

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**EFEITO DA OPSONIZAÇÃO DE CÉLULAS
LEVEDURIFORMES DE *Paracoccidioides*
brasiliensis COM SORO HUMANO SOBRE A
ATIVIDADE FUNGICIDA DE MONÓCITOS**

Larissa Emi Matsumoto

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Monografia apresentada ao
Departamento de Microbiologia e
Imunologia do Instituto de
Bociências, Universidade Estadual
Paulista – UNESP - Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

**Botucatu – SP
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Matsumoto, Larissa Emi.

Efeito da opsonização de células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* com soro humano sobre a atividade fungicida de monócitos / Larissa Emi Matsumoto. – Botucatu: [s.n.], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

1. Fungos - Biologia 2. Paracoccidioides brasiliensis 3. Imunologia

Palavras-chave: Atividade fungicida; Monócitos; *Paracoccidioides brasiliensis*; Peróxido de hidrogênio; Sistema complemento

Uma coisa que aprendi nessa longa vida: toda nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – ainda sim é a coisa mais preciosa que nós temos.

Albert Einstein

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre zelaram pela minha educação, me guiaram durante toda minha vida, me apoiaram e me incentivaram em minhas escolhas.

Agradeço imensamente à Profa Dra Maria Terezinha Serrão Peraçoli por ter me aceitado como estagiária, por todos os valorosos ensinamentos e por todo o auxílio nestes anos de estágio no Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Agradeço também a Erika Nakaira Takahagi pela compreensão, paciência e, principalmente, pela amizade.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, pela orientação, atenção, paciência, incentivo, dedicação e amizade. Obrigada por me ensinar a gostar ainda mais de Ciência e de pesquisa e por ter me dado a oportunidade de investigar e conhecer um pouco desta vasta e surpreendente área, que é a Imunologia. Sua orientação foi imprescindível em minhas escolhas durante o curso de Biologia.

À Érika Nakaira Takahagi, pela constante ajuda, pelas experiências compartilhadas, pelos sábios conselhos, pelas conversas sinceras e pela imensa paciência. Sua amizade foi muito importante para mim durante estes anos de graduação. Com certeza, você me ajudou a crescer e a ver algumas situações sob uma perspectiva diferente.

Aos docentes do Departamento de Imunologia, Alexandrina, Ângela, Maurício, Ramon e Sílvio, por me auxiliarem direta ou indiretamente em meu projeto, sejam nas reuniões científicas ou no convívio do dia-a-dia.

Aos funcionários, Sônia, Nice, Luís e Lula, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela enorme dedicação e competência no que fazem. Posso dizer que a ajuda de vocês foi fundamental para o projeto.

Às amigas de laboratório, Camila, Magda e Renata, pelo convívio, pela ajuda, pela atenção, pelo incentivo, pelo acolhimento e pela amizade. Obrigada por tudo que me ensinaram!

Aos colegas de Departamento, Ana Paula, Elisandra, Guilherme, Luciane e Micheli, por me ensinar muitas das rotinas de laboratório, pela paciência e pela amizade. Vocês sempre me ajudaram muito.

Aos doadores de sangue, sem os quais, a realização deste projeto seria impossível.

À CNPq/PIBIC pelo apoio financeiro deste projeto.

Aos meus pais, Mikiko e Kanji Matsumoto, por me ajudarem em tudo, por me ensinarem o valor das coisas, por estarem sempre dispostos a ouvir e também a aconselhar, por respeitarem, me apoiarem e me incentivarem em minhas escolhas e por estarem sempre por perto, mesmo morando longe. Até agora, meus objetivos foram alcançados graças ao esforço conjunto de vocês. Obrigada por tudo!

Às minhas irmãs, Yumi, Yukari e Sayuri, pelos conselhos, pelas conversas, pelos momentos de descontração e pela eterna amizade. Sei que posso sempre contar com vocês!

Ao meu sobrinho, Gabriel, por tornar meu dia-a-dia mais feliz e iluminado.

Ao meu namorado, Gerson Shinya Suzuki, pela compreensão, por me ajudar e apoiar sempre, por ser meu melhor amigo nas horas em que mais preciso, por me fazer rir, por nossas conversas compridas, pelas palavras de conforto e incentivo, pelo amor incondicional e por me tornar uma pessoa melhor. Obrigada por fazer parte da minha vida!

À minha amiga, Lilian Saemi Arita, por compartilhar de momentos bons e ruins, por ser esta pessoa iluminada e maravilhosa, por ver sempre o lado bom das pessoas, por me aturar quase todos os dias (exceto nos fins de semana) e por sua amizade verdadeira. Você sempre foi e será minha companheira para todas as horas, minha irmã de consideração.

Aos meus queridos amigos Christian, Fernando, Giovana, Helton, Juliana, Patrícia, Renata e Tiago, pela amizade que resiste mesmo à distância. Sem vocês, a vida não teria sentido. Obrigada por me ensinarem a aproveitar mais a vida. Vocês são muito especiais!

À República Refugiados, especialmente ao Danilo e ao Júlio, que me acolheram sempre que precisei e por terem se tornado meus grandes amigos.

À República Monte Olimpo, em sua formação 2007, pelas brincadeiras, pelo convívio, pelos momentos de descontração, pela amizade, respeito e carinho.

À quadragésima turma do curso de Ciências Biológicas, por estes cinco anos de convivência.

Não poderia deixar de agradecer à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, da cidade de Botucatu, por fornecer amplo suporte aos graduandos e por proporcionar-me uma excelente formação acadêmica.

Agradeço a todos que fizeram parte deste projeto e de minha vida. Sem dúvida, cada um de vocês me proporcionou experiências memoráveis.

Resumo

Monócitos e macrófagos são células da imunidade inata que desempenham importante papel na defesa contra infecções fúngicas, através do reconhecimento dos fungos, ativação e desenvolvimento de atividade fungicida. A função das células fagocitárias depende do seu estado de ativação, induzido principalmente pelo ambiente de citocinas, presentes durante a interação com o microrganismo. O presente projeto teve por objetivo avaliar o efeito da opsonização de células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* com soro humano sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e atividade fungicida de monócitos humanos, estimulados ou não com Interferon-gama ($IFN-\gamma$), contra *P. brasiliensis*. Monócitos de sangue periférico, obtidos de indivíduos saudáveis, foram cultivados na ausência ou presença de $IFN-\gamma$ por 24h a $37^\circ C$. A seguir, essas células foram desafiadas com a amostra Pb18 de *P. brasiliensis* por 60 min para determinação da produção de H_2O_2 e por 4h para a avaliação da atividade fungicida nas proporções fungo-monócito de 1:50. A suspensão fúngica foi previamente incubada por 30 min a $37^\circ C$ na ausência de soro (SS) ou na presença de *pool* de soro humano normal, inativado (SI) por aquecimento a $56^\circ C$ ou soro humano fresco (SF) não submetido à inativação do sistema complemento, nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 30% em meio de cultura RPMI. A atividade fungicida de monócitos contra a amostra Pb18 foi avaliada por plaqueamento dessas co-culturas em meio de cultivo BHI-água e determinação da recuperação de fungos viáveis após 14 dias de incubação a $36^\circ C$. A produção de H_2O_2 por monócitos foi determinada através da técnica de redução do vermelho de fenol. Os resultados mostraram que a adição de SF ou SI em diferentes concentrações a culturas de *P. brasiliensis* não interfere com a viabilidade do fungo. Monócitos cultivados na presença ou ausência de $IFN-\gamma$ e desafiados com Pb18 não opsonizado (SS) ou opsonizado com diferentes concentrações de SI não apresentam atividade fungicida. Entretanto, essas células pré-tratadas com $IFN-\gamma$ e desafiadas com o fungo opsonizado com SF nas concentrações de 10% e 20% apresentam atividade fungicida significativamente mais elevada do que com os demais tratamentos. Os ensaios da liberação de H_2O_2 mostraram que monócitos desafiados com *P. brasiliensis* produzem níveis significativamente mais elevados de H_2O_2 quando o fungo é opsonizado com SF ou SI em relação aos fungos não opsonizados (SS). Monócitos previamente estimulados com $IFN-\gamma$ produzem níveis mais elevados desse metabólito em

