

João Paulo Martins Do Carmo

**ATIVACÃO E DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS
HUMANOS COM GM-CSF *IN VITRO* PARA AQUISIÇÃO
DE ATIVIDADE FUNGICIDA CONTRA O
Paracoccidioides brasiliensis – PAPEL DOS
METABÓLITOS DO OXIGÊNIO E NITROGÊNIO**

Orientadora: Profª Drª Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu – UNESP, para
obtenção do título de Mestre em Patologia

Botucatu

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO

Carmo, João Paulo Martins.

Ativação e diferenciação de monócitos humanos com GM-CSF in vitro para aquisição de atividade fungicida contra o *Paracoccidioides brasiliensis* : papel dos metabólitos do oxigênio e nitrogênio / João Paulo Martins Do Carmo. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Orientador: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

1. Paracoccidioidomicose. Aspectos imunológicos

CDD 616.969

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; *Paracoccidioides brasiliensis*; Monócitos humanos; Macrófagos humanos; GM-CSF; Atividade fungicida; H₂O₂; NO

agradecimentos

A Deus, por guiar -me pelo caminho da Sabedoria, quando, olhando para trás, nos momentos de maior dificuldade, não conseguia enxergar meus passos. Pois era justamente aí que o Senhor me carregava nos braços.

“Com muito custo, podemos conhecer o que está na Terra e com dificuldade encontramos o que está ao alcance da mão. Mas quem poderá investigar o que está no céu? Quem poderá conhecer o Teu projeto, se Tu não lhe deres Sabedoria, enviando do alto o Teu Espírito Santo? Somente assim foram endireitados todos os caminhos de quem vive sobre a terra. Somente assim os homens aprenderam aquilo que Te agrada. Eles foram salvos por meio da Sabedoria”.

Sabedoria 9,16-18.

Aos docentes, funcionários, pós-graduandos e estagiários do Departamento de Microbiologia e Imunologia: Alexandrina Sartori, José Maurício Sforcin, Maria Terezinha S Peraçoli, Ramon Kaneno, Sílvio Luís de Oliveira, Eduardo Bagagli, João MG Candeias, João Pessoa A Jr.; Cilmyery S Kurokawa, Sueli A Calvi, Luciane A Dias, Daniela R Rodrigues, Andréa Vanessa Belik, Keila Z Siqueira, Elisandra G Tavian, Michele J Acorci, Ricardo Orsi, Érika T Nakaira, Sandra G Bosco, Rosana AR Martins, Luís Henrique Franco, Lisiane A Martins, Silvia C Pedrini, Wilson B da Silva; Maria Antonia Martinez da Palma, Luís Henrique Alquati, Maria de Lourdes Alves, Benedito Correa, Benedito Placideli, Roberto Rocha, Sônia M Faraldo e Leonice A. Garcia. Pela convivência, apoio, auxílio, aprendizado, sugestões, críticas e lições, que contribuíram tanto para a minha vida profissional quanto pessoal.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia, pela acessibilidade e disponibilidade. À Tânia Andradetti, obrigado pela compreensão e dedicação. Aos pós-graduandos, especialmente aos colegas de graduação (XXXIII) e amigos Rodrigo Otávio Alves de Lima e Erick da Cruz Castelli, pela cooperação, solidariedade, apoio, ombro e ouvidos durante a minha caminhada, desde a graduação. À Prof. Dra. Denise Fecchio, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Patologia, pelas orientações, sugestões e auxílios na metodologia; e pelo apoio e incentivo na apresentação de trabalhos e na redação desta dissertação.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina: Regina Spadin, Natanael, Vânia, e novamente, à Tânia, pelo auxílio e esclarecimento de dúvidas quanto ao programa.

Aos doadores de sangue e a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, sem os quais a concepção deste não seria possível.

Um agradecimento especial à minha querida orientadora, e segunda mãe nesses últimos anos, desde a Iniciação Científica: Prof. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares. Obrigado pelo apoio, pela amizade, orientação, incentivo e pela oportunidade de aprender e crescer na investigação científica em Imunologia.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque ele se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”.

Albert Einstein

Aos meus familiares: pais (João Martins do Carmo e Maria Joana do Carmo), irmãos, sobrinhos, “agregados” e amigos, pelo apoio moral e incondicional com o qual impulsionaram a minha caminhada, apesar das dificuldades.

À memória de minha avó materna Euripa Vicente Ferreira
(*25/02/1927 – 11/01/2002+), que me ensinou, através de minha mãe, a
educação, o respeito, a disciplina, a humildade e a honestidade.

*“As pessoas são, com frequência, egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Mesmo assim, perdoe-as sempre.
Se você é gentil, podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.
Mesmo assim, seja gentil sempre.
Se você é honesto e franco, podem enganá-lo.
Mesmo assim, seja honesto e franco sempre.
O que você levou anos para construir,
alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa sempre, mesmo assim.
Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.
O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de si, embora isso possa nunca ser o bastante.
Dê o melhor de si assim mesmo.
Veja que, no final das contas, é entre você e Deus.
Nunca foi entre você e as outras pessoas”*

Me. Tereza de Calcutá.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
I.1	Paracoccidioidomicose – aspectos Imunológicos..... 1
I.2	GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)..... 5
I.2.1	Farmacologia e Efeitos no Sistema Imune..... 5
I.2.2	Modulação da Defesa do Hospedeiro Contra Infecções..... 7
I.3	Mecanismos microbicidas das células fagocitárias..... 8
I.3.1	Metabolismo oxidativo..... 8
I.3.2	NO (Óxido Nítrico): Síntese, Liberação e Efeitos Biológicos..... 10
I.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 13
CAPÍTULO II – ARTIGO	
II.1	RESUMO..... 26
II.2	INTRODUÇÃO..... 27
II.3	MATERIAIS E MÉTODOS..... 29
II.3.1	Reagentes e Meios..... 29
II.3.2	Casuística..... 29
II.3.3	Isolamento e Cultura de Monócitos e Macrófagos..... 30
II.3.4	Cultivo do <i>P. brasiliensis</i> 30
II.3.5	Teste de Viabilidade do <i>P. brasiliensis</i> 31
II.3.6	Avaliação da Atividade Fungicida..... 31
II.3.7	Avaliação da produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI)..... 32
II.3.8	Avaliação da produção de intermediários reativos do nitrogênio (RNI)..... 33
II.3.9	Análise Estatística..... 34
II.4	RESULTADOS..... 35
	Papel de GM-CSF sobre a atividade fungicida de monócitos humanos (MO) in 35 vitro para a eliminação de <i>P. brasiliensis</i> de alta virulência.....
	Papel de CAT e L-NMMA sobre a atividade fungicida de MO ativados com 36 GM-CSF
	Papel de GM-CSF sobre atividade fungicida de macrófagos derivados de 38 monócitos humanos somente com CTCM por 7 dias de cultura in vitro (MØ).
	Papel de CAT e L-NMMA sobre a atividade fungicida de MØ ativados com 39 GM-CSF.....
	Papel de GM-CSF sobre atividade fungicida de macrófagos derivados de 42

	monócitos humanos, obtidos na presença de GM-CSF por 7 dias de cultura in vitro (G-MØ).....	
	Papel de CAT e L-NMMA sobre a atividade fungicida de G-MØ ativados com. GM-CSF.....	43
II.5	DISCUSSÃO.....	46
III	ANEXO	
	Abstract.....	I
	References.....	VII
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	VII

LISTA DE FIGURAS

- FIG. 1.** Monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados na ausência (MO) ou presença de GM-CSF (G) em diferentes concentrações (1; 10; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 U/mL) por 18h e desafiados com *P. brasiliensis* por 4h para avaliação da atividade fungicida *in vitro*. Os resultados são expressos pela Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 11 indivíduos 35
- FIG. 2.** Monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) ativados com GM-CSF (125U/mL) durante 18h foram incubados na presença de CAT (20000U/mL) ou L-NMMA (450U/mL), desafiados concomitantemente com Pb18 por 4h, e avaliados para atividade fungicida *in vitro*. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 11 indivíduos 37
- FIG. 3.** Macrófagos derivados de monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) pela incubação somente com CTCM por 7 dias (MØ) foram ativados com GM-CSF (G) em diferentes concentrações (1; 10; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 U/mL) durante 18h. Em seguida, as células foram desafiadas com Pb18 por 4h e avaliados quanto à atividade fungicida *in vitro*. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos 39
- FIG. 4.** Macrófagos derivados de monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) pela incubação somente com CTCM por 7 dias (MØ) foram ativados com GM-CSF durante 18h (GM-CSF); pré-incubados na ausência ou presença de CAT (20000U/mL) ou L-NMMA (450U/mL) e desafiados concomitantemente com *P. brasiliensis* por 4h. Em seguida, as células foram avaliadas quanto à atividade fungicida *in vitro*. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos 41
- FIG. 5.** Macrófagos derivados de monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) pela incubação na presença de GM-CSF 250 U/mL por 7 dias (G-MØ) foram ativados com GM-CSF (G) em diferentes concentrações (1; 10; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 U/mL) durante 18h. Em seguida, foram ativados com Pb18 por 4h e avaliados quanto à atividade fungicida *in vitro*. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos 42
- FIG. 6.** Macrófagos derivados de monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) pela incubação com GM-CSF 250 U/mL por 7 dias (G-MØ) foram ativados com GM-CSF 125 U/mL por 18h e pré-incubados na presença de CAT (20000U/mL) ou L-NMMA (450U/mL); desafiados concomitantemente com Pb18 por 4h, e avaliados quanto à atividade fungicida *in vitro*. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos 44

LISTA DE FIGURAS

Tab. 1. Produção de H_2O_2 e NO_2^- em coculturas de monócitos pré-ativados com GM-CSF (125U/mL) por 18h, e posteriormente desafiados com Pb18 por 4h, na ausência ou presença de (CAT) ou NO (L-NMMA). Os resultados expressam $M \pm EP$ de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos 38

Tab. 2. Produção de H_2O_2 e NO_2^- em coculturas de macrófagos derivados de monócitos ($M\emptyset$) pré-ativados com GM-CSF por 18h e desafiados posteriormente com *P. brasiliensis* por 4h, na ausência ou presença de CAT ou L-NMMA. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos 41

Tab. 3. Produção de H_2O_2 e NO_2^- em coculturas de macrófagos derivados de monócitos na presença de GM-CSF por 7 dias (G- $M\emptyset$), pré-ativados com GM-CSF por 18h e desafiados com Pb18 por 4h, na ausência ou presença de CAT ou L-NMMA. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos 45

Lista de Abreviaturas

BHI – Infusão cérebro coração

CAT – Catalase

EDTA – Ethylenediamine Tetracetic Acid

EP – Erro Padrão

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

G-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

G-MØ - Macrófagos Derivados de Monócitos do Sangue Periférico, durante 7 dias na presença de CTCM + GM-CSF 250 U/mL

GPY – Glicose 1,5%, Peptona 1% e Extrato de Levedura 0,5%

Gp43 – Glicoproteína 43

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IFN- γ - Interferon -gama

IL – Interleucina

Ig- Imunoglobulina

LGL – Linfócitos grandes granulares

L-NMMA – L-Monomethyl-Arginina

LPS – Lipopolissacáride de *Escherichia coli* O₅₅B₅

MAC – Complexo *Mycobacterium avium* – *intracellulare*

MCCC – Meio de Cultura de Células Completo

MO – Monócitos

MØ - Macrófagos Derivados de Monócitos do sangue Periférico, durante 7 dias na presença de CTCM

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NK – Células Natural Killer (Exterminadoras Naturais)

NO – Óxido Nítrico

NOS – NO-Sintase

O₂ - Oxigênio

O₂⁻ - Ânion Superóxido

OH - Ânion Hidroxila

Pb18 – Cepa 18 do *P. brasiliensis*

PCM - Paracoccidioidomicose

PBS – Salina Tamponada com Fosfatos

Pmns – Leucócitos Polimorfonucleares

RNI – Intermediários Reativos de Nitrogênio (**R**eactive **N**itrogen **I**ntermediates)

ROI – Intermediários Reativos de Oxigênio (**R**eactive **O**xygen **I**ntermediates)

RPMI – Meio para Cultura de Células

SOD – Superóxido-Dismutase

TH – Linfócitos T Helper (Auxiliares)

TGF-β - Fator de Transformação do Crescimento - Beta

TNF-α - Fator de Necrose Tumoral - alfa

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu, com auxílio financeiro da FAPESP

CAPÍTULO I
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Paracoccidioidomicose – Aspectos Imunológicos

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina^[1,2]. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo dimórfico, que se apresenta sob a forma de levedura em tecidos do hospedeiro e quando cultivado à temperatura de 37°C. À temperatura ambiente, apresenta-se sob a forma de micélio^[3-5].

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos da fase miceliana, representados por micélios e conídios, presentes em água, plantas e solo; e que penetrem no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primariamente os pulmões, provocando o chamado complexo primário em nível pulmonar^[4]. Esse complexo pode evoluir para a cura ou tornar-se latente caracterizando a paracoccidioidomicose-infecção, identificável pela ausência de sinais ou sintomas clínicos^[1,6,7], embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina^[8].

Pode ainda progredir para a paracoccidioidomicose-doença com conseqüente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais pela via linfo-hematogênica^[1,2,6,7]. As manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões principais que definem as formas aguda e crônica da doença. A forma aguda é habitualmente severa, de evolução rápida e compromete o sistema fagocitário mononuclear (baço, fígado, linfonodo e medula óssea). A forma crônica tem duração prolongada, instalação lenta e gradual e as lesões permanecem localizadas ou envolvem mais de um órgão ou sistema^[6,7].

A doença afeta, principalmente, trabalhadores rurais, em contato constante com a vegetação e o solo. Na forma aguda, jovens de ambos os sexos são afetados em igual proporção. Entretanto, na doença crônica do adulto há predominância de homens infectados em relação às mulheres na faixa etária entre 30 e 49 anos. Provavelmente, o número reduzido de mulheres afetadas está relacionado a um efeito protetor promovido pelos hormônios femininos^[1,6,7].

Estudos *in vitro* demonstraram que estrógenos atuam inibindo a transformação de micélios e ou conídios em leveduras, evento fundamental na instalação da infecção^[9,10]. Paralelamente, foi demonstrada a presença de receptores para estrógenos tanto na fase micelial como na leveduriforme^[11,12].

