentes não está relacionada com níveis de NO.

A análise de citocinas no sobrenadante de cultura mostrou que M $\phi$  normais de animais A/J tratados com anti-IL-10 produziram níveis elevados e significativos de IL-12 e reduzidos de IL-10. Com camundongos B10.A obteve-se níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  induzidos pelo tratamento com anti-IL-10.

De modo semelhante com nossos dados, Sieling et al. (1993) mostraram que leucócitos do sangue periférico infectados com *Mycobacterium leprae* e tratados com AcM anti-IL-10 produziram níveis elevados de TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IFN- $\gamma$ . Este trabalho também mostrou que a IL-4 inibe a secreção de IL-10 e, concomitantemente aumenta a liberação de TNF- $\alpha$  e GM-CSF. Estes dados sugerem que a IL-4 e IL-10 contribuem para a imunossupressão em doenças infecciosas humanas.

Para consolidar os resultados obtidos com 10  $\mu$ g/mL do AcM anti-IL-10, foi realizado outro experimento com 20  $\mu$ g/mL deste mesmo AcM.

Os resultados confirmam que a adição do AcM anti-IL-10 (20  $\mu$ g/mL) no cultivo dos M $\phi$  de animais B10.A e A/J não altera a capacidade fungicida dos M $\phi$  ativados ou não com IFN- $\gamma$ . A determinação dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura mostrou que o tratamento com dose maior do AcM levou à síntese aumentada de TNF- $\alpha$  e redução de IL-10 para os M $\phi$  previamente

ativados com IFN- $\gamma$  de camundongos B10.A (dados não mostrados). Este resultado não foi observado quando o tratamento dos M $\phi$  foi com 10  $\mu$ g/mL do AcM.

Estudamos também o efeito da inibição de TGF- $\beta$  nos mecanismos microbicidas e de síntese de citocinas de M $\phi$  de camundongos B10.A e A/J ativados ou não por IFN- $\gamma$ .

O TGF- $\beta$ , que é um produto principalmente secretado por células T, mas também é produzido por M $\phi$  e pode atuar autocrinamente inibindo as suas funções. O TGF- $\beta$  pode ter funções protetoras ou exacerbadoras de doenças causadas por patógenos distintos.

Barral-Netto et al. (1992) mostraram que o TGF- $\beta$  é produzido após a infecção *in vivo* e *in vitro* com *L. amazonensis* e que a administração de anticorpos anti-TGF- $\beta$  inibe a produção de IL-4 e aumenta os níveis de IFN- $\gamma$ . Além disso, camundongos BALB/c, que são normalmente resistentes à infecção por *L. brasiliensis*, quando tratados com a proteína recombinante TGF- $\beta$  (2 ng/mL) desenvolvem a doença grave (Barral et al., 1993). Além disso, a neutralização do TGF- $\beta$  com o uso do AcM anti-TGF- $\beta$  (200  $\mu$ g/mL) levou à melhora da doença. Estes dados sugerem um papel modulador importante para o TGF- $\beta$  em leishmanioses cutâneas.

Trabalho desenvolvido por Omer & Riley (1998) mostrou que camundongos BALB/c infectados com *P. chabaudi chabaudi* ou *P. yoelii* e tratados com o AcM anti-TGF- $\beta$  nos primeiros 7 dias pós-infecção apresentaram doença mais grave levando a morte precoce dos camundongos quando comparados aos animais controle e aos animais tratados com o recombinante TGF- $\beta$ . Concluí-se neste trabalho que os níveis de TGF- $\beta$  são inversamente correlacionados com a gravidade da infecção e que o TGF- $\beta$  exerce um papel importante na regulação da infecção por *Plasmodium sp.*

Em nosso trabalho pudemos observar que os M $\phi$  de camundongos A/J não se ativam com IFN- $\gamma$  (10.000 e 2.000) e não conseguem matar o fungo, quando comparados aos de camundongos B10.A. Trabalho desenvolvido por Silva et al. (1991) mostrou que o TGF- $\beta$  pode bloquear o efeito de IFN- $\gamma$ . Talvez os M $\phi$  de

animais A/J estivessem sendo muito ativados por TGF- $\beta$  e desta forma o tratamento com IFN- $\gamma$  exógeno não estaria levando à morte do Pb.

Nossos resultados mostraram que o tratamento com 20  $\mu\text{g/mL}$  do AcM anti-TGF- $\beta$  não alterou a capacidade fungicida e tampouco a produção de NO pelos M $\phi$  de animais B10.A pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$ . Por outro lado, os M $\phi$  de camundongos A/J quando tratados com o AcM anti-TGF- $\beta$  apresentaram atividade fungicida aumentada (cerca de 83 a 86%) e produção elevada de NO quando infectados com o fungo. Assim, ao contrário da IL-10, o TGF- $\beta$  é importante inibidor da atividade microbicida de M $\phi$  de animais A/J.

A análise de citocinas no sobrenadante de cultivo de M $\phi$  tratados ou não com o anti-TGF- $\beta$  também foi estudada. Níveis elevados de TNF- $\alpha$  e IL-12 foram encontrados em animais B10.A e de TNF- $\alpha$  com M $\phi$  de camundongos A/J.

Pode-se verificar nas figuras 15 e 17 que M $\phi$  infectados de animais A/J produziram mais TNF- $\alpha$  ( $247 \pm 43$ ) que os animais B10.A ( $88 \pm 12$ ). O tratamento com o AcM anti-TGF- $\beta$  ressaltou ainda mais essa produção mais acentuada de TNF- $\alpha$  para o grupo de M $\phi$  de animais A/J.

Por outro lado, os níveis de IL-12 estão sempre muito mais elevados em animais B10.A ( $82 \pm 16$ ), quando comparados aos animais resistentes ( $0 \pm 0$ ).

Há a proposta recente de denominar os M $\phi$  de M1 e M2 baseado em seu padrão de ativação (Mills et al., 2000). Assim, M $\phi$  M1 provenientes de linhagens Th1 de camundongos (C57BL/6 e B10.A) para a resposta imune contra *L. major* apresentam uma produção dominante de NO em resposta ao LPS ou IFN- $\gamma$  exógeno.