comparação aos não estimulados com a citocina. Em conjunto, os resultados sugerem a participação de componentes do sistema complemento na opsonização de *P. brasiliensis* e na ativação de monócitos, induzindo a liberação de H₂O₂ e eficiente atividade fungicida contra o fungo, quando essas células são pré-ativadas com IFN- γ .

Introdução

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica, endêmica na América Latina, que tem como agente etiológico o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (WANKE & LONDERO, 1994). As manifestações clínicas da micose são de doença granulomatosa crônica, comprometendo especialmente tecidos pulmonares, mucosas e o sistema fagocítico mononuclear, com disseminação para fígado, baço, adrenais e outros órgãos (FRANCO et al., 1989; 1993).

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem de fatores ligados ao fungo, como virulência e composição antigênica, das condições ambientais e principalmente de fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro, durante a interação com o fungo (PERAÇOLI & SOARES, 1992).

Os mecanismos de imunidade inespecífica ou inata apresentam grande importância no combate a fungos patogênicos. Entre os vários mecanismos naturais de defesa, as células fagocitárias desempenham papel central na resistência aos fungos, devido a sua participação na reação inflamatória e na atividade fungicida, ambas dependentes dos mecanismos de ativação dessas células, induzidos pelos fungos e, principalmente por citocinas produzidas pelas células durante a interação com o parasita. Distúrbios da atividade funcional dessas células podem ocasionar o desenvolvimento da doença ou a morte do microrganismo e, ainda influenciar o aparecimento da resposta imune adaptativa. A interação entre o fungo e as células do hospedeiro pode determinar várias alterações metabólicas, responsáveis pelos sintomas clínicos, apresentados por pacientes com a infecção fúngica.

Monócitos e macrófagos são células do sistema mononuclear fagocitário, importantes na defesa do hospedeiro (ADAMS & HAMILTON, 1987) e considerados fontes importantes de citocinas (VAN FURTH, 1998). Essas células são responsáveis pela ingestão e inativação de leveduras ou partículas fúngicas e interação com linfócitos T e B, promovendo a produção de citocinas, reconhecimento e processamento do antígeno (FROMTLING & SHADOMY 1986; VAN FURTH, 1998).

A maioria dos fungos causadores de micoses sistêmicas apresenta estreita relação com monócitos ou macrófagos nas fases iniciais da infecção ou no decorrer da doença (FROMTLING & SHADOMY, 1986). Segundo DEEPE & BULLOCK (1990), na interação entre o fungo e os fagócitos, é importante considerar o processo de reconhecimento e ligação do fungo à superfície dessas células. A

ligação se estabelece devido a inúmeras moléculas presentes na membrana celular do macrófago, que facilitam a ligação a receptores específicos entre o hospedeiro e a célula fúngica.

Monócitos e macrófagos são, portanto, células da imunidade inata que expressam receptores de superfície para manose, CD14, componentes do sistema complemento, porção Fc de moléculas de imunoglobulinas e *Toll-like* (TLR) capazes de reconhecer produtos microbianos, levando à estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas (ABBAS & LICHTMAN, 2003; UNDERHILL & OZINSKY, 2002). As propriedades fagocítica e microbicida dessas células podem ser moduladas pelos receptores específicos de membrana, envolvidos na interação com os microrganismos (POPI et al., 2002). Entre esses receptores de superfície dos macrófagos, os melhor caracterizados são o receptor de manose e o receptor para o componente C3 do sistema complemento, ambos capazes de mediar a fagocitose e a morte intracelular de microrganismos patogênicos (LINEHAN et al., 2000).

O receptor para manose é uma lectina do macrófago que interage com resíduos terminais de manose e fucose de glicoproteínas e glicolípídeos. Esses açúcares são moléculas tipicamente observadas na parede celular de microrganismos, que são assim, reconhecidas pelas células do hospedeiro (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Esse receptor é capaz de interagir com uma ampla variedade de microrganismos, como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, protozoários e micobactérias (GAYNOR et al., 1995, KAHN et al., 1995; LINEHAN et al., 2000; O'RIORDAN et al., 1995, STAHL & EZEKOWITZ, 1998).

O sistema complemento, ativado tanto pela via clássica como pela alternativa, pode opsonizar e lesar alguns microrganismos e também mediar eventos iniciais da resposta inflamatória (CALDERONE & LINEHAN, 1989). Células leveduriformes de *P. brasiliensis* ativam o complemento pela via alternativa in vitro (MUNK & DIAS DA SILVA, 1992), resultando na opsonização e fagocitose do fungo por macrófagos (CALICH et al., 1979). Entretanto, até o momento, não se conhece o papel da opsonização do fungo por componentes do complemento sobre a atividade fungicida de monócitos contra o *P. brasiliensis*.

O reconhecimento de *Cryptococcus neoformans* por macrófagos e células dendríticas é dependente de componentes do complemento, presentes no soro (LEVITZ & TABUNI, 1991; KELLY et al. 2005). A incubação de cepas contendo cápsula polissacarídica com soro humano não inativado leva à ativação da via

alternativa do complemento e deposição de grande quantidade de fragmentos C3 na superfície da cápsula fúngica, auxiliando assim, a fagocitose (KOZEL et al., 1988; WILSON & KOZEL, 1992). Assim, formas encapsuladas de *Cryptococcus neoformans* podem ser fagocitadas após opsonização por componentes do sistema complemento, anticorpos específicos e ligação ao receptor para porção Fc da molécula de anticorpo e para fragmentos de C3, CR1, CR2, CR3 e CR4 (CROSS et al., 1997).

Na paracoccidiodomicose, assim como na maioria dos processos infecciosos, os fagócitos constituem importante linha de defesa do hospedeiro às infecções fúngicas (MURPHY, 1991).

Estudos experimentais e em pacientes com paracoccidiodomicose permitem sugerir que a resistência ao fungo parece ser dependente das atividades de células T e macrófagos, mediadas por interferon-gamma (IFN- γ) e outras citocinas de perfil Th1, destacando-se o papel do TNF- α . O efeito sinérgico entre essas duas citocinas é essencial para a resistência do hospedeiro contra infecções por microrganismos intracelulares (MARTIN-OROZCO et al., 2001) e para uma eficiente atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* (CALVI et al., 2003; SOARES et al., 2001).