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, como sua virulência e composição antigênica; das condições ambientais; e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, patrimônio genético e competência imune. Em relação a este fator, estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos específicos e inespecíficos de defesa que atuam na resistência ao *P. brasiliensis*^[7,13-15].

No que se refere aos mecanismos específicos, apesar dos antígenos do fungo induzirem tanto à produção de anticorpos quanto à resposta imune mediada por células, os primeiros parecem não exercer papel protetor. Ao contrário, uma exacerbação da resposta humoral é observada justamente nas formas mais agudas e graves da doença^[16-20]. Em relação à resposta imune celular, vários estudos^[21-26] permitiram concluir que os pacientes com paracoccidiodomicose apresentam diferentes graus de comprometimento, variando desde a total anergia até respostas aparentemente preservadas.

A posição ocupada no espectro depende de múltiplos fatores, tais como fase da doença, resposta ao tratamento e forma clínica. O maior grau de anergia tem sido observado por ocasião do diagnóstico, ocorrendo uma tendência à normalização da resposta com a evolução do tratamento^[25]. Em relação às formas clínicas podemos considerar que o comprometimento da resposta imune celular é mais intenso na forma aguda que na crônica^[23].

Os trabalhos citados demonstram claramente que uma resposta imune celular intacta é crucial para a defesa do hospedeiro contra o fungo. Alguns mecanismos específicos através dos quais essa resposta resulta em proteção estão sendo elucidados. Desta forma, sendo o *P. brasiliensis* um microrganismo intracelular, o mecanismo de defesa previsto envolveria a estimulação de células CD4+ da subpopulação Th1. Assim, após a ativação destas células com

conseqüente liberação de citocinas, como o IFN- γ , células polimorfonucleares e macrófagos seriam recrutados e ativados no sítio da infecção, podendo fagocitar e destruir intracelularmente o fungo. Os macrófagos ativados secretariam citocinas e posteriormente se diferenciariam em células epitelióides. O granuloma formado, envolvendo o *P. brasiliensis*, pode ser considerado como uma resposta do hospedeiro ao fungo, na tentativa de destruir, bloquear ou circunscrever o parasita, impedindo sua multiplicação e disseminação^[24].

Trabalhos utilizando células murinas têm demonstrado esse mecanismo. Nesse sentido, macrófagos ativados por IFN- γ ou linfocinas não purificadas, adquirem a capacidade de digerir o fungo, podendo desempenhar funções efetoras importantes contra o *P. brasiliensis*^[27]. CANO et al.^[28] verificaram que macrófagos cultivados em presença de linfocinas obtidas de células de baço de animais imunizados aumentaram sua capacidade de destruir conídios.

Em estudos ultra-estruturais de leveduras de *P. brasiliensis* no interior de macrófagos ativados, foi possível demonstrar que após 4 horas de interação ocorre a desintegração citoplasmática e o esvaziamento das células fúngicas, restando apenas a parede celular^[29]. No entanto, BRUMMER et al.^[30] observaram que a atividade fungicida apresentada por macrófagos murinos ativados não era inibida na presença de superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), dimetil-sulfoxida (DMSO) ou azida (AZI), indicando que as leveduras de *P. brasiliensis* podem ser digeridas por macrófagos ativados por um mecanismo independente dos produtos do metabolismo oxidativo.

Os trabalhos utilizando células humanas não confirmam os achados com células de animais, particularmente no que se refere à importância do IFN- γ como citocina ativadora da função macrofágica para aquisição de atividade fungicida. Resultados obtidos por MOSCARDI-BACCHI et al.^[31] revelaram que monócitos e macrófagos de indivíduos normais quando ativados por IFN- γ apenas inibem o crescimento intracelular do *P. brasiliensis* sem exercer atividade fungicida.

De forma similar, trabalhos em nosso laboratório^[32] têm demonstrado que a pré-incubação de monócitos com IFN- γ não os induz a uma eficiente atividade fungicida contra a cepa do *P. brasiliensis* de alta virulência. Essa citocina, no

entanto, é capaz de induzir essa atividade, quando do desafio com cepa de baixa virulência, a qual, comparada à de alta virulência, induz à produção de níveis maiores de TNF- α pelos fagócitos. Assim, concluímos que uma eficiente atividade fungicida ocorre após a ativação dos monócitos humanos via efeito sinérgico entre IFN- γ e TNF- α ^[32]. Adicionalmente, outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o mecanismo de atividade fungicida das células ativadas com essas citocinas é mediado por H₂O₂^[33].

Em conjunto, os trabalhos acima demonstram que, na paracoccidiodomicose, os mecanismos ativadores das células fagocitárias, decorrentes da liberação de citocinas produzidas por células CD4 de padrão Th1, ou pela própria célula fagocitária estão parcialmente entendidos.

Por outro lado, o papel de citocinas supressoras, como a Interleucina-10 (IL-10) e o Fator de Transformação do Crescimento- β (TGF- β) sobre a atividade fungicida de células fagocitárias ativadas contra o *P. brasiliensis* também não está completamente elucidado. Utilizando macrófagos murinos ativados por IFN- γ , Gazzinelli et al. ^[34,35] detectaram o papel desativador da IL-10 e do TGF- β sobre a atividade microbicida contra o *Trypanosoma cruzi*.

Nesse sentido, SILVA et al.^[36] realizaram trabalho recente em nosso laboratório com o objetivo de avaliar o efeito da IL-10 e do TGF- β sobre a atividade fungicida in vitro de monócitos humanos pré-ativados com IFN- γ e TNF- α , contra a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18). Os resultados para as duas citocinas foram discrepantes: IL-10 inibiu a atividade fungicida induzida por TNF- α , enquanto que processo semelhante não ocorreu com o TGF- β , cuja incubação simultânea com IFN- γ ou TNF- α não alterou a atividade induzida por estas citocinas.

Esse trabalho, no entanto, não avaliou os mecanismos de atuação de IL-10 e TGF- β , que poderia estar relacionado com uma inibição da liberação de H₂O₂ por fagócitos ativados, uma vez que trabalho concomitante realizado em nosso laboratório demonstrou que monócitos humanos ativados exercem atividade fungicida contra cepa virulenta do fungo através de uma maior produção desse metabólito^[33].

Apesar desse trabalho não ter estudado a participação de H_2O_2 sobre a atividade fungicida de células humanas, os dados de MOREIRA et al. [37] obtidos em nossos laboratórios, utilizando macrófagos peritoneais murinos ativados com $IFN-\gamma$, sugerem a participação de H_2O_2 e de NO na atividade fungicida contra o Pb18. Além disso, esse trabalho demonstra também o papel inibitório da IL-10 sobre a atividade fungicida induzida tanto por $IFN-\gamma$ quanto por $TNF-\alpha$.

SOARES et al. [38] demonstraram que a necessidade de ativação das células por $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ para a aquisição de atividade fungicida por monócitos ocorre devido à liberação de prostaglandinas, induzida pelo fungo. Os autores sugerem que esse mediador poderia estar inibindo a produção de H_2O_2 e que o processo de ativação com as duas citocinas faria com que as células liberassem maiores quantidades desse metabólito, compensando esta inibição.

Outras citocinas, como os fatores estimuladores de colônias, particularmente o GM-CSF, ainda não foram estudadas no que se refere a sua atuação na interação *P. brasiliensis*/células fagocitárias.

2. GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)

2.1. Farmacologia e Efeitos no Sistema Imune

O GM-CSF endógeno é um polipeptídeo altamente glicosilado e foi identificado pela primeira vez com base na sua capacidade de estimular a proliferação clonal de precursores in vitro [39]. Foi também o primeiro fator de crescimento hematopoiético mielóide humano a ser clonado molecularmente, o que permitiu a expressão de grandes quantidades da proteína [40]. Pesquisas in vitro e in vivo usando GM-CSF murino (rMuGM-CSF) e humano (rHuGM-CSF) sintéticos demonstraram que o termo CSF (fatores estimuladores de colônias) é limitado, porque descreve somente um aspecto de vários efeitos biológicos que lhe foram atribuídos nos últimos anos [41].

O rHuGM-CSF, que neste texto será referido simplesmente como GM-CSF, daqui por diante, também é conhecido como sargramostim, nome dado ao GM-

CSF humano recombinante derivado de levedura e sintetizado por clonagem molecular a partir de *Saccharomyces cerevisiae*^[41].

Embora represente um papel vital na hematopoiese ao induzir o crescimento de várias linhagens celulares diferentes, o GM-CSF também aumenta inúmeras atividades funcionais das células efectoras maduras envolvidas na apresentação de antígenos e na imunidade mediada por células, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas^[41,42]. Seus efeitos biológicos são mediados através da ligação a receptores (GM-CSF-R) expressos na superfície das células-alvo, como granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e células progenitoras de macrófagos; bem como neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, plasmócitos, alguns tipos de linfócitos T, células endoteliais vasculares, células uterinas e células de leucemia mielóide^[41].

A proliferação aumentada de neutrófilos é um importante aspecto da função do GM-CSF; porém, efeitos deste fator de crescimento multi-linhagem sobre outras células do sistema imune, incluindo monócitos e macrófagos, já foram identificados. A administração de GM-CSF não somente aumenta os níveis de monócitos circulantes, mas também aumenta a função de monócitos e macrófagos, incluindo metabolismo oxidativo, citotoxicidade e fagocitose dependente de Fc. Aumenta também a maturação, proliferação e migração de células dendríticas; além da expressão de moléculas de MHC de classe II nestas células e nos macrófagos, o que melhora sua função como células apresentadoras de antígenos^[41-43].

Combinados, estes efeitos do GM-CSF não somente aumentam a quantidade de células hematopoiéticas, mas também aumentam a função imune. A capacidade de GM-CSF de acelerar a recuperação mielóide e prevenir infecção resultou em múltiplas indicações aprovadas para sargramostim e molgramostim (GM-CSF derivado de *Escherichia coli*) em seus respectivos países. As drogas são usadas em pacientes que sofreram Transplante Autólogo de Medula Óssea (TAMO); Transplante de Células Progenitoras do Sangue Periférico (TCPSP); indução de terapia para Leucemia Mielóide Aguda (LMA); retardamento de enxerto

ou falência após Transplante de Medula Óssea (TMO); e neutropenia induzida por quimioterapia^[41,42].

2.2. Modulação da Defesa do Hospedeiro Contra Infecções

O aumento da atividade microbicida de monócitos por GM-CSF foi demonstrado in vitro contra *Candida albicans*^[42,44], *A. fumigatus*^[45,46], *Histoplasma capsulatum*^[47,48], *Cryptococcus neoformans*^[49] e *T. cruzi*^[50]. Trabalhos independentes^[51,52] verificaram que o GM-CSF promove também a morte do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC). SUZUKI et al.^[52] utilizaram um modelo murino de infecção disseminada com MAC e observaram concentrações significativamente mais baixas de MAC no fígado e baço de camundongos tratados com sargramostim por 14 dias, em comparação com o camundongo controle.

Outros relatos sugerem que o sargramostim aumenta também o efeito antimicobacteriano de claritromicina, azitromicina, amicacina e ofloxacina^[42]. Em camundongos, o GM-CSF recombinante murino protegeu 62% dos ratos neutropênicos de um inóculo letal de *C. albicans*, reduzindo a lesão pulmonar. Além disso, não houve efeito do GM-CSF murino sobre a contagem de neutrófilos, sugerindo que o mecanismo protetor envolvido levava ao aumento dos mecanismos de defesa.

Assim, está bem estabelecido que as citocinas, particularmente IFN- γ e GM-CSF, podem inibir a replicação intracelular de bactérias ou protozoários que permanecem no meio intracelular para sua proliferação. Organismos como *Mycobacteria*, *Salmonella*, *Listeria*, *Leishmania*, citomegalovírus e HIV utilizam macrófagos no tecido como parte de seu ciclo de vida. Além disso, demonstrou-se recentemente que a exposição ao GMCSF reduz a susceptibilidade de macrófagos à infecção pelo HIV^[53].

Estes estudos in vitro de monócitos ou macrófagos de diferentes fontes teciduais têm confirmado o papel que a estimulação destas células representa na resposta inflamatória a infecções fúngicas^[42].

Os avanços no conhecimento das propriedades do GM-CSF expandiram grandemente os possíveis benefícios da citocina em uma ampla variedade de protocolos, particularmente aqueles nos quais a prevenção da infecção é desejável. A citocina pode ser útil como profilaxia ou tratamento adjunto de infecções bacterianas ou fúngicas em indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes que recebem quimioterapia mielossupressora e pacientes com infecção avançada pelo HIV^[53].

O sargramostim está sendo avaliado também como adjuvante de vacinas contra doenças infecciosas e cânceres e como imunoterapia no tratamento de várias malignidades, incluindo melanoma e neuroblastoma^[42].

3. Mecanismos microbicidas das células fagocitárias

3.1. Metabolismo oxidativo

O dano induzido por metabólitos tóxicos, sobretudo as espécies de oxigênio ativadas é um importante mecanismo de lesão. Esses radicais livres derivados de oxigênio podem ser liberados no meio extracelular por leucócitos após a exposição a agentes quimiotáticos, imunocomplexos, citocinas ou durante o metabolismo oxidativo do fagócito. Este metabolismo é uma importante medida de ativação dos fagócitos durante a fase efetora das respostas imunes, e este processo está altamente relacionado à exposição dessas células a vários microrganismos, com concomitante aumento da atividade microbicida^[54].

O ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila (OH^\cdot) são as principais espécies produzidas dentro da célula, podendo combinar-se com óxido nítrico (NO) para formar outros intermediários reativos de nitrogênio e exercer o seu efeito biológico. Assim, a habilidade que os macrófagos ativados possuem de destruir *Leishmania*^[55], *Mycobacterium*^[56] e *Candida*^[57] correlaciona-se com sua capacidade de produzir H_2O_2 .

A expressão de baixos níveis desses potentes mediadores pode aumentar a expressão de citocinas e moléculas de aderência endotelial, amplificando a cascata que suscita a resposta inflamatória. Em níveis mais altos, a liberação desses

mediadores pode ser lesiva para o hospedeiro. Os efeitos dos metabólitos de oxigênio são abrangentes, sendo os seguintes particularmente relevantes para a lesão celular, pois contribuem para a desestruturação de macromoléculas biológicas: peroxidação lipídica de membranas, modificação oxidativa de proteínas e lesão do DNA^[58].

