

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”

UNESP – FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

Efeito da interleucina-15 sobre a atividade
fungicida, metabolismo oxidativo e produção de
citocinas por monócitos humanos, infectados *in*
vitro com *Paracoccidioides brasiliensis*

CAMILA FERREIRA BANNWART

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Doenças
Tropicais da Faculdade de Medicina de
Botucatu para obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Profa Dra Maria Terezinha Serrão Peraçoli

BOTUCATU

2007

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose é uma micose sistêmica, endêmica na América Latina, com alta incidência no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina ⁽¹⁾. O agente etiológico da doença é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que se apresenta na forma de micélio ou conídios à temperatura ambiente, com variação de 4 a 28°C. Na temperatura de 37°C, tanto *in vivo*, nos tecidos do hospedeiro, quanto *in vitro*, em meios de cultura apropriados apresenta-se sob a forma de levedura ⁽²⁾.

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 ^(3,4). Pacientes com a forma ativa da micose apresentam uma gama de sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais que definem as formas aguda e crônica ⁽⁵⁾. A forma aguda é geralmente grave, de evolução rápida, afeta predominantemente jovens de ambos os sexos e compromete preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear. A forma crônica tem duração prolongada, instalação lenta, gradual e afeta principalmente indivíduos do sexo masculino acima de 30 anos de idade. As manifestações pulmonares são evidentes em 90% dos adultos doentes e as lesões podem permanecer localizadas (forma unifocal) ou disseminar por via linfática pulmonar ou linfohematogênica, envolvendo outros órgãos ou sistemas (forma multifocal) ^(4,6).

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. O *P.brasiliensis* induz resposta imunológica altamente complexa e multifatorial, cujos componentes celulares são ativados, no sentido de desempenharem papel efetor direto contra o parasita ou de participar dos mecanismos imunoregulatórios presentes no organismo infectado ⁽⁷⁾.

A reação granulomatosa que ocorre na paracoccidiodomicose humana e na experimental, representa uma resposta do hospedeiro ao *P.brasiliensis*, na tentativa de bloquear e restringir o fungo, impedindo sua multiplicação e disseminação pelos tecidos ⁽⁴⁾. A evolução do granuloma parece estar relacionada à resposta imune do hospedeiro e aos componentes de parede liberados pelo fungo ⁽⁸⁾. A análise imunohistoquímica da composição das células presentes nos granulomas epitelióides, obtidos de biópsias de pele ou mucosa de pacientes com paracoccidiodomicose tem demonstrado a presença de um agrupamento central de células HLA-DR⁺, representadas por macrófagos e células epitelióides envolvidas por manto periférico de células T com predomínio da população CD4⁺. Estes achados sugerem que os linfócitos T e as células HLA-DR⁺ estão ativamente envolvidas no processo de formação do granuloma e na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* ⁽⁹⁾. Portanto, macrófagos e linfócitos T parecem ser as células centrais na morfogênese do processo inflamatório e, sua atuação sinérgica tem papel importante na formação e modulação do granuloma, através da produção de citocinas e outros mediadores no sitio inflamatório ⁽¹⁰⁾.

Os mecanismos de imunidade inespecífica ou inata apresentam grande importância no combate a fungos patogênicos. Entre os vários mecanismos naturais de defesa, monócitos e macrófagos desempenham papel central na

resistência aos fungos e são consideradas fontes importantes de citocinas ⁽¹¹⁾. 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 ⁽¹²⁾. A função dessas células depende do seu estado de ativação, induzido principalmente pelo ambiente de citocinas presentes durante a interação com o microrganismo. Assim, o sucesso da implantação do *P. brasiliensis* nos tecidos do hospedeiro parece depender não só de características do fungo, mas principalmente, do ambiente de citocinas produzidas durante o confronto entre o fungo e os fagócitos.

Os principais mecanismos pelos quais os monócitos e macrófagos podem ser ativados são: 1) após interação com microrganismos e seus produtos, tais como endotoxinas e componentes da parede celular ⁽¹³⁾; 2) estímulo por citocinas como interferon-gama (IFN- γ) ⁽¹⁴⁾ e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). ^(15,16). Uma das alterações metabólicas que ocorre quando o macrófago é ativado, é o aumento das atividades microbicida, fagocítica e citotóxica ^(17,18). Essas alterações envolvem também modificações bioquímicas e de diferentes funções dessas células, tais como aumento da capacidade de aderência, espraiamento sobre superfícies de vidro ^(19,20), expressão de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade ⁽¹³⁾, produção de metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio e síntese de citocinas inflamatórias como Interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-8 e TNF- α ⁽²¹⁾.

Os macrófagos e monócitos, além de serem fontes importantes de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12, em micoses sistêmicas são responsáveis também pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e fator beta de crescimento e transformação (TGF- β 1). Todas essas citocinas apresentam atividade estimuladora ou supressora sobre os macrófagos e linfócitos, interagindo com os receptores específicos, presentes nessas células e modulando sua função ^(22,23). Citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-8 e GM-CSF são importantes no processo de ativação macrofágica, enquanto outras como IL-6, IL-10 e TGF- β 1 são consideradas fatores de desativação do ⁽²⁴⁻²⁶⁾. O balanço na produção de citocinas supressoras e estimuladoras pode interferir tanto na resposta imune específica como inespecífica. O desequilíbrio na produção tanto de citocinas supressoras como estimulatórias pode afetar a resposta inata ou ainda causar distúrbios na resposta imune específica, mediada por linfócitos T e B ⁽²⁷⁾.

Estudos experimentais e em pacientes com paracoccidiodomicose permitem sugerir que a resistência ao fungo pode ser dependente das atividades de células T e macrófagos, mediadas por 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 ⁽²⁸⁾ e para uma eficiente atividade fungicida contra o *P.brasiliensis* ^(29,30).

A ativação do *burst* respiratório, com conseqüente aumento da produção de metabólitos do oxigênio, tais como o ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), é considerada como importante medida de ativação macrofágica, sendo este processo altamente relacionado à exposição a vários microrganismos, com concomitante aumento da atividade microbicida. Os metabólitos do oxigênio causam lesão celular, desorganizando a estrutura de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos e ativando grupos tiol em enzimas ⁽³¹⁾. Assim, a capacidade que os macrófagos ativados possuem em destruir *Leishmania donovani* ⁽³²⁾, *Mycobacterium leprae* ⁽³³⁾ e *Candida albicans* ⁽³⁴⁾ correlaciona-se com a produção de H_2O_2 por essas células.

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 $IFN-\gamma$, a multiplicação é limitada e os conídios e células fúngicas podem ser destruídos ⁽³⁵⁻³⁷⁾. Em relação às células murinas os resultados mostraram que a ativação com $IFN-\gamma$ promove a eliminação do fungo por meio da via L-arginina/óxido nítrico (NO) ⁽³⁸⁾.

Embora os mecanismos envolvidos na destruição do *P. brasiliensis* por monócitos e macrófagos ativados não estejam ainda totalmente esclarecidos, estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram que a atividade fungicida de monócitos humanos contra o *P. brasiliensis* parece ser dependente da produção de H_2O_2 por essas células após ativação com $IFN-\gamma$ associado a $TNF-\alpha$ ⁽²⁹⁾. A incubação dos monócitos com catalase, um “escavenger” desse metabólito, inibe a morte intracelular por monócitos ativados com $TNF-\alpha$ ou com $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ ⁽³⁹⁾. Por outro lado, o tratamento prévio de monócitos humanos com IL-10 inibe atividade fungicida dessas células ativadas com $TNF-\alpha$ ⁽⁴⁰⁾. Resultados obtidos por

MOREIRA et al. ⁽⁴¹⁾, empregando macrófagos peritoneais de camundongos ativados com IFN- γ , sugerem a participação de H₂O₂ e de óxido nítrico (NO) na atividade fungicida contra o *P.brasiliensis* e demonstram o papel inibitório da IL-10 sobre essa atividade induzida tanto por IFN- γ quanto por TNF- α . Portanto, a atividade fungicida da célula fagocitária parece depender do balanço entre citocinas estimuladoras e supressoras produzidas pela célula, durante a interação com fungo.

Os componentes da parede celular ou da cápsula de fungos patogênicos são freqüentemente estudados e relacionados à produção de citocinas, que modulam a resposta imune do hospedeiro, podendo contribuir tanto para a regressão como para a patogênese da doença. A produção de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 é observada em estudos *in vitro*, após estímulo de macrófagos e monócitos humanos com diferentes fungos, como *Coccidioides immitis*, ⁽⁴²⁾, *Cryptococcus neoformans* ^(43,44), *C.albicans* ^(45,46), *Malassezia* ^(47,48) e *P.brasiliensis* ^(49,50), demonstrando que essas células podem ser fontes importantes de citocinas, após interação com esses microrganismos. Dessa forma, o emprego de componentes da cápsula e da parede fúngica pode ser muito importante para elicitar a resposta inflamatória, formação de granulomas e distúrbios imunes, que podem interferir com as respostas específica e inespecífica do hospedeiro.

O estudo do perfil de citocinas produzido durante a infecção *in vitro* de monócitos de indivíduos saudáveis, com cepas de alta ou baixa virulência de *P.brasiliensis* demonstrou, que cepas virulentas do fungo induzem precocemente

e, em níveis elevados, tanto citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α como anti-inflamatórias IL-10, quando comparada à cepa pouco virulenta. Esses resultados sugerem que cepas virulentas do fungo podem ser responsáveis por um desequilíbrio prolongado na produção de citocinas, durante a infecção do hospedeiro ⁽⁴⁹⁾. Assim, o ambiente de citocinas presente na interação inicial fagócito-*P. brasiliensis*, poderia ser eficiente para eliminação do fungo ou permitir sua implantação e multiplicação nos tecidos do hospedeiro, causando doença progressiva. O perfil e a quantidade de diferentes citocinas produzidas, com atividade supressora ou estimulatória sobre a resposta imune, pode determinar diferenças na evolução da paracoccidiodomicose.

Os trabalhos da literatura citada sugerem a importância do estudo do envolvimento de citocinas produzidas por monócitos e macrófagos na infecção por *P. brasiliensis*, particularmente aquelas envolvidas na indução da resposta inflamatória e na atividade fungicida. Entretanto, o papel de outras citocinas inflamatórias, além de IFN- γ e TNF- α na evolução da interação monócito-*P. brasiliensis* não tem sido estudado.

A interleucina-15 (IL-15) é uma citocina que possui atividades biológicas semelhantes às da IL-2 ⁽⁵¹⁾, estimulando a proliferação, diferenciação e secreção de citocinas por células Natural killer (NK), células T e a produção de anticorpos por células B ^(52,53) e ainda contribui para a homeostase do sistema imune ⁽⁵⁴⁾.

A similaridade funcional entre IL-15 e IL-2 é explicada, em parte, pela semelhança das subunidades dos receptores para essas citocinas. A IL-15 compartilha com o receptor da IL-2 as cadeias beta (IL-2R β) e gamma (IL-2R γ),

sendo a cadeia alfa (IL-15 R α) específica para cada citocina ^(51, 55, 56). Três tipos de ligação de alta afinidade (α , $\alpha+\beta$, $\alpha+\beta+\gamma$) e uma de afinidade intermediária ($\beta+\gamma$) foram descritas recentemente ⁽⁵⁷⁾. Esses autores em conjunto com MORTIER et al. ⁽⁵⁸⁾ demonstraram que a cadeia alfa do receptor para IL-15 de humanos e murinos encontra-se não somente ligada à membrana, mas também na forma solúvel, sendo gerada a partir de clivagem proteolítica do receptor transmembrana, um processo intensificado na presença de certos agentes químicos como o PMA. A expressão de IL-15 na membrana celular pode ser mais importante na função extracelular que a secreção da citocina e explica a dificuldade em se detectar IL-15 livre em sistemas biológicos ⁽⁵⁹⁾.

A sinalização mediada por IL-15 é melhor caracterizada em linfócitos T e resulta na ativação de quinases da família Janus. A cadeia beta recruta JAK1, enquanto a cadeia gama recruta JAK3, resultando na fosforilação e ativação de STAT-3 e STAT-5, respectivamente ⁽⁶⁰⁾.

Apesar das similaridades entre IL-15 e IL-2, essas citocinas possuem diferentes papéis no sistema imune. Enquanto IL-2 modula a resposta imune adquirida dependente de células T, IL-15 atua em um amplo espectro de ações bioregulatórias, especialmente na imunidade inata, ativando monócitos de forma autócrina ^(54, 61-63).

Alguns estudos têm demonstrado que monócitos e macrófagos respondem ao estímulo com IL-15, aumentando a fagocitose e a atividade microbicida ⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾. Essa citocina também induz aumento na produção de IL-8 e da proteína quimiotática para monócitos (MCP-1), que atraem monócitos e neutrófilos, levando

ao acúmulo dessas células em sítios inflamatórios. Portanto, a IL-15 produzida em locais de inflamação pode ter um papel importante na regulação de infiltrados de leucócitos ⁽⁶⁷⁾.

Na imunidade inata, os monócitos participam na ativação de células NK, via secreção de citocinas como IL-12 e TNF- α , que por sua vez induzem a produção de IFN- γ pelas células NK, exercendo efeito parácrino sobre os monócitos ^(68,69). A combinação de IL-15 e IL-12 é portanto um potente estímulo para a produção de IFN- γ , TNF- α e GM-CSF por células NK humanas ⁽⁷⁰⁾. Além disso, o sinergismo entre IL-12 e IL-15 é responsável pela indução da resposta de células Th1, contra infecções por microrganismos intracelulares ⁽⁶⁹⁾. Assim, tanto IL-15 quanto IL-12, produzidas por monócitos humanos ativados, parecem ter papel crítico como cofatores na produção de IFN- γ por células NK, importante para ativação dos monócitos e o desenvolvimento da resposta imune inata efetiva nas infecções, num período que precede o aparecimento da resposta de células T antígeno específicas ⁽⁶⁸⁾.