Os M $\phi$  M2, (BALB/c e DBA/2), por sua vez, exibem um perfil tolerante ao crescimento do patógeno caracterizado pela produção de altos níveis de TGF- $\beta$ . O padrão de ativação desses M $\phi$  parece ser independente de linfócitos, uma vez que camundongos C57BL/6 e BALB/c dos fenótipos NUDE (deficientes de células T) e SCID (deficientes de células T e B) apresentam a mesma polarização (Mills et al., 2000).

Nesta mesma linha, trabalho desenvolvido por Murata et al. (2002) também mostrou a existência de 2 tipos de M $\phi$ , o redutivo e o oxidativo. O M $\phi$  redutivo

exibe um perfil caracterizado por aumento na produção de NO, IL-12 e baixa produção de IL-10. Já o Mø oxidativo é caracterizado por produzir níveis baixos de NO e elevados de IL-6 e IL-10.

Nosso trabalho sugere que os Mø de camundongos A/J apresentam um perfil de Mø oxidativos, o que justificaria os níveis elevados de IL-10 (ação importante do TGF- $\beta$ ) e níveis reduzidos de NO cultivo de 72 horas. Por outro lado, os Mø de camundongos B10.A apresentam um fenótipo redutivo. Na classificação M1 e M2 os Mø de camundongos A/J seriam M2. Nosso resultado é muito interessante, pois mostra que fenômeno de imunidade natural exacerbada, com grande produção de NO e atividade fungicida evidente não confere o fenótipo de resistência aos camundongos B10.A. Assim, grande número de leveduras do Pb é morta ao ser fagocitado por Mø de camundongos B10.A. Esta imunidade, entretanto, não é esterilizante, e a contínua produção de NO levaria à desativação da resposta imune adquirida e ao posterior descontrole do crescimento fúngico e doença mais grave.

Assim, os mecanismos ativadores de Mø são essenciais para o controle da multiplicação do fungo, mas devem se desenvolver de maneira balanceada com processos anti-inflamatórios e com a resposta imune adquirida para que o fenômeno final seja imunoproteção e não imunossupressão.

Nossos dados demonstraram que os Mø de camundongos A/J são modulados por TGF- $\beta$ , uma vez que a sua neutralização levou ao controle da infecção. Mais ainda, há claros indícios que a atividade fungicida de Mø de camundongos resistentes não é mediada pelo NO. Outros mecanismos de ativação podem então ser operantes nos Mø destes animais.

Mø ativados por IL-10, IL-4, IL-13, PGE2 e TGF- $\beta$  podem ativar a enzima arginase (Modollel et al., 1995) e consumir a arginina que é o substrato da ação da iNOS. Sendo assim, os Mø não fazem NO por competição pelo substrato (Hibbs et al., 1990). Trabalho desenvolvido por Corraliza et al. (1995) também mostrou que a indução da enzima arginase em Mø levou à inibição da secreção de NO.

Em camundongos vários estudos mostraram que o balanço entre a atividade da arginase/NOS-2 é um importante mecanismo no controle da função dos M $\phi$  (Corraliza et al., 1995; Modollel et al., 1995).

Acreditamos que será de grande interesse estudar a atividade e expressão da arginase para melhor caracterizar a atividade dos M $\phi$  em camundongos, principalmente nos resistentes, quando infectados com o fungo Pb. A ausência de NO e ação preponderante de TGF- $\beta$ , talvez em conjunto com IL-10 levaria à ativação preferencial desta via de metabolismo da arginase.

Uma outra abordagem interessante que poderá melhor elucidar o comportamento dos M $\phi$  de animais susceptíveis e principalmente os de animais resistentes será estudar a expressão e atividade da enzima indolamina-dioxigenase (IDO).

A IDO é uma enzima presente em uma variedade de tecidos, bem como, em M $\phi$  e células dendríticas estimuladas por IFN- $\gamma$  ou LPS (Grohmann et al., 2003). A IDO cataboliza o triptofano em quinurenina e outros compostos biologicamente ativos. O triptofano, por sua vez, é um componente essencial para a proliferação de patógenos intracelulares ou tumorais (Mellor et al., 1999) e seus produtos podem atuar inibindo vários mecanismos da resposta imune adaptativa (Bozza et al., 2005).

De acordo com os nossos resultados (figura 16) podemos notar que o efeito fungicida dos M $\phi$  alveolares de camundongos A/J induzido pela neutralização de TGF- $\beta$  endógeno não é dependente da produção de NO, visto que os M $\phi$  normais produziram 83% de atividade fungicida e produção nula deste mediador. Talvez a enzima IDO desses M $\phi$  possa estar mais ativada pela ação do anti-TGF- $\beta$  que propiciaria uma maior ação do IFN- $\gamma$  endógeno sobre os M $\phi$  que resultaria na maior degradação do triptofano e conseqüente controle do crescimento fúngico e na inibição da proliferação de linfócitos T. De acordo, o trabalho recente de Bozza et al. (2005) mostrou que a inibição da enzima IDO em camundongos BALB/c infectados com leveduras viáveis de *C. albicans* levou a uma infecção exacerbada devido ao aumento de triptofano e mais ainda, pela inibição da resposta imune adaptativa.

Nossos resultados mostram que M $\phi$  alveolares de camundongos A/J produzem preferencialmente IL-10 e níveis baixos de IL-12. Talvez este perfil seja concomitante à expressão diminuída da enzima IDO no combate ao fungo. A prevalência de IL-10 impede a ação do IFN- $\gamma$  que ativaria IDO a diminuir o triptofano necessário ao crescimento fúngico. Além disso, a produção de NO torna-se inibida, uma vez que a IL-10 desativa os M $\phi$  e leva ao aumento da expressão da arginase.