O número de oxidantes que têm sido detectados após a secreção de O_2^- continua a crescer. O espectro destas espécies de oxidantes gerados durante a estimulação do fagócito é altamente variável. A natureza do leucócito, seus produtos de exocitose, a célula-alvo e o meio extracelular têm a capacidade de modular o tipo e a magnitude dos oxidantes envolvidos. Provavelmente, a importância relativa para o processo patológico destas várias espécies, resultantes dos metabólitos reativos derivados dos fagócitos, é dependente das condições fisiológicas e ou patológicas, associadas ao equilíbrio entre a síntese e inativação dessas substâncias^[54,59].

As células criaram vários mecanismos para remover os radicais livres, e desse modo, minorar a lesão. Essas moléculas são naturalmente instáveis e costumam se decompor espontaneamente. O superóxido, por exemplo, é instável sofre dismutação em oxigênio e H_2O_2 na presença de água. Contudo, há vários sistemas enzimáticos e não enzimáticos que contribuem para a inativação dos radicais livres^[54,60,61].

Os vários trabalhos, com o objetivo de verificar a participação desses metabólitos na atividade microbicida de fagócitos ativados têm-se utilizado dos chamados “scavengers” (antioxidantes) dessas substâncias, tais como superóxido-dismutase (SOD), para o ânion superóxido; catalase (CAT), para H_2O_2 ; dimetilsulfóxido (DMSO), para radical hidroxila; e um inibidor da mieloperoxidase, como a azida (AZI), para o oxigênio singlete^[31].

No entanto, os macrófagos podem destruir microrganismos por mecanismos não oxidativos tais como acidificação dos fagossomas, lisozima, proteínas catiônicas e componentes do sistema complemento^[60,61]; ou ainda, remoção de ferro por proteínas quelantes e digestão dos microrganismos por hidrolases lisossomais^[62].

3.2. NO (Óxido Nítrico): Síntese, Liberação e Efeitos Biológicos

Um outro importante mecanismo que os macrófagos ativados por citocinas utilizam na fase efetora das respostas imunes é a liberação de óxido nítrico (NO) derivado do aminoácido L-arginina^[63-65]. A síntese ocorre a partir da oxidação do aminoácido semi-essencial L-arginina, por ação da enzima NO-sintase (NOS), tendo como composto intermediário a N^G-hidróxi-L-arginina e liberando, além de NO, a L-citrulina^[59,63,64]. Oxigênio molecular (O²), NADPH, FAD, FMN e tetraidrobiopterina (H₄biopterina) são requeridos como co-fatores para a síntese de NO. A L-citrulina é reutilizada para a síntese de L-arginina, contribuindo para manter a concentração ideal deste aminoácido no interior da célula^[63,65].

A quantidade de NO produzida varia com o estímulo, a fonte celular e a espécie. Até o momento, já foram reconhecidas e individualizadas duas isoformas e três subtipos de NOS, diferindo com relação à distribuição, peso molecular e produção por diferentes genes^[59,63]:

a. constitutiva ou constitucional (*cNOS*), dependente de Ca²⁺, é encontrada basicamente nas células endoteliais (denominada de *ecNOS* ou *tipo I*); e nos neurônios (denominada de *ncNOS* ou *tipo III*). As *cNOS*, que ocorrem também nas células epiteliais, plaquetas e neutrófilos, produzem NO em pequenas quantidades, em ritmo fisiológico. O estímulo para o início de ação destas enzimas ocorre através de mediadores como bradicinina, histamina, PAF, acetilcolina e vários leucotrienos.

O NO liberado nessas situações pode atuar como neurotransmissor, regulando desde o relaxamento de esfíncteres no sistema gastrointestinal até a transmissão de estímulos no sistema nervoso central, em áreas como a memória ou o olfato. Quantidades similares, porém, se liberadas pelas células endoteliais, regulam o relaxamento da musculatura lisa adjacente, explicando a vasodilatação.

b. indutiva (*iNOS* ou *tipo II*), independente de Ca²⁺, expressa-se sob a ação de citocinas, endotoxinas, interleucinas e outros mediadores inflamatórios, manifestando-se, principalmente, em neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas dos vasos mediante a produção de grandes

quantidades de NO. As quantidades maiores produzidas em consequência a uma cadeia de estímulo, envolvendo o sistema enzimático iNOS, podem ocasionar ou ampliar processos inflamatórios em vários órgãos^[59].

O NO assim produzido pode ter ação autócrina, ou então, difundir-se para as células-alvo, onde ativa o sistema da guanilciclase, com o aumento da produção de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina), através do qual ocasiona seu efeito biológico. Existem evidências de que outros mecanismos independentes do cGMP possam estar envolvidos, como a inibição da síntese de DNA, da respiração mitocondrial e do transporte ativo na membrana de fungos, bactérias e bacteriófagos^[59,63].

Situações de morte celular e dano tecidual, de forma semelhante, também podem ser verificadas quando níveis elevados desse gás inativam várias enzimas que contêm complexos ferro-enxofre (Fe-S), presentes nos microrganismos, levando à falha metabólica e, em consequência, à morte celular^[59,65,66].

O macrófago é o produtor mais proeminente de NO no meio inflamatório. Alguns estímulos inflamatórios que induzem a expressão de iNOS, também induzem a produção de arginase, que depleta arginina. A regulação da iNOS ocorre principalmente por transcrição gênica, que pode ser ativada por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α e IFN- γ , e endotoxina (LPS); enquanto os glicocorticóides e as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e TGF- β são inibitórias. Na maioria dos sistemas, porém, combinações de citocinas são geralmente indutoras mais potentes de NO do que citocinas utilizadas isoladamente^[59,63,67-69].

Animais infectados experimentalmente e tratados com inibidores do sistema NOS/NO apresentam inflamação mais severa que os do grupo controle^[59]. Neste contexto, uma série de relatos sugere fortemente que a destruição de *L. major*^[70-74], e *L. donovani* em macrófagos peritoneais murinos ativados por citocinas e macrófagos derivados de medula óssea não é mediada pelos produtos do metabolismo oxidativo, mas pelo NO ou óxidos de nitrogênio inorgânicos derivados da L-arginina^[75].

Embora em macrófagos murinos o NO seja uma importante molécula de defesa citotóxica, permanecem controvérsias sobre a sua importância na atividade

microbicida de fagócitos humanos^[58,63,76]. Assim, macrófagos alveolares, peritoneais ou derivados de monócitos do sangue periférico humano não possuem capacidade de secretar quantidades substanciais de NO, mesmo após ativação com LPS e IFN- γ ^[77-80] et al., 1990).

Por outro lado, DENIS^[51] demonstrou que o processo de incubação de macrófagos humanos com TNF- α e GM-CSF permite que essas células inibam o crescimento de cepas virulentas e avirulentas de *M. avium*, através de mecanismo dependente da geração de NO. Resultados semelhantes foram obtidos quando macrófagos humanos foram ativados com IFN- γ e TNF- α e desafiados com^[81] *T. cruzi*. Em trabalho de revisão, MaCMICKING et al.^[63] relataram que monócitos e macrófagos humanos podem expressar NOS2 funcional em nível de síntese protéica.

Os trabalhos citados mostram a importância do metabolismo do oxigênio e do nitrogênio como mecanismos de destruição de microrganismos por fagócitos ativados. No entanto, patógenos intracelulares têm desenvolvido várias estratégias para evadirem-se dessas importantes funções efetoras das células fagocitárias. A maioria dos trabalhos refere-se à evasão do metabolismo oxidativo, processo que ocorre com microrganismos como o *H. capsulatum*^[82-84].

Em relação ao NO, NASLUND et al.^[85] detectaram que células de macrófagos murinos não induzem a enzima NOS quando desafiados com cepa virulenta de *C. neoformans*. PROUDFOOT et al.^[86], mostraram que macrófagos expostos a glicoinositol-fosfolípídeos (GIPL) de *L. major* produziram pequenas quantidades de NO, e a atividade leishmanicida apresentou-se bastante reduzida, quando ativados subsequentemente com quantidades adequadas de IFN- γ e LPS.

Assim, para os fagócitos, a natureza dos estímulos inflamatórios pode influenciar qual ou quais de uma ampla variedade de diferentes oxidantes potencialmente formados são, de fato, importantes para os mecanismos microbicidas.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco M. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1987, 25:5-18.
2. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Bailliere's Clin Trop Med Commun Dis* 1989, 4:185-220.
3. Borelli D. Prevalence of systemic mycosis in Latin America. In: International Symposium on Mycosis. Proceedings of the International Symposium on Mycosis; 1970; Washington: Paho, Scientific Publication, 1970. p. 28-38.
4. Carbonell LM. Ultrastructure of dimorphic transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* 1969; 100:1076-8.
5. San-Blas F, San-Blas G. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: SZANISLO, PJ. Fungal Dimorphism. New York: Plenum, 1985: 93-120.
6. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993; 5:115-49.
7. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 233-58
8. Lacaz CS. South American Blastomycosis. *Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo*, 107-20, 1956.
9. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides*

- brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1984; 46:346-53.
10. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens to conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 1988; 56:711-3.
 11. Loose, DS, Stover, EP, Restrepo, A, Stevens, DA, Feldman, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *P. brasiliensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 7659-63.
 12. Stover EP, Schar G, Clemons KV, Stevens DA, Feldman D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun* 1986; 51:1999-2203.
 13. Calich, VLG, Russo, M, Vaz, CAC, Burger, E, Singer-Vermes, LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Ciênc Cult (São Paulo)* 1994; 46, p. 455-61.
 14. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. 1994; Boca Raton: CRC Press, 1994: 175-186.
 15. Peraçoli MTS, Parise-Fortes, MR, Silva, MFP, Montenegro, MR. Natural Killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995; 37:129-36.
 16. Arango M & Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathology*, 1982; 79: 115-24.

17. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Inf Dis* 1997; 175:1263-7
18. Biagioni L, Souza, MJ, Chamma, LG, Mendes, RP, Marques, AS, Mota, NGS et al. Serology of Paracoccidioidomycosis II. Correlation Between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med* 1984 78: 617-621.
19. Mendes RP, Scheinberg MA, Rezkallah-Iwasso MT, Marcondes-Machado J, Milano SIM, Pereira PCM, Meira DA, Barravieira B, Curi PR. Evaluation of IgE in sera of patients with paracoccidioidomycosis. In: Resúmenes del IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis, Caracas, p. 124, 1989.
20. Yarzabal LA, Dessaint JP, Arango M, Albornoz MCB, Campins H. Demonstration and quantification of IgE antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in paracoccidioidomycosis. *Intern Arch Alerg* 1980; 62; 346-51.
21. Chequer-Bou-Habib D, Oliveira-Neto MP, Da Cruz MFF, Galvão-Castro B. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in paracoccidioidomycosis. *Braz J Med Biol Res* 1989 22:205-12.
22. Mok PWY & Greer DI. Cell-mediated immune response in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol*, 1977, 28:89-98
23. Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes, J et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans Soc Trop Med Hyg*, 1985, 79:765-72.

24. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol* 1976; 24:365-378.
25. Peraçoli MTS, Soares AMVC, Mendes RP, Marques S. A. Guastale, H. A., Meira, D. A., Rezkallah-Iwasso, M. T. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. Early and late evaluation after treatment. *Rev Ib Micol* 1988; 5:69
26. Restrepo A, Restrepo M, Restrepo F, Aristizabal LH, Moncada L, Velez H. Immune Responses In Paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouradia* 1978; 16:151-63.
27. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol* 1988a; 140: 2786-9
28. Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol*, 1992; 30:161-8.
29. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun* 1989; 57:2289-94.
30. Brummer E, Hanson LH, Stevens, DA. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int J Immunopharmacol* 1988b;10:945-52.

31. Moscardi-Bacchi M; Brummer E; Stevens DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: Inhibition by activated phagocytes. J Med Microbiol 1994; 40:159-64
32. Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Machado JM, Fecchio D, Marques SA, Soares AMVC. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect 2002 (submitted).
33. Carmo, JPM, Peraçoli, MTS, Calvi, SA, Dias, LA, Tavian, EG, Soares, AMVC. Killing of high-virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes: the role of oxygen intermediates. Ann Rev Biom Sci 2002; Special Issue:93.
34. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . Eur J Immunol 1992a; 22: 2501-6.
35. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Sher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitric oxide production by IFN- γ -activated macrophages. J Immunol 1992b; 148: 1792-6
36. Silva WB. Efeito da Interleucina 10 e do Fator Transformador do Crescimento-beta sobre a atividade fungicida de monócitos humanos contra o *Paracoccidioides brasiliensis*. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2002.
37. 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

38. Soares AMVC, Calvi AS, Peraçoli MTS, Fernandez AC, Dias LA, Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunol* 2001; 102:480-5.
39. Nemunaitis, J: Granulocyte-macrophage Colony-stimulating factor: A review from preclinical development to clinical application. *Transf* 1993; 33:70-83.
40. Sullivan, GW, Carper, HT, Mandel GL. The effect of three human recombinant hematopoietic growth factors (GM-CSF, G-CSF, and IL-3) on Phagocyte Oxidative Activity. *Blood* 1993; 81:1863-1870.
41. ARMITAGE JO, Emerging applications of Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood* 1998; 92:4491-4508
42. JONES, TC. Use of Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) in Prevention and Treatment of Fungal Infections. *Eur J Canc* 1999; 5:S8-S10
43. Gasson, JC. The molecular physiology of GM-CSF. *Blood* 1990; 77:1131-45
44. Smith PD, Lamerson LI, Banks SM, Saini SS, Wahl LM, Calderone RA, Wahl SM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments human monocyte fungicidal activity for *Candida albicans*. *J Inf Dis* 1990; 161:999-1005.
45. Rolides E, Sein T, Holmes A, Blake C, Pizzo PA, Walsh TJ. Effects of macrophage colony-stimulating factor on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *J Inf Dis* 1995; 172:1028-134.
46. Rolides E, Blake C, Holmes A, Pizzo PA, Walsh TJ: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- γ prevent dexamethasone-induced

immunosuppression of antifungal monocyte activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae. J Med Vet Mycol 1996; 34:63

47. Newman SL & Gootee L. Colony-stimulating factors activate human macrophages to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum* yeasts. Infect Immun 1992; 60:4593-600
48. Deepe Jr., Gibbons R, Woodward E. Neutralization of endogenous Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*. J Immun 1999 163: 4985-4993.
49. Collins HI & Bancroft GJ. Cytokine enhancement of complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of tumor necrosis factor- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. Eur J Immunol 1992; 22:1447-53.
50. Reed SG; Nathan CF, Pihl DI, Rodricks P, Shanebeck K, Conlon PJ et al. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. J Exp Med 1987; 166:1734-42.
51. Denis M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill virulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. J Leuk Biol Res 1991 22:205-12.
52. Suzuki K, Lee WJ, Hashimoto T, Tanaka E, Murayama T, Amitani R et al. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF or tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) activate human alveolar macrophages to inhibit growth of *Mycobacterium avium* complex. Clin Exp Immunol 1994; 98:169-73

53. Tascini C, Vecchiarelli A, Preziosi R, Francisci D, Bistoni F, Baldelli F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and fluconazole enhance anti-cryptococcal activity of monocytes from AIDS patients and normal subjects. *AIDS*, 13:49-55.
54. Rosen MG, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 1995; 9:200-9.
55. 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; 66:2-4.
56. Holzer TJ, Nelson KE, Schauf V, Criespen RG, Anderson BR. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. *Infect Immun* 1986; 51:514-20.
57. 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.
58. James SL, Nacy C. Effector functions of macrophages and parasites. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:155-18, 1993.
59. Lyons, CR. Emerging roles of nitric oxide in inflammation. *Hosp Pract* 1996; 31: 69-86.
60. Moonis M, Ahmad I, Bochhowot BW. Macrophages in host defence. - An overview. *Ind J Biochem Biophys* 1992; 29:115-22.
61. 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 1:179-87.