Existem evidências do envolvimento da IL-15 em infecções murinas e humanas por vários microrganismos, incluindo *Toxoplasma gondii* ⁽⁷¹⁾, *C.neoformans* ⁽⁷²⁾, *C.albicans* ⁽⁶⁶⁾, *Salmonella choleraesuis* ⁽⁷³⁾, *Escherichia coli* ⁽⁷⁴⁾, *Listeria monocytogenes* ⁽⁷⁵⁾, *Mycobacterium tuberculosis* e *M.leprae* ^(76,77) e diferentes vírus como HIV ⁽⁷⁸⁾, herpes-vírus ^(79,80) ou vírus da hepatite C ⁽⁸¹⁾.

Na resposta imune contra microrganismos intracelulares JULLIEN et al. ⁽⁷⁷⁾ demonstraram que a incubação *in vitro* de *M.leprae* com monócitos do sangue periférico de pacientes com hanseníase, induzia secreção de IL-15 por essas

células. A expressão de RNA mensageiro (mRNA) e a síntese da proteína IL-15 eram mais intensamente expressas pelas células dos pacientes com a forma tuberculóide em comparação com a forma virchoviana. Portanto, a IL-15 parece participar na defesa contra infecções, por induzir o desenvolvimento e ativação de células efetoras como células NK, células T $\gamma\delta$ e células T envolvidas nas respostas imunes inata e adaptativa ⁽⁶⁹⁾.

O papel da IL-15 na resposta de monócitos a fungos tem sido pouco estudado. VASQUEZ et al. ⁽⁶⁶⁾, verificaram que a IL-15 induz aumento na produção de ânion superóxido e na atividade fungicida de monócitos humanos contra *C. albicans*. MODY et al. ⁽⁷²⁾, investigaram a liberação de IL-15 em resposta ao *C. neoformans* e verificaram que esse fungo é um potente estímulo para a liberação de IL-15 pelos monócitos. Os autores concluíram que tanto IL-15 quanto IL-2 contribuem para a proliferação de linfócitos e para a atividade fungicida dessas células contra formas encapsuladas e acapsuladas do *C. neoformans*.

Essa citocina também ativa leucócitos polimorfonucleares (PMN). WINN et al. ⁽⁸²⁾ mostraram que o tratamento prévio de PMN humanos com IL-15 por 2 h induz a produção de O_2^- em resposta a *Aspergillus fumigatus*. Após 22 h de incubação com IL-15, ocorre aumento na liberação de IL-8 pelos PMN e lesão da célula fúngica. Esses resultados sugerem que a IL-15 pode desempenhar papel importante na imunomodulação da resposta do hospedeiro à aspergilose. Neutrófilos humanos cultivados na presença de IL-15 apresentam aumento da atividade fungicida contra *P. brasiliensis*, associada à maior liberação de H_2O_2 , sugerindo efeito modulador da IL-15 sobre a ativação dessas células ⁽⁸³⁾.

Os resultados da literatura demonstram que a IL-15 é produzida principalmente por monócitos e macrófagos em resposta a agentes infecciosos, sendo uma importante citocina pró-inflamatória, que induz ativação da fagocitose e da atividade microbicida pelas células de defesa do hospedeiro. Dessa forma, a IL-15 pode desempenhar papel central tanto na resposta imune inata quanto na adquirida contra infecções por uma variedade de microrganismos, como também na patogênese de doenças inflamatórias crônicas ^(69, 84).

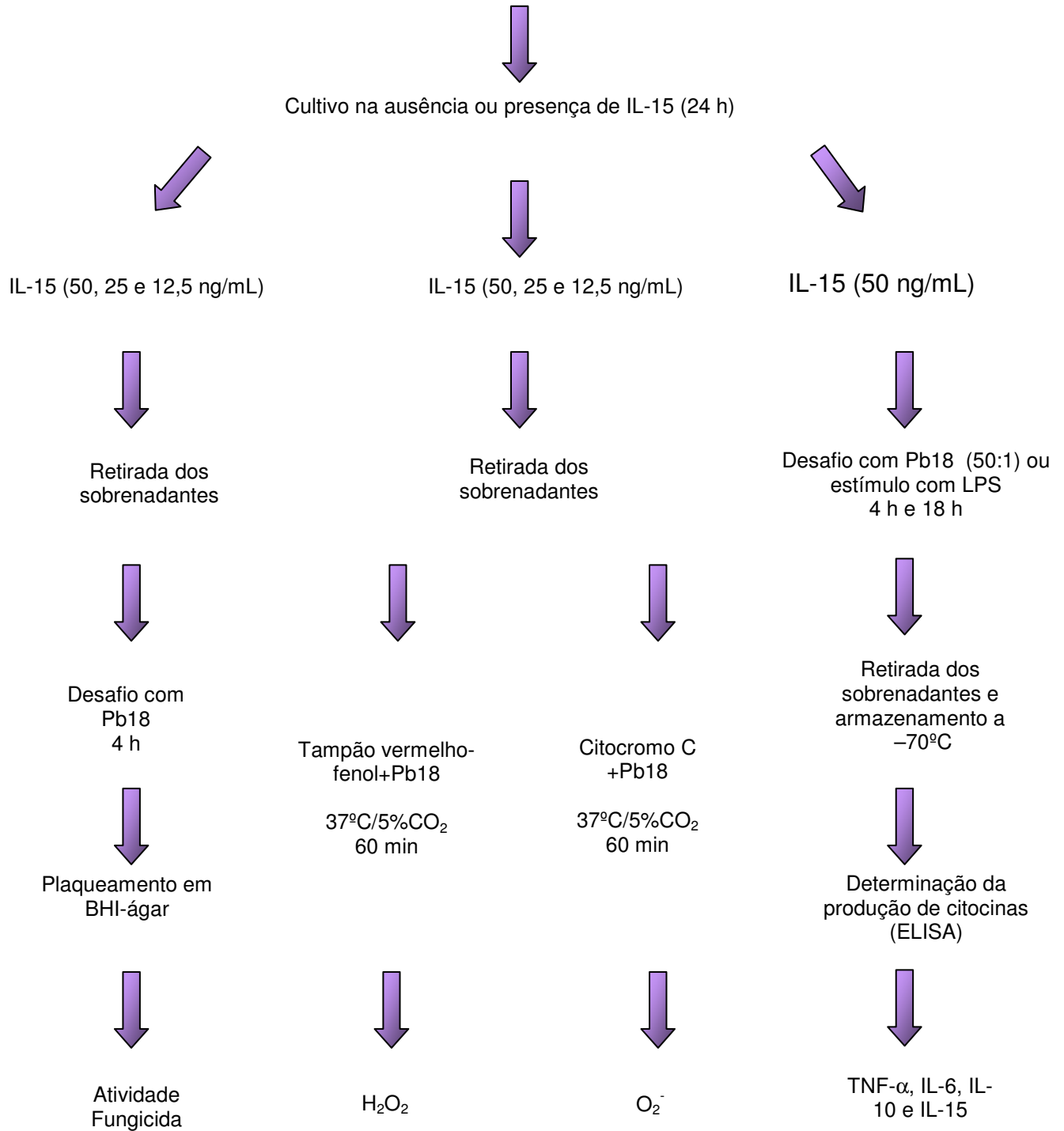
Considerando que a produção de IL-15 por monócitos e seu efeito sobre a atividade fungicida dessas células não foram ainda estudados na infecção por *P. brasiliensis*, o estudo do efeito modulador da IL-15 sobre o estado de ativação de monócitos poderia trazer importante contribuição ao estudo dos mecanismos envolvidos na reação inflamatória contra *P. brasiliensis*.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da IL-15 sobre a atividade fungicida, produção de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-15 por monócitos infectados *in vitro* com *Paracoccidioides brasiliensis*.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Isolamento e cultura de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis



4 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Casuística

Foram utilizadas amostras do sangue periférico de 15 indivíduos saudáveis, doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP – Câmpus de Botucatu. O consentimento dos indivíduos, para participação no presente trabalho, foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Of.330/2006-CEP).

4.2. Cultivo e preparo da suspensão de *P. brasiliensis*

Utilizou-se a amostra de *P. brasiliensis* Pb18, proveniente da Micoteca do departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. A cepa foi mantida a 37°C com subcultivos semanais em meio de cultura GPY, contendo 2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 2% de ágar. As células leveduriformes foram empregadas após 6 dias de cultivo, para a infecção das culturas de monócitos. Após o crescimento, as células foram removidas da superfície de cultivo, com alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) e pérolas de vidro de 4mm de diâmetro, sendo 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, utilizando microscópio com contraste de fase, segundo método descrito por SOARES et al. ⁽³⁰⁾. Foram consideradas como viáveis as células que se apresentaram com aspecto brilhante, uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração opaca e escura. Nos ensaios, foram empregadas suspensões fúngicas que apresentavam, no mínimo, 90% de viabilidade.

4.3. Isolamento e cultura de monócitos

Sangue periférico de indivíduos saudáveis foi obtido por punção venosa, sendo 10 mL colocados em tubos estéreis contendo 20 U/mL de heparina (Liquemine-Roche). As células mononucleares foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque ⁽⁸⁵⁾ e lavadas inicialmente com solução gelada de EDTA-PBS, por centrifugação a 200 g por 5 minutos e, em seguida, com meio de cultura RPMI por mais 5 minutos a 200 g. Após este período, as células foram ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro AB humano inativado (meio RPMI completo), sendo a identificação e viabilidade dos monócitos realizada através da incorporação de vermelho neutro. Alíquotas de 50 µL da suspensão celular foram incubadas a 37°C, durante 10 minutos com 450 µL da solução do corante a 0,02%. A seguir, a suspensão celular foi ajustada para 2×10^6 monócitos/mL e 100 µl dessa suspensão foram distribuídos em placas de cultura de 96 orifícios. Após

uma hora de incubação a 37°C em tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes foram eliminadas através de lavagem das placas com meio de cultura RPMI.

4.4. Atividade fungicida

Culturas de monócitos obtidas conforme descrito no item 4.3 foram previamente tratadas com IL-15 (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) nas concentrações de 50, 25 e 12,5 ng/mL. Ensaios de neutralização dessas diferentes doses de IL-15 foram realizados, incubando-se as culturas com IL-15 adicionada de anticorpo monoclonal anti-IL-15 (R & D Systems) nas concentrações de 1, 0,5 e 0,2 µg/mL para neutralizar, 50, 25 e 12,5 ng/mL de IL-15, respectivamente, segundo recomendações do fabricante (R&D Systems). Após incubação por 24 h, os sobrenadantes das culturas foram retirados, as culturas de monócitos lavadas em meio RPMI completo e desafiadas com 100 µL de solução de meio RPMI suplementado com 10% de soro AB inativado contendo células leveduriformes de *P. brasiliensis*, na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica. Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas as suspensões do fungo em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com os monócitos (cultura controle). Após o período de 4 h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as culturas submetidas a lavagens com água destilada. Este processo permite que as células sejam removidas da placa e lisadas, com conseqüente liberação dos fungos que foram eventualmente fagocitados. As suspensões obtidas através desse processo foram adicionadas aos sobrenadantes já coletados e foram 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 controle e experimentais com água destilada, resultou em um volume de aproximadamente 2 mL. Em seguida, 100 µL das suspensões fúngicas em água destilada foram semeados em três placas contendo meio de cultura de infusão cérebro-coração (BHI-ágar, Difco Laboratories, Michigan, USA), adicionado de 4% de soro de cavalo e 5% de fator de crescimento, preparado a partir de filtrado de cultura de células leveduriformes do *P. brasiliensis* (cepa 192), cultivadas em meio de Casals a 36°C e com agitação (120 rpm) durante 7 dias. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C por 14 dias, quando então as unidades formadoras de colônia foram contadas. A atividade fungicida (AF) foi determinada pela seguinte fórmula:

$$AF = 1 - \frac{\text{média das UFC das culturas experimentais}}{\text{média das UFC das culturas controles}} \times 100$$

4.5. Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por monócitos

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo o método descrito por PICK & MIZEL ⁽⁸⁶⁾ e adaptado por RUSSO et al. ⁽⁸⁷⁾.

As células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram obtidas de acordo com o item 4.3. A concentração celular foi ajustada para 2x10⁶ monócitos/mL e 100 µL desta suspensão (2x10⁵) foram distribuídos em placas de culturas de células de fundo plano (Nunc, Life Tech. Inc., Maryland,

USA), contendo 96 orifícios. As placas foram incubadas por 60 min a 37 °C em tensão constante de 5% de CO₂. Após incubação, as células não aderentes foram retiradas e a placa lavada duas vezes com meio RPMI. Em seguida os monócitos foram cultivados na ausência ou presença de IL-15 (R&D Systems) nas concentrações de 50, 25 e 12,5 ng/mL e as placas foram incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi retirado e adicionado 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) e 20 ng ou 50 ng de *Phorbol myristate acetate* (PMA - Sigma) adicionada de *P. brasiliensis* na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica. Após 60 min à 37 °C a reação foi interrompida pela adição de 10 µL de NaOH 1N. As amostras foram ensaiadas em quadruplicata. A densidade óptica foi determinada em leitor automático de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland), com filtro de 620 nm, com *blank* constituído de 100 µL de solução de vermelho fenol e 10 µL de NaOH 1N. 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.

4.6. Determinação de ânion superóxido (O₂⁻) por monócitos

A liberação de O₂⁻ pelos monócitos do sangue periférico foi determinada utilizando-se o cromógeno Ferricitocromo C (Sigma), segundo o método de PICK & MIZEL ⁽⁸⁶⁾ e adaptado por RUSSO et al. ⁽⁸⁷⁾.

Seguindo o mesmo protocolo utilizado para a avaliação de H₂O₂, culturas contendo 2X10⁵ monócitos pré-tratados com IL-15 nas diferentes concentrações por 24 h foram incubadas com 100 µL de solução salina de Hanks', livre de vermelho de fenol e contendo *P. brasiliensis* na proporção de 50 monócitos para um fungo, 160 µM de citocromo C e 50 ng de PMA. Células tratadas com citocromo C e suplementadas com 300 U/mL de superóxido dismutase (Sigma) foram utilizadas como *blank* da reação. As placas foram incubadas a 37°C e 5 % de CO₂ por 60 min e a leitura das densidades ópticas (DO) realizada em espectrofotômetro com filtro de 550nm.