Conídios ou células leveduriformes de *P. brasiliensis* multiplicam-se facilmente no interior de macrófagos alveolares e peritoneais murinos, depois de ingeridos. Entretanto, quando essas células são ativadas por IFN- γ , a multiplicação é limitada e os conídios e células fúngicas podem ser destruídos (BRUMMER et al., 1988, 1989, 1990).

Em modelos experimentais murinos de paracoccidiodomicose, a atividade fungicida de macrófagos contra o *P. brasiliensis*, decorrente da ativação com IFN- γ foi atribuída à produção de óxido nítrico (NO), induzida pela enzima NO sintase. A indução dessa enzima depende do sinergismo de ação de citocinas de perfil Th1, como TNF- α e IFN- γ e, de produtos liberados pelo próprio agente patogênico (BOCCA et al., 1998). Outros autores mostraram que a ativação com IFN- γ promove a eliminação do fungo tanto por meio da via L-arginina/óxido nítrico (NO) (GONZALEZ et al., 2000) como pela produção de NO e H₂O₂ (MOREIRA et al., 2008). Assim, no decorrer da infecção experimental por *P. brasiliensis*, há intensa produção de TNF- α , IFN- γ e NO, que se correlaciona com a capacidade fungicida dos macrófagos (NASCIMENTO et al., 2002).

Os mecanismos envolvidos na destruição do fungo por monócitos e macrófagos ativados não estão ainda totalmente esclarecidos. CALVI et al. (2003)

demonstraram que a ativação com IFN- γ não é suficiente para a atividade fungicida de células humanas contra cepa virulenta (Pb18) do *P. brasiliensis*. Este processo é efetivo após a pré-ativação dos monócitos com TNF- α ou IFN- γ associado ao TNF- α . Concordando com esses resultados, CARMO et al. (2006) demonstraram que a atividade fungicida de monócitos humanos contra o *P. brasiliensis* parece ser dependente da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por essas células, após ativação com IFN- γ e TNF- α . Por outro lado, o tratamento prévio de monócitos humanos com IL-10 inibe atividade fungicida dessas células ativadas com TNF- α (COSTA et al., 2007). Portanto, a atividade fungicida da célula fagocitária parece depender do balanço entre citocinas estimuladoras e supressoras produzidas pela célula, durante a interação com fungo.

Embora já tenha sido descrito que células leveduriformes de *P. brasiliensis* se multiplicam no interior de macrófagos não ativados (BRUMMER et al., 1989), não se conhece, até o momento, como o fungo é internalizado pelos fagócitos e, se a atividade fungicida dessas células está relacionada à ingestão das partículas fúngicas. Portanto, a avaliação da atividade fungicida de monócitos contra o *P. brasiliensis* opsonizado com soro humano poderá permitir a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro que ocorre na paracoccidiodomicose.

Objetivo

O presente projeto teve por objetivo avaliar o efeito da opsonização de células leveduriformes de *P. brasiliensis* com soro humano sobre a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e sobre a atividade fungicida de monócitos de sangue periférico humano, estimulados ou não com Interferon-gama, contra *P. brasiliensis*.

Materiais e Métodos

1. Cultivo de *P. brasiliensis*

A amostra de *P. brasiliensis* Pb18, considerada de alta virulência, foi cultivada em meio de cultura contendo 2% de glicose, 1% de peptona e 0,5% de extrato de levedura (GPY), com incubação a 36°C e utilizada após 6 dias de cultivo.

2. Teste de viabilidade do *P. brasiliensis*

Após o crescimento da amostra de *P. brasiliensis* cultivada de acordo com o item anterior, as células leveduriformes foram removidas da superfície de cultivo através da adição de aproximadamente 10 mL de meio RPMI, transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37°C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, uma alíquota dessa suspensão foi obtida para contagem das células leveduriformes em câmara hemocitométrica, tipo Neubauer. A viabilidade das células fúngicas foi determinada, utilizando-se microscópio com contraste de fase, segundo método descrito por SOARES et al. (2001). São consideradas como células viáveis as que se apresentam com aspecto brilhante, uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração opaca e escura. Foram empregadas nos experimentos, suspensões fúngicas com viabilidade maior ou igual a 90%.

3. Isolamento e cultura de monócitos

Um volume de 10 mL de sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis, doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu, foi colhido por punção venosa e colocado em tubo estéril, contendo 20 U/mL de heparina (Liquemine, Roche). As células mononucleares foram obtidas por separação em gradiente de Ficoll-Hypaque, segundo a técnica descrita por BOYUM (1968). O anel rico em células mononucleares foi lavado, inicialmente, com solução gelada de EDTA 0,01 M em PBS, por 10 minutos a 200 g e depois lavadas com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) por mais 10 minutos a 200 g. Após esses procedimentos as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal (Gibco) inativado (RPMI completo), sendo a identificação e a viabilidade dos monócitos estimadas após incubação com vermelho neutro a 0,02% por 10 minutos a 37°C. Os monócitos foram diferenciados dos linfócitos por apresentarem citoplasma de coloração vermelha. Assim, a concentração celular foi

ajustada para 2×10^6 monócitos viáveis/mL após contagem em câmara hemocitométrica.

4. Preparo do extrato-aquoso de células fúngicas

A amostra Pb192 de *P. brasiliensis* foi cultivada em meio de cultura GPY, contendo 2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 2% de ágar por incubação a 36°C. As culturas foram utilizadas após 5 dias de cultivo para o preparo do extrato aquoso segundo o método de KURITA et al. (1993). O crescimento de um tubo de cultura de Pb192 foi retirado com alça de platina e colocado em frasco contendo 250 mL de GPY, sendo incubado a 36°C com agitação constante de 140 rpm por 7 dias. Após o período, o meio foi distribuído em frascos plásticos que foram centrifugados a 2500 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado fúngico pesado, sendo adicionado volume de água destilada estéril suficiente para obtenção de suspensão fúngica a 10%. A seguir, a suspensão foi autoclavada a 127°C por 15 minutos e deixada em repouso por três dias à temperatura ambiente. Após esse período, os frascos contendo essa suspensão foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante retirado com esterilidade e denominado extrato aquoso. As alíquotas desse extrato foram armazenadas a -20°C até o momento de uso.