62. Rothermel CD, Rubin BY, Murray HW. Oxygen-dependent inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* growth by human monocytes and interferon- γ activated macrophages. J Immunol 1986; 137: 689-92.
63. MacKmicking, J, XIE Q, NATHAN C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol 1997 ; 15:323-50.
64. Granger DL, Lehninger AL. Site of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. J Cell Biol 1982; 95:527-32.
65. Drapier JC, Hibbs JR. Murine cytotoxic activation macrophages inhibit aconitase in tumor cells. Inhibition involves the iron-sulfur prosthetic group and is reversible. J Clin Invest 1986; 78:790-5.
66. Rosen H, Klebanoff SJ. Oxidation of microbial iron-sulfur centers by the myeloperoxidase - H₂O₂ - halide antimicrobial system. Infect Immun 1985; 47:613-18.
67. De Vera ME, Shapiror A, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris Jr SM, et al. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:1054-9
68. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993; 329:2002-12.
69. Ding AC, Nohan F, Stwehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison

of activating cytokines and evidence for independent production. J Immunol 1988; 141:2407-11.

70. Green SJ, Meltzer MS, Hibbs Jr JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by a L-arginine-dependent mechanism. J Immunol 1990(a); 144:278.
71. Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer M, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of TNF- α . J Immunol , 1990(b); 145:4290-7.
72. Liew FY, Yun L, Millot S. TNF- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide synthase. J Immunol 1990(a); 145:4306.
73. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RMJ, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. J Immunol 1990(b); 144:4793.
74. Maüel J, Ransijn A, Buchmüller-Rouiller Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. J Leuk Biol 1991; 49:73-82
75. Green SJ, Nacy CA, Meltzer MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. J Leuk Biol 1991; 50:93-103.
76. Albina, JE. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? J Leuk Biol, 58:643-9

77. 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; 142:1313-9.
78. Hibbs JBJ, Westenfelder C, Taintor R. Evidence for cytokine -inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992; 89:867-77.
79. Murray HW, Teitelbaum RF. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 1992 165:513-7.
80. James SL, Cook KW, Lazdin JK. Activation of human monocyte-derived macrophages to kill schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro. *J Immunol* 145:286-90, 1990.
81. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 1992; 33:35-40.
82. Wolf JE, Kerchberger V, Kobayashi GS, Little JR. Modulation of the macrophage oxidative burst by *Histoplasma capsulatum*. *J Immun* 1987; 138:582-6.
83. Wolf JE, Abegg AL, Travis SJ, Kobayashi GS, Little JR. Effects of *Histoplasma capsulatum* on murine macrophages functions: inhibition of macrophage priming, oxidative burst and antifungal activities. *Infect Immun* 1989; 57:513-9.
84. Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* fails to trigger the release of superoxide from macrophages. *Infect Immun* 1987; 55:29-34.

85. Naslund PK, Miller CW, Granger DL. *Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. *Infect Immun* 1995; 63:1298-1304.

86. Proudfoot L, O'donnell CA, Liew FY. Glyco-inositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 1995 25:745-750.

CAPÍTULO II
ARTIGO

GM-CSF ativa monócitos e macrófagos derivados de monócitos humanos para aquisição de atividade fungicida in vitro contra o *Paracoccidioides brasiliensis*, por um mecanismo dependente de intermediários reativos de oxigênio

1. RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) sobre a atividade fungicida de monócitos/macrófagos humanos in vitro contra o *Paracoccidioides brasiliensis*. Monócitos do sangue periférico (MO) e macrófagos derivados de monócitos humanos (MØ) foram ativados com diferentes concentrações de GM-CSF e, após 18 horas de incubação, foram desafiados com uma cepa de alta virulência do *P. brasiliensis* (Pb18). Em seguida, as células foram avaliadas quanto à atividade fungicida, pela técnica de plaqueamento e após 7-10 dias, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). O GM-CSF ativou MO e MØ para atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* em uma maneira concentração-dependente, principalmente na concentração de 125 U/mL. Uma vez detectado esse papel, MO e MØ ativados com GM-CSF foram desafiados novamente com o Pb18, desta vez na presença de inibidores de H₂O₂ (CAT) e de NO (L-NMMA) e, em seguida, submetidos à dosagem dos níveis de H₂O₂ e NO, para avaliação dos mecanismos efetores envolvidos. Os resultados permitem afirmar que houve uma associação entre a atividade fungicida apresentada e os níveis de H₂O₂ liberados. Além disso, o efeito sobre a atividade fungicida foi inibido pela CAT, confirmando o papel da H₂O₂ nesse processo. Em contrapartida, L-NMMA não apresentou o mesmo efeito, sugerindo que o NO não está envolvido. Com base nesses dados, o papel do GM-CSF sobre as células fagocitárias humanas nos mecanismos de defesa contra o *P. brasiliensis* é discutido.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, H₂O₂, fagócitos humanos, GM-CSF, atividade fungicida

2. INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é a principal micose sistêmica na América latina. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis* é um microorganismo que sofre dimorfismo térmico, desenvolvendo-se como levedura à temperatura corporal, e micélio à temperatura ambiente^[1,2]. Assim, este fungo causa infecções pela inalação de conídios ou elementos micelianos. Estes conídios são convertidos na forma de levedura parasitária nos pulmões^[3].

A doença se manifesta sob múltiplas formas, variando de benigna e localizada para as formas graves e disseminadas, dependendo de uma resposta imune celular preservada ou não^[4]. Entre os mecanismos de controle que foram relatados para esta infecção, os monócitos e macrófagos parecem exercer um papel fundamental, atuando como a primeira linha de defesa do organismo^[3].

Entretanto, a função das células fagocitárias depende do seu estado de ativação^[5]. Conídios ou leveduras de *P. brasiliensis* ingeridos multiplicam-se facilmente no interior de macrófagos alveolares murinos ou peritoneais, porém, quando essas células são ativadas por citocinas, como o IFN- γ , a multiplicação é limitada e os conídios ou as células leveduriformes podem ser destruídos^[2,3,6-8].

Em relação às células murinas, os resultados mostraram que a ativação com IFN- γ promove a eliminação do fungo através da via L-arginina/óxido nítrico (NO)^[9]. No entanto, trabalhos em nosso laboratório demonstraram que a ativação com IFN- γ não é suficiente para a atividade fungicida de células humanas contra a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18)^[10].

Este processo é efetivo após a pre-ativação dos fagócitos com TNF- α ou IFN- γ +TNF- α . Além disso, estes estudos forneceram fortes evidências para a participação da H₂O₂ no mecanismo efetor, uma vez que a catalase, um “scavenger” de H₂O₂, inibiu a morte intracelular por monócitos ativados com TNF- α ou TNF- α +IFN- γ ^[11].

Entretanto, o papel de outras citocinas, além de IFN- γ e TNF- α , na evolução da interação monócito/macrófago-*P. brasiliensis* ainda não está completamente esclarecido.

Há amplas evidências de que o GM-CSF não somente promove a proliferação e diferenciação de células precursoras hematopoiéticas, mas também induz vários aspectos da ativação das células fagocitárias^[12-16], como o aumento do metabolismo oxidativo^[15], através do qual passam a secretar espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 , O_2^- and OH^-) que são citotóxicas para microrganismos e células tumorais.

Os efeitos de GM-CSF sobre as funções de monócitos/macrófagos contra patógenos microbianos foram estudados em testes clínicos em humanos, e experimentos in vitro e in vivo^[12,13,16]. O aumento da atividade microbicida de monócitos por GM-CSF foi demonstrado in vitro contra *C. albicans*^[17], *A. fumigatus*^[18,19], *H. capsulatum*^[20,21], *C. neoformans*^[22], *T. cruzi*^[23], *M. avium*^[24], *M. lepraemurium*^[26] e MAC^[25].

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar: 1. o papel de GM-CSF sobre a atividade fungicida de monócitos/macrófagos humanos contra a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18); 2. o papel dos intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio na possível destruição de Pb18 por monócitos/macrófagos ativados por GM-CSF.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Meios.

GM-CSF recombinante humano (GM-CSF) foi fornecido por R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA. Meio de cultura de células RPMI 1640; Histopaque (d=1.077); Catalase (CAT), um “scavenger” da produção de H₂O₂; e Monomethyl-L-arginine (L-NMMA), um inibidor competitivo da sintase de óxido nítrico (NO-sintase ou simplesmente, NOS – enzima responsável pela síntese de NO); Phorbol-Myristate-Acethate (PMA); Sulfanilamida; e Naphytil-Ethylene-Diamine-Dihydrochloride (NEED) foram fornecidos por Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA.

O meio de cultura de células completo (MCCC) constitui-se de meio de cultura de tecidos RPMI 1640 contendo 10% (vol/vol) soro AB humano inativado, 20 mM HEPES, 2 mM de L-glutamina (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA) e 40 µg/ml de gentamicina. Para plaqueamento das culturas, foi utilizado meio em ágar - BHI (Brain-Heart Infusion) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), contendo 0,5% de gentamicina (Neoquímica, Anápolis, GO, Brazil), 4% de soro normal de cavalo, e 5% de filtrado de cultura de cepa 192 de *P. brasiliensis* (v/v), fonte do fator de crescimento^[27]. Placas de fundo chato de 96 wells foram fornecidas por Nunc, Life Tech. Inc., Maryland, MA, EUA. Peroxidase de raiz forte de cavalo (tipo II) foi obtida de Sigma Chemical, San Diego, CA, EUA.

3.2. Casuística

Foram utilizadas amostras de sangue periférico de doadores normais do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP - Campus de Botucatu, para o desafio com Pb18. Este procedimento incluiu o consentimento formal e esclarecido destes indivíduos, exigido quando da aprovação do projeto pela Comissão de Ética e Pesquisa desta Instituição.

3.3. Isolamento e Cultura de Monócitos e Macrófagos

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (BOYUM et al., 1968). O anel rico em linfócitos e monócitos foi lavado inicialmente com solução gelada de EDTA-PBS, por 5 minutos a 200g e, logo após, com meio de cultura RPMI por mais 5 minutos a 200g.

Após este período, a suspensão celular foi ressuspensa em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y.) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co. USA), 40 µg/ml de gentamicina e 10% de soro AB humano inativado (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC), sendo a identificação e viabilidade dos monócitos realizadas através da incorporação pelo vermelho neutro (alíquotas de 50 µl da suspensão celular foram incubadas a 37°C durante 10 minutos com 0,45 ml da solução do corante a 0,02%).

A seguir, a suspensão celular foi ajustada para 2×10^6 monócitos/mL e distribuída 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. Em seguida, as células foram novamente incubadas na presença ou não de estímulos (GM-CSF, Pb18, L-NMMA ou CAT, conforme o protocolo experimental).

Para a transformação em macrófagos, antes da incubação com os devidos estímulos, os monócitos foram mantidos durante 7 dias na presença de MCCC ou MCCC + GM-CSF 250 U/mL, tendo-se o cuidado de trocar o meio a cada 48h. A troca do meio é importante para garantir a manutenção da viabilidade das células.

3.4. Cultivo do *P. brasiliensis*

Foi utilizada a cepa 18 de *P. brasiliensis* (Pb18) mantida em nosso laboratório através de cultivo em meio proposto por FAVA NETTO et al. (1969) a 37°C, em tubos de 20 x 20 mm. As culturas foram usadas após 5 ou 6 dias de cultivo.

3.5. Teste de Viabilidade do *P. brasiliensis*

As células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas de acordo com o item 3.4. Após o crescimento, as células leveduriformes foram removidas da superfície de cultivo através da adição de aproximadamente 10 ml de meio RPMI, transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4mm de diâmetro e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37° C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não defeitos durante a agitação.

Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, sendo utilizada uma alíquota para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que se apresentaram com aspecto brilhante, uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. A suspensão utilizada nos ensaios foi de 4×10^4 fungos viáveis/mL (4×10^3 fungos/orifício), estabelecendo uma relação fungo/monócito de 1:50.

3.6. Avaliação da Atividade Fungicida

As culturas de monócitos e macrófagos, obtidas de acordo com o item 3.3, respectivamente, e submetidas à pré-ativação com citocinas foram desafiadas com 0,1 mL de suspensão de *P. brasiliensis*, contendo 4×10^4 fungos/ml. Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas as suspensões do fungo, em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com as monocamadas de monócitos/macrófagos sendo consideradas como culturas controles. Outros orifícios receberam, além da suspensão de fungo, volume igual de “scavenger” de H₂O₂ (0,1 mL CAT 20000 U/mL) ou inibidor competitivo da NOS (0,1 mL L-NMMA 450 U/mL).

Após um período de 4h, os sobrenadantes das culturas foram coletados, e as monocamadas de monócitos/macrófagos submetidas a diversas lavagens com água destilada. Este processo permite que os monócitos/macrófagos sejam removidos da lamínula, lisados, 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 (culturas controles).

Ao final do processo, o material obtido, a partir das lavagens com água destilada, das culturas controles e das experimentais resultaram em um volume de aproximadamente 2ml. Esse material, contendo fungos viáveis ou não, foi centrifugado e ressuspenso em volume de água destilada que permitiu o crescimento de, no máximo, 200 colônias de fungos por placa, tornando a leitura das mesmas mais sensíveis.