A concentração do ânion superóxido foi calculada através da seguinte relação:

$$\text{Concentração O}_2^- \text{ (nmol)} = \frac{\text{DO} \times 100}{6,3}$$

4.7. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos

Os monócitos obtidos conforme descrito no item 4.3 foram incubados na concentração de 1X10⁶ monócitos/mL em placas de 24 orifícios por 4 e 18 h em tensão de 5% de CO₂ a 37°C, sem estímulos e tratamentos (cultura controle), com de 20 µg/mL de lipopolissacáride de *Escherichia coli*, O₅₅B₅ (LPS), com *P. brasiliensis* na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica, ou ainda pré-incubados com IL-15 (50 ng/mL) por 24 h e desafiados com *P. brasiliensis* na mesma proporção monócito:fungo. Após o período, os sobrenadantes foram aspirados, centrifugados a 400 g e alíquotas desse material foram conservadas a

-70 °C até o momento de sua utilização para dosagem de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-15.

4.8. Dosagem de citocinas

A quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura de monócitos foi realizada pela técnica de ELISA. As placas de 96 orifícios e fundo plano (MaxiSorp-Nunc Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA) foram sensibilizadas por 18 h a 5°C com anticorpo monoclonal anti-citocina, diluído em PBS. Após esse período, os orifícios foram lavados 4 vezes com 300 μ L de PBS, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado colocando-se em cada orifício 300 μ L de PBS + BSA 1% e incubado à temperatura ambiente por 60 min. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100 μ L dos sobrenadantes gerados e das citocinas recombinantes (R&D Systems) foram adicionados aos orifícios das placas. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente e nova lavagem da placa, o anticorpo revelador policlonal anti-citocina (R&D Systems) foi adicionado seguindo-se de incubação por 2 h à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionado 100 μ L de estreptoavidina conjugada com peroxidase (R&D Systems), na concentração de 2 μ g/mL por 20 min a 37°C, seguido pela lavagem da placa com PBST. Após esse período, adicionou-se 100 μ L do substrato enzimático, constituído por 10 μ L de H₂O₂ a 30% (Sigma), diluídos em 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e 1 mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 min, a reação foi bloqueada pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2M e a

leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 492nm.

As concentrações dos anticorpos monoclonal e policlonal, bem como das citocinas recombinantes específicas, utilizadas nas reações, foram as recomendadas pelo fabricante (R & D Systems) e estão descritas abaixo:

Citocina	Ac monoclonal	Ac policlonal	Curva padrão
TNF-α	2 μ g/mL	200 ng/mL	15,6 a 1000 pg/mL
IL-6	2 μ g/mL	200 ng/mL	4,6 a 600 pg/mL
IL-10	2 μ g/mL	200 ng/mL	7,8 a 1000 pg/mL
IL-15	1 μ g/mL	25 ng/mL	3,9 a 1000 pg/mL

4.9. Análise Estatística

Os dados obtidos do efeito da IL-15 sobre a atividade fungicida de monócitos contra o *P. brasiliensis*, bem como a produção de peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e produção de citocinas por essas células foram analisados empregando-se o teste de análise de variância (ANOVA) para amostras dependentes, através do programa estatístico INSTAT, Graph-Pad, San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da IL-15 sobre a atividade fungicida de monócitos humanos contra *Paracoccidioides brasiliensis*

A análise da figura 1 mostra que a incubação do fungo com os monócitos sem tratamento com IL-15 (cultura controle) não reduziu o número de UFC recuperadas após plaqueamento, em comparação com a cultura contendo apenas o fungo (Pb). Por outro lado, o tratamento prévio dos monócitos com IL-15 nas diferentes concentrações empregadas, seguido do desafio com o fungo, diminuiu significativamente o número de fungos viáveis em relação às culturas não tratadas com a citocina. A adição de anti-IL-15 nas culturas permitiu maior recuperação de unidades formadoras de colônia.

Na figura 2 observam-se os resultados da atividade fungicida de monócitos tratados ou não com IL-15 e desafiados com Pb18. Verifica-se que o tratamento com IL-15 nas concentrações de 50, 25 e 12,5 ng/mL induziu atividade fungicida significativamente mais elevada em comparação com a obtida nas culturas de monócitos não tratadas com IL-15. A atividade fungicida de monócitos tratados com a IL-15 na dose de 50 ng/mL foi significativamente maior do que a obtida pelo tratamento com as doses de 25 e 12,5 ng/mL. Esses resultados mostram o efeito dose-dependente da IL-15 sobre a atividade fungicida de monócitos infectados com *P. brasiliensis*. A neutralização da IL-15 por anticorpos anti-IL-15 eliminou o efeito fungicida dos monócitos, induzido pelo tratamento com as diferentes concentrações da citocina.

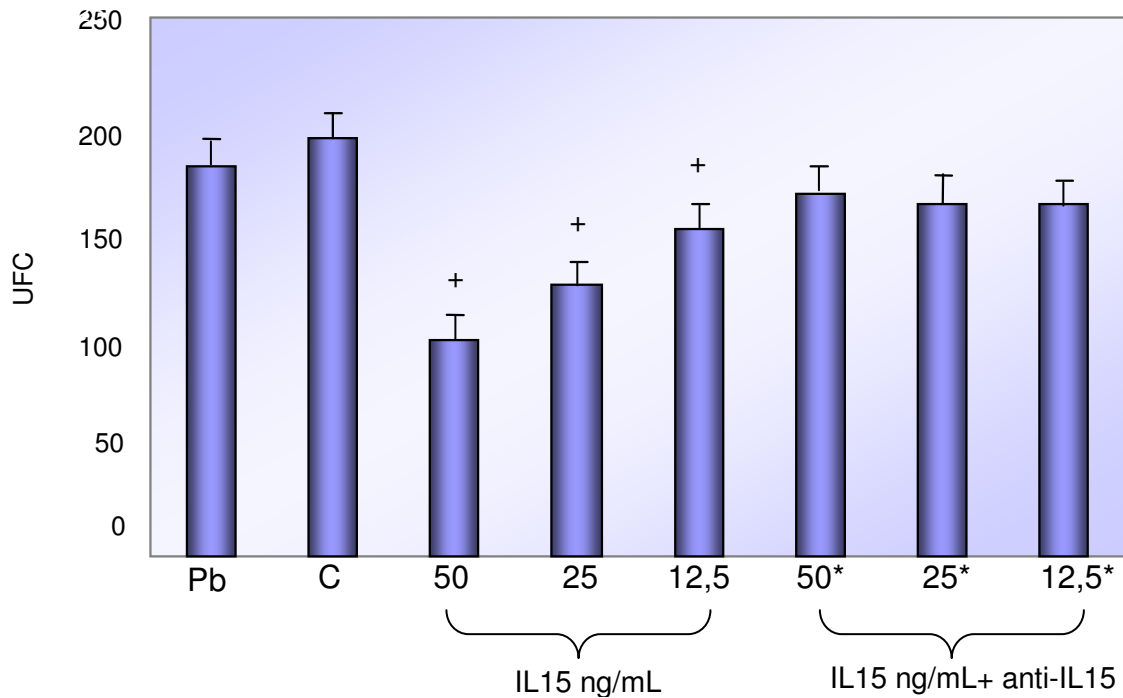


Figura 1. Unidades formadoras de colônias (UFC) de *Paracoccidioides brasiliensis* recuperadas após 4 h de co-cultura com monócitos humanos, tratados ou não com diferentes concentrações de IL-15 ou com IL-15 adicionada de anticorpo policlonal anti-IL15. Os resultados são expressos em média \pm SD das UFC a partir de cultura de monócitos obtidos de 15 indivíduos saudáveis.

C= cultura controle

* culturas com IL-15 (50, 25 e 12,5 ng/mL) adicionada de anticorpo anti-IL-15

+ ($p < 0,05$) vs Pb, C, IL-15 + anti-IL-15

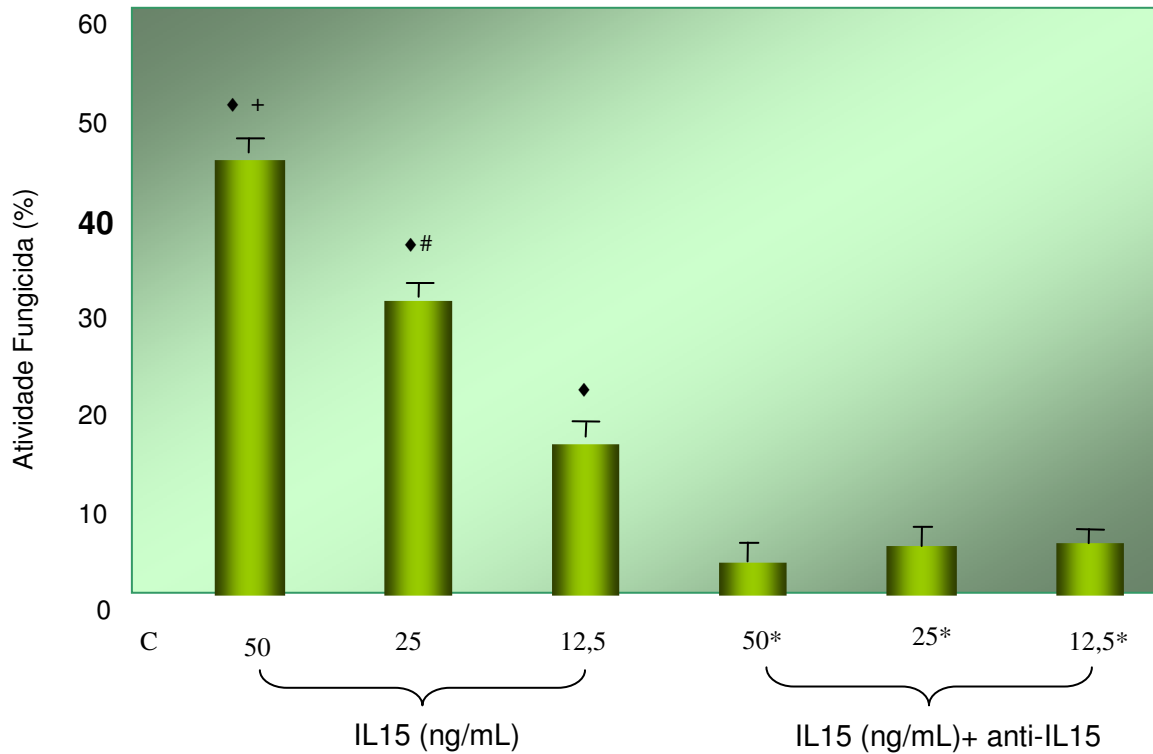


Figura 2. Atividade fungicida de monócitos humanos previamente tratados com IL-15 ou IL-15 + anticorpo policlonal anti-IL-15 e desafiados com a amostra Pb18 de *Paracoccidioides brasiliensis*. Os resultados são expressos em média \pm SD da porcentagem da atividade fungicida, obtida a partir de cultura de monócitos obtidos de 15 indivíduos saudáveis.

C= cultura controle

* culturas tratadas com IL-15 (50, 25 e 12,5 ng/mL) adicionada de anticorpo anti-IL-15

♦ ($p < 0,05$) vs culturas controle (C) e IL15 + anti-IL15

+ ($p < 0,05$) vs IL15: 25 e 12,5 ng/mL, IL15 + anti-IL15

($p < 0,05$) vs IL15: 12,5 ng/mL, IL15 + anti-IL15

5.2. Efeito da IL-15 sobre a produção de H₂O₂ por monócitos humanos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

Para avaliar o efeito da IL-15 sobre a capacidade de produção de H₂O₂, primeiramente foram padronizadas as concentrações de PMA a serem utilizadas no ensaio. Para isso, monócitos humanos foram pré-tratados com concentrações de IL-15 variando de 50 a 12,5 ng/mL. Após 24 h, o sobrenadante da cultura foi retirado e as células foram estimuladas com 20 ou 50 ng de PMA. A concentração de 50 ng de PMA induziu liberação de níveis significativamente mais elevados de H₂O₂ quando comparada com a dose de 20 ng (dados não mostrados). Em vista disso, a concentração de 50 ng de PMA foi utilizada como estímulo ótimo para indução de H₂O₂ por monócitos. Os resultados estão representados na figura 3 e mostram níveis de H₂O₂ liberados por monócitos tratados com diferentes concentrações de IL-15 e desafiados ou não com Pb18. A pré-incubação com a citocina não interferiu com a capacidade de produção de H₂O₂ tanto nas culturas estimuladas quanto nas não estimuladas com PMA. Após desafio com Pb18, as células tratadas ou não com IL-15, produziram níveis significativamente menores de H₂O₂ em comparação às culturas controle (C) e às cultivadas na ausência do fungo. A adição de PMA aumentou significativamente a produção de H₂O₂ somente pelas células tratadas ou não com IL-15 e que não foram desafiadas com Pb18. Os resultados mostram que o tratamento com a citocina não estimulou a produção de H₂O₂ e não reverteu o efeito inibidor do fungo sobre a produção desse metabólito.