Estamos obtendo resultados importantes que permitirão a melhor compreensão da patogenia da PCM, e em particular, os mecanismos que levam à resistência e susceptibilidade ao fungo. Este trabalho traz resultados originais demonstrando que hiperativação de imunidade inata pode levar a patologia grave. É muito interessante verificar que os mesmos mecanismos que são fundamentais para a morte e eliminação ou contenção do fungo (por exemplo, produção de NO e migração celular) podem estar associados à susceptibilidade dos hospedeiros. Por outro lado, uma ativação ineficiente do sistema devido à ativação precária de M $\phi$  frente ao patógeno pode redundar em fenótipo resistente. O balanço da imunidade adquirida, mediada por linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> determinará, posteriormente, o destino da infecção.

Finalmente, gostaríamos de finalizar uma hipótese geral de imunidade inata na PCM pulmonar levando em consideração nossos resultados obtidos com M $\phi$  alveolares de camundongos susceptíveis e resistentes.

Nossos dados mostram que os M $\phi$  alveolares de animais **susceptíveis** são grandes produtores de IL-12 e são facilmente ativáveis por IFN- $\gamma$ . A alta produção de IL-12 poderia estimular as células NK a secretar IFN- $\gamma$  que induziria a secreção de altos níveis de NO. Este mecanismo levaria a eficiente capacidade fungicida dos M $\phi$  nas primeiras horas de infecção.

O padrão de ativação dos M $\phi$  de animais B10.A exibe um perfil do tipo M1 ou redutivo (Mills et al., 2000; Murata et al., 2002) que levaria a uma eficiente imunidade inata. Entretanto, esses animais comportam-se como susceptíveis a PCM e não controlam o crescimento fúngico no decorrer da doença.



Acreditamos que o excesso de NO produzido por esses M $\phi$  induziria anergia ou deleção de células T CD4+. A expressão de altos níveis de moléculas co-estimulatórias (CD40, B7, MHC de classe II) pelas células apresentadoras de antígeno poderia levar à ativação preferencial de células T CD8+ que não é suficiente para ativar os M $\phi$  e controlar infecção no decorrer da doença. De acordo, trabalhos prévios em nosso laboratório demonstraram que a imunidade adaptativa de camundongos B10.A é basicamente controlada na ativação de linfócitos T CD8+ (Cano et al., 2000; Chiarella, 2003).

Por outro lado, os M $\phi$  de camundongos **resistentes** produzem níveis baixos de IL-12 e níveis altos de IL-10 e TNF- $\alpha$  quando infectados com o fungo Pb. Este comportamento resulta numa baixa ativação de células NK, níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  e de NO.

Deste modo, os M $\Phi$  de animais A/J seriam poucos ativados no início da infecção e a imunidade inata, então, menos eficiente quando comparada à de animais B10.A. O padrão de ativação desses M $\Phi$  parece exibir um perfil do tipo M2 ou oxidativo (Mills et al., 2000; Murata et al., 2002). A baixa produção de NO por esses M $\phi$  não induziria anergia de células T e de uma forma mais lenta, porém progressiva, os animais A/J desenvolveriam uma imunidade mediada por células T CD4+ e T CD8+ que irão controlar a infecção.

Esta proposta baseia-se em nossos dados experimentais e permite compreender como mecanismos de imunidade inata altamente eficiente podem redundar em patologia infecciosa grave.

## **CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

- O IFN- $\gamma$  e a IL-12 são capazes de induzir atividade fungicida em M $\phi$  alveolares de camundongos susceptíveis. Ao contrário, somente o IFN- $\gamma$  em altas doses é capaz de induzir a morte do Pb por M $\phi$  alveolares de animais resistentes.

- A atividade fungicida de M $\phi$  de camundongos susceptíveis pôde ser associada à produção de altos níveis de NO que puderam ser modulados por um inibidor da síntese de NO a aminoguanidina. Em camundongos resistentes a produção de NO foi baixa e não se alterou pelo tratamento com aminoguanidina.

- Camundongos susceptíveis sintetizam mais MCP-1 e IL-12 que camundongos resistentes que por sua vez apresentam a síntese de IL-10 e GM-CSF mais elevadas.

- A IL-10 não modula a atividade fungicida de M $\phi$  alveolares de camundongos susceptíveis e resistentes, porém regula a síntese de NO e TNF- $\alpha$  de M $\phi$  de camundongos B10.A e de IL-12 por M $\phi$  de animais A/J.

- O TGF- $\beta$  é o grande regulador negativo da atividade fungicida de M $\phi$  de camundongos resistentes, porém não interfere no comportamento de camundongos susceptíveis. Em ambas as linhagens o TGF- $\beta$  é a citocina inibidora da síntese de TNF- $\alpha$  e, em camundongos resistentes, a presença de TGF- $\beta$  esteve associada à síntese aumentada de IL-10. Além disso, pôde-se verificar que camundongos resistentes podem desenvolver atividade fungicida contra o Pb independente da síntese de NO.

Em resumo, os M $\phi$  alveolares de animais susceptíveis são facilmente ativados por IFN- $\gamma$  e IL-12, produzem altos níveis de NO e têm eficiente atividade fungicida. Por outro lado, os M $\phi$  de animais resistentes só se ativam com alta concentração de IFN- $\gamma$  e IL-12 e a sua capacidade fungicida é inibida por TGF- $\beta$  endógeno.