Em seguida, 0,1 ml das suspensões em água destilada foi semeado em três placas contendo meio de cultura BHI, mais 4% de soro de cavalo e 5% de fator de crescimento, preparado a partir de filtrado de cultura de células leveduriformes do fungo (cepa 192), cultivadas em meio de Casals 37°C e com agitação (120 rpm) durante 7 dias. A recuperação dos fungos viáveis foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após 7-10 dias de semeadura e a porcentagem de atividade fungicida calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de atividade fungicida} = 1 - \frac{\text{média das UFC das culturas experimentais}}{\text{média das UFC das culturas controles}} \times 100$$

3.7. Avaliação da produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI):

A produção de ROI pode ser medida indiretamente avaliando-se a liberação de H₂O₂, que foi determinada segundo o método descrito por PICK & KEISARI (1980) e adaptado por PICK e MISEL (1981).

Os monócitos ou macrófagos derivados de monócitos, obtidos conforme descrição no item anterior, foram distribuídos em placas de 96 orifícios, e incubados, em duplicata, por 24 horas a 37°C em tensão de 5% de CO₂ na presença ou ausência de 100 µL de GM-CSF recombinante humano em diferentes

concentrações (1; 10; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 U/mL). Após este período, os sobrenadantes das culturas foram utilizados para dosagem de óxido nítrico (NO) e as células aderentes foram ressuspensas ao volume original (0,1 mL) em solução de vermelho de fenol contendo: 140 mM NaCl; 10nM de tampão fosfato, pH 7; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho fenol; 0,01mg/mL de peroxidase de raiz forte tipo II e, na presença ou ausência de 1mg de PMA, e foram incubadas por uma hora a 37°C em câmara úmida e escura.

Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 0,01 mL de NaOH 1N. A absorbância foi determinada em microleitor automático de ELISA, com filtro de 620 nm, contra um branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 1N. Os resultados são expressos em nanomols (nM) de $H_2O_2/2 \times 10^6$ células, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 variando de 8,0 a 0,5 nM.

3.8. Avaliação da produção de intermediários reativos do nitrogênio (RNI):

Da mesma forma que para a avaliação de ROI, a liberação de RNI foi determinada indiretamente, através da formação de NO_2^- pela decomposição de NO (óxido nítrico) no meio. Com o sobrenadante das culturas de monócitos/macrófagos, foi feita dosagem da produção de NO_2^- pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess (GREEN, 1981).

Aos sobrenadantes, foram adicionados 100 μ L do reagente de Griess, que contém NEED 0,1% diluído em água destilada, e sulfanilamida 1% diluída em H_3PO_4 5%, os quais foram misturados em volumes iguais no momento da reação. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

As amostras foram lidas em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm contra um branco constituído por reagente de Griess. Os resultados são expressos em μ mols de NO_2^- por 2×10^5 células, comparando-se a D. O. (densidade óptica) com uma curva padrão de concentrações conhecidas de NO_2^- .

3.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad InStat (San Diego, California - USA). Diferenças significativas entre os diversos grupos foram determinadas pela Análise de Variância para medidas repetidas (Repeated Measures ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer, com a significância sendo definida como $P < 0,05$. Os resultados são expressos em Média (M) \pm Erro Padrão (EP).

4. RESULTADOS

Papel de GM-CSF sobre a atividade fungicida de monócitos humanos (MO) in vitro contra Pb18

A Fig. 1 mostra a porcentagem de atividade fungicida (%) de monócitos recém-isolados do sangue periférico de doadores normais, incubados somente com MCCC (MO) ou na presença de GM-CSF (G) em diferentes concentrações (1; 10; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 U/mL). A pré-incubação de monócitos com GM-CSF durante 18h induziu um aumento concentração-dependente na atividade fungicida contra a cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb18). Foram detectadas diferenças significativas em todas as concentrações de GM-CSF utilizadas, em relação a MO, e a atividade máxima ocorreu com as concentrações de 125 (33,9%) e 250 U/mL (32,9%).

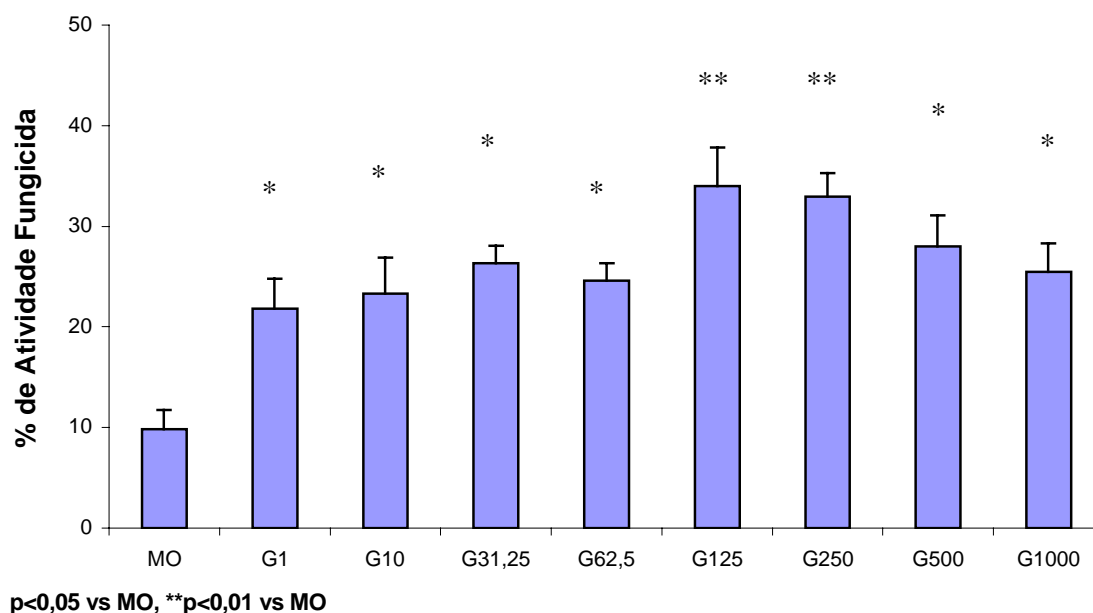


FIG. 1. Monócitos (2×10^5 /mL) foram pré-incubados na ausência (MO) ou presença de GM-CSF (G) em diferentes concentrações (1; 10; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 U/mL) por 18h e desafiados com *P. brasiliensis* por 4h para avaliação da atividade fungicida in vitro. Os resultados são expressos pela Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 11 indivíduos

Papel de CAT e L-NMMA sobre a atividade fungicida de MO ativados com GM-CSF

Para detectar os mecanismos efetores envolvidos na destruição de Pb18 por MO ativados com GM-CSF, foram realizadas coculturas dessas células com Pb18 e tratadas concomitantemente com CAT ou L-NMMA. Os resultados mostraram que CAT inibiu a atividade fungicida apresentada por monócitos ativados, indicando o papel da H_2O_2 neste processo. Por outro lado, L-NMMA não mostrou um efeito significativo (Fig. 2).

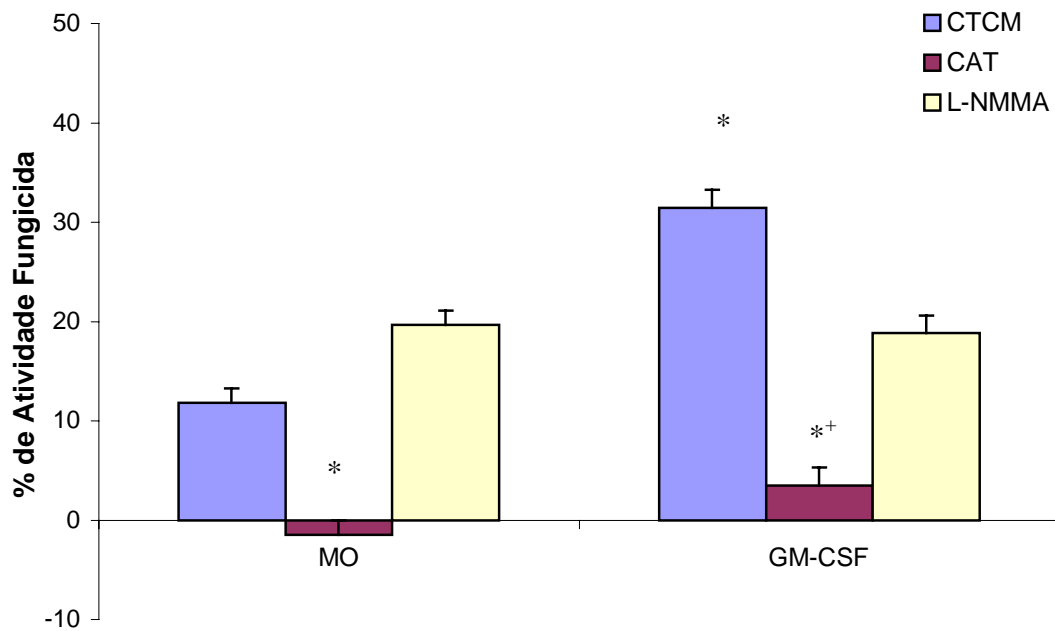
Como mostrado na Tab. 1, os níveis de H_2O_2 diminuíram significativamente após o desafio dos monócitos não ativados com Pb18 (MO+Pb = 0.81 ± 0.24 nM), em comparação com os monócitos não ativados e não desafiados com o fungo (MO = 1.97 ± 0.53 nM). Porém quando essas células foram pré-ativadas com GM-CSF (MO+GM-CSF = 3.13 ± 0.63 nM), foi detectado um aumento significativo nos níveis de H_2O_2 , em relação a MO ou MO+Pb.

Além disso, em monócitos pré-ativados com GM-CSF e desafiados com Pb18 (MO+GM-CSF+Pb = 2.88 ± 0.52 nM), os níveis de H_2O_2 foram semelhantes aos detectados nas culturas de MO+GM-CSF. Estes dados mostram que, de maneira diferente dos monócitos incubados somente com Pb18 (MO+Pb), o desafio com Pb18 de células pré-ativadas com GM-CSF (MO+GM-CSF+Pb) não resultou em redução dos níveis de H_2O_2 . Além disso, todas as culturas tratadas com CAT (MO+CAT, MO+GM-CSF+CAT, MO+Pb+CAT) apresentaram redução nos níveis de H_2O_2 , comparados aos níveis detectados na ausência deste “scavenger”.

Em relação aos níveis de NO_2^- , de maneira semelhante ao ocorrido com a liberação de H_2O_2 , foi detectada uma inibição significativa na liberação deste metabólito, nos sobrenadantes das culturas de MO+Pb (= 1.46 ± 0.49 μ M), comparadas com MO (= 2.38 ± 0.75). Entretanto, ao contrário do detectado para H_2O_2 , o GM-CSF (2.54 ± 0.69 μ M) não estimulou as células para liberação aumentada de NO_2^- , o que sugere a não correlação dos níveis deste metabólito

com atividade fungicida. A ausência do efeito de L-NMMA sobre essa atividade reforça estes resultados.

Assim, conclui-se, dos resultados apresentados nos gráficos 1 e 2 e na tabela 1, que a atividade fungicida apresentada por monócitos ativados é mediada por H₂O₂. O NO parece não estar envolvido.



*p<0,05 vs MO, +p<0,05 vs MO+GM-CSF

FIG. 2. Monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) ativados com GM-CSF (125U/mL) durante 18h foram incubados na presença de CAT (20000U/mL) ou L-NMMA (450U/mL), desafiados concomitantemente com Pb18 por 4h, e avaliados para atividade fungicida in vitro. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 11 indivíduos

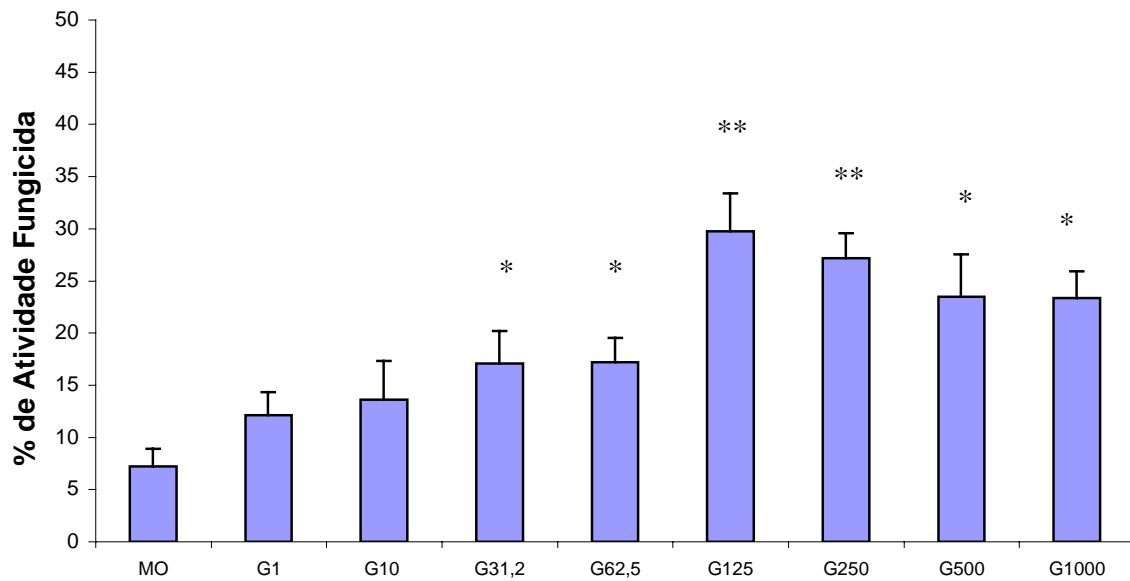
Tab. 1. Produção de H₂O₂ e NO₂⁻ em coculturas de monócitos pré-ativados com GM-CSF (125U/mL) por 18h, e posteriormente desafiados com Pb18 por 4h, na ausência ou presença de (CAT) ou NO (L-NMMA). Os resultados expressam M±EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos

Tratamento dos Monócitos	Síntese de H ₂ O ₂ (nmoles/2x10 ⁵ células)	Síntese de NO ₂ ⁻ (µmoles/2x10 ⁵ células)
MO	1.97±0.43	2.38±0.75
MO+ CAT/L-NMMA*	0.55±0.12♦	1.64±0.45+♦
MO+ Pb	0.81±0.24+	1.46±0.49+
MO + Pb + CAT/L-NMMA	0.34±0.08♦	1.19±0.31+♦
MO + GM-CSF	3.13±0.63+•	2.54±0.69
MO + GM-CSF + CAT/L-NMMA	0.92±0.46♦	1.84±0.51+♦
MO + GM-CSF + Pb	2.88±0.52+•	1.39±0.52+
MO + GM-CSF + Pb + CAT/L-NMMA	1.12±0.44♦	1.16±0.39+♦

+ = p<0,05 vs MO; • = p<0,05 vs MO+Pb, ♦ = p<0,05 vs coculturas sem CAT ou L-NMMA. * = (CAT/L-NMMA) = CAT foi utilizada nas culturas para dosagem dos níveis de H₂O₂, e L-NMMA foi utilizado em culturas para dosagem de NO₂⁻. MO = Monócitos cultivados somente com CTCM; MO+Pb = MO desafiados com Pb; MO+GM-CSF = monócitos pré-ativados com GM-CSF

Papel de GM-CSF sobre atividade fungicida de macrófagos derivados de monócitos humanos somente com CTCM por 7 dias de cultura in vitro (MØ)

Como se pode observar na fig. 3, de maneira semelhante aos dados obtidos com a pré-incubação de MO com GM-CSF, macrófagos (MØ) ativados com GM-CSF apresentaram um aumento concentração-dependente na atividade fungicida, a partir da concentração de 31,25 U/mL (15,5%), até as concentrações mais significativas de 125 e 250 U/mL (29,8% e 27,2%, respectivamente), comparadas com os MØ controle (7,2%). Deve ser ressaltado que, comparado aos MO (fig. 1; 33,9 e 32,9), a atividade de MØ ativados não foi significativamente alterada.