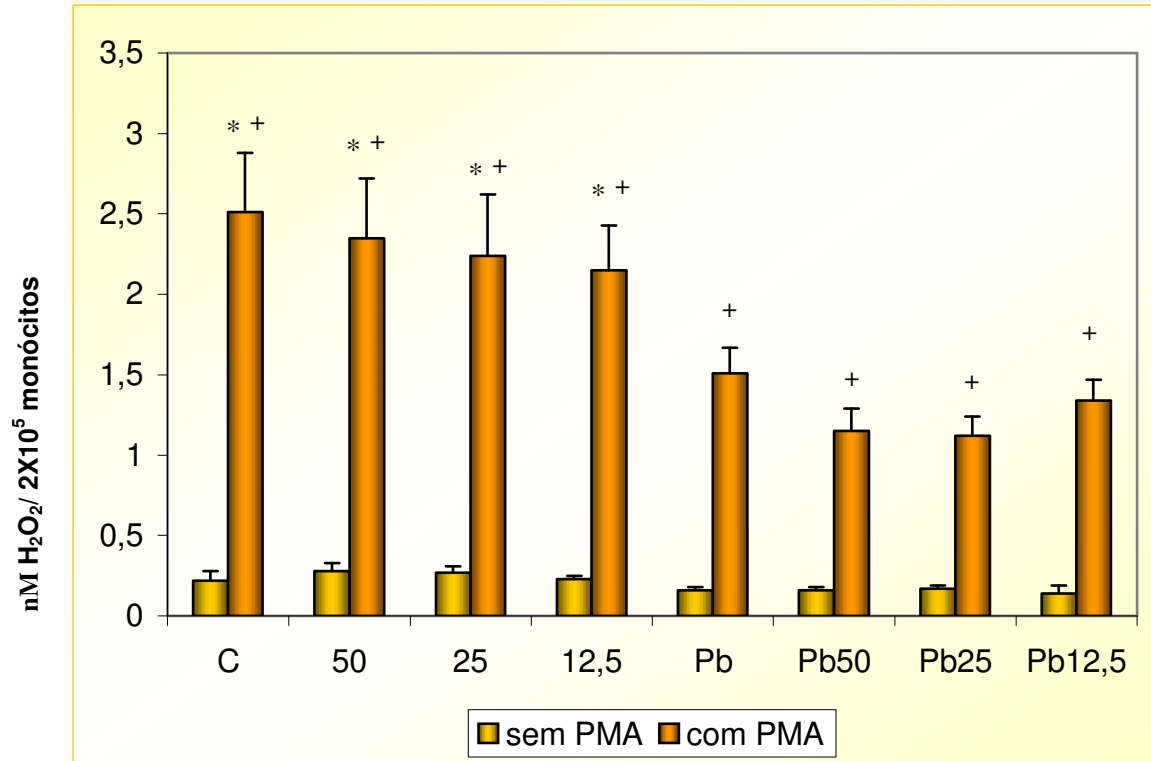


Figura 3. Efeito da IL-15 sobre a produção de H₂O₂ por monócitos humanos tratados com IL-15 (50, 25 e 12,5 ng/mL) e desafiados ou não com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) na ausência ou presença de 50 ng de PMA. Os resultados são expressos em média \pm SD dos valores obtidos de 15 indivíduos saudáveis

C= cultura controle

* (p<0,05) vs C, Pb, Pb50, Pb25 e Pb12,5

+ (p<0,01) vs sem PMA

5.3. Efeito da IL-15 sobre a produção de ânion superóxido por monócitos humanos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

Inicialmente, o ensaio de produção de O_2^- foi padronizado empregando-se o estímulo com PMA nas concentrações de 20 e 50 ng. Níveis significativamente mais elevados de O_2^- foram liberados na concentração de 50 ng de PMA em comparação com a dose de 20 ng (dados não mostrados). Portanto, a concentração de 50 ng de PMA foi utilizada para estímulo ótimo dos monócitos no estudo do efeito da IL-15 sobre a produção de O_2^- por essas células desafiadas com Pb18. Os resultados estão representados na Figura 4 e mostram que o tratamento prévio das células com a IL-15 não causa alteração na capacidade de produção desse metabólito em células submetidas ao estímulo com PMA. Após o desafio com o Pb18 e estímulo com PMA nenhum efeito foi observado sobre a produção desse radical.

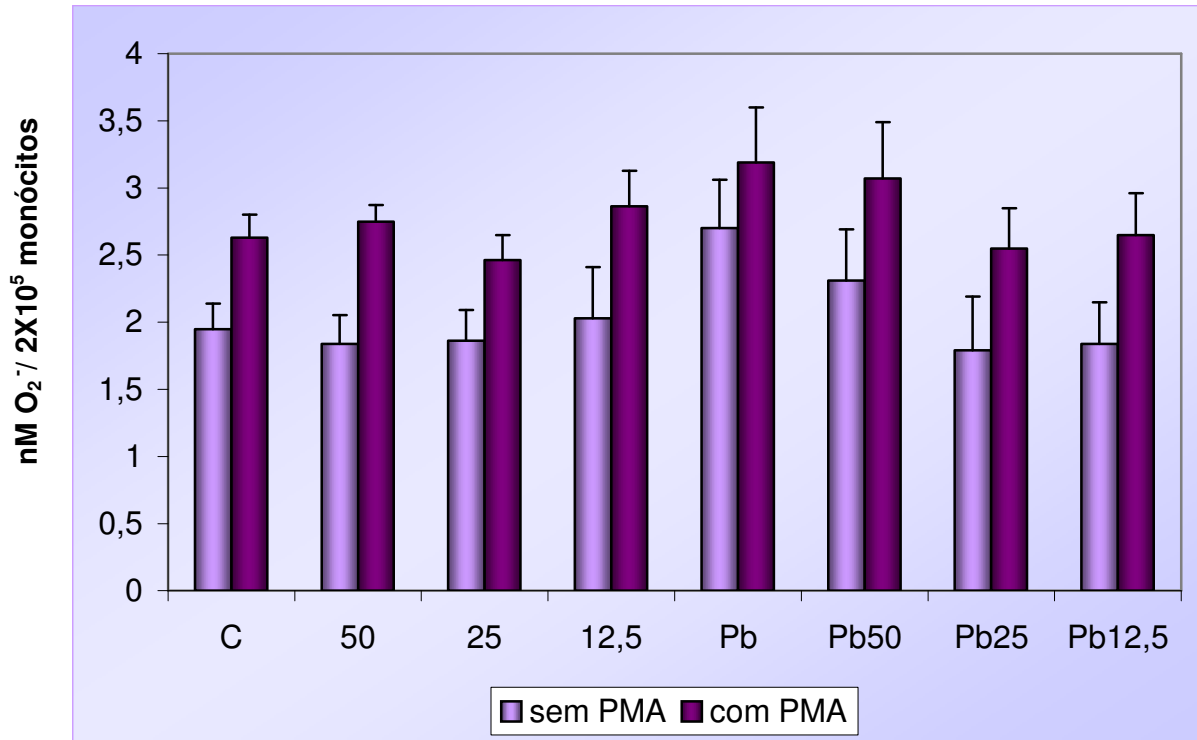


Figura 4. Efeito da IL-15 sobre a produção de ânion superóxido (O_2^-) por monócitos humanos tratados com IL-15 (50, 25 e 12,5 ng/mL) e desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). Os resultados são expressos em média \pm SD dos valores obtidos de 15 indivíduos saudáveis

C= cultura controle

5.4. Efeito da IL-15 na produção de citocinas por monócitos

5.4.1. Determinação de TNF- α

Os resultados do efeito da IL-15 sobre a produção de TNF- α estão representados na Figura 5. O estímulo com LPS foi utilizado como controle positivo da ativação de monócitos. A concentração de TNF- α detectada nas culturas de monócitos incubadas com Pb18 durante 18 h foi significativamente maior em comparação às culturas controle (C 4h e 18h) e em relação aos resultados obtidos após 4 h de incubação com o fungo (Pb-4h). O pré-tratamento das células com IL-15 causou aumento significativo da produção de TNF- α nas culturas não infectadas com Pb18 (IL-15) e nas culturas desafiadas com o fungo tanto após 4 h quanto 18 h de co-cultivo (Pb+IL-15). Os níveis da citocina detectados no sobrenadante das culturas tratadas com IL-15 e obtidas após 18 h foram significativamente mais elevados em relação aos detectados após 4 h de cultivo e aos obtidos na cultura controle não tratada com IL-15. A produção de TNF- α após tratamento com IL-15 e desafio com Pb18 por 18 h foi significativamente mais elevada em comparação a todas as demais culturas. Os resultados mostram que a pré-incubação de monócitos com IL-15 induz aumento na produção de TNF- α pelas células submetidas ou não ao desafio com Pb18.

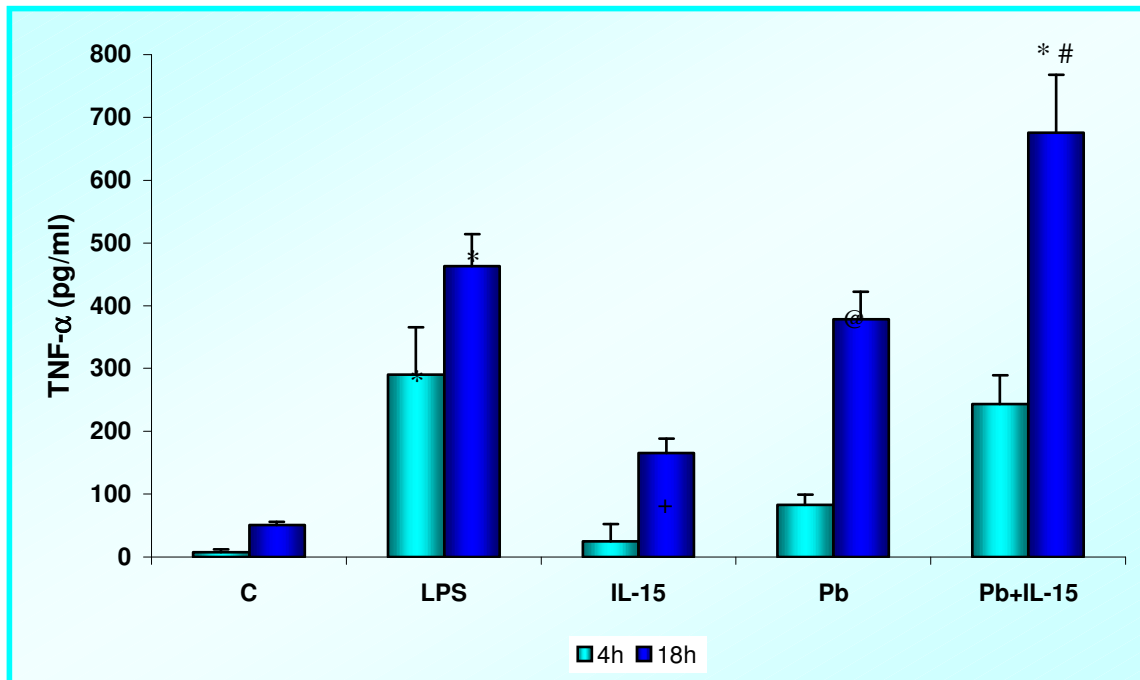


Figura 5. Produção de TNF- α por monócitos humanos tratados ou não com IL-15 (50 ng/mL) e desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) em co-culturas de 4 e 18 horas. Os resultados são expressos em média \pm SEM de 15 indivíduos saudáveis. C= cultura controle

@ (p<0,05) vs Pb4 h

+ (p < 0,01) vs Mo (4e18 h); Mo+IL-15-4 h

(p < 0,05) vs Pb-4 h/18 h; Pb+IL-15-4 h

* (p < 0,05) vs Mo-4 h/18 h; Mo+IL-15- 4 h/18 h; Pb-4 h; Pb+IL-15-4 h

5.4.2. Determinação de IL-6

A análise dos níveis de IL-6 produzidos após 18 h de cultivo dos monócitos com Pb18 demonstra que o fungo é capaz de induzir a produção de IL-6 durante a infecção in vitro. Esses níveis foram significativamente mais elevados em comparação aos obtidos nas culturas controle não estimuladas (C-4h e 18h), às culturas previamente tratadas com IL-15 (IL-15-4h e 18h) e às desafiadas com o fungo por 4 h (Pb+IL-15-4h). A pré-incubação de monócitos com IL-15 não resultou em aumento da produção de IL-6 por células desafiadas ou não com Pb18. Os resultados indicam que a produção da citocina foi significativamente mais elevada nas co-culturas obtidas após 18 h em comparação ao período de 4 h em todas as culturas realizadas, mostrando uma produção tardia de IL-6.

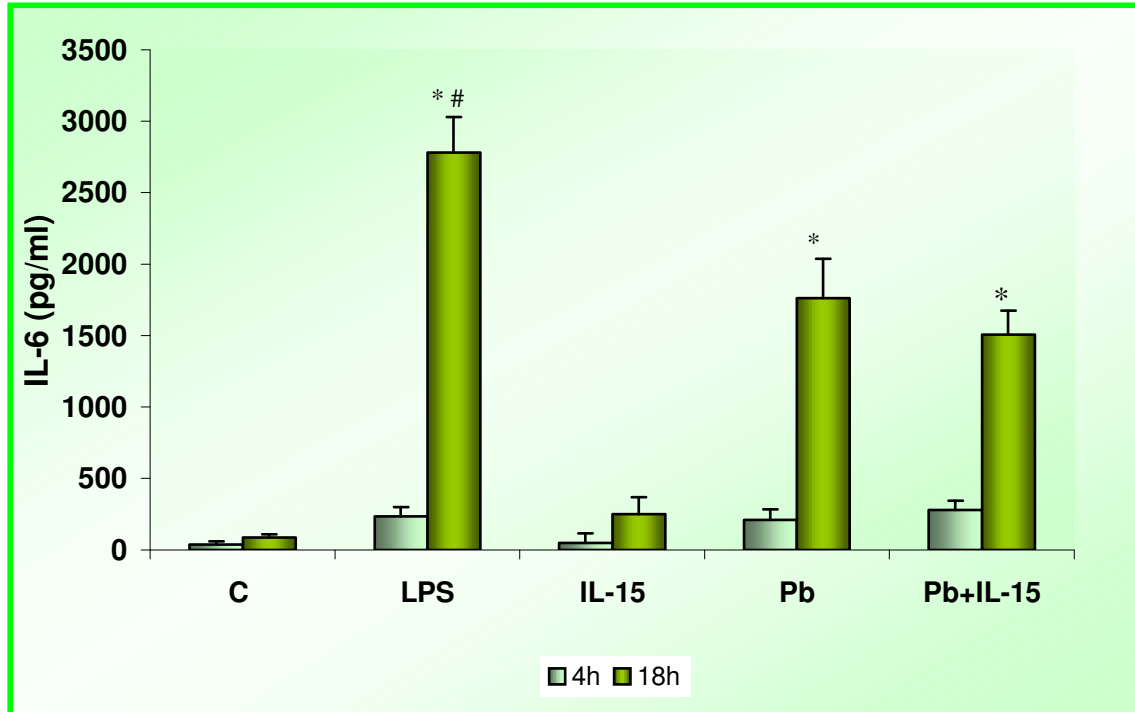


Figura 6. Produção de IL-6 por monócitos humanos tratados ou não com IL-15 (50 ng/mL) e desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) em co-culturas de 4 e 18 horas. Os resultados são expressos em média \pm SEM dos valores obtidos de 15 indivíduos saudáveis.