5. Avaliação da atividade fungicida

5.1. Padronização da concentração de Interferon-gama para estudo da atividade fungicida

Monócitos, obtidos conforme descrito no item 3, foram cultivados na presença ou ausência de diferentes concentrações (10, 20, 50, 100 e 200 UI/mL) de Interferon-gama (R & D Systems) por 24h a 37°C em placas de 96 orifícios e fundo plano (Linbro, Flow Lab, USA). A seguir, os orifícios da placa foram lavados com meio RPMI completo e os monócitos desafiados com células leveduriformes de *P. brasiliensis*, previamente incubadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro humano autólogo não inativado, na proporção fungo:monócito de 1:50 (culturas experimentais). Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas as suspensões de células fúngicas, diluídas em RPMI, e em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com os monócitos (culturas controles). Após

o período de 4h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as células submetidas a diversas lavagens com água destilada estéril. Este processo permite que os monócitos sejam removidos da placa e lisados, com conseqüente liberação dos fungos que foram, eventualmente, fagocitados. As suspensões obtidas através desse processo foram adicionadas aos sobrenadantes já coletados e consideradas como culturas experimentais. O mesmo procedimento foi realizado com as suspensões controles, contendo apenas o fungo. Ao final do processo, o material obtido a partir de lavagens das culturas controles e das experimentais com água destilada, contendo fungos viáveis ou não, foi centrifugado e ressuspendido em volume de água destilada que permita o crescimento de, no máximo, 200 colônias de fungos por placa, tornando a leitura da mesma mais sensível. Em seguida, 100 µL das suspensões fúngicas em água destilada foram semeados em três placas contendo meio de cultura ágar infusão de cérebro-coração (BHI-ágar – Difco Lab., Michigan, USA), suplementado com 4% de soro de cavalo e 5% de extrato aquoso preparado segundo KURITA et al. (1993), conforme descrito no item 4. A suspensão foi semeada, com auxílio de bastões de vidro em forma de L, por toda a superfície do meio de cultura. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a 36°C por 14 dias. A recuperação de fungos viáveis foi determinada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após 14 dias de semeadura e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de recuperação de fungos viáveis} = \frac{\text{Média das UFC das culturas experimentais}}{\text{Média das UFC das culturas controles}} \times 100$$

5.2. Avaliação do efeito do soro humano sobre a viabilidade de *P. brasiliensis*

Com o objetivo de avaliar se o soro humano poderia exercer efeito tóxico sobre a viabilidade de *P. brasiliensis*, células leveduriformes da amostra Pb18 de *P. brasiliensis* foram previamente incubadas por 30 minutos a 37°C na ausência de soro (SS) ou na presença de *pool* de soro humano normal, inativado por aquecimento a 56°C (SI) ou soro fresco, não submetido à inativação do sistema complemento (SF), nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 30% em meio de cultura RPMI. Em seguida as suspensões fúngicas foram plaqueadas em meio BHI-ágar

para avaliação da viabilidade por meio da recuperação dos fungos viáveis, conforme descrito no item 5.1.

5.3. Efeito do soro humano sobre a atividade fungicida de monócitos contra *P.brasiliensis*

Monócitos, obtidos conforme descrito no item 3, foram cultivados na presença ou ausência de 100 UI/mL de Interferon-gama (R & D Systems) por 24h a 37°C e 5% de CO₂ em placas de 96 orifícios e fundo plano (Linbro, Flow Lab, USA). A seguir, os orifícios da placa foram lavados com meio RPMI completo e os monócitos desafiados com células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* na proporção fungo:monócito de 1:50. As células leveduriformes da amostra Pb18 de *P. brasiliensis* foram previamente incubadas por 30 minutos a 37°C na ausência de soro (SS) ou na presença de *pool* de soro humano normal, inativado por aquecimento a 56°C (SI) ou soro fresco, não submetido à inativação do sistema complemento (SF), nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 30% em meio de cultura RPMI. Em seguida, as co-culturas contendo monócitos e fungo foram plaqueadas em meio BHI-ágar, conforme descrito no item 5.1. A atividade fungicida (AF) dos monócitos foi determinada após 14 dias de semeadura e calculada através da seguinte fórmula:

$$AF = 1 - \left[\frac{\text{Média das UFC das culturas experimentais}}{\text{Média das UFC das culturas controles}} \right] \times 100$$

6. Determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por monócitos

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por Pick & Mizel (1981) e adaptado por Russo et al. (1989).

As células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram obtidas de acordo com o item 3 e incubadas por 24h na ausência ou presença de 100 UI/mL de Interferon-gama (R&D Systems) a 37 °C em tensão constante de 5% de CO₂. Após incubação, a placa foi lavada com meio RPMI completo e as células aderentes foram desafiadas com células leveduriformes viáveis de *P. brasiliensis* na proporção fungo:monócitos de 1:1 e 1:50. As células leveduriformes da amostra Pb18 de *P. brasiliensis* foram previamente incubadas por 30 minutos a 37°C na

ausência de soro (SS) ou na presença de *pool* de soro humano normal, inativado por aquecimento a 56°C (SI) ou soro fresco, não submetido à inativação do sistema complemento (SF), na concentração de 10% em solução tampão vermelho fenol. Em seguida, foram adicionados, a cada orifício, 100 µL de solução tampão contendo: 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato, pH 7; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho fenol; 0,01 mg/mL de peroxidase tipo II (Sigma, Chemical Co USA) e 1 mg de *Phorbol myristate acetate* (PMA - Sigma). Após 60 minutos a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 10 µL de NaOH 1 N. As amostras foram ensaiadas em triplicata. A densidade óptica de cada orifício da placa foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620 nm, com *blank* constituído de 100 uL de solução de vermelho fenol e 10 uL de NaOH 1 N. Os resultados foram expressos em nanomoles de H₂O₂/2x10⁵ monócitos, a partir de curva padrão preparada em cada ensaio, e constituída por concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão vermelho fenol.

7. Análise estatística

Os resultados da padronização da concentração de IFN-γ para ativação de monócitos, produção de H₂O₂ e avaliação da atividade fungicida dessas células contra células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para amostras dependentes, empregando-se o programa estatístico INSTAT, Graph Pad, San Diego, CA, USA, 2000. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

1. Padronização da concentração de IFN-gama para avaliação da atividade fungicida de monócitos contra *P.brasiliensis*

Na Figura 1 são apresentados os resultados da percentagem de atividade fungicida obtidos nas culturas de monócitos desafiados com o fungo em relação às culturas controle, contendo apenas o fungo.

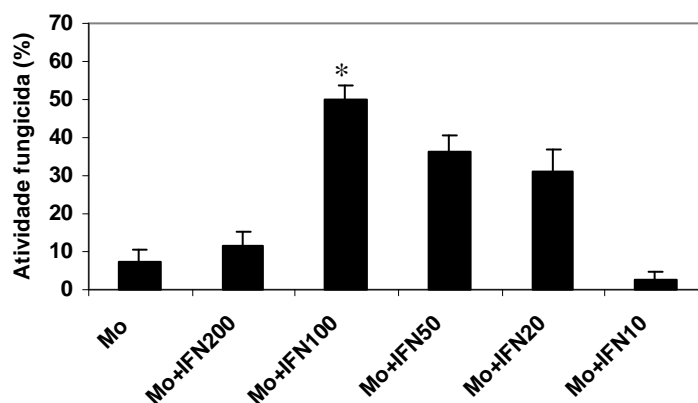


Figura 1. Atividade fungicida de monócitos humanos estimulados ou não com diferentes concentrações de Interferon-gama e desafiados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* tratadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro humano não inativado. Os resultados são expressos em valores da média \pm SD obtida de 5 ensaios independentes

* ($p < 0.05$) versus Mo, Mo+IFN200, Mo+IFN20, Mo+IFN10.