* p<0,05 vs MO, ** p<0,01 vs MO

FIG. 3. Macrófagos derivados de monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) pela incubação somente com CTCM por 7 dias (MØ) foram ativados com GM-CSF (G) em diferentes concentrações (1; 10; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 U/mL) durante 18h. Em seguida, as células foram desafiadas com Pb18 por 4h e avaliadas quanto à atividade fungicida in vitro. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos

Papel de CAT e L-NMMA sobre a atividade fungicida de MØ ativados com GM-CSF

Para avaliar os mecanismos efetores envolvidos na ativação de MØ com GM-CSF para a destruição de Pb18, as coculturas foram desafiadas com Pb18 e tratadas concomitantemente com CAT ou L-NMMA. De modo semelhante à cultura de MO (fig. 2), CAT inibiu a atividade fungicida induzida por GM-CSF, confirmando o papel de H_2O_2 neste processo, também em MØ. Por outro lado, L-NMMA não alterou a atividade fungicida de MØ ativados com GMCSF, semelhante ao que ocorreu nas culturas de MO (Fig. 4).

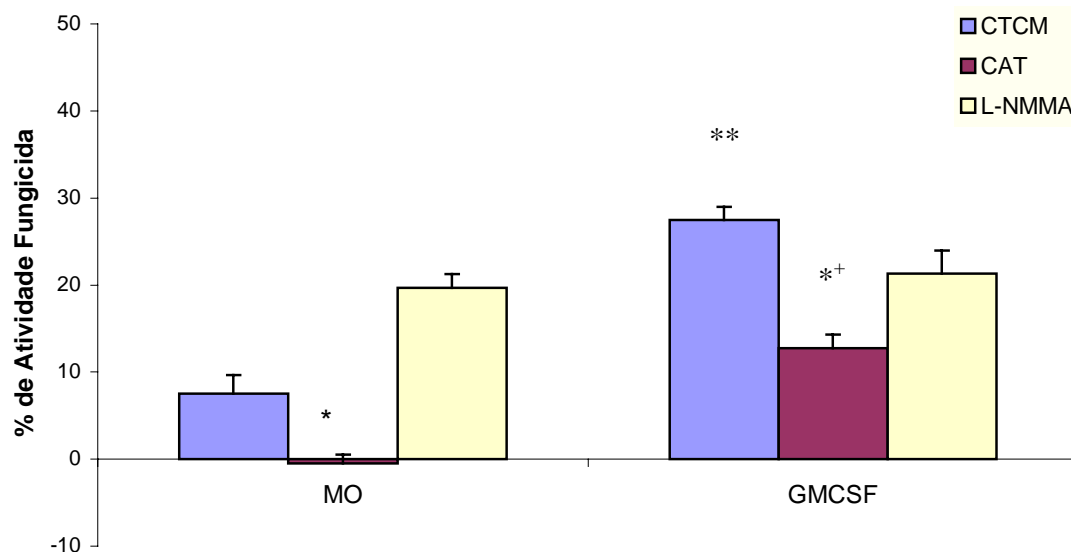
A Tab. 2 mostra que os níveis de H_2O_2 apresentaram-se significativamente reduzidos após o desafio com Pb18 de MØ não ativados ($MØ+Pb = 0.71\pm 0.23nM$), quando comparados aos MØ não desafiados ($MØ = 1.24\pm 0.53nM$). Entretanto, quando os MØ foram pré-ativados com GM-CSF ($MØ+GM-CSF = 2.33\pm 0.64nM$), foi detectado um aumento significativo na síntese de H_2O_2 , em relação a MØ ou $MØ+Pb$.

Em $MØ+GM-CSF$ desafiados com Pb18 ($MØ+GM-CSF+Pb = 2.17\pm 0.6nM$), os níveis de H_2O_2 foram semelhantes aos detectados nas culturas de $MØ+GM-CSF$. Estes dados mostram que, diferente de $MØ+Pb$, o desafio com Pb18 de células ativadas ($MØ+GM-CSF+Pb$) não leva à inibição na liberação de H_2O_2 . Enquanto isso, em todas as coculturas tratadas com CAT, obteve-se uma inibição significativa nos níveis de H_2O_2 , comparados aos detectados na ausência deste “scavenger”.

Em relação ao NO_2^- , dados semelhantes aos obtidos com a liberação de H_2O_2 e aos obtidos nas culturas de MO, foram detectados. Os sobrenadantes das coculturas de $MØ+Pb$ ($= 2.46\pm 0.53\mu M$) apresentaram uma significativa inibição na síntese deste metabólito, comparada ao MØ ($= 3.17\pm 0.98$). Porém, ao contrário do detectado para H_2O_2 , GM-CSF ($3.03\pm 0.91\mu M$) não estimulou as células para uma síntese aumentada de NO_2^- , comparada a MØ.

Além disso, $MØ+GM-CSF+Pb$ (1.89 ± 0.39) não liberaram níveis mais elevados de NO_2^- . Mais uma vez, como aconteceu nos sobrenadantes das culturas de MO, os resultados mostram que os níveis de NO_2^- foram mais baixos em todos os sobrenadantes das culturas, sugerindo que não houve, novamente, correlação com atividade fungicida. Estes resultados se associam mais uma vez com a observada ausência de efeito de L-NMMA sobre a atividade fungicida apresentada por MØ ativados com GM-CSF.

Em conjunto, os resultados apresentados na tab. 2 e nas figs. 3 e 4 evidenciam que a atividade fungicida apresentada por MØ ativados com GM-CSF é mediada por H_2O_2 , como nos experimentos com MO. Nos experimentos com MØ, o NO também não parece estar envolvido.



*p<0,05 vs MO, **p<0,01 vs MO, +p<0,05 vs MO+GM-CSF

FIG. 4. Macrófagos derivados de monócitos (2×10^5 /mL) pela incubação somente com CTM por 7 dias ($M\emptyset$) foram ativados com GM-CSF durante 18h (GM-CSF); pré-incubados na ausência ou presença de CAT (20000U/mL) ou L-NMMA (450U/mL) e desafiados concomitantemente com *P. brasiliensis* por 4h. Em seguida, as células foram avaliadas quanto à atividade fungicida in vitro. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos

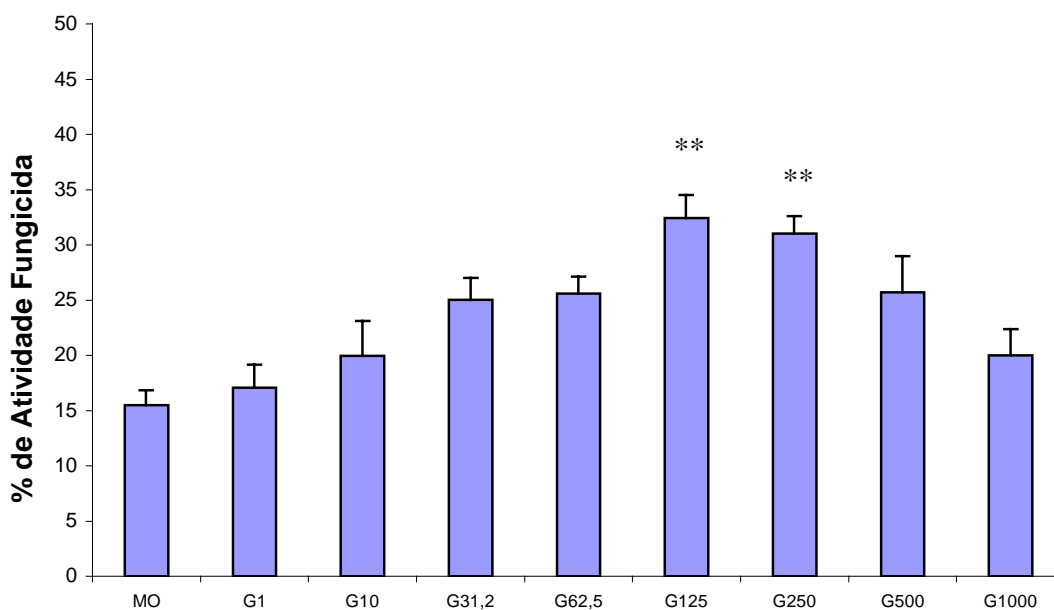
Tab. 2. Produção de H_2O_2 e NO_2^- em coculturas de macrófagos derivados de monócitos ($M\emptyset$) pré-ativados com GM-CSF por 18h e desafiados posteriormente com *P. brasiliensis* por 4h, na ausência ou presença de CAT ou L-NMMA. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos

Tratamento de Monócitos	Síntese de H_2O_2	Síntese de NO_2^-
	(nmoles/ 2×10^5 células)	(μ moles/ 2×10^5 células)
$M\emptyset$	1.34 \pm 0.53	3.17 \pm 0.98
$M\emptyset$ + CAT/L-NMMA*	0.91 \pm 0.31+ \blacklozenge	1.94 \pm 0.47+ \blacklozenge
$M\emptyset$ + Pb	0.71 \pm 0.23+	2.46 \pm 0.53+
$M\emptyset$ + Pb + CAT/L-NMMA	0.39 \pm 0.12+ \blacklozenge	1.42 \pm 0.41b+ \blacklozenge
$M\emptyset$ + GM-CSF	2.33 \pm 0.64+ \bullet	3.03 \pm 0.91
$M\emptyset$ + GM-CSF + CAT/L-NMMA	1.02 \pm 0.36 \blacklozenge	2.1 \pm 0.44a+ \blacklozenge
$M\emptyset$ + GM-CSF + Pb	2.17 \pm 0.6+ \bullet	1.89 \pm 0.39+
$M\emptyset$ + GM-CSF + Pb + CAT/L-NMMA	0.89 \pm 0.27+ \blacklozenge	1.22 \pm 0.27+ \blacklozenge

+ = p<0,05 vs MO; \bullet = p<0,05 vs MO+Pb, \blacklozenge = p<0,05 vs coculturas sem CAT ou L-NMMA. * (CAT/L-NMMA) = CAT foi utilizada nas culturas para dosagem dos níveis de H_2O_2 , e L-NMMA foi utilizado em culturas para dosagem de NO_2^- . $M\emptyset$ = Macrófagos cultivados somente com CTM; $M\emptyset$ +Pb = $M\emptyset$ desafiados com Pb; $M\emptyset$ +GM-CSF = $M\emptyset$ pré-ativados com GM-CSF

Papel de GM-CSF sobre atividade fungicida de macrófagos derivados de monócitos humanos, obtidos na presença de GM-CSF por 7 dias de cultura in vitro (G-MØ)

A Fig. 5 mostra um aumento na atividade fungicida de macrófagos derivados de monócitos humanos (obtidos após 7 dias de tratamento na presença de GM-CSF 250 U/mL - G-MØ), somente quando ativados com as concentrações de 125 e 250 U/mL (32,4% e 31,0%, respectivamente), de maneira semelhante à apresentada por MO e MØ ativados com GM-CSF. Pode-se observar também que o processo de diferenciação para MØ não altera de maneira significativa a sensibilidade à pré-ativação com GM-CSF.



*p<0,05 vs MO, **p<0,01 vs MO, +p<0,05 vs MO+GM-CSF

FIG. 5. Macrófagos derivados de monócitos (2×10^6 /mL) pela incubação na presença de GM-CSF 250 U/mL por 7 dias (G-MØ) foram ativados com GM-CSF (G) em diferentes concentrações (1; 10; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 U/mL) durante 18h. Em seguida, foram ativados com Pb18 por 4h e avaliados quanto à atividade fungicida in vitro. Os resultados expressam a Média (M) ± EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos

Papel de CAT e L-NMMA sobre a atividade fungicida de G-MØ ativados com GM-CSF

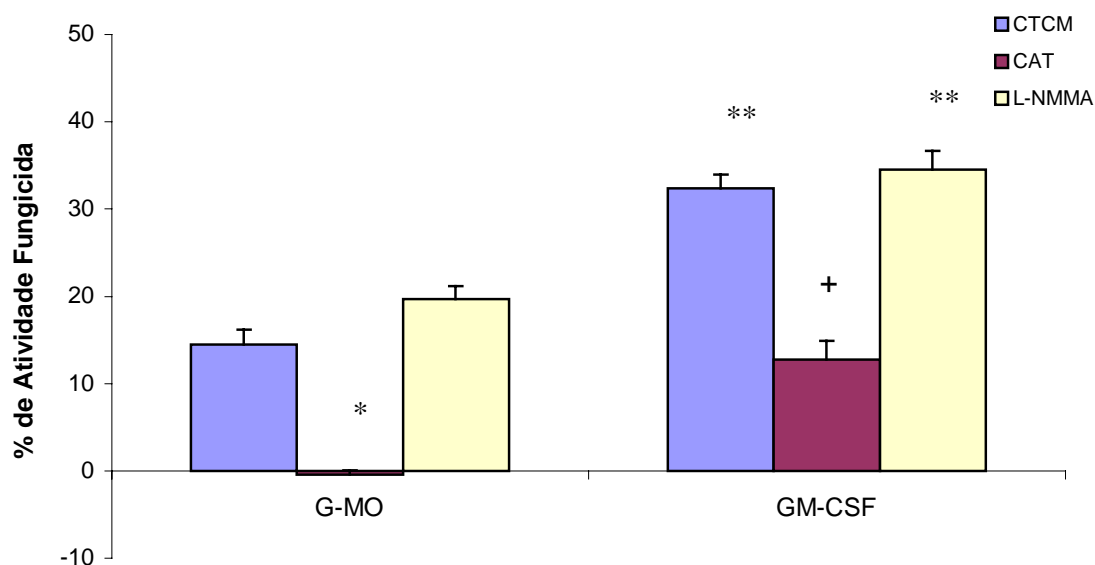
De modo semelhante aos experimentos com MO e MØ, foram realizados experimentos para avaliação dos mecanismos efetores envolvidos na atividade fungicida de G-MØ ativados com GM-CSF, contra o Pb18. A Fig. 6 mostra que, de modo semelhante às culturas de MO e MØ, CAT reverteu a atividade fungicida apresentada por G-MØ ativados com GM-CSF, o que reforça o papel da H₂O₂ neste processo. Outra vez, L-NMMA não diminuiu a atividade fungicida de G-MØ ou G-MØ ativados com GM-CSF, ao contrário dos resultados obtidos quando do tratamento com CAT (Fig. 6).