Assim, a Imunidade Inata de animais resistentes, ao contrário do esperado, é menos eficiente do que aquela de camundongos susceptíveis no início da infecção com o fungo Pb.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, v.5, p.125-141, 1930.
- ALBORNOZ, M.C.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v.9, p.248-253. 1971.
- ARANGO, M.; YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmuno-globulinemia E in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.79, p.115-123, 1982.
- ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; PINA, A.; KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; VAZ, C.A.C.; FRANCO, M.F.; CALICH, V.L.G. Dual role of IL-4 in pulmonary paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect. Immun.**, v.72, p.3932-3940, 2004.
- BACCARINI, M.; BLASI, E.; PUCETTI, P.; BISTONI, F. Phagocytic killing of *Candida albicans* by different murine effector cells. **Sabouraudia**, v.21, p.271-286, 1983.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; CAMARGO, Z.P.; GOMES, G.M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasipus novencinctus*) captured in an endemic area of Paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.58, 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. **Microbes Infect.**, v.1, p.273-278, 1999.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor- $\beta$  as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.3442-3446, 1993.
- BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.W.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor- $\beta$  in leishmanial infections: a parasite escapes mechanism. **Science**, v.257, p.545-548, 1992.
- BENARD, G.; ROMANO, C.C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v.13, p.248-252, 2001.
- 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.**, v.175, p.1263-1267, 1997.
- BERMUDEZ, L.E.; WU, M.; YOUNG, L.S. Interleukin-12-stimulated natural killer cells can activated human macrophages to inhibit growth of *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.**, v.63, p.4099-4104, 1995.
- BHARDWAJ, N.; NASH, T.W.; HORWITZ, M.A. Interferon-gamma-activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **J. Immunol.**, v.137, p.2662-2669, 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.
- BLASI, E.; PITZURRA, I.; PULITI, M.; CHIMIENTI, A. R.; MAZZOLLA, R.; BARLUZZI R.; BISTONI, F. Differential susceptibility of yeast and hyphal forms of *Candida albicans* to macrophage-derived nitrogen-containing compounds. **Infect. Immun.**, v.63, p.1806-1809, 1995.
- 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.**, 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.280-2879, 1999.
- BOGDAN, C.; STENGER, S.; ROLLINGHOF, M.; SOLBACH, W. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin-4 synergizes with interferon- $\gamma$  to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.**, v.21, p.327-333, 1991.
- BOPP, C. Algumas considerações sobre a micose de Lutz no Rio Grande do Sul. **An. Fac. Med.**, v.15, p.97-123, 1955.
- BOTTOMLY, K. A functional dichotomy in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. **Immunol. Today**, v.9, p.268-274, 1988.



- BOZZA, S.; FALLARINO, F.; PITZURRA, L.; ZELANTE, T.; MONTAGNOLI, C.; BELLOCCHIO, S.; MOSCI, P.; VACCA, C.; PUCCHETTI, P.; ROMANI, L. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. **J. Immunol.**, v.174, p.2910-2918, 2005.
- 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.
- BROWN, J.P.; ZACHARY, J.F.; TEUSCHER, C.; WEIS, J.J.; WOOTEN, R.M. Dual role of interleukin-10 in murine Lyme disease: regulation of arthritis severity and host defense. **Infect. Immun.**, v.67, p.5142-5150, 1999.
- BRUMMER, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells, p.213-223. In, M. Franco; C. Silva Lacaz; A. Restrepo Moreno; and G. Del Negro (ed.), Paracoccidioidomycosis. CRC Press, Boca Raton, Fla., 1994.
- BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, E. Paracoccidioidomycosis: an Update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p.89-117, 1993.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- $\gamma$  for enhanced killing of *P. brasiliensis* or *B. dermatitides*. **J. Immunol.**, v.140, p.2786-2787, 1988.
- 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.
- BUCHMEIER, N.A.; SCHREIBER, R.D. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.82, p.7404-7408, 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
- CALICH, V.L.G. Immunogenetics in Paracoccidioidomycosis.1994. p.151-166. In, Franco,M.F.;Lacaz,C.S.;Restrepo,A.;DelNegro,G.(ed),Paracoccidioidomycosis.CR C Press, Boca Raton,Fla.
- 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.
- 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.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.615-623, 1998.
- CALICH, V.L.G.; VAZ, C.A.; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v.149, p.407-417, 1998.
- CALVI, S.A., PERAÇOLI, T.S.; MENDES, R.P.; MARCONDES-MACHADO, J.; FECCHIO, D.; MARQUES, S.A.; SOARES, A.M.V.C. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect.**, v.00, p.01-07, 2003.
- 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 infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v.63, p.1777-1783, 1995.

CANO, L.E.; ARANGO, R.; SALAZAR, M.E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effects of cytokines. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.30, p.161-168, 1992.

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

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; MENGEL, J.A.; 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 resistant and susceptible mice to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v.68, p.352-359, 2000.

CAYATTE, A.J.; MAGNER, F.; COHEN, R.A. VCAM-1 induction by TNF-alpha in human umbilical vein endothelial cells: a regulatory mechanism sensitive to intracellular generation of reactive oxygen species and exogenous nitric oxide. **Faseb J.**, v.11, p.2647, 1997.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D.A. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Infect. Immun.**, v.56, p.1771-1777, 1988.

CASTRO, A.G.; SILVA, R.A.; APPELBERG, R. Endogenously produced IL-12 is required for the induction of protective T cells during *Mycobacterium avium* infections in mice. **J. Immunol.**, v.155, p.2013-2019, 1995.

CHABOT, S.; SALEZ, L.; McCORMACK, F.X.; TOUQUI, L.; CHIGNARD, M. Surfactant Protein A inhibits lipopolysaccharide-induced *in vivo* production of

interleukin-10 by mononuclear phagocytes during lung inflammation. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v.28, p.347-353, 2003.

CHER, D.; MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T-cell clone. II Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J. Immunol.**, v.138, p.3688-3694, 1987.

CHIARELLA, A.P. Caracterização da função das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> na paracoccidiodomicose pulmonar de camundongos isogênicos. Características imunopatológicas da paracoccidiodomicose experimental (M. Sc. Dissertation). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2003.

CLARK, J.A.; ROEKETT, K.A.; COUDEN, W.B. Possible central role of nitric oxide in conditions similar to cerebral malaria. **Lancet.**, v.340, p.894-896, 1992.

COOPER, A.M.; FLYNN, J.L. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr. Opin. Immunol.**, v.7, p.512-516, 1995.

CORRALIZA, I.M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE<sub>2</sub>) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochemical and biophysical research communications**, v.206, p.667-673, 1995.

CUNHA, F.Q.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthases by interferon-gamma in murine macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.182, p.1155-1159, 1992.