Os resultados da padronização da atividade fungicida de monócitos mostram que o IFN- γ tem efeito dose-dependente sobre a capacidade dos monócitos matarem o *P. brasiliensis*. A concentração de 100 UI da citocina induziu valores significativamente mais elevados em comparação ao tratamento das células com as doses de 10, 20, 200 UI/mL de IFN- γ e da cultura não estimulada. Em vista desses resultados, utilizamos a concentração de 100 UI/mL de IFN- γ nos estudos para avaliar o efeito da opsonização de *P. brasiliensis* com soro humano sobre a atividade fungicida de monócitos.

2. Avaliação do efeito do soro humano sobre a viabilidade de *P. brasiliensis*

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram previamente incubadas por 30 minutos a 37°C na ausência de soro (SS) ou na presença de *pool* de soro humano normal, inativado por aquecimento a 56°C (SI) ou soro fresco, não submetido à inativação do sistema complemento (SF), nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 30% em meio de cultura RPMI. Em seguida as suspensões fúngicas foram plaqueadas em meio BHI-ágar para avaliação da viabilidade por meio da recuperação dos fungos viáveis.

Na Figura 2 observa-se que o número de unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos viáveis recuperados após tratamento com SF e SI foram semelhantes aos dos fungos não opsonizados com soro humano. Os resultados mostraram que a adição de SF ou de SI em diferentes concentrações a culturas de *P. brasiliensis* não interfere com a viabilidade do fungo.

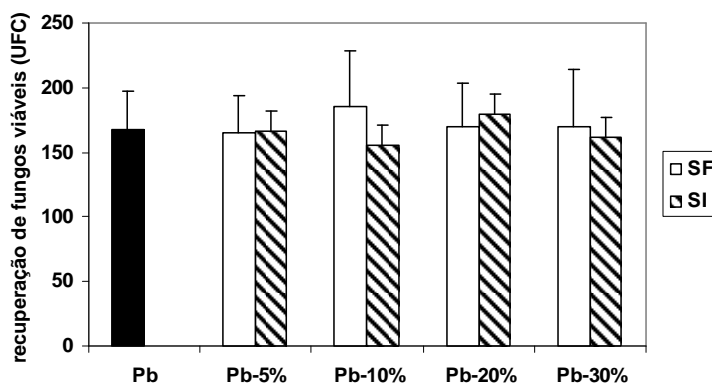


Figura 2. Efeito do soro humano não inativado (SF) ou inativado por aquecimento a 56°C (SI) sobre o cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Células leveduriformes da amostra Pb18 foram cultivadas na presença ou ausência de SF e SI nas concentrações de 5, 10, 20 e 30% em meio RPMI por 4h a 37°C e em seguida plaqueadas em meio BHI-ágar para avaliação da viabilidade por meio da recuperação dos fungos viáveis. Os resultados representam a média \pm SD de 10 experimentos independentes.

A manutenção de formas viáveis de *P. brasiliensis* após tratamento do fungo com soro humano confirma resultados anteriores de que componentes do sistema complemento são ativados pelo fungo e se ligam à superfície da célula fúngica. MUNK & DA SILVA (1992) mostraram que diferentes componentes do sistema complemento e seus produtos de clivagem se depositam sobre a superfície da amostra Pb18 de *P. brasiliensis*. A incubação de células leveduriformes de Pb18, opsonizadas com soro humano normal, mostrou que Pb18 ativa o complemento *in vitro* e liga C3 e fragmentos C3c, C3d, C3g, fator H, fator B, C4 e C5b-9 em sua superfície. A análise microscópica por imunofluorescência mostrou padrão de distribuição uniforme desses componentes em mais de 80% das células de Pb18. A ligação desses componentes à superfície da célula fúngica não exerce efeito sobre a viabilidade do *P. brasiliensis*. Em trabalho recente, VILANI-MORENO et al. (2007) verificaram que *Lacazia loboi*, agente etiológico da Doença de Jorge Lobo, micose subcutânea crônica, ativa o complemento pela via alternativa, levando ao depósito do componente C3 na parede celular, sem causar alteração da viabilidade do fungo.

3. Efeito do soro humano sobre a atividade fungicida de monócitos contra *P.brasiliensis*

Os resultados da Figura 3 mostram que monócitos cultivados na presença ou ausência de IFN- γ e desafiados com Pb18 não opsonizado (SS) ou opsonizado com diferentes concentrações de SI não apresentam atividade fungicida. Entretanto, essas células pré-tratadas com IFN- γ e desafiadas com o fungo opsonizado com SF nas concentrações de 10% e 20% apresentam atividade fungicida significativamente mais elevada do que quando o fungo é opsonizado com 5 e 30% de SF ou com diferentes concentrações de SI e, também maior em comparação com células não estimuladas com IFN- γ e desafiadas com Pb18 opsonizado com SF. O desafio de monócitos não ativados por IFN- γ com Pb18 opsonizado com 10% e 20% de SF induziu aumento significativo da atividade fungicida em comparação às co-culturas desafiadas com o fungo não opsonizado ou opsonizado com as mesmas concentrações de SI (Figura 3).

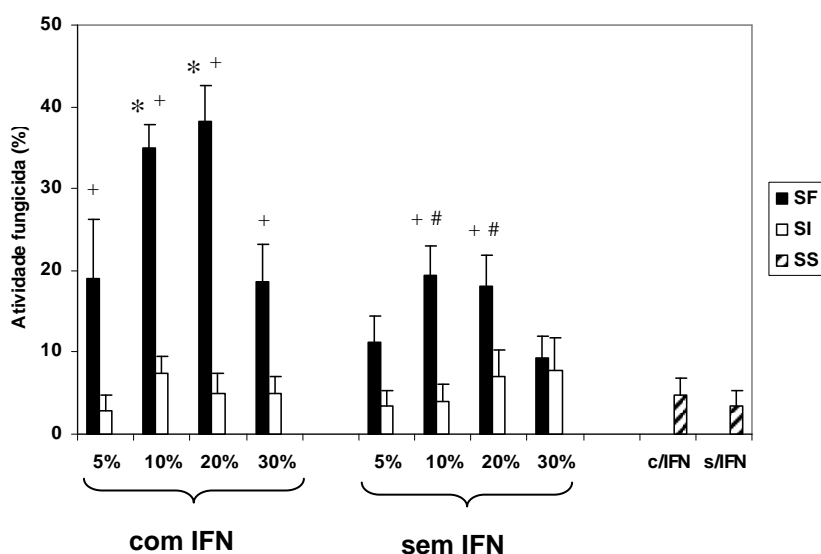


Figura 3. Atividade fungicida de monócitos humanos estimulados ou não com 100 UI/mL de Interferon-gama (IFN- γ) por 24 h a 37°C e desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* pré-tratadas com meio RPMI sem soro (SS), RPMI com soro humano não inativado (SF) ou RPMI com soro humano inativado (SI) nas concentrações de 5, 10, 20 e 30% e na proporção fungo:monócito de 1:50. Os valores representam a média \pm SD dos resultados obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ versus 5% e 30% (SF);

+ $p < 0,05$ (SF versus SI, SS);

p < 0,001 (c/IFN x s/IFN)

O efeito do tratamento das células com IFN- γ sobre a atividade fungicida de monócitos desafiados com Pb18 opsonizado com SF, SI ou não opsonizado (SS) pode ser melhor visualizado na Figura 4.