Como se pode observar na Tab. 3, os níveis de H₂O₂ apresentaram-se significativamente diminuídos após o desafio com Pb18 (G-MØ+Pb = 0.82±0.24nM), quando comparados aos níveis apresentados por G-MØ não desafiados com o fungo (G-MØ = 1.82±0.63nM). Entretanto, quando G-MØ foram pré-ativadas com GM-CSF, foi detectado um aumento significativo na liberação de in H₂O₂ (G-MØ+GM-CSF = 3.71±0.94nM). Em G-MØ+GM-CSF desafiados com Pb18 (G-MØ+GM-CSF+Pb = 2.83±0.73nM), os níveis de H₂O₂ foram semelhantes aos liberados por G-MØ+GM-CSF. Estes dados mostram que, diferente de G-MØ+Pb, o desafio com Pb18 das células ativadas (G-MØ+GM-CSF+Pb) não levou à inibição de H₂O₂. Em todas as coculturas tratadas com CAT, obteve-se uma inibição significativa nos níveis de H₂O₂ liberados, comparados aos níveis detectados na ausência deste “scavenger”.

No que se refere à produção de NO₂⁻, semelhante aos dados obtidos com H₂O₂ e com as culturas de MO e MØ, houve uma inibição significativa nos níveis deste metabólito nos sobrenadantes das coculturas de G-MØ+Pb (= 2.46±0.53µM), comparados aos de G-MØ (= 3.17±0.98). Contudo, ao contrário do detectado para H₂O₂, GM-CSF (3.03±0.91µM) não estimulou as células G-MØ para uma produção aumentada de NO₂⁻, em relação a MØ. Além disso, G-MØ+GM-CSF+Pb (1.89±0.39) não liberaram níveis mais elevados de NO₂⁻ do que

MØ+GM-CSF. Os dados obtidos com a dosagem dos níveis de NO_2^- , que foram muito baixos em todos os sobrenadantes das coculturas, sugerem que, outra vez, não houve correlação entre os níveis desse metabólito e a atividade fungicida apresentada por G-MØ ativados com GM-CSF. Novamente, estes dados se associam com a ausência de efeito de L-NMMA observado sobre a atividade fungicida de G-MØ+GM-CSF.

Portanto, conclui-se dos resultados apresentados na tab. 2 e nas figs. 3 e 4, que a atividade fungicida apresentada por MØ ativados com GM-CSF é mediada por H_2O_2 , semelhante a MO. Em G-MØ, o NO também parece não estar envolvido.



* $p < 0,05$ vs MO, ** $p < 0,01$ vs MO, + $p < 0,05$ vs MO+GM-CSF

FIG. 6. Macrófagos derivados de monócitos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) pela incubação com GM-CSF 250 U/mL por 7 dias (G-MØ) foram ativados com GM-CSF 125 U/mL por 18h e pré-incubados na presença de CAT (20000U/mL) ou L-NMMA (450U/mL); desafiados concomitantemente com Pb18 por 4h, e avaliados quanto à atividade fungicida in vitro. Os resultados expressam a Média (M) \pm EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos

Tab. 3. Produção de H₂O₂ e NO₂⁻ em coculturas de macrófagos derivados de monócitos na presença de GM-CSF por 7 dias (G-MØ), pré-ativados com GM-CSF por 18h e desafiados com Pb18 por 4h, na ausência ou presença de CAT ou L-NMMA. Os resultados expressam a Média (M) ± EP de experimentos realizados com células obtidas do sangue periférico de 8 indivíduos

Tratamento dos Monócitos	Síntese de H₂O₂ (nmoles/2x10⁵ células)	Síntese de NO₂⁻ (µmoles / 2x10⁵ células)
G-MØ	1.82±0.63	2.93±1.05
G-MØ+ CAT/L-NMMA	0.41±0.17+♦	1.35±0.85+♦
G-MØ+ Pb	0.82±0.24+	1.23±0.71+
G-MØ + Pb + CAT/L-NMMA	0.31±0.12+♦	0.77±0.25+♦
G-MØ + GM-CSF	3.71±0.94+•	3.22±0.97
G-MØ + GM-CSF + CAT/L-NMMA	2.14±0.6♦	2.74±0.89♦
G-MØ + GM-CSF + Pb	2.83±0.73+•	0.97±0.21+
G-MØ + GM-CSF + Pb + CAT/L-NMMA	1.68±0.13♦	1.21±0.4+♦

+ = p<0,05 vs MO; • = p<0,05 vs MO+Pb, ♦ = p<0,05 vs coculturas sem CAT ou L-NMMA. * (CAT/L-NMMA) = CAT foi utilizada nas culturas para dosagem dos níveis de H₂O₂, e L-NMMA foi utilizado em culturas para dosagem de NO₂⁻. G-MØ = Macrófagos derivados de monócitos cultivados na presença de GM-CSF por 7 dias; G-MØ +Pb = G-MØ desafiados com Pb; G-MØ+GM-CSF = G-MØ pré-ativados com GM-CSF

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel de GM-CSF sobre a ativação de fagócitos mononucleares humanos e os mecanismos efetores desenvolvidos por estas células para a destruição de *P. brasiliensis*. Os resultados apresentados aqui permitem considerar a existência de uma importante atividade fungicida induzida por GM-CSF nos monócitos e macrófagos derivados de monócitos humanos.

A estimulação de monócito/macrófago para a atividade antimicrobiana por GM-CSF já foi relatada para vários estudos in vivo e in vitro, os quais apresentam evidências de que esta citocina ativa neutrófilos, monócitos e macrófagos, aumentando a capacidade destas células de destruir parasitas intracelulares, incluindo *C. albicans*^[17], *A. fumigatus*^[18,19], *H. capsulatum*^[20,21], *T. cruzi*^[23], *M. avium*^[24], *M. lepraemurium*^[25], e MAC^[26].

Uma vez confirmado o papel do GM-CSF sobre a atividade fungicida de monócitos e macrófagos humanos contra o Pb18, foram realizados outros experimentos com o objetivo de esclarecer os mecanismos efetores pelos quais as células estariam exercendo esta atividade. Nossos dados demonstraram claramente que CAT inibiu a atividade fungicida das células testadas (MO, MØ, or G-MØ ativados com GM-CSF). Além disso, os resultados sobre a liberação de H₂O₂ mostraram que, apesar do Pb18 inibir a liberação deste metabólito, como indicado por trabalhos prévios realizados em nossos laboratórios^[33], quando as células são ativadas com GM-CSF, observa-se um efeito compensatório, garantindo os níveis de H₂O₂ necessários para um efeito fungicida.

Assim, este trabalho fornece evidências de que o mecanismo pelo qual as células ativadas com GM-CSF destróem o Pb18 é mediado por H₂O₂. Outros trabalhos em nosso laboratório^[11] demonstraram que este metabólito também é efetivo na destruição de Pb18 por fagócitos humanos ativados simultaneamente com IFN- γ e TNF- α , de maneira semelhante à que ocorre com outros microrganismos^[17,20,23,34,35].

Por outro lado, em relação aos níveis de NO₂⁻, nossos resultados indicam que este metabólito não é induzido na eliminação de Pb18 por fagócitos humanos,

uma vez que L-NMMA não reverteu a atividade fungicida apresentada pelos fagócitos e os níveis de NO_2^- em todas as coculturas foram muito baixos, incluindo os níveis liberados pelas células pré-ativadas com GM-CSF.

A síntese de NO, com a subsequente formação de peroxinitrito^[36] é um importante mecanismo antifúngico das células mononucleares^[36-38], que tem sido demonstrado eficiente em inibir a replicação e eliminação de fungos^[9,39] e outros microrganismos por fagócitos mononucleares murinos. Resultados anteriores obtidos em nossos laboratórios demonstraram, porém, que a eliminação de Pb18 por macrófagos peritoneais murinos ativados com IFN- γ TNF- α é mediada por NO e H_2O_2 ^[40].

Embora se saiba que o radical NO é sintetizado abundantemente por fagócitos de camundongos e ratos, a secreção por fagócitos mononucleares humanos tem sido objeto de um assunto controverso^[24,37,40,41]. MacMICKING et al.^[40] e ALBINA^[42] relataram que monócitos/macrófagos humanos expressam a NO sintase tipo II (NOS2) após síntese protéica, em resposta a vários estímulos. Adicionalmente, enquanto foi comprovado como potente composto antifúngico em camundongos, seu papel não foi estabelecido em humanos^[37-39]. Especificamente, neste trabalho, NO não parece estar envolvido na atividade fungicida de fagócitos humanos contra leveduras de Pb18.

Em relação ao papel do GM-CSF sobre a ativação in vivo de macrófago para a eliminação de Pb18, nós sugerimos que este processo poderia estar ocorrendo nas fases iniciais do contato hospedeiro/fungo, i.e., durante uma resposta imune inata. Alguns trabalhos relataram que outras células, além de linfócitos T ativados, podem estar envolvidas na produção de GM-CSF, como as células NK. Embora não haja relatos demonstrando que esta citocina seja produzida por estas células em resposta ao Pb18, alguns trabalhos demonstraram que a liberação de fatores de ativação de neutrófilos por células NK estimuladas com *Candida*, e identificaram a presença de TNF- α , IFN- γ e GM-CSF^[25,43,44]. GM-CSF também foi rapidamente induzido por *Mycobacterium avium-M. intracellulare* a partir de LGL e monócitos, acoplado com sua capacidade de induzir a atividade bactericida de monócitos^[44].

A literatura relata vários mecanismos pelos quais o GM-CSF poderia estar envolvido na eliminação das leveduras de Pb18. Alguns trabalhos indicam que o GM-CSF pode induzir a secreção de TNF- α in vitro^[14,45], o que sugere uma ação indireta do GM-CSF sobre a atividade fungicida. Trabalhos em nosso laboratório demonstraram que o TNF- α é importante como um segundo sinal para a eliminação de Pb18 por monócitos/macrófagos^[10].

Entretanto, este fator pode agir também diretamente, como relatado por vários trabalhos. WILLIAMS et al. (1999)^[14], descrevem um aumento na expressão de receptores sobre a superfície de macrófagos, como CD11a/CD18, CD11b/CD18 and CD11c/CD18 (LFA), que aumentam os fenômenos dependentes de adesão; e os receptores FC γ -RII (CDw32), que ligam imunoglobulinas durante a fagocitose. O aumento na expressão destes receptores pode contribuir para aumentar a capacidade fagocitária do macrófago. Além disso, esta citocina aumenta a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), o metabolismo oxidativo e a geração de ânion superóxido tanto por macrófagos e monócitos^[12,14-16,45].

Em relação ao potencial efeito terapêutico de GM-CSF, JONES^[11] observa que os resultados de alguns trabalhos levaram à recomendação de uso de citocinas em pacientes com infecções fúngicas, associadas com pneumonia neutropênica severa. O autor enfatiza o uso de GM-CSF tanto por seu papel sobre a hematopoiese quanto por sua vantagem potencial de ativação de macrófagos. Uma abordagem recomendada para o uso de GM-CSF baseia-se no seu efeito sobre a incorporação e ação de antifúngicos. TASCINI et al.^[46] observaram atividade anti-criptocócica de monócitos humanos de pacientes com AIDS, após tratamento concomitante com GMCSF e fluconazol.

Em conclusão, com base nos resultados apresentados neste trabalho, complementados com os dados da literatura, sugerimos que investigações adicionais sejam realizadas com o objetivo de aprimorar o conhecimento sobre o papel do GM-CSF nas interações de células fagocitárias / *P. brasiliensis*, na tentativa de explorar essa citocina como uma nova estratégia terapêutica no tratamento da paracoccidiodomicose.

GM-CSF activates human monocytes and monocyte-derived macrophages to kill *Paracoccidioides brasiliensis* by a mechanism dependent on reactive oxygen intermediates

ABSTRACT

The ability of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) to activate human monocytes/macrophages for virulent *Paracoccidioides brasiliensis* killing was evaluated. Peripheral blood monocytes (MO) and monocyte-derived macrophages (MØ) were activated with different concentrations of GM-CSF. Afterwards, cells were challenged with *P. brasiliensis* strain 18 (Pb18) and the fungicidal activity was evaluated, plating and counting the Colony Forming Units (CFU) after 10 days. GM-CSF activated MO and MØ for *P. brasiliensis* killing in a concentration-dependent manner. There was an association between this activity and the release of high levels of H₂O₂ by activated cells. Moreover, the killing effect was inhibited by Catalase (CAT), confirming the role of H₂O₂ in this process. On the contrary, L-Monomethyl-Arginine (L-NMMA) had no effect on fungicidal activity, suggesting that nitric oxide (NO) is not involved. Based on these data, the role of GM-CSF-activated human cells in the defense mechanisms against *P. brasiliensis* is discussed.

Key words: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, H₂O₂, human monocytes, human macrophages, GM-CSF, fungicidal activity

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the major systemic mycosis in Latin America. Its etiological agent is the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, a microorganism with thermal dimorphism, being a yeast at body temperature^[1,2]. This fungus causes a natural infection by inhalation of conidia or mycelial elements which are converted into the parasitic yeast form in lungs^[3]. This disease shows multiple forms, ranging from benign and localized to severe and disseminated forms, depending upon the cell immunity^[4].