DE CATERINA, R.; LIBBY, P.; PENG, H.B.; THANNICKAL, V.J.; RAJAVASHISCH, T.B.; GIMBRONE, M.A.J.; SHIN, W.S.; LIAO, J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial cell activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J. Clin. Invest.**, v.96, p.60-68, 1995.

DEEPE G.S.J.r.; ROMANI, L.; CALICH, V.L.G.; HUFFNAGLE, G.; ARRUDA, C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.; PERFECT, J.R. Knockout mice as experimental models of virulence. **Med. Mycol.**, v.38, p.87-98, 2000.

DENIS, M. Interferon-gamma treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. **Cell. Immunol.**, v.132, p.150-157, 1991.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v.141, p.2407-2412, 1988.

DOHEERTY, T.M.; SHER, A. Defects in cell-mediated immunity affect chronic, but not innate, resistance of mice to *Mycobacterium avium* infection. **J. Immunol.**, v.158, p.4822-4831, 1997.

DRAPIER, J.C.; HIRLING, H.; WIETZERBIN, J.; KALDY, P.; KUHN, L.C. Reciprocal modulation of aconitase activity and RNA-binding activity of iron regulatory factor by nitric oxide. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.356, p.141-148, 1994.

FAVA NETTO, C.; RAPHAEL, A. A reação intradérmica com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana. **Rev. Inst. Med. Trop. 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**, v.7, p.332-336, 1965.

FAZIOLI, R.A. Paracoccidioidomicose experimental murina. Estudo da proliferação e da contribuição de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> na resposta imune de camundongos

resistentes e susceptíveis. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 1997.

FENTON, M.J.; VERMEULEN, M.W. Immunopathology of tuberculosis, roles of macrophages and monocytes. **Infect. Immun.**, v.64, p.683-690, 1996.

FERREIRA, M.S.; FREITAS, L.H.; LACAZ, S. Cda.; DEL NEGRO, GM.; de MELO, N.T.; GARCIA, N.M.; de 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 Uberlandia, Brazil. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.28, p.253-256, 1990.

FLEISCHMANN, J.; WU-HSIEH, B.; HOWARD, D.H. The intracellular fate of *Histoplasma capsulatum* in human macrophages is unaffected by recombinant human interferon-gamma. **J. Infect. Dis.**, v.161, p.143-145, 1990.

FLORY, C.M.; JONES, M.I.; WARREN, J.S. Pulmonary granulomas formation in the rat is partially dependent on monocyte chemoattractant protein 1. **Lab. Investig.**, v.69, p.396-404, 1993.

FORNARI, M.C.; BAVA, A.J.; GUERENO, M.T.; BERARDI, V.E.; SILAF, M.R.; NEGRONI, R.; DIEZ, R.A. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.8, p.1036-1038, 2001.

FRANCO, M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Sabouraudia**, v.25, p.5-18, 1987.

FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, 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.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MEIRA, D.A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Trop. Med. Mycol.**, v.5, p.115, 1993.
- FRANKOVÁ, D.; ZIDEK, Z. IFN-gamma induced TNF-alpha is a prerequisite for *in vitro* production of nitric oxide generated in murine peritoneal macrophages by IFN-gamma. **Eur. J. Immunol.**, v.28, p.838-843, 1998.
- 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**, v.35, p.227-235, 1993.
- GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$ -activated macrophages. **J. Immunol.**, v.148, p.1792-1796, 1992.
- GONZALEZ, A.; DE 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. Advances in the treatment of fungus infections. **Gac. Med. Mex.** v.104, p.450-456, 1972.
- GORDON, S. The role the macrophage in immune regulation. **Res. Immunol.**, v.149, p.685-688, 1998.
- GOTZE, O.; BIANCO, C.; COHN, Z.A. The induction of macrophage spreading by factor B of the properdin system. **J. Exp. Med.**, v.149, p.372-386, 1979.

GRANGER, D.L.; HIBBS, J.B.; PERFECT, J.R.; DURACK, D.T. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of macrophages. **J. Clin. Investig.**, v.85, p.264-273, 1990.

GREEN, S. J.; NACY, C.A. Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. **Curr. Opin, Infect. Dis.**, v.6, p.383-396, 1993.

GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NAACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanisms in IFN- $\gamma$  stimulated macrophages by induction of TNF- $\alpha$ . **J. Immunol.**, v.145, p.4290-4297, 1990.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUCETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends Immunol.**, v.24, p.242-248, 2003.

HAMACHER, J.; SCHABERG, T. Adhesion molecules in lung disease. **Lung**, v.172, p.189-213, 1994.

HEINZEL, F.P.; SCHOENHAUT, D.S.; BERKO, R.M.; ROSSER, L.E.; GATELY, M.K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v.177, p.1505-1509, 1993.

HIBBS, J.B.; VAVRIN, Z.J.R.; TAINTOR, R.R. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **J. Immunol.**, v.138, p.550-565, 1987.

HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VARVRIN, Z.; RACHLIN, E.M. Nitric oxide, a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.157, p.87-94, 1988.

HIBBS, M.L.; WARDLAW, A.J.; STACKER, S.A.; ANDERSON, D.C.; LEE, A.; ROBERTS, T.M.; SPRINGER, T.A. Transfection of cells from patients with



- leukocyte adhesion deficiency with an integrin beta subunit (CD18) restores lymphocyte function-associated antigen-1 expression and function. **J. Clin. Invest.**, v. 85, p.674-681, 1990.
- HOFT, D.F.; SCHNAPP, A.R.; EICKHOFF, C.S.; ROODMAN, S.T. Involvement of CD4<sup>+</sup> Th1 cells in Systemic Immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v.68, p.197-204, 2000.
- HOGABOAM, C.M.; CHENSUE, S.W.; STEINHAUSER, M.L.; HUFFNAGLE, G.B.; LUKACS, N.W.; STRIETER, R.M.; KUNKEL, S.L. Alteration of the cytokine phenotype in an experimental lung granuloma model by inhibiting nitric oxide. **J. Immunol.**, v.159, p.5585-5593, 1997.
- HOLAN, V.; KRULOVA, M.; ZAJICOVA, A.; PINDJAKOVA, J. Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in the immune system. **Mol. Immunol.**, v.38, p.989-995, 2002.
- HSIEH, C.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O GARRA, A.; MURPHY, K.M. Listeria-induced Th1 development in  $\alpha\beta$ -TCR transgenic CD4<sup>+</sup> T cells occurs through macrophage production of IL-12. **Science**, v.260, p.547-549, 1993.
- JAMES, S.L.; GLAVEN, J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involved arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. **J. Immunol.**, v.143, p.4208-4212, 1989.
- KARAOUI, R.M.; HALL, N.K.; LARSH, H.W. Role of macrophages in immunity and pathogenesis of experimental cryptococcosis induced by the airborne route. Phagocytosis and intracellular fate of *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**, v.20, p.409-422, 1977.