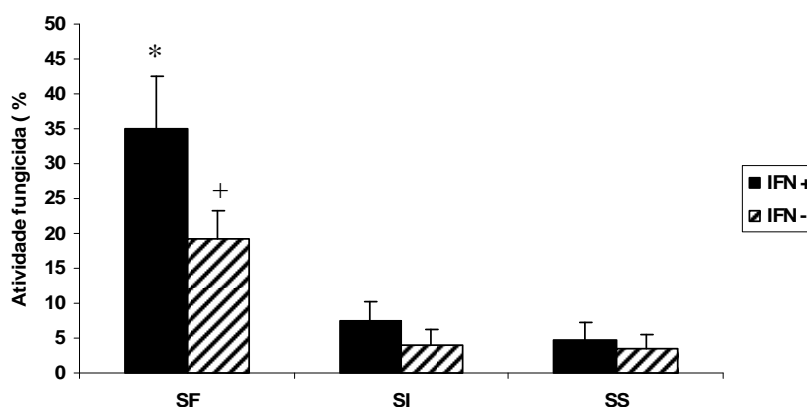


Figura 4. Atividade fungicida de monócitos humanos estimulados ou não com 100 UI/mL de Interferon-gama (IFN- γ) por 24h a 37°C e desafiados por 4h com células leveduriformes de *P. brasiliensis* pré-tratadas com meio RPMI sem soro (SS), RPMI com 10% de soro humano não inativado (SF) ou RPMI com 10% soro humano inativado (SI) e na proporção fungo:monócito de 1:50. Os valores representam a média \pm SD dos resultados obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* p < 0,01 versus SF-IFN; SI (IFN⁺ e IFN⁻); SS (IFN⁺ e IFN⁻);

+ p < 0,01 versus SI (IFN⁺ e IFN⁻); SS (IFN⁺ e IFN⁻)

A análise dos resultados revela que monócitos previamente tratados ou não com IFN- γ e desafiados com Pb18 opsonizado com soro fresco, não inativado (SF), apresentaram capacidade fungicida significativamente mais elevada em relação às células desafiadas com o fungo não opsonizado (SS) ou tratado com soro inativado (SI). Esses resultados sugerem que a ativação de monócitos com IFN- γ aumenta a capacidade fungicida dessas células contra o fungo, quando as células fúngicas são opsonizadas pelo sistema complemento. Atividade fungicida eficiente só é obtida após ativação de monócitos com IFN- γ ou após ação sinérgica de IFN- γ e TNF- α (CALVI et al., 2003; CARMO et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2007). A atividade fungicida de macrófagos derivados de monócitos contra *Histoplasma capsulatum* mostrou ser dependente da concentração de IFN- γ para ativação dessas células (BRUMMER et al., 1991). VECCHIARELLI et al. (1989) demonstraram que

macrófagos alveolares humanos e monócitos do sangue periférico são capazes de matar *Candida albicans* após ativação com IFN- γ , Interleucina-1 ou Lipopolissacáride (LPS).

Já está bem estabelecido na literatura, que uma eficiente atividade fungicida de monócitos e macrófagos está relacionada com a produção de níveis elevados de TNF- α , detectados após pré-ativação com IFN- γ , resultando na morte de microrganismos tais como *Listeria monocytogenes* (LANGERMANS et al., 1992), *Leishmania major* (GREEN et al., 1990) e *H. capsulatum* (WU-HSIEH et al., 1992). Além disso, um efeito sinérgico de ambas citocinas é necessário para ativar monócitos do sangue periférico para *killling* de *Legionella pneumophila* (MATSIOTA-BERNARD et al., 1993), *Leishmania donovani* (REINER et al., 1995) e *Coccidioides immitis* (BEAMAN, 1991).

Estudos sobre os mecanismos envolvidos na atividade fungicida de monócitos humanos contra *P. brasiliensis* demonstraram a participação de H₂O₂ no mecanismo efetor dessas células após ativação com IFN- γ e TNF- α . Segundo CALVI et al. (2003) H₂O₂ parece ser um metabólito importante para a atividade fungicida de monócitos estimulados por IFN- γ e TNF- α e CARMO et al. (2006), atribuíram a atividade fungicida de monócitos humanos, estimulados por TNF- α ou TNF- α associado a IFN- γ sobre Pb18 à produção de H₂O₂, uma vez que esse processo foi inibido significativamente na presença de catalase.

Ao contrário da literatura, nossos resultados mostram que monócitos não estimulados com IFN- γ e desafiados com Pb18 tratado com soro fresco apresentam atividade fungicida significativamente mais elevada em comparação com células estimuladas ou não com IFN- γ e desafiadas com o fungo tratado com soro inativado ou sem soro. Essa atividade, embora significativamente menor do que a obtida após tratamento com IFN- γ indica o importante papel do sistema complemento na atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*.

O sistema complemento participa na defesa contra infecções fúngicas, promovendo quimiotaxia, opsonização das leveduras e fagocitose por células inflamatórias (GRUBER et al., 1998; LEVITZ, 2002; TRIEBEL et al., 2003). A fagocitose de *C. albicans* e de *C. neoformans* é dependente da opsonização do fungo por componentes do complemento e, é acentuadamente reduzida após inativação do soro por aquecimento a 56°C (BOLANOS & MITCHELL, 1989; FERRANTE & THONG, 1979; KOZEL et al., 1988).

A opsonização é um pré-requisito para a fagocitose por monócitos, macrófagos e células polimorfonucleares (STURTEVANT & LATGÉ, 1992). Portanto, a deposição do componente C3 e sua degradação na parede celular de fungos patogênicos se constitui no evento central da interação entre o fungo e o hospedeiro humano (SPETH et al., 2004). Vários trabalhos têm mostrado que macrófagos humanos expressam o receptor para complemento CR3, que reconhece iC3b, o fragmento de C3 predominante em fungos opsonizados com soro humano como *C. neoformans* (KELLY et al., 2005; ZARAGOZA et al., 2003) e *Blastomyces dermatitidis* (ZHANG & KLEIN, 1997; ZHANG et al., 2001).

4. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por monócitos humanos contra *P. brasiliensis*

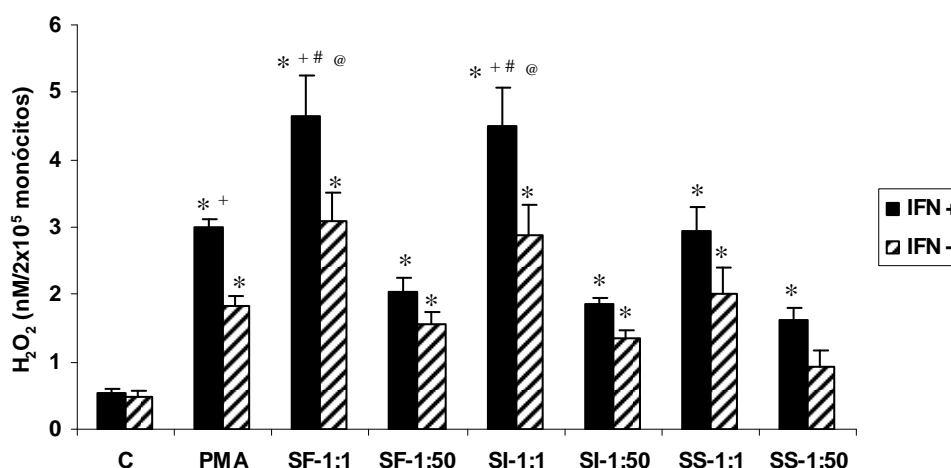


Figura 5. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por monócitos humanos estimulados ou não com 100 UI/mL de Interferon-gama (IFN- γ) por 24 h a 37°C e desafiados por 60 min com células leveduriformes de *P. brasiliensis* pré-tratadas com meio RPMI sem soro (SS), RPMI com 10% de soro humano não inativado (SF) ou RPMI com 10% soro humano inativado (SI), na proporção fungo:monócito de 1:1 e de 1:50. Os valores representam a média \pm SD dos resultados obtidos de 15 indivíduos saudáveis.

* (p<0,05) versus controle;

+ (p<0.05) versus IFN γ ;

(p<0,05) versus 1:50; @ (p<0.05) versus SS

A pesquisa da liberação de H₂O₂ mostrou que monócitos desafiados com *P. brasiliensis* produzem níveis significativamente mais elevados de H₂O₂ quando o fungo é opsonizado com SF ou SI em relação aos fungos não opsonizados (SS). Monócitos previamente estimulados com IFN- γ produzem níveis mais elevados

desse metabólito em comparação aos não estimulados com a citocina. Além disso, a proporção fungo-monócito de 1:1 induz níveis mais elevados de H_2O_2 do que a proporção 1:50 (Figura 4). Estudos sobre os mecanismos envolvidos na atividade fungicida de monócitos humanos contra *P. brasiliensis* apontam para a participação de H_2O_2 no mecanismo efetor dessas células após ativação com IFN- γ e TNF- α . Segundo CALVI et al. (2003), H_2O_2 parece ser um metabólito importante para a atividade fungicida de monócitos estimulados por IFN- γ e TNF- α , representando uma das principais moléculas envolvidas em mecanismos microbicidas e tumoricidas destas células. CARMO et al. (2006), atribuíram a atividade fungicida de monócitos humanos, estimulados por TNF- α ou TNF- α associado ao IFN- γ sobre Pb18 à produção de H_2O_2 , uma vez que esse processo foi inibido significativamente na presença de catalase.

A maior liberação de H_2O_2 e mais eficiente atividade fungicida, detectadas após estímulo dos monócitos com IFN- γ , reforçam trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, que associaram a atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* à produção de H_2O_2 , pelos monócitos ativados com IFN- γ .

Em conjunto, os resultados sugerem que o soro humano não inativado contém componentes do sistema complemento, importantes para ativação de monócitos e indução de atividade fungicida eficiente contra *P. brasiliensis*. Considerando que o *P. brasiliensis* ativa o complemento pela via alternativa (MUNK & DA SILVA, 1992), estudos envolvendo componentes dessa via de ativação e seus receptores na superfície de monócitos permitirão melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação de monócitos pelo *P. brasiliensis* e sua importância na relação patógeno-hospedeiro.

Conclusões

- A concentração de IFN- γ que induziu o desenvolvimento da atividade fungicida mais eficiente foi a de 100 U/mL
- A adição tanto do soro não inativado, quanto inativado não interfere na viabilidade do fungo.
- Soro humano não inativado contém componentes do complemento, importante para a ativação e indução da atividade fungicida.

- Células previamente ativadas com IFN- γ e desafiadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* opsonizadas com soro fresco e soro inativado apresentam altos níveis de produção de H₂O₂, representando uma importante molécula na ativação da atividade fungicida.

Referências Bibliográficas

ABBAS AK, LICHTMAN AH. Innate Immunity. In:----- Editors. Cellular and Molecular Immunology 5thed, 2003; cap 12, 275-97.

ADAMS DO; HAMILTON TA . Macrophages as destructive cells in host defense. In: GALLIN JI, GOLDSTEIN JM, SKYDERMAN RS., editors. Inflammation: basic principles and correlates. New York: Raven Press, 1987.

BEAMAN L. Effects of recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor on in vitro interactions of human mononuclear phagocytes with *Coccidioides immitis*. Infect Immun 1991; 59: 4227-4229

BOCCA AL, HAYASHI EE, PINHEIRO AG, FURLANETTO AB, CAMPANELLI AP, CUNHA FQ, FIGUEIREDO F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J Immunol. 1998; 161: 3056-63.

BOLANOS B, MITCHELL TG. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages. J Med Vet Mycol 1989; 27: 203-217.

BOYUM A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968; 97: 77-89.

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

BRUMMER E, HANSON LH, STEVENS DA. *In vitro* and *in vivo* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitides*. J Immunol 1988; 140: 2786-9.

BRUMMER E, SUN SH, HARRISON JL, PERLMAN AM, PHILPOTT DE, STEVENS DA. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. *Infect Immun* 1990; 58: 2628-36.

BRUMMER E, KURITA N, YOSHIDA S, NISHIMURA K, MIYAJI M. Killing of *Histoplasma capsulatum* by gamma-interferon-activated human monocyte-derived macrophages: evidence for a superoxide anion-dependent mechanism. *J Med Microbiol* 1991; 35: 29-34.

CALDERONE RA, LINEHAN L. The role of complement in host resistance to systemic fungal infection. *Immunology Series* 1989; 47: 225-42.

CALICH VLG, KIPNIS TL, MARIANO M, FAVA-NETTO C, DIAS DA SILVA W. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: Its opsonic effect and possible significance for an in vivo model of infections. *Clin Immunol Immunopathol* 1979; 12: 20-30.

CALVI SA, PERAÇOLI MTS, MENDES RP, MARCONDES-MACHADO J, FECCHIO D, MARQUES SA, SOARES AMVC. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect* 2003; 5: 107-13.

CARMO JP, DIAS-MELICIO LA, CALVI SA, PERAÇOLI MTS, SOARES AMVC. TNF-alpha activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol* 2006; 44: 363-368.

COSTA DL, DIAS-MELICIO LA, ACORCI MJ, BORDON AP, TAVIAN EG, PERAÇOLI MT, SOARES AM. Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol*. 2007; 51:73-80.

CROSS CE, COLLINS HL, BANCROFT GJ. CR3-dependent phagocytosis by murine macrophages: different cytokines regulate ingestion of a defined CR3 ligand and complement-opsonized *Cryptococcus neoformans*. *Immunology* 1997; 91: 289-96.

DEEPE GS, BULLOCK WE. Immunological aspects of fungal pathogenesis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 567-79.

FERRANTE A, THONG YH. Requirement of heat-labile opsonins for maximal phagocytosis of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1979; 17: 293-297.

FRANCO M, MENDES RP, MOSCARDI-BACCHI M, REZKALLAH-IWASSO MT, MONTENEGRO MR. Paracoccidioidomycosis. *Bailliere's Clin Trop Med Comm Dis* 1989, 4:185-220.