C= cultura controle

* ($p < 0,001$) vs Mo 4 h/18 h, Mo+IL-15 4 h/18 h, Pb-4 h, Pb+IL-15-4 h

($p < 0,05$) vs Pb-18 h, Pb+IL-15-18 h

5.4.3. Determinação de IL-10

A pré-incubação dos monócitos com IL-15 e desafio com Pb18 levou à maior produção de IL-10, com valores significativamente mais elevados em relação às culturas apenas infectadas com Pb18 e às tratadas ou não com IL-15 (C, IL-15) (Figura 7). O tratamento das células com IL-15 não induziu aumento na produção de IL-10 na ausência de infecção com o fungo. Os resultados da produção de IL-10 mostram que a citocina é produzida mais tardiamente pelos monócitos. Após 4 h de cultura dos monócitos com esses estímulos, as concentrações da citocina foram inferiores aos valores do limite de detecção do teste e, portanto, não representada na figura. Os níveis de IL-10 produzidos após desafio dos monócitos com Pb18 foram significativamente mais elevados em comparação aos obtidos na cultura controle (C).

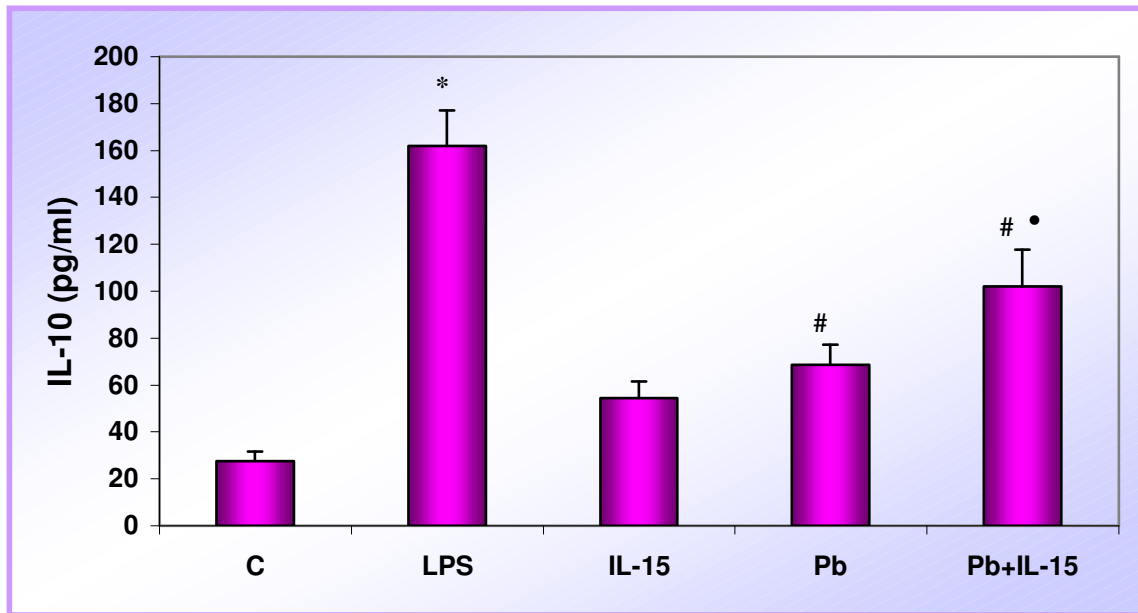


Figura 7. Produção de IL-10 por monócitos humanos tratados ou não com IL-15 (50 ng/mL) e desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) em co-culturas de 4 e 18 horas. Os resultados são expressos em média \pm SEM dos valores obtidos de 15 indivíduos saudáveis.

C= cultura controle

* ($p < 0,05$) vs C, IL-15, Pb e Pb+ IL-15

($p < 0,05$) vs C

• ($p < 0,05$) vs Pb

5.4.4. Determinação de IL-15

A concentração de IL-15, avaliada no sobrenadante de cultura de monócitos, representada na Figura 8, mostra que apesar de níveis baixos de detecção, após 18 h de cultivo, a produção de IL-15 foi significativamente maior nas culturas tratadas com a citocina (IL-15) quando comparada com a obtida nas demais culturas de monócitos submetidos ou não aos estímulos com LPS e com Pb18. Em monócitos que foram pré-incubados com IL-15 e a seguir desafiados com o fungo, houve um aumento na produção de IL-15 em relação à cultura das células apenas infectadas com Pb18. Os resultados mostram que o tratamento de monócitos com IL-15 induz a produção dessa citocina por células submetidas ou não ao estímulo com Pb18. Não foram obtidos níveis detectáveis de IL-15 nos sobrenadantes das culturas de monócitos avaliados após 4 h de cultivo com os estímulos empregados.

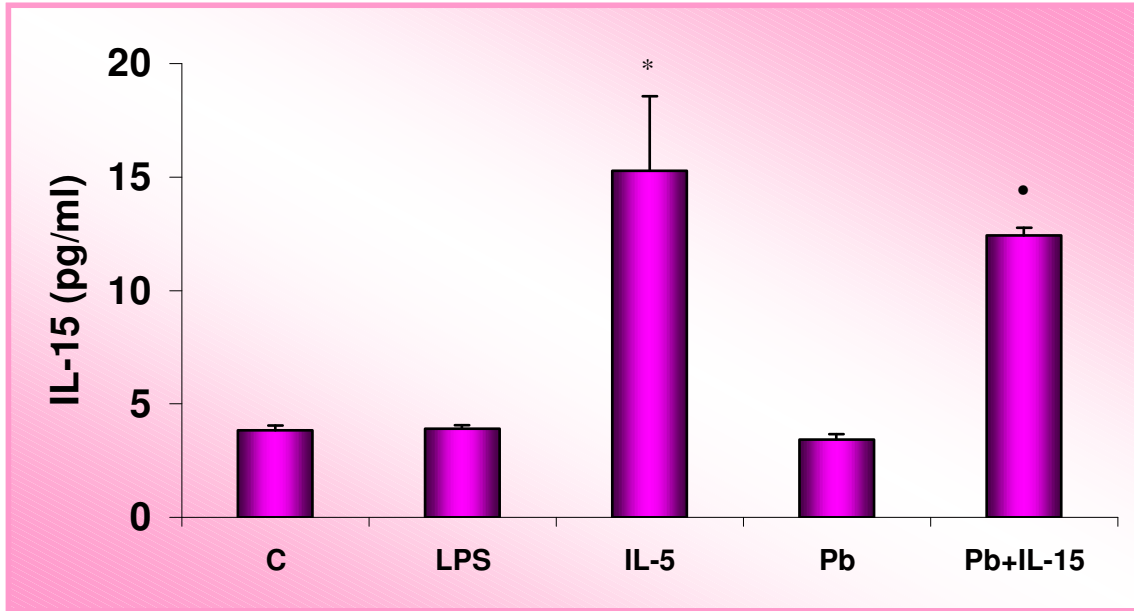


Figura 8. Produção de IL-15 por monócitos humanos tratados ou não com IL-15 (50 ng/mL) e desafiados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) em co-culturas de 4 e 18 horas. Os resultados são expressos em média \pm SEM dos valores obtidos de 15 indivíduos saudáveis.

C= cultura controle

* ($p < 0,05$) vs C, LPS e Pb

• ($p < 0,05$) vs Pb

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos a atividade fungicida, a produção de H_2O_2 , O_2^- e das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-15 por monócitos humanos, quando cultivadas na ausência ou presença de IL-15 e desafiadas *in vitro* com a cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18).

A atividade funcional de monócitos desafiados com *P. brasiliensis* tem sido estudada na literatura em relação à atividade fungicida e produção de citocinas (29,49,88). Os resultados demonstram que uma eficiente atividade fungicida só é obtida após ativação sinérgica de monócitos com IFN- γ e TNF- α (29). Entretanto, não existem trabalhos relacionando o papel da IL-15 na regulação da resposta inflamatória ao *P. brasiliensis*. Os ensaios relativos à atividade fungicida de monócitos, cultivados na ausência de IL-15, mostram que essas células, não ativadas, não desenvolvem atividade fungicida contra o Pb18 e confirmam resultados prévios obtidos em nosso laboratório (29,89,90). No entanto, quando as células são tratadas com a citocina, apresentam atividade fungicida eficiente, sendo observado um efeito dose-dependente nas concentrações empregadas de 50, 25 e 12,5 ng/mL de IL-15. A neutralização da IL-15 por anticorpos anti-IL-15 eliminou o efeito fungicida dos monócitos induzido pelo tratamento com as diferentes concentrações da citocina, comprovando o efeito ativador da IL-15 sobre os monócitos. Esses resultados concordam com os descritos por (66), que observaram aumento da atividade fungicida de monócitos humanos contra *C. albicans*, após tratamento das células com IL-15 nas doses de 50 e 100 ng/mL. Essa citocina também ativa outras células da imunidade inata, como neutrófilos,

aumentando o metabolismo oxidativo dessas células e causando lesão em hifas de fungos do gênero *Aspergillus*. Assim, a IL-15 parece desempenhar importante papel na imunomodulação do hospedeiro contra a aspergilose invasiva ⁽⁸²⁾. O tratamento prévio de neutrófilos com IL-15, seguido de desafio com *C. albicans* leva a aumento da fagocitose e atividade fungicida contra a levedura, por essas células, sendo esse efeito dose-dependente ⁽⁵⁶⁾.

Para investigar o possível mecanismo envolvido no aumento da atividade fungicida dos monócitos contra *P. brasiliensis* induzida por IL-15, avaliamos o efeito da IL-15 sobre a liberação de H_2O_2 e O_2^- por essas células. Quando os monócitos foram previamente tratados com a citocina, os níveis de H_2O_2 produzidos pelo estímulo com PMA mantiveram-se iguais em todas as culturas, independentemente da concentração empregada no tratamento. Esses resultados mostram que a IL-15 não influenciou a capacidade de produção de H_2O_2 após o tratamento por 24h com a citocina. No entanto, após o desafio desses monócitos com o Pb18, tanto as células cultivadas na ausência quanto na presença da IL-15 e estimuladas com o PMA tiveram uma significativa inibição na produção de H_2O_2 . Os resultados demonstram que o Pb18 inibe a liberação de H_2O_2 e, que o tratamento prévio dos monócitos com IL-15, não reverte a inibição causada pelo fungo, reforçando estudos anteriores que mostraram ser a cepa Pb18 capaz de inibir a liberação de H_2O_2 por monócitos ativados com IFN- γ ^(90,91). A capacidade da cepa virulenta Pb18 inibir a liberação de H_2O_2 por monócitos estimulados com PMA sugere que o fungo desenvolve mecanismos de escape do efeito fungicida da célula fagocitária do hospedeiro, por interferência com o metabolismo oxidativo

dessa célula. Dentro deste contexto, MOREIRA et al. ⁽⁹²⁾, estudando genes do *P.brasiliensis* envolvidos na interação fungo-hospedeiro, identificaram uma proteína de 61 kDa com atividade de catalase, que reagia com soro de pacientes com paracoccidiodomicose e apresentava homologia funcional com catalases de outros fungos. Essa proteína está expressa em maior quantidade na forma de levedura do fungo em comparação com a forma miceliana, sendo induzida 20 min após a exposição das células fúngicas ao peróxido de hidrogênio. Os autores sugerem que essa proteína pode atuar como fator de virulência do *P. brasiliensis*, por interferir com o mecanismo microbicida dependente de oxigênio.

Ensaio relativo à produção de O_2^- produzidos por monócitos tratados ou não com IL-15 e desafiados com Pb18 mostraram que o fungo não inibe a produção de O_2^- . O escape do metabolismo oxidativo tem sido relatado para outros fungos patogênicos como *Histoplasma capsulatum* ⁽⁹³⁻⁹⁶⁾, *C.albicans* ^(97,98), *C.neoformans* ^(99,100) e *A.fumigatus* ⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾. SLIGHT et al. ⁽¹⁰²⁾ descreveram a presença de uma toxina em esporos de *A.fumigatus*, capaz de inibir a produção de O_2^- por macrófagos alveolares de ratos e alterar a função das células, podendo ser considerado um importante fator para a colonização do fungo no pulmão e expressão de seus efeitos patogênicos. Em trabalho recente, BORDON et al., ⁽⁸⁹⁾ demonstraram que a mesma cepa virulenta de *P.brasiliensis* (Pb18), empregada em nosso trabalho, desenvolve mecanismo de escape dos efeitos de monócitos não ativados ou mesmo ativados por IFN- γ através da indução de liberação de prostaglandinas por essas células. Monócitos humanos, quando desafiados com

essa cepa virulenta, produzem prostaglandinas que inibem a atividade fungicida dessas células por meio da redução dos níveis de H_2O_2 e $TNF-\alpha$.