KARUPIAH, G.; CHEN, J.H.; MAHALINGAM, S.; NATHAN, C.F.; MACMICKING, J.D. Rapid interferon gamma-dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice. **J. Exp. Med.**, v.188, p.1541-1546, 1998.

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.; 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.

KOOGUCHI, K.; HASHIMOTO, S.; KOBAYASHI, A.; KITAMURA, Y.; KUDOH, I.; KRONISH, J.; SAWA, T. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Infect. Immun.**, v.66, p.3164-3169, 1998.

KUBOTA, Y.; IWASAKI, Y.; HARADA, H.; YOKOMURA, I.; UEDA, M.; HASHIMOTO, S.; NAKAGAWA, M. Role of alveolar macrophages in Candida-induced acute lung injury. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.8, p.1258-1262, 2001.

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.

LACAZ, C.S. 1994. 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.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica**: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LAKE, F.R.; NOBLE, P.W.; HENSON, P.M.; RICHES, D.W.H. Functional switching of macrophage responses to TNF-alpha by interferons, implications for the pleiotropic activities of TNF-alpha. **J. Clin. Invest.**, v.93, p.1661-1669, 1994.

LANE, T.E.; OTERO, G.C.; WA-HSIEH, B.; HOWARD, D.H. Expression of inducible nitric oxide synthase by stimulated macrophages correlates with their anti-histoplasma activity. **Infect. Immun.**, v.62, p.1940-1945, 1994.

LANGERMANS, J.A.; HAZENHOS, W.L.; van FURTH, R. Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. **J. Immunol. Methods.**, v.174, p.185-194, 1994.

LANGERMANS, J.A.M.; VAN DER HULST, M.E.B.; NIBBEREING, P.H.; HIEMSTRA, P.S.; FRANSEN, L.; VAN FURTH, R. IFN- $\gamma$ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- $\alpha$ . **J. Immunol.**, v.148, p.568-574, 1992.

LEVITZ, S.M.; FARREL, T.P.; MAZIARZ, R.T. Killing of *Cryptococcus neoformans* by human peripheral blood mononuclear cells stimulated in culture. **J. Infect. Dis.**, v.163, p.1108-1113, 1991

LIEW, F.Y.; MIIIOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite "in vivo" is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J. Immunol.**, v.144, p.4794-4797, 1990.

- LIEW, F.Y.; LI, Y.; SEVERN, A.; MILLOTT, S.; SCHMIDT, J.; SALTER, M.; MONCADA, S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v.21, p.2489-2494, 1991.
- LOOSE, D.S.; STOVER, E.P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol protein and inhibits a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.80, p.7659-7663, 1983.
- LUCHIARI, M.A.; MODOLELL, M.; EICHMANN, K.; PEREIRA, C.A. *In vivo* depletion of interferon-gamma leads to susceptibility of A/J mice to mouse hepatitis virus 3 infection. **Immunobiology.**, v.185, p.475-482, 1992.
- 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.
- MACKINNON, J.E. Geographical distribution and prevalence of paracoccidioidomycosis. **Pan. Am. Health Org. Sci. Publ.**, v.254, p.45-52, 1972.
- MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.323-350, 1997.
- MAGEE, D.M.; COX, R.A. Roles of gamma interferon and interleukin-4 genetically determined resistance to *Coccidioides immitis*. **Infect. Immun.**, v.63, p.3514-3519, 1995.
- 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, p.237-241, 2001.

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

MATTOS GROSSO, D.; ALMEIDA, S.R.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Characterization of gp70 and Anti-gp70 Monoclonal Antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* Pathogenesis. **Infect. Immun.**, v.71, p.6534-6542, 2003.

MAUËL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **J. Leukoc. Biol.**, v.49, p.73-82, 1991.

MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nat. Rev. Immunol.**, v.4, p.762-774, 2004.

MICHALISZYN, E.; SÈNÈCHAL, S.; MARTEL, P.; REPENTIGNY, L. Lack of involvement of nitric oxide in killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by pulmonary alveolar macrophages. **Infect. Immun.**, v.63, p.2075-2078, 1995.

MILLER, M.F.; MITCHELL, T.G. Killing of *Cryptococcus neoformans* strain by human neutrophils and monocytes. **Infect. Immun.**, v.59, p.24-28, 1991.

MILLS, C.D.; KINCAID, K.; ALT, J.M.; HEILMAN, M.J.; ANNETTE, M.H. M1/M2 macrophages paradigm. **J. Immunol.**, v.164, p.6166-6173, 2000.

MODELELL, M.; CORRALIZA, I.M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **Eur. J. Immunol.**, v.25,

p.1101-1104,1995.

MODY, C.H.; TYLER, C.L.; SITRIN, R.G.; JACKSON, C.; TOEWS, G.B. Interferon- $\gamma$  activates rat alveolar macrophages for anti-cryptococcal activity. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v.5, p.19-26, 1991.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. 1994. Pathology, p. 131-147. In, M. Franco; C. S. Lacaz; A. Restrepo-Moreno; and G. Del Negro (ed.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

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.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. **Adv. Immunol.**, v.46, p.111-147, 1989.

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.**, v.136, 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.

MUÑOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  on macrophage activation for the killing of *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur. J. Immunol.**, v.22, p.301-307, 1992.

MURATA, Y.; SHIMAMURA, T.; HAMURO, J. The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. **Int. Immunol.**, v.14, p.201-212, 2002.

MURPHY, J.E.W.; BISTONI, F.; DEEP, G.S.; BLACKSTOCK, R.A.; BUCHANAN, K.; ASHMAN, R.B.; ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; FÈ D'OSTIANI, C.; DEL SERO, G.; CALICH, V.L.G.; KASHINO, S.S. Type 1 and Type 2 cytokines, from basic science to fungal infections. **Med. Mycol.**, v.36, p.109-118, 1998.

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

NABORS, G.S.; NOLAN, T.; CROOP, W.; LI, J.; FARREL, J.P. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. **Parasite Immunol.**, v.17, p.569-579, 1995.

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**, v.28, p.19-27, 1986.

NAKAMURA, L.T.; WO-HSIEH, B.A.; HOWARD, D.H. Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.**, v.62, p.680-684, 1994.

- NASCIMENTO, F.R.F.; CALICH, V.L.G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis, Essential for Resistant, but Overproduction Associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v.168, p.01-08, 2002.
- NASH, T.W.; LIBBY, D.M.; HORWITZ, M.A. IFN-gamma-activated human alveolar macrophages inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **J. Immunol.**, v.140, p.3978-3981, 1988.
- NASSAR, F.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A. Effect of *in vivo* macrophage colony-stimulating factor on fungistasis of bronchoalveolar and peritoneal macrophages against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.38, p.2162-2164, 1994.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v.79, p.319-326, 1987.
- NEGRONI, R. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. **Prensa Med.**, v.53, p.2831-2832, 1966.
- NEWMAN, S.L.; GOOTEE, L. colony-stimulating factors activate human macrophages to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum* yeasts. **Infect. Immun.**, v.60, p.4593-4597, 1992.
- NIEDBALA, W.; WEI, XQ.; PIEDRAFITA, D.; XU, D.; LIEW, F.Y. Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. **Eur. J. Immunol.**, v.29, p.2498-505, 1999.
- NORRIS, K.A.; SCHIRIMPF, J.E.; FLYNN, I.L.; MORRIS, S.M. Enhancement of macrophages microbicidal activity, supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v.63, p.2793-2796, 1995.



O'BRIEN, L.; ROBERTS, B.; ANDREW, P.W. *In vitro* interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages, activation of anti-mycobacterial activity of macrophages and mechanisms of anti-mycobactericidal activity. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.215, p.97-130, 1996.

OGLE, C.K.; WU, J.Z.; MAO, X.; SZCZUR, K.; ALEXANDER, J.W.; OGLE, J.D. Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. **Inflammation**, v.18, p.511-523, 1994.

OMER, F.M.; RILEY, E.M. Transforming growth factor- $\beta$  production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. **J. Exp. Med.**, v.188, p.39-48, 1998.

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

PHILIPPE, B.; IBRAHIM-GRANET, O.; PRÉVOST, M.C.; GOUGEROT-POCIDALO M.A.; SANCHEZ PEREZ, M.; VAN DER MEEREN, A.; LATGÉ, J.P. Killing of *Aspergillus fumigatus* by Alveolar Macrophages Is mediated by Reactive Oxidant Intermediates. **Infect. Immun.**, v.71, p.3034-3042, 2003.

PINA, A.; CALICH, V.L.G. Efeito da depleção *in vivo* de leucócitos PMN em camundongos resistentes e susceptíveis a paracoccidioidomicose pulmonar. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF, USP, 2002.

PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; VAZ, C.A.C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.I.W.; KELLER, A.C.; CALICH, V.L.G. Absence of IL-4 determines a less severe

pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect. Immun.**, v.72, p.2369-2378, 2004.

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

PUPO, J.A. Evolução e formas clínicas da blastomicose sul-americana (paracoccidioidomicose). **J. Bras. Med.**, v.9, p.967-974, 1965.

RAYCHAUDHURI, B.; DWEIK, R.; CONNORS, M.J.; BUHROW, L.; MALUR, A.; DRAZBA, J. nitric oxide blocks nuclear factor-kappa b activation in alveolar macrophages. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v.21, p.311-316, 1999.

RESNICK, M. B.; WELLER, P.F. Mechanism of eosinophil recruitment. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v.8, p.349-355, 1993.

REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of Immunity to *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.**, v.13, p.151-177, 1995.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; SALAZAR, M.E. The mycelial form of *P.brasiliensis*. 1988. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 10, Barcelona, 1988. **Proceedings**. Barcelona: ISHAM, 1988. p.143-148.

RESTREPO, A. The ecology of *P. brasiliensis*, a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.23, p.323-334, 1985.

RESTREPO, A.; ROBLEDO, M.; GUTIERREZ, F.; SANCLEMENTE, M.; CASTANEDA, E.; CALLE, G. Paracoccidioidomycosis, (South American blastomycosis). A study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.19, p.68-76, 1970.

- RESTREPO, B.I.; MCEWEN, J.G.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 24, p.337-339, 1986.
- ROMAGNANI, S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. **Immunol. Today.**, v.12, p.256-267, 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.**, v.158, p.5349-5356, 1997.
- ROMANI, L.; HOWARD, D.H. Mechanisms of resistance to fungal infections. **Curr. Opin. Immunol.**, v.7, p.517-523, 1995.
- ROMANI, L.; MOCCI, S.; CENCI, E.; ROSSI, R.; PUCCETTI, P.; BISTONI, F. Th1 and Th2 cytokine secretion patterns in murine candidiasis, association of Th1 responses with acquired resistance. **Infect. Immun.**, v.59, p.4647-4654, 1991.
- SALEZ, L.; BALLOY, V.; ROOIJEN, N.V.; LEBASTARD, M.; TOUQUI, L.; McCOMACK, F.X.; CHIGNARD, M. Surfactant Protein A suppresses lipopolysaccharide-induced IL-10 production by murine macrophages. **J. Immunol.**, v.166, p.6376-6382, 2001.
- SALKOWSKI, C.A.; BALISH, E. A monoclonal antibody to gamma interferon blocks augmentation of natural killer cell activity induced during systemic cryptococcosis. **Infect. Immun.**, v.59, p.486-493, 1991.
- 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.165-169, 1998/1999b.