FRANCO M, PERAÇOLI MTS, SOARES AMVC, MONTENEGRO MR, MENDES RP, MEIRA DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993; 5:115-49.

FROMTLING RA, SHADOMY HJ. An overview of macrophages fungal interactions. *Mycopathologia* 1986; 93:77-93.

GAYNOR CD, MCCORMACK FX, VOELKER DR, MCGOWAN SE, SCHLESINGER LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol*. 1995; 155: 5343-51.

GONZALEZ A, DE GREGORI W, VELEZ D, RESTREPO A, CANO LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* 2000; 68: 2546-52.

GREEN SJ, CRAWFORD RM, HOCKMEYER JT, MELTZER MS, NACY CA. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1990; 145: 4290-4297.

GRUBER A, LUKASSER-VOGL E, VON ZEPELIN MB, DIERICH MP, WURZNER R. Human immunodeficiency virus type1 gp160/gp41 binding to *Candida albicans* selectively enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis* 1998; 177: 1057–1063.

KAHN S, WLEKLINSKI M, ARUFFO A, FARR A, CODER D, KAHN M. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp. Med* 1995; 182: 1243-58.

KELLY RM, CHEN J, YAUCH LE, LEVITZ SM. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2005; 73: 592-8.

KOZEL TR, PFROMMER GS, GUERLAIN AS, HIGHISON BA, HIGHISON GJ. Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. *Infect Immun* 1988; 56: 2794-2800.

KURITA N, SANO A, COELHO K I, TAKEO K, NISHIMURA K, MIYAJI M. An improved culture medium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1993; 31:201-5.

LANGERMANS JA, VAN DER HULST ME, NIBBERING PH, VAN FURTH R. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. *Infect Immun* 1992; 60: 5107-5112.

LEVITZ SM. Receptor-mediated recognition of *Cryptococcus neoformans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2002; 43: 133-136.

LEVITZ SM, TABUNI A. Binding of *Cryptococcus neoformans* by human cultured macrophages. Requirements for multiple complement receptors and actin. *J Clin Invest* 1991; 87: 528-35.

LINEHAN SA, MARTÍNEZ-POMARES I, GORDON S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect* 2000; 2: 279-88.

MARTÍN-OROZCO N, ISIBASI A, ORTIZ-NAVARRETE V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. *Immunology* 2001; 103: 41-8.

MATSIOTA-BERNARD P, LEFEBRE C, SEDQUI M, CORNILLET P, GUENOUNOU M. Involvement of tumor necrosis factor alpha in intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. *Infect Immun* 1993; 61: 4980-4983.

MOREIRA AP, DIAS-MELICIO LA, PERAÇOLI MT, CALVI SA, VICTORIANO DE CAMPOS SOARES AM. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Mycopathologia*. 2008; 166:17-23.

MUNK ME, DIAS DA SILVA W. Activation of human complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. J Med Vet Mycol 1992; 30: 481-4.

MURPHY JW. Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi. Annu Rev Microbiol 1991; 45: 509-38.

NASCIMENTO FR, CALICH VL, RODRIGUEZ D, RUSSO M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. J Immunol. 2002; 168: 4593-600.

NASCIMENTO MP, CAMPOS SOARES AM, DIAS-MELÍCIO LA, PARISE-FORTES MR, MARTINS RA, NAKAIRA ET, PERAÇOLI MT. Fungicidal activity of human monocyte-derived multinucleated giant cells induced *in vitro* by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. Mycopathologia 2008; 166:25-33.

O'RIORDAN DM, STANDING JE, LIMPER AH. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. Infect Immun 1995; 63: 779-84.

PERAÇOLI MTS, SOARES AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta CE, editor. Imunologia das infecções. Uberaba: FUNEPU; 1992. p.15-36.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophage in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. J Immunol Methods 1981; 46: 211-26.

POPI AF, LOPES JD, MARIANO M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. Cell Immunol 2002; 218: 87-94.

REINER NE, NG W, WILSON CB, MCMASTER WR, BURCHETT SK. Modulation of *in vitro* monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. J Clin Invest 1995; 85: 1914-1924.

RUSSO M, TEIXEIRA HC, MARCONDES MCG, BARBUTO JAM. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Brazilian J Med Biol Res*, 1989; 22: 1271-73.

SOARES AM, CALVI SA, PERAÇOLI MT, FERNADEZ AC, DIAS LA, DOS ANJOS AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102: 480-5.

SOARES AMVC, SILVA WB, RODRIGUES DR, CALVI SA, DIAS LA, PERAÇOLI MTS, KUROKAWA CS. IL-10 but not TGF-beta inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human activated monocytes. *Annual Rev Biomed Sci* 2002 (special issue) p. 89.

SPETH C, RAMBACH G, LASS-FLORL C, DIERICH MP, WURZNER R.) The role of complement in invasive fungal infections. *Mycoses* 2004; 47: 93-103.

STAHL PD; EZEKOWITZ RAB. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 50-5.

STURTEVANT JE, LATGÉ JP. Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J Infect Dis* 1992; 166: 580–586.

TRIEBEL T, GRILLHOSL B, KACANI L, LELL CP, FUCHS A, SPETH C, LASS-FLORL C, STEINMANN J, DIERICH MP, WURZNER R. Importance of the terminal complement components for immune defence against *Candida*. *Int J Med Microbiol* 2003; 292: 527-536.

UNDERHILL DM; OZINSKY A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825-52.

VAN FURTH R. Human monocytes and cytokines. *Res Immunol* 1998; 149: 719-20.

VECCHIARELLI A, TODISCO T, PULITI M, DOTTORINI M, BISTONI F. Modulation of anti-*Candida* activity of human alveolar macrophages by interferon-gamma or interleukin-1-alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1989;1: 49-55.

VILANI-MORENO FR, MOZER E, SENE AMG, FERASÇOLI MO, PEREIRA TC, MIRAS MG, SOUZA GHP, BELONE AFF. In vitro and in situ activation of the complement system by the fungus *Lacazia loboi*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2007; 49: 97-101.

WANKE B, LONDERO AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p.109-120.

WILSON MA, KOZEL TR. Contribution of antibody in normal human serum to early deposition of C3 onto encapsulated and nonencapsulated *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1992; 60: 754-61.

WU-HSIEH BA, HOWARD DH. Intracellular growth inhibition of *Histoplasma capsulatum* induced in murine macrophages by recombinant gamma interferon is not due to a limitation of the supply of methionine or cysteine to the fungus. Infect Immun 1992; 60: 698-700.

ZARAGOZA O, TABORDA CP, CASADEVALL A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. Eur. J Immunol 2003; 33: 1957–1967.

ZHANG MX, BRANDHORST TT, KOZEL TR, KLEIN BS. Role of glucan and surface protein BAD1 in complement activation by *Blastomyces dermatitidis* yeast. Infect Immun 2001; 69: 7559–64.

ZHANG MX, KLEIN B. Activation, binding and processing of complement component 3 (C3) by *Blastomyces dermatitidis*. Infect Immun 1997; 65: 1849–55.