Não observamos efeito da IL-15 sobre a liberação de O_2^- induzida por PMA nas culturas de monócitos previamente tratados com IL-15 e infectados ou não com Pb18. Esses resultados associados aos do efeito da IL-15 sobre a produção de H_2O_2 sugerem que a citocina não exerce efeito modulador sobre o metabolismo oxidativo de monócitos estimulados com PMA ou Pb18. Resultados semelhantes foram descritos por MASTROIANNI et al. ⁽¹⁰⁴⁾, avaliando o efeito *in vitro* de IL-15 sobre o estado funcional de neutrófilos de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana. Os autores mostraram que embora o tratamento das células com IL-15 induza aumento da quimiotaxia e atividade fungicida dessas células, a citocina não modula o *burst* oxidativo das células, avaliado por quimioluminescência. Por outro lado, o efeito estimulatório de IL-15 sobre o metabolismo oxidativo foi observado por VAZQUEZ et al. ⁽⁶⁶⁾, que verificaram uma produção três vezes maior de O_2^- por monócitos humanos tratados com IL-15 ou IL-2 por 18 e 48h estimulados com PMA e uma significativa produção de O_2^- quando as células foram desafiadas com conídios de *C. albicans* opsonizados em relação às culturas não tratadas e não estimuladas. Contudo, a incubação de monócitos por 4h com a citocina não induz produção de O_2^- após estímulo com PMA e a produção direta desse metabólito também não é detectada em células que não receberam estímulos em nenhum dos períodos analisados.

Os resultados obtidos na infecção *in vitro* de monócitos de indivíduos saudáveis, com a amostra virulenta de *P. brasiliensis*, demonstraram que o fungo

é capaz de estimular a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Observamos que nas culturas de monócitos apenas infectados com Pb18, sem tratamento com IL-15, os níveis de TNF- α , produzidos ao longo de 18 h de infecção dos monócitos com o fungo, foram significativamente mais elevados, em comparação com o tempo de 4h. Estudos anteriores em nosso laboratório, avaliando a cinética de produção de TNF- α por monócitos humanos ⁽¹⁰⁵⁾ e por macrófagos peritoneais de hamsters ⁽⁵⁰⁾ infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis*, demonstraram que os níveis mais elevados da citocina são obtidos no período de 18h de co-cultivo do fungo com a célula fagocitária. Produção elevada de TNF- α também foi observada por FIGUEIREDO et al. ⁽¹⁰⁶⁾, após desafio de camundongos com fração F1 da parede celular das cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis*. Assim, pode-se considerar que a parede celular do *P. brasiliensis* estaria estimulando a produção de TNF- α e a resposta imunológica do hospedeiro. A pré-incubação de monócitos com IL-15 induziu efeito estimulatório significativo sobre a produção de TNF- α , quando as células foram desafiadas com a amostra virulenta do fungo, sendo esse efeito mais acentuado no período de 18h de co-cultivo monócito-*P. brasiliensis*. Além disso, nossos resultados mostram que o tratamento de monócitos com IL-15 também induz a produção de níveis significativamente mais elevados de TNF- α em culturas controle, não estimuladas. Os resultados sugerem um papel estimulador da IL-15 na regulação da síntese de TNF- α pelos monócitos infectados ou não com *P. brasiliensis*.

O tratamento de macrófagos com altas doses de IL-15 exerce efeito estimulatório sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1

e IL-6 e anti-inflamatórias como a IL-10 ⁽⁶³⁾. YANG et al. ⁽¹⁰⁷⁾ avaliaram o efeito da IL-15 sobre a produção de citocinas de padrão Th1 (IFN- γ e TNF- α) e Th2 (IL-4 e IL-10) por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com tuberculose, estimulados ou não Com PPD. Verificaram que o tratamento das células com IL-15 aumentava a produção de IFN- γ e TNF- α e diminuía a de IL-4 e IL-10 tanto nas células dos pacientes como de indivíduos controle saudáveis. Os autores sugerem que a IL-15 pode aumentar a defesa contra a tuberculose, podendo ser útil no tratamento da doença.

A produção de IL-6 detectada nas culturas de monócitos tratados com IL-15 apresenta um aumento significativo em relação às culturas não-tratadas em ambos os períodos de 4 e 18h. Após o desafio com Pb18 houve um aumento na produção de IL-6 com níveis semelhantes em células tratadas e não tratadas com a IL-15, evidenciando que o Pb18 estimula a produção de IL-6 por monócitos e que a IL-15 não induz aumento na produção de IL-6, mesmo quando as células são submetidas ao estímulo com o fungo. Resultados anteriores mostram que a cepa Pb18 induz níveis elevados de IL-6 quando co-cultivada com monócitos humanos não ativados por citocinas ^(49,89,108). Esses resultados sugerem que componentes da parede celular do fungo são provavelmente estimuladores potentes da produção de IL-6. A comparação dos resultados a produção de TNF- α e IL-6 por monócitos desafiados com Pb18 mostra que o fungo estimula a produção de ambas as citocinas. Na infecção de fagócitos por microrganismos patogênicos, a produção de IL-6 pode ser estimulada por IL-1 e TNF- α e representa um mecanismo de controle da ativação da célula hospedeira. A

produção de IL-6 por macrófagos infectados com *M. avium* parece influenciar a resposta imune do hospedeiro, impedindo a ativação dessas células por TNF recombinante ⁽¹⁰⁹⁾. Por outro lado, a produção de IL-6 por monócitos humanos estimulados com componentes de *C. neoformans* pode ser independente de TNF- α e os monócitos são os principais responsáveis por essa liberação ⁽¹¹⁰⁾. Em vista disso, a síntese de IL-6 pode ser induzida tanto por TNF- α ⁽¹¹¹⁾, como também por ação direta de produtos microbianos, por via independente de TNF ^(112,113). Assim, os resultados da literatura sugerem que a IL-6 regula a produção de TNF- α e IL-1 num mecanismo de *feedback* negativo ⁽¹¹⁴⁾. Tendo-se em vista estudos que demonstraram ser o TNF um potente indutor de IL-6 em culturas de fibroblastos ⁽¹¹⁵⁾, a existência de uma interação recíproca estimulatória / inibitória entre TNF e IL-6, sugere uma relação complexa de grande importância na regulação de muitas atividades dessas duas citocinas ⁽¹¹⁶⁾.

A pré-incubação dos monócitos com IL-15 levou à maior produção de IL-10 pelas células, observada no período de 18h de infecção com Pb18. Os resultados mostram que o Pb18 estimula a produção de IL-10 por monócitos e que a síntese de IL-10 ocorre mais tardiamente, em relação à produção de TNF- α e IL-6, por monócitos infectados com o fungo, uma vez que não detectamos essa citocina após 4h de co-cultivo. Esses resultados são semelhantes aos descritos por SIQUEIRA et al. ⁽¹¹⁷⁾ e corroboram os de SHIRATSUCHI et al. ⁽¹¹⁸⁾ que detectaram, em culturas de monócitos infectados com *M.avium*, níveis máximos de TNF- α entre 6 e 24h e de IL-10 após 24 e 48h.

De maneira semelhante aos resultados da produção de TNF- α , a pré-incubação com IL-15 induziu aumento dos níveis de IL-10 pelos monócitos infectados com Pb18 e sugere seu papel regulador sobre a ativação dessas células e sobre a síntese de citocinas inflamatórias. O efeito supressor da IL-10 sobre a produção de TNF- α e IL-1 por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos sadios estimuladas com *C. neoformans*, *C. albicans* e LPS foi descrito por LEVITZ et al. ⁽¹¹⁹⁾. Em estudo sobre a regulação da síntese de citocinas e prostaglandinas por IL-10, NIHO et al. ⁽¹²⁰⁾ verificaram que TNF- α e PGE₂ são moléculas chave na indução de IL-10 por monócitos estimulados com LPS. O TNF- α pode também estimular diretamente a produção de mRNA para IL-10, por mecanismo independente de PGE₂. Níveis elevados de IL-10 produzidos inibem eficientemente a síntese de TNF- α , PGE₂, bem como da própria IL-10, regulando, portanto, a resposta inflamatória *in vivo*. Em vista desses resultados, podemos sugerir que a maior concentração de IL-10, obtida nas culturas de monócitos tratados com IL-15 e infectados com Pb18, poderia ser decorrente do efeito estimulatório da IL-15 sobre a produção de TNF- α observado no presente trabalho.

A produção de IL-15 no sobrenadante de cultura de monócitos foi detectada somente após 18 h de co-cultivo com LPS ou Pb18, porém os níveis da citocina foram muito baixos e não diferiram dos observados na cultura controle não estimulada. Além disso, esses níveis foram significativamente menores em relação às culturas somente tratadas com IL-15. Esses resultados são surpreendentes e diferem dos obtidos na literatura. Segundo CARSON et al. ⁽⁷⁰⁾, o estímulo de

monócitos humanos com LPS leva ao aparecimento da proteína IL-15 após 5h de cultivo das células com a endotoxina. Além disso, a adição de LPS ou GM-CSF na cultura dessas células resulta na mobilização da IL-15 estocada intracelularmente para a membrana plasmática ⁽¹²¹⁾.

Dados da literatura alertam para a dificuldade de detecção de IL-15 em sobrenadante de cultura de células, apesar de uma ampla distribuição dessa citocina nos vários tecidos e células. Segundo alguns autores, a maioria das culturas primárias e linhagens de células que expressam mRNA para IL-15 não liberam níveis detectáveis dessa citocina em meio de cultura ⁽¹²²⁻¹²⁴⁾. Por outro lado, o receptor solúvel de IL-15 (sIL-15R α) é encontrado tanto na membrana celular quanto na forma solúvel ^(125, 58) e pode formar complexos do tipo receptor-ligante com a IL-15 produzida, dificultando a detecção de IL-15 livre no soro e em sobrenadantes de cultura ⁽¹²⁶⁾. Assim, os baixos níveis de IL-15 produzidos mesmo após estímulo dos monócitos com LPS e Pb18 poderiam ser explicados pela neutralização da citocina produzida pelo receptor solúvel presente na cultura.

Nossos resultados mostrando maior produção da IL-15 após tratamento dos monócitos com IL-15 recombinante, sugerem um efeito autócrino dessa citocina sobre os monócitos, reforçando dados da literatura ⁽¹²⁷⁾. Quando os monócitos foram tratados com IL-15 e então desafiados por 18h com o Pb18 houve um aumento significativo na produção dessa citocina, demonstrando que a IL-15 pode regular sua própria produção.

De acordo com MUSSO et al. ⁽⁵⁶⁾, mesmo que o mRNA para IL-15 seja constitutivamente expresso em monócitos e macrófagos e induzido por uma

variedade de estímulos, evidências de secreção dessa citocina são encontradas excepcionalmente em condições patológicas, como inflamações crônicas e doenças auto-imunes. Níveis significativamente elevados de IL-15 podem ser detectados no soro e líquido de pacientes com esclerose múltipla ⁽¹²⁸⁾ e no soro de 40% dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Altas concentrações de IL-15 nesses pacientes se correlacionam com a expressão de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e CD25 em linfócitos desses pacientes ⁽¹²⁹⁾. Na fase ativa do lúpus eritematoso observa-se aumento da síntese e liberação de IL-15 por monócitos estimulados *in vitro* com IFN- γ e LPS, bem como o aumento do número de monócitos contendo IL-15 associada à membrana ⁽¹³⁰⁾. Esses dados levantam a possibilidade de que monócitos expressem preferencialmente IL-15 ligada à membrana. Explorando essa hipótese, MUSSO et al. ⁽⁵⁶⁾ demonstraram que a IL-15 biologicamente ativa é detectável na forma associada à membrana de monócitos humanos normais e de linhagens monocíticas, mas não em células T ou B. Assim, sugerem que a maioria dos efeitos biológicos da IL-15, sob condições fisiológicas, ocorre dependentes da forma da citocina ligada à membrana.

A IL-15 presente na membrana possui a capacidade de mediar eventos de sinalização reversa, especialmente em monócitos e células de carcinoma de próstata ^(125, 126, 131). Essa sinalização reversa aumenta significativamente a produção de citocinas pró inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-8, indicando a relevância desse processo para a complexa função imunomodulatória destas células ^(125,131).

A análise comparativa dos efeitos do tratamento com IL-15 sobre a atividade fungicida e a produção de H_2O_2 , O_2^- e citocinas por monócitos infectados com *P.brasiliensis* mostra que a IL-15 estimula a atividade fungicida dessas células, provavelmente por aumento da produção de TNF- α . A associação entre atividade fungicida eficiente e produção elevada de TNF- α por monócitos corrobora resultados prévios descritos na literatura ^(29,39). Entretanto, essa atividade não parece ser dependente da produção tanto de H_2O_2 como de O_2^- , uma vez que o tratamento de monócitos com IL-15 não induziu aumento na produção desses metabólitos reativos do oxigênio durante o desafio dos monócitos com Pb18. Esses resultados diferem dos obtidos por CALVI et al. ⁽²⁹⁾ que sugerem ser H_2O_2 um metabólito importante para a atividade fungicida de monócitos estimulados por IFN- γ e TNF- α e dos de CARMO et al. ⁽³⁹⁾, que associaram a atividade fungicida de monócitos humanos, estimulados por TNF- α ou TNF- α associado a IFN- γ sobre Pb18 à produção de H_2O_2 , uma vez que esse processo foi inibido significativamente na presença de catalase. Porém, o mesmo não ocorreu na presença de inibidores de O_2^- ou de NO, sugerindo que H_2O_2 participa da atividade fungicida, enquanto NO não parece estar diretamente envolvido na morte de *P.brasiliensis* por monócitos humanos. Em trabalho recente RODRIGUES et al. ⁽¹³²⁾ demonstraram o envolvimento de H_2O_2 na atividade fungicida de neutrófilos humanos contra *P.brasiliensis*, quando essas células foram ativadas *in vitro* por IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF. A inibição dessa atividade na presença de catalase e de superóxido dismutase mostra que H_2O_2 e O_2^- participam como moléculas efetoras nesse processo. Entretanto, resultados

anteriores obtidos com macrófagos alveolares e peritoneais murinos, mostram que essas células matam *P.brasiliensis* por mecanismo independente do metabolismo oxidativo ^(35,133). Além disso, a produção de NO tem sido descrita como eficiente na inibição da replicação e na morte de *P.brasiliensis* ^(134,38,135,136) e de outros fungos como *C.albicans* ⁽¹³⁷⁾ e *C.neoformans* ⁽¹³⁸⁾ por fagócitos mononucleares murinos. Por outro lado o papel do NO na atividade antifúngica de células humanas não está ainda bem definido. A secreção de NO e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), envolvida na conversão de L-arginina em NO por monócitos humanos, tem apresentado resultados controversos na literatura ⁽¹³⁹⁻¹⁴²⁾. Esse metabólito não parece estar envolvido na morte de *C.neoformans* ⁽¹⁴³⁾, *A.fumigatus* ⁽¹⁴⁴⁾, *H.capsulatum* ⁽¹⁴⁵⁾ e de *P.brasiliensis* ⁽⁹¹⁾. Entretanto, a expressão de iNOS foi descrita por macrófagos e células gigantes presentes em granulomas de linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM ⁽¹⁴⁶⁾. Assim, o envolvimento de NO na morte de *P.brasiliensis* não está ainda claramente definido e merece maiores estudos.