SCOTT, P.; FARREL, J.P. Experimental cutaneous leishmaniasis, induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. **Chem. Immunol.**, v.70, p.60-80, 1998.

SHELLITO, J.E.; KOLLS, J.K.; OLARIU, R.; BECK, D.M. Nitric oxide and host defense against *Pneumocystis carinii* infection in a mouse model. **J. Infect. Dis.**, v.173, p.432-439, 1996.

SIELING, P.A.; ABRAMS, J.S.; YAMAMURA, M.; SALGAME, P.; BLOOM, B.R.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *In vitro* modulation of T cell responses in leprosy. **J. Immunol.**, v.150, p.5501-5510, 1993.

SIHMA & CIB In: COLOQUIO INTERNACIONAL SOBRE LA PARACOCCIDIIDOMICOSIS. **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.

- SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). **J. Exp. Med.**, v.174, p.539- 545, 1991.
- SINGER-VERMES, L.M.; CALDEIRA, C.B.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Experimental murine paracoccidioidomycosis, relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v.94, p.75-79, 1993.
- SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; FRANCO, M.F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; CALICH, V.L.G. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.27, p.71-82, 1989.
- 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, 1974.
- 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, p.1811-1820, 2000.
- SUGAR, A.M.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A. Murine pulmonary macrophages, evaluation of lung lavage fluids, miniaturized monolayers and candidacidal activity. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.127, p.110-112, 1983.
- TARAMELLI, D.; MALABARBA, M.G.; SALA, G.; BASILICO, N.; COCCUZZA, G. Production of cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by *Aspergillus fumigatus* conidia or hyphae. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.34, p.49-56, 1996.

- TAYLOR-ROBINSON, A.W.; PHILLIPS, R.S.; SEVEM, A.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y.  
The role of Th1 and Th2 cells in a rodent malaria infection. **Science**, v.260,  
p.1931-1934, 1993.
- TRAYNOR, T.R.; HERRING, A.C.; DORF, M.F.; KUZIEL, W.A.; TOWES, G.B.;  
HULFNAGLE, G.B. Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte  
chemotactic protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity. **J. Immunol.**,  
v.168, p.4659-4666, 2002.
- TRINCHIERI, G.; KUBIN, M.; BELLONE, G.; CASSATELLA, M.A. Cytokine cross-talk  
between phagocytic cells and lymphocytes, relevance for differentiation/activation  
of phagocytic cells and regulation of adaptive immunity. **J.Cell. Biochem.**, v.53,  
p.301-308, 1993.
- VECCHIARELLI, A.; DOTTORINI, M.; PIETRELLA, D.; MONARI, C.; RETINI, C.;  
TODISCO, T.; BISTONI, F. Role of human alveolar macrophages as antigen-  
presentation cells in *Cryptococcus neoformans* infection. **Am. J. Respir. Cell.  
Mol. Biol.**, v.11, p.130-137, 1994.
- VECCHIARELLI, A.; F. BISTONI; E. CENCI; S. PERITO; A. CASSONI. *In-vitro* killing  
of *Candida* species by murine immunoeffectors and its relationship to the  
experimental pathogenicity. **Sabouraudia**. v.23, p.377-387, 1985.
- VERDOT, L.; LALMANACH, G.; VERCRUYSSSE, V.; HARTMANN, S.; LUCIUS, R.;  
HOEBEKE, J.; GAUTHIER, F.; VRAY, B. Cystatins up-regulate nitric oxide  
release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages. **J. Biol.  
Chem.**, v. 271, p.28077-28081, 1996.
- VONK, A.G.; WIELAND, C.W.; NETEA, M.G.; KULLBERG, B.J. Phagocytosis and  
intracellular killing of *Candida albicans* blastoconidia by neutrophils and  
macrophages: a comparison of different microbiological test systems. **J.  
Microbiol. Methods**, v.49, p.55-62, 2002.

- WAGNER, D.; SANGARI, F.J.; KIM, S.; PETROFSKY, M.; BERMUDEZ, L.E. *Mycobacterium avium* infection of macrophages results in progressive suppression of interleukin-12 production *in vitro* and *in vivo*. **J. Leukoc. Biol.**, v.71, p.80-88, 2002.
- 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, p.109-117, 1994.
- WEINBERG, P.B.; BECKER, S.; GRANGER, D.L.; KOREN, H.S. Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by human alveolar macrophages. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.136, p.1242-1247, 1987.
- WISHAH, K.; MALUR, A.; RAYCHAUDHURI, B.; MELTON, A.L.; KAVURU, M.S.; THOMASSEN, M.J. Nitric oxide blocks inflammatory cytokine secretion triggered by CD23 in monocytes from allergic, asthmatic patients and healthy controls. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v.89, p.78-82, 2002.
- WU, H.; CASADEVALL, A.; LEE, S.C.; GOLDMAN, D.L. Phagocytic activity and monocyte Chemotactic Protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis. **Infect. Immun.**, v.71, p.930-936, 2003.
- WU-HSIEH, B.A.; HOWARD, D.H. Inhibition of the intracellular growth of *Histoplasma capsulatum* by recombinant murine gamma interferon. **Infect. Immun.**, v.55, p.1014-1016, 1987.
- WU-HSIEH, B.A.; LEE, G.S.; FRANCO, M.; HOFMAN, F.M. Early activation of splenic macrophages by tumor necrosis factor alpha is important in determining the outcome of experimental histoplasmosis in mice. [Published erratum appears in 1992 *Infect. Immun.* 60, 5324]. **Infect. Immun.**, v.60, p.4230-4238, 1992.

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.**, v.155, p.785-795, 1995.