Por outro lado, macrófagos podem destruir microrganismos por mecanismos não oxidativos, tais como acidificação dos fagossomas, lisozima, proteínas catiônicas e componentes do sistema complemento ^(13, 147). Portanto, é possível que o tratamento prévio com IL-15 possa ativar outros mecanismos microbicidas do monócito, causando a morte do *P.brasiliensis*.

No seu conjunto, os resultados do presente trabalho mostram que a IL-15 tem efeito modulador sobre monócitos humanos infectados com *P.brasiliensis*, caracterizado por aumento da atividade fungicida e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias durante o confronto fungo-monócitos. Assim, a continuidade dos

estudos sobre os mecanismos envolvidos na regulação da síntese de citocinas e na atividade fungicida de monócitos humanos modulada pela IL-15 poderão contribuir para melhor compreensão da interação fungo-hospedeiro na paracoccidiodomicose.

7. CONCLUSÕES

1. A IL-15 induz atividade fungicida eficiente em monócitos humanos contra o *P. brasiliensis*, sendo esse efeito dose-dependente.
2. O tratamento de monócitos com IL-15 não interferiu com a produção de H_2O_2 e O_2^- pelas células desafiada com *P. brasiliensis*, sugerindo que a atividade fungicida parece ser independente do metabolismo oxidativo.
3. A IL-15 modula a produção in vitro de TNF- α e IL-15 em monócitos infectados com Pb18.
4. A interação de monócitos humanos com leveduras de *P. brasiliensis* induz a produção de TNF- α , IL-6 e IL-10.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. 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.109-20.
2. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* : a puzzle still unsolved. J Med Vet Mycol. 1985; 23: 323-334.
3. Franco M, Sano A, Kera K, Nishimura K, Takeo K, Mivaji M. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1989; 31:151-7.
4. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes R P, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Trop Med Mycol. 1993; 5: 115-149.
5. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its forms. Rev Soc Bras Med Trop. 1987; 20: 129-132.
6. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. (Eds). Paracoccidioidomycosis. Boca Raton. CRC Press. 1994; p. 233-258.
7. Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: TOSTA CE. Imunologia das infecções. Uberaba: FUNEPU, 1992, p: 15-36.
8. Figueiredo F, Silva CL, Alves LMC, Rossi MA. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. Braz J Med Biol Res 1986; 19: 615A.

* Referências bibliográficas elaboradas de acordo com o International Comitee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submitted to biomedical Journal Ann Intern Méd 1997; 126:36-47.

9. Moscardi-Bacchi M, Soares A, Mendes R, Marques S, Franco M. *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1989; 27:149-58.
10. De Brito T, Franco MF. Granulomatous infection. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1994; 36: 185-92.
11. Van Furth R. Human monocytes and cytokines. *Res Immunol.* 1998;149:719-20. Review
12. Fromtling RA, Shadomy HJ. An overview of macrophages fungal interactions. *Mycopathologia* 1986; 93:77-93.
13. Moonis M, Ahmad I, Bachhawat BK. Macrophages in host defence: an overview. *Indian J Biochem Biophys.* 1992; 29:115-22.
14. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med.* 1983;158:670-89.
15. Hoffman M, Weinberg JR. Tumor necrosis factor α induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased antigen expression by peritoneal macrophages. *J Leukocyte Biol* 1987; 42: 704-10.
16. Reed SV, Nathan CF, Pihl DL, Rodricks P, Schaneback K, Conilon PJ, et al. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* with interferon. *J Exp Med* 1987; 166: 1743-9.
17. Evans R. Specific and non-specific activation of macrophages. In: Wagner,

W.R., Habin, H. Activation of macrophages: proceedings. Amsterdam: Excerpta Médica, 1974. 305p.

18. Mackenness GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. J Exp Med 1964; 120:105-10.
19. Mackenness GB, Blander RV. Cellular immunity. Prog Allergy 1967; 11:89-91.
20. Rabinovitch M. Macrophages spreading *in vitro*. In: Mononuclear phagocytes, characteristics, physiology & function. Oxford: Van Furth, 1975.
21. Abbas AK, Lichtman AH. Innate Immunity. In: Elsevier Editors. Cellular and Molecular Immunology 5thed, 2003; cap 12, 275-97.
22. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor- β in human disease. N Engl J Méd. 2000; 4:1350-1358.
23. Hamblin AS. Cytokines and cytokine receptors. Oxford: Oxford University Press; 1993, 90 p.
24. Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. Eur Respir J. 1994; 7: 1678-1689.
25. Trinchieri, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). Curr Opin Immunol. 1997; 9:17-23.
26. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Desactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. Nature. 1988; 334: 260-2.
27. Gordon S. The role of the macrophage in immune regulation. Res Immunol 1998; 149: 685-8.

28. 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.
29. Calvi SA, Peraçoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques AS, et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect.* 2003; 5:107-13.
30. Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS, Fernandez 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; 102:480-485.
31. James SL, Nacy C. Effector functions of macrophages and parasites. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 518-23.
32. Zarley JH, Britigan BE, Wilson ME. Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes. Role of hydroxyl radical and protection by heat shock. *J Clin Invest* 1991; 88: 1511-21.
33. Holzer TJ, Nelson KE, Crispen RG, Andersen BR. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. *Infect Immun* 1986; 51: 514-20.
34. Watanabe K, Kagaya K, Yamada T, Fukazawa Y. Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant gamma interferon. *Infect Immun.* 1991;59:521-8.
35. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhance killing of

Paracoccidioides brasiliensis or *Blastomyces dermatitidis*. J Immunol. 1988; 140:2786-2789.

36. 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: 2289-2294.
37. 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.
38. Gonzalez A, 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: 2546-2552.
39. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. *Med Mycol*. 2006; 44: 363-368.
40. Soares AMVC, Silva WB, Rodrigues DR, Calvi SA, Dias LA, Peraçoli MTS, et al. IL-10 but not TGF-beta inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human activated monocytes. *Annual Rev Biomed Sci* 2002 p. 89.
41. Moreira AP, Peraçoli MTS, Dias LA, Martins M, Calvi SA, Soares AMVC. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by peritoneal macrophages activated by IFN- γ or TNF- α is mediated by H₂O₂ and NO. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 145.
42. Dooley DP, Cox RA, Hestilow KL, Dolan MJ, Magee DM. Cytokine induction in human coccidioidomycosis. *Infect Immun* 1994; 62: 3980-3.

43. Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Kozel TR. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. *Infect Immun* 1996; 64: 2846-9.
44. Cross CE, Bancroft GJ. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and β -glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. *Infect Immun* 1995; 63: 2604-11.
45. Jouault T, Bernigaud A, Lepage G, Trinel PA, Poulain D. The *Candida albicans* phospholipomannan induces *in vitro* production of tumor necrosis factor alpha from human and murine macrophages. *Immunology* 1994; 83: 268-73.
46. Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell Interleukin-12 and Gamma Interferon production. *Infect Immun* 2000; 68: 2464-9.
47. Kesavan S, Walters CE, Holland KT, Ingham E. The effects of *Malassezia* on pro-inflammatory cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Med Mycol* 1998; 36: 97-106.
48. Suzuki T, Tsuzuki A, Ohno N, Ohshima Y, Yadomae T. Enhancement of IL-8 production from human monocytic and granulocytic cell lines, THP-1 and HL-60, stimulated with *Malassezia furfur*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;28:157-62.
49. Kurokawa CS, Soares AMVC, Araujo JR JP, Sugizaki MF, Peraçoli MTS. Pro and anti-inflammatory cytokine produced by human monocytes infected *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol Immunol*. 2006; *in pres*

50. Parise-Fortes MR, Da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, Soares AM, Peraçoli MTS. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol.* 2000; 38: 51-60.
51. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck KD, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science.* 1994; 264:965-8.
52. Armitage RJ, Macduff BM, Eisenman J, Paxton R, Grabstein KH. IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J Immunol.* 1995; 154: 483-90.
53. Carson WE, Giri JG, Lindermann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med.* 1994; 180: 1395-403.
54. Lodolce JP, Burkett PR, Koka RM, Boone DL, Ma A. Regulation of lymphoid homeostasis by interleukin-15. *Cytokine Grow Factor Rev.* 2002; 13: 129-39.
55. Burton KA, Johnson BD, Hausken ZE, Westenbroek RE, Idzerda RL, Scheuer T, et al. Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca²⁺ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 30; 94:11067-72.
56. Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, et al. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma- upregulated interleukin-15. *Blood.* 1999; 93:3531-9.

57. Budagian V, Bulanova E, Paus R, Bulfone-Paus S. IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17:259-80.
58. Mortier E, Bernard J, Plet A, Jacques Y. Natural proteolytic release of a soluble form human IL-15 receptor α -chain that behaves as a specific, high affinity IL-15 antagonist. *J Immunol.* 2004; 173:1681-8.
59. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 19-49.
60. Johnston JA, Bacon CM, Finbloom DS, Rees RC, Kaplan D, Shibuya K, et al. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:8705–9.
61. Van Belle T, Grooten J. IL-15 and IL-15R α in CD4⁺ T cell immunity. *Arch Immunol Ther Exp.* 2005; 53: 115-26.
62. Ohteki T, Suzue K, Makl C, Ota T, Koyasu S. Critical role of IL-15- IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat Immunol.* 2001; 2: 1138-43.
63. Alleva DG, Kaser SB, Monroy MA, Fenton MJ, Beller DI. IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *J Immunol.* 1997; 159:2941-2951.
64. D'Agostino P, Milano S, Arcoleo F, Di Bella G, LA Rosa M, Ferlazzo V, et al. Interleukin-15, as interferon-gamma, induces the killing of *Leishmania infantum* in phorbol-myristate-acetate-activated macrophages increasing

interleukin-12. Scand J Immunol. 2004; 60:609–14.

65. Maeurer MJ, Trinder P, Hommel G, Walter W, Freitag K, Atkins D, et al. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of Mycobacterium tuberculosis-infected mice. Infect Immun. 2000; 68:2962-70.
66. Vazquez N, Walsh TJ, Friedman D, Chanock SJ, Lyman CA. Interleukin 15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. Infect Immun. 1998; 66:145-50.
67. Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein-1 production in human monocytes. Blood. 1997; 90:2804-9.
68. Carson WE, Caligiuri MA. Interleukin-15 as a potential regulator of the innate immune response. Brazilian J Med Biol Res 1998; 31: 1-9.
69. Yoshikai Y, Nishimura H. The role of interleukin-15 in mounting an immune response against microbial infection. Microbes Infect. 2000; 2: 381-9.
70. Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, et al. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. J Clin Invest. 1995; 96:2578-82.
71. Khan IA, Kasper LH. IL-15 augments CD8+ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunol. 1996; 157:2103-8.
72. Mody CH, Spurrel JC, Wodd CJ. Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans* – stimulated monocytes. J Infect Dis. 1998; 178:803-14.

73. Nishimura H, Hiromatsu K, Kobayashi N, Grabstein KH, Paxton R, Sagamura K, et al. IL-15 in a novel growth for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection. J Immunol. 1996; 156: 663-9.
74. Takano M, Nishimura H, Kimura Y, Mokuno Y, Wahizu J, Itohara S, et al. Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in *Escherichia coli* infection in mice. Infect Immun 1998; 66: 3270-8.
75. Hirose K, Suzuki H, Nishimura H, Mitani A, Washizy J, Matsuguchi T, et al. Interleukin-15 might be responsible by early activation of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral infection with *Listeria monocytogenes* in rats. Infect Immunol. 1998; 66:5677-83.
76. Doherty TM, Seder RA, Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. J Immunol 1996; 156: 735-41.
77. Jullien D, Sieling PA, Uyemura K, Mar ND, Rea TH, Modlin RL. IL-15 an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. J Immunol. 1997; 158: 800-6.
78. Chehimi J, Marshall JD, Salvucci O, Frank I, Chehimi S, Kawecky S, et al. IL-15 enhances immune function during HIV infection. J Immunol 1997; 158: 5978-87.
79. Flamand L, Stefanescu i, Menez J. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. J Clin Invest 1996; 97: 1373-81.
80. Atedzoe BN., Ahmad A., Menezes J. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. J. Immunol. 1997; 159: 4966-72.

81. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, et al. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. Clin. Exp. Immunol. 1997; 109: 458-63.
82. Winn RM, Gil-Lamaignere C, Roilides E, Simitsopoulou M, Lyman CA, Maloukou A, et al. Selective effects of interleukin (IL)-15 on antifungal activity and IL-8 release by polymorphonuclear leukocytes in response to hyphae of *Aspergillus* species. J Infect Dis. 2003; 188: 585-90.
83. Tavian EG, Dias-Melicio LA, Bordon AP, Acorci MJ, Biondo GA, Peraçoli MT, et al. Effect of IL-15 on fungicidal activity and H₂O₂ release by human neutrophils challenged with high virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis., 2006, 12, 340.
84. Kirman I, Vainer B, Nielsen OH. Interleukin-15 and its role in chronic inflammatory diseases. Inflamm Res. 1998; 47:285-9. Review.
85. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest. 1968; 97: 77-89.
86. 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: 211-226.
87. Russo M, Teixeira HC, Marcondes MC, Barbuto JA. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. Braz J Med Biol Res. 1989; 22:1271-3.
88. Nascimento MPP, Soares AMVC, Parise-Fortes MR, Martins RAR, Nakaira ET, Peraçoli MTS. Monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by interferon-gamma and *Paracoccidioides brasiliensis* antigen display

fungicidal activity. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2005, 47 (suppl14): p21.

89. Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. Prostaglandin E₂ inhibits human monocytes *Paracoccidioides brasiliensis* killing by decreasing H₂O₂ and TNF-alpha production. Microbes Infect 2006 (in press).
90. Carmo JPM, Peraçoli MTS, Calvi AS, Dias LA, Soares AMVC. Inhibition of unprimed human monocytes oxidative burst by high-virulent strain *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of prostaglandins. Ann Rev Biol Med. 2002; 93.
91. Martins RAR, Soares AMVC, Nascimento MPP, Nakaira ET, Peraçoli MTS. Effect of transforming growth factor beta on the functional activity of human monocytes in vitro infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2005, 47 (suppl14): p22.
92. Moreira SF, Bailao AM, Barbosa MS, Jesuino RS, Felipe MS, Pereira M, et al. Monofunctional catalase P of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification, characterization, molecular cloning and expression analysis. Yeast. 2004; 21:173-182.
93. Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* fails to trigger release of superoxide from macrophages. Infect Immun. 1987; 55: 29-34.
94. Kurita N, Terao K, Brummer E, Ito E, Nishimura K, Miyaji M. Resistance of *Histoplasma capsulatum* to killing by human neutrophils. Evasion of oxidative burst and lysosomal-fusion products. Mycopathologia. 1991; 115:207-213.
95. Ikeda T, Little JR. Deactivation of macrophage oxidative burst in vitro by different strains of *Histoplasma capsulatum*. Mycopathologia. 1995; 132:133-

141.

96. Wolf JE, Abegg AL, Travis SJ, Kobayashi GS, Little JR. Effects of *Histoplasma capsulatum* on murine macrophage functions: inhibition of macrophage priming, oxidative burst, and antifungal activities. *Infect Immun.* 1989; 57: 513-519.
97. Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, et al. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol.* 2005; 56:397-415.
98. Heinsbroek SE, Brown GD, Gordon S. Dectin-1 escape by fungal dimorphism. *Trends Immunol.* 2005; 26:352-354.
99. Luberto C, Martinez-Marino B, Taraskiewicz D, Bolanos B, Chitano P, Toffaletti DL, et al. Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Invest.* 2003; 112:1080-1094.
100. Noverr MC, Cox GM, Perfect JR, Huffnagle GB. Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production. *Infect Immun.* 2003; 71: 1538-1547.
101. Rementeria A, Lopez-Molina N, Ludwig A, Vivanco AB, Bikandi J, Ponton J, et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol.* 2005; 22: 1-23.
102. Slight J, Nicholson WJ, Mitchell CG, Poutilly N, Beswick PH, Seaton A, et al. Inhibition of the alveolar macrophage oxidative burst by a diffusible component from the surface of the spores of the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Thorax.* 1996; 51: 389-396.

103. Tsunawaki S, Yoshida LS, Nishida S, Kobayashi T, Shimoyama T. Fungal metabolite gliotoxin inhibits assembly of the human respiratory burst NADPH oxidase. *Infect Immun*. 2004; 72: 3373-3382.
104. Mastroianni CM, d'Ettorre G, Forcina G, Lichtner M, Mengoni F, D'Agostino C, et al. Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 2000; 96:1979-1984.
105. Kurokawa CS, Peraçoli MTS, Araujo JR JP, Calvi SA, Sugizaki MF, Soares AMVC. Cytokine production from human monocytes infected *In vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34: 125-6.
106. Figueiredo F, Alves LMC, Silva CL. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol*. 1993; 93: 189-94.
107. Yang XM, Dong DQ, Li C, Yang YH. The effect of interleukin-7 and interleukin-15 on the production of Th1 and Th2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from patients with tuberculosis. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2006; 29: 403-406.
108. Nakaira ET, Sugizaki MF, Soares AMVC, Nascimento MPP, Martins RAR, Peraçoli MTS. Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes stimulated *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis* treated with amphotericin B and itraconazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2005, 47 (suppl14): p22.
109. Bermudez LE, Wu M, Petrofsky M, Young LS. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infect Immun*. 1992; 60: 4245-52.

110. Delfino D, Cianci L, Lupis E, Celeste A, Petrelli ML, Curro F, et al. Interleukin-6 production by human monocytes stimulated with *Cryptococcus neoformans* components. *Infect Immun*. 1997; 65: 2454-6.
111. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol*. 1990; 8:253-78.
112. Havell EA, Sehgal PB. Tumor necrosis factor-independent IL-6 production during murine listeriosis. *J Immunol*. 1991; 146:756-61.
113. Kontny E, Ziolkowska M, Ryzewska A, Maslinski W. Protein kinase c-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-1beta, IL-6). *Cytokine*. 1999; 11:839-48.
114. Dinarello CA, Marnoy SO, Rosenwasser LJ. Role of arachidonate metabolism in the immunoregulatory function of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor/interleukin-1. *J Immunol*. 1983; 130:890-5.
115. Kohase M, Henriksen-DeStefano D, May LT, Vilcek J, Sehgal PB. Induction of beta 2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell*. 1986; 45:659-66.
116. Aderka D, Le JM, Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol*. 1989; 143:3517-23.
117. Siqueira KZ, Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS. Interleukin-6 modulates cytokine production and increases growth of a virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* in human monocytes. *Cytokine*. 2006; *in press*

118. Shiratsuchi H, Hamilton B, Toossi Z, Ellner JJ. Evidence against a role for interleukin-10 in the regulation of growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes. *J Infect Dis.* 1996; 173: 410-7.
119. Levitz FM, North EA. Gamma interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immunol.* 1996; 64: 1595-9.
120. Niho Y, Niuro H, Tanaka Y, Nakashima H, Otsuka T. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta Haematol.* 1998; 99:165-70.
121. Neely GG, Robbins SM, Amankwah EK, Epelman S, Wong H, Spurrell JCL, et al. Lipopolysaccharide-stimulated or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated monocytes rapidly express biologically active IL-15 on their cell surface independent of new protein synthesis. *J Immunol.* 2001; 167:5011-7.
122. Gaggero A, Azzarone B, Andrei C, Mishal Z, Meazza R, Zappia E, et al. Differential intracellular trafficking, secretion and endosomal localization of two IL-15 isoforms. *Eur J Immunol.* 1999; 29:1265-74.
123. Kurys G, Tagaya Y, Bamford R, Ranover JA, Waldmann TA. The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *J Biol Chem.* 2000; 275:30653-9.
124. Meazza R, Verdiani S, Biassoni R, Coppolecchia M, Gaggero A, Orengo AM, et al. Identification of a novel interleukin-15 (IL-15) transcript isoform generated by alternative splicing in human small cell lung cancer cell lines. *Oncogene.* 1996; 12:2187-92.

125. Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, Ludwig A, Rose-John S, Saftig P, et al. Natural soluble interleukin-15R alpha is generated by cleavage that involves the tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE/ADAM17). *J Biol Chem.* 2004; 279: 40368-75.
126. Bulfone-Paus S, Bulanova E, Budagian V, Paus R. S, The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling. *Bioessays.* 2006; 28:362-77. Review
127. Nishimura H, Fujimoto A, Tamura N, Yajima T, Wajjwalku W, Yoshikai Y. A novel autoregulatory mechanism for transcriptional activation of the IL-15 gene by a nonsecretable isoform of IL-15 generated by alternative splicing. *Faseb J.* 2005; 19: 19-28.
128. Rentzos M, Cambouri C, Rombos A, Nikolaou C, Anagnostouli M, Tsoutsou A, et al. IL-15 is elevated in serum and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2006; 241: 25-29.
129. Aringer M, Stummvoll GH, Steiner G, Koller M, Steiner CW, Hofler E, et al. Serum interleukin-15 is elevated in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2001; 40: 876-81.
130. Baranda L, De la Fuente H, Layseca-Espinosa E, Portales-Perez D, Nino-Moreno P, Valencia-Pacheco G, et al. IL-15 and IL-15R in leucocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2005;44:1507-13
131. Neely GG, Epelman S, Ma LL, Colarusso P, Howlett CJ, Amankwah EK, et al. Monocytes surface-bound IL-15 can function as an activating receptor and participate in reverse signaling. *J Immunol.* 2004; 172:4225-34.
132. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC.

Paracoccidioides brasiliensis killing by IFN- γ , TNF- α and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. Med Mycol. 2006 (in press).

133. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. Int J Immunopharmacol. 1988; 10:945-52.
134. Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* – infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J Immunol. 1998; 161: 3056-3063.
135. Jimenez Mdel P, Restrepo A, Radzioch D, Cano LE, Garcia LF. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 47:56-66.
136. Nascimento FRF, Calich VLG, Rodriguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. J Immunol. 2002; 168:4593-4600.
137. Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E. Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. Infect Immun. 1996; 64: 3127-3133.
138. Alspaugh JA, Granger DL. Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. Infect Immun. 1991; 59: 2291-2296.
139. Denis M. Human monocytes/macrophages: NO or not NO? J Leukoc Biol. 1994; 55: 682-684.
140. Albina JE. On the expression of nitric oxide synthase by human

macrophages. Why no NO? J Leukoc Biol. 1995; 58: 643-649.

141. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol. 1997; 15:323-350.
142. Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. J Infect Dis 1993; 167: 1358-1363.
143. Cameron ML, Granger DL, Weinberg JB, Kozumbo WJ, Koren HS. Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation to nitrite or nitrate. Am Rev Respir Dis. 1990; 142: 1313-1319.
144. Michaliszyn E, Senechal S, Martel P, de Repentigny L. Lack of involvement of nitric oxide in killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by pulmonary alveolar macrophages. Infect Immun. 1995; 63: 2075-2078.
145. Desai G, Nassar F, Brummer E, Stevens DA. Killing of *Histoplasma capsulatum* by macrophage colony stimulating factor-treated human monocyte-derived macrophages: role for reactive oxygen intermediates. J Med Microbiol. 1995; 43: 224-229.
146. Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. Cytokine. 2003; 21:234-41.
147. Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y, Suzuki S, Kobayashi M, Okawa Y, et al. Biochemical mechanisms of intracellular killing of fungi. J Med Vet Mycol. 1992; 30:179-87.

RESUMO

A interleucina-15 (IL-15) é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos e macrófagos em resposta a agentes infecciosos, desempenhando importante papel modulador na imunidade inata e adaptativa. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da IL-15 sobre a atividade fungicida, metabolismo oxidativo e a produção de citocinas por monócitos humanos, infectados *in vitro* com cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). Monócitos de sangue periférico, obtidos de indivíduos saudáveis, foram pré-incubados na ausência ou presença de IL-15 (12,5, 25 e 50 ng/mL) por 24 h a 37°C e infectados com Pb18 na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica durante 4 h e 18 h. A atividade fungicida de monócitos foi determinada após 4 h pela recuperação de fungos viáveis por plaqueamento das co-culturas em meio BHI-ágar. O metabolismo oxidativo foi avaliado pela liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de ânion superóxido (O₂⁻) nas culturas desafiadas com Pb18 e estimuladas com *phorbol myristate acetate* (PMA) durante 60 min. A produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), IL-6, IL-10 e IL-15 foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) nos sobrenadantes das co-culturas obtidos após 4 e 18 h de incubação. Os resultados mostraram que a pré-incubação de monócitos com IL-15 induziu aumento significativo na atividade fungicida contra Pb18 de maneira dose-dependente, sendo esse efeito neutralizado pela adição de anticorpo monoclonal anti-IL-15. O tratamento com IL-15 não interferiu na capacidade de liberação de H₂O₂ e O₂⁻ por monócitos desafiados com Pb18 sugerindo que a atividade fungicida estimulada por IL-15 ocorre por mecanismos independentes do metabolismo oxidativo. Monócitos infectados com o fungo, na ausência de IL-15, produziram níveis de TNF-α, IL-6 e IL-10 significativamente maiores após 18 h de co-cultivo. O pré-tratamento de monócitos com IL-15 induziu a produção de níveis significativamente mais elevados de TNF-α, IL-10 e IL-15 pelas células desafiadas com o fungo, sugerindo efeito autócrino e modulador da IL-15 na produção de citocinas pro e anti-inflamatórias durante a infecção de monócitos com *P.brasiliensis*.

ABSTRACT

Interleukin-15 (IL-15) is a pro-inflammatory cytokine especially produced by monocytes and macrophages against infectious agents and that play a pivotal role in the innate and adaptive immune response. The aim of this study was to analyze the effects of IL-15 on fungicidal activity, oxidative metabolism and cytokine production by human monocytes challenged *in vitro* with a virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18). Peripheral blood monocytes obtained from healthy individuals were pre-incubated for 24h with or without human recombinant IL-15 (12.5, 25 and 50 ng/mL), and then challenged with Pb18 in a ratio of 50:1 monocytes:fungi. Fungicidal activity of monocytes against Pb18 was assessed by viable fungi recovery from 4 h co-cultures after plating in BHI-agar. Oxidative metabolism was evaluated by hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion (O₂⁻) release in the monocyte cultures challenged by Pb18 and stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) for 60 min. Tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, IL-10 and IL-15 production by monocytes were determined in culture supernatants by enzyme immunoassay (ELISA). The results showed that IL-15 enhanced fungicidal activity against Pb18 in a dose-dependent pattern. This effect was abrogated by addition of anti-IL-15 monoclonal antibody to the co-cultures. No significant effect of IL-15 on H₂O₂ and O₂⁻ release by monocytes was observed suggesting that the fungicidal activity was independent of oxidative metabolism activation. Monocytes infected with *P. brasiliensis* in the absence of IL-15, produced significantly higher levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 after 18 h of co-culture in comparison to experiments of 4h-incubation with the fungus. The pre-treatment of monocytes with IL-15 induced significant higher levels of TNF- α , IL-10 and IL-15 production by these cells challenged with the fungus. These results suggest an autocrine and modulatory effect of IL-15 on pro- and anti-inflammatory production during monocyte infection with *P. brasiliensis*.