Among the immune mechanisms reported to this infection, monocytes/macrophages appear to play a fundamental role, acting as the first defense line in the organism^[3], depending on their state of activation^[5]. Ingested conidia or yeast forms of *P. brasiliensis* readily multiply inside murine alveolar or peritoneal macrophages; however when cells are activated by cytokines, such as IFN- γ , the multiplication is limited and conidia or yeast cells may be killed^[2,3,6-8].

With regards to murine cells, results have shown that IFN- γ activation promotes *P. brasiliensis* killing through the L-arginine/NO pathway^[9]. However, works in our laboratory have demonstrated that IFN- γ activation is not enough for the fungicidal activity of human cells against virulent *P. brasiliensis* (Pb18)^[10]. This process is effective after cells preactivation with TNF- α or IFN- γ plus TNF- α . Moreover, these studies provided strong evidence of H₂O₂ participation as an effector mechanism, since Catalase, a H₂O₂ scavenger, inhibited the intracellular killing by TNF- α or TNF- α plus IFN- γ -activated monocytes^[11].

The role of other cytokines, besides IFN- γ and TNF- α concerning human monocyte/macrophage-*P. brasiliensis* interaction is still unclear. Ample evidence has been provided that GM-CSF not only promotes proliferation and differentiation of hematopoietic precursor cells, but also induces various aspects of macrophage activation^[12-16], e.g., respiratory burst activity^[15]. Monocytes release reactive oxygen species (H₂O₂, O₂⁻ and OH⁻), which are cytotoxic to microorganisms and tumour cells.

The effects of GM-CSF on the function of monocytes/macrophages against microbial pathogens have been studied in uncontrolled trials in humans and in vitro and in vivo experiments^[12,13,16]. Enhancement of the microbicidal activity of monocytes by GM-CSF was shown in vitro against *Candida albicans*^[17], *Aspergillus fumigatus*^[18,19], *Histoplasma capsulatum*^[20,21], *Cryptococcus neoformans*^[22], *Trypanosoma cruzi*^[23], *Mycobacterium avium*^[24], *M. lepraemurium*^[25] and *M. avium-intracellulare* Complex (MAC)^[26]. Therefore, we propose that the activation of monocytes/macrophages by GM-CSF might be important for killing of *P. brasiliensis*.

Thus, the aim of this work was to study: 1. the role of GM-CSF on human monocytes/macrophages fungicidal activity against a virulent strain of *P. brasiliensis* (Pb18); 2. the involvement of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the killing of Pb18 by GM-CSF-activated monocytes/macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Media.

Recombinant human GM-CSF was purchased from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA. RPMI 1640 Tissue culture medium; Histopaque (d=1.077); CAT; L-NMMA; Phorbol-Myristate-Acethate (PMA); Sulphanilamide; and Naphtyl-Ethylene-Diamine-Dihydrochloride (NEED) were purchased from Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA.

Complete tissue culture media (CTCM) consisted of RPMI 1640 supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated human AB serum, 20 mM HEPES, 2 mM of L-glutamine (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) and 40 µg/ml of gentamicin. Brain-Heart Infusion (BHI) agar medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), used for cultures plating, contained 0,5% of gentamicin (Neoquímica, Anápolis, GO, Brazil), 4% horse normal serum and 5% *P. brasiliensis* strain 192 culture filtrate (v/v), the latter being the source of growth-promoting factor^[27]. 96-well flat-bottomed plates were purchased from Nunc, Life Tech. Inc., Maryland, MA, USA. Horseradish peroxidase (type II) was obtained from Sigma Chemical, San Diego, CA, USA.

Fungi.

P. brasiliensis strain 18 (Pb 18) was maintained in the yeast-form cells at 35°C in GPY culture medium during six days^[28]. Yeast viability was determined by phase contrast microscopy and bright yeast cells were counted as viable, while dark ones were considered nonviable. Fungal suspensions containing more than 90% viable cells were used for the experiments.

Donors.

Monocytes were isolated from the blood of healthy volunteers donors, after informed consent from the University Hospital of the Botucatu Medical School, São Paulo State University (Brazil). The Hospital Ethics Committee approved this study.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from heparinized venous blood by density gradient. Briefly, 10 ml of heparinized blood were mixed with an equal volume of complete tissue culture medium (CTCM). Samples were layered over 5 ml of Histopaque in a 15 ml conical plastic centrifuge tube.

After centrifugation at $300 \times g$ for 30 min at room temperature, the interface layer of PBMC was harvested and washed twice with PBS-EDTA and once with CTCM. Cell viability as determined by 0.2% trypan blue exclusion was $> 95\%$ in all experiments. The monocytes were stained with neutral red (0,02%) and the concentrations were adjusted to 2×10^6 monocytes/ml in CTCM. More than 90% of the cells were considered as monocytes by morphologic examination, neutral red uptake, and staining for inespecific esterase staining^[29].

Monocyte/macrophage monolayers.

100 μ L of monocyte suspension (2×10^6 monocytes/ml) was dispensed into 96-well flat-bottomed plates. After incubation during 2h at 37°C in 5% CO₂, non-adherent cells were removed by aspiration and each well was rinsed twice with CTCM. After adherence, monocytes were cultured in CTCM at 37°C in 5% CO₂ during 18h, alone (MO) or containing GM-CSF in different concentrations (1, 10, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 U/mL).

For the differentiation process of monocytes into macrophages, monocytes cultures were maintained during 7 days in CTCM, changing the culture media every other day and, subsequently activating the cells with GM-CSF (MØ), in different

concentrations (1, 10, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 U/mL). In other experiments, monocyte-derived macrophages were cultured in the presence of GM-CSF 250U/mL (G-MØ), changing the culture media every other day, during 7 days. After monocyte-macrophage differentiation, the supernatants were removed and cells were activated with GM-CSF in different concentrations (1, 10, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 U/mL) for 18h.

Fungicidal activity.

After supernatants removal of control and treated monolayers, monocytes/macrophages were challenged with 100 µl of 2×10^4 viable units/ml of Pb18 (ratio 50:1) in CTCM containing 10% fresh human AB serum, in absence or presence of CAT (20,000 U/mL) or L-NMMA (450 U/mL). After coculture during 18 h (experimental cultures), cells were harvested by aspiration with sterile distilled water to lyse monocytes. Each culture and well washing was contained in a final volume of 2 ml.

The number of colony forming units (CFU) of Pb18 per culture was determined by plating 100 µl of the 2 ml harvested volume, in triplicate, on BHI containing 4% normal horse serum and 5% *P. brasiliensis* strain 192 culture filtrate (v/v). A control culture only containing 100 µl of yeast-form Pb18 (2×10^4 viable units/ml) was submitted to the same procedures used for the experimental cultures. Inoculated plates were incubated at 35°C in sealed plastic bags to prevent drying.

After 10 days the number of CFU per plate was counted and the percentage of fungicidal activity was determined by the formula:

$$\text{Fungicidal Activity (\%)} = 1 - \frac{\text{mean CFU of experimental culture}}{\text{mean CFU of control culture}} \times 100$$

Reactive oxygen intermediates (ROI) determination:

ROI production was indirectly measured by assessing H₂O₂ release from monocytes and macrophages, according to the method previously described by PICK & KEISARI^[30] and adapted by PICK & MIZEL^[31].

Monocytes or monocyte-derived macrophages were obtained as previously described, and cultured in duplicate in 96-well plates for 24 hours, at 37°C in 5% CO₂ tension, with or without 100 µL of recombinant human GM-CSF (rh-GM-CSF) (1, 10, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 U/mL). After this period, culture supernatants were used to nitric oxide (NO) determination and the adherent cells were resuspended to the original volume (0,1 mL) in phenol red buffer solution containing: 140 mM of NaCl; 10nM of phosphate buffer, pH 7; 5,5 mM of dextrosis; 0,56 mM of phenol red; 0,01mg/mL of peroxidase from strong root type II and, in the presence or absence of 1mg of phorbol myristate acethate (PMA), and were incubated at 37°C in a dark, humid chamber. After 60 minutes, the reaction was interrupted by the addition of 0,01 mL of NaOH 1N. Absorbances were measured at 620 nm in an automatic ELISA microreader. Results were expressed in nanomols (nM) of H₂O₂/2x10⁵ cells, using a standard curve.

Reactive nitrogen intermediates (RNI) determination:

NO production was determined based on Griess reaction^[32]. Culture supernatants were mixed in with an equal volume of Griess reagent (1% Sulphanilamide, 0.1% NEED, in 5% phosphoric acid) at room temperature for 10 min^[32]. Sodium nitrite (NaNO₂⁻) was used as standard. Absorbances were measured at 540 nm in an ELISA microreader. Assays were carried out in quadruplicate. Results were expressed in µmols of NO₂⁻/2x10⁵ cells, comparing the optical density (OD) with a standard curve of known NO₂⁻ concentrations.

Statistical Analysis.

Statistical procedures were performed using Graphpad Instat software (San Diego, California - USA). Significant differences among the various groups were detected by Repeated Measures Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey-Kramer Multiple Correlations. Significance level was set at $p < 0,05$. Results are expressed by Mean (M) \pm Standard Error of the Mean (SEM).

RESULTS

Role of GM-CSF on human monocyte (MO) fungicidal activity *in vitro* for high-virulent *P. brasiliensis* killing

Figure 1 shows the percentage (%) of fungicidal activity of monocytes newly isolated from the peripheral blood of normal donors, incubated only with CTCM (MO) or in the presence of GM-CSF (G) in different doses (1, 10, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 U/mL). Preincubation of monocytes with GM-CSF during 18h induces a concentration-dependent increase in the fungicidal activity against high-virulent strain of *P. brasiliensis* (Pb18). Significant fungicidal activity was detected in every concentration of GM-CSF, and maximal activity occurred with the doses of 125 (33.9%) and 250 U/mL (32.9%).

Role of CAT and L-NMMA on fungicidal activity of GM-CSF-activated MO

In order to detect the effector mechanisms involved in GM-CSF-activated MO for *P. brasiliensis* killing, cocultures of monocytes were challenged with Pb18 and treated concomitantly with CAT (20,000 U/mL), a scavenger of H₂O₂ production; or L-NMMA (450 U/mL), a competitive inhibitor of nitric oxide synthase (NOS), the enzyme responsible for NO production. Results showed that CAT inhibited the fungicidal activity presented by GM-CSF-activated monocytes, indicating the role of H₂O₂ in this process. On the other hand, L-NMMA did not show a significant effect (Fig. 2).

As shown in Tab. 1, H₂O₂ levels were significantly diminished after non-activated monocytes challenge with Pb18 (MO+Pb = 0.81±0.24nM), when compared to non-activated monocytes alone (MO = 1.97±0.53nM). However, when monocytes were preactivated with GM-CSF, a significant increase in H₂O₂ production was detected (MO+GM-CSF = 3.13±0.63nM), when compared to MO or MO+Pb. Moreover, in monocytes preactivated with GM-CSF and challenged with Pb18 (MO+GM-CSF+Pb = 2.88±0.52nM), H₂O₂ levels were similar to those

detected in MO+GM-CSF cultures. These data show that, differently of non-activated monocytes challenged with Pb18 (MO+Pb), the challenge of GM-CSF-preactivated cells with Pb (MO+GM-CSF+Pb) did not result in H₂O₂ inhibition. In addition, all the cocultures treated with CAT (MO+CAT, MO+GM-CSF+CAT, MO+Pb+CAT) showed a significant inhibition in H₂O₂ levels, compared to those detected in absence of this scavenger.

Concerning NO₂⁻ production, similarly to H₂O₂ release, in cocultures supernatants of MO+Pb (= 1.46±0.49µM), we detected a significant inhibition in this metabolite production, compared to MO (= 2.38±0.75). However, conversely to H₂O₂, GM-CSF (2.54±0.69µM) did not stimulate the cells to increase NO₂⁻ production, when compared to MO. Moreover, MO+GM-CSF+Pb did not release higher levels of NO₂⁻. Together, the results showed that NO₂⁻ levels were very low in all cocultures supernatants, suggesting no correlation with fungicidal activity. The lack of L-NMMA effect on fungicidal activity of MO+GM-CSF reinforces these results.

Results shown in figures 1 and 2 and table 1 suggest that the fungicidal activity presented by GM-CSF-activated monocytes is mediated by H₂O₂, while NO seems not to be involved.

Role of GM-CSF on the fungicidal activity of human monocyte-derived macrophages cultured in CTCM during 7 days *in vitro* (MØ)

Similarly to the data obtained with MO preincubation, GM-CSF activated macrophages (MØ) displayed a dose-dependent increase in fungicidal activity, from 31,25 U/mL (15.5%), to the most significant concentrations of 125 and 250 U/mL (29.8% and 27.2%, respectively), when compared to control MØ (7.2%). It shall be reinforced that, compared to MO (fig. 1; 33.9 and 32.9%), the activity of activated-MØ was not statistically significant.

Role of CAT and L-NMMA on fungicidal activity of GM-CSF-activated MØ

In order to detect the effector mechanisms involved in GM-CSF-activated macrophages (MØ) for *P. brasiliensis* killing, we challenged these cocultures with Pb18 and treated them concomitantly with CAT or L-NMMA. Similarly to monocyte cultures (MO – fig. 2), CAT inhibited the fungicidal activity induced by GM-CSF, confirming the role of H₂O₂ in this process, as well with MØ. On the other hand, L-NMMA did not change fungicidal activity of GMCSF-activated MØ, like in MO cultures (Fig. 4).

One may see in Tab. 2 that the levels of H₂O₂ were significantly diminished after nonactivated macrophages challenge with Pb18 (MØ+Pb = 0.71±0.23nM), when compared to macrophages alone (MØ = 1.24±0.53nM). However, when macrophages were preactivated with GM-CSF (MØ+GM-CSF = 2.33±0.64nM), a significant increase in H₂O₂ production was detected, when compared to MØ or MØ+Pb.

Macrophages preactivated with GM-CSF and challenged with Pb showed similar H₂O₂ levels (MØ+GM-CSF+Pb = 2.17±0.6nM) to those detected in MØ+GM-CSF culture. These data show that, differently of non-activated MØ challenged with Pb18 (MØ+Pb), the challenge of activated cells (MØ+GM-CSF+Pb) did not lead to H₂O₂ inhibition. In all the cocultures treated with CAT, a significant inhibition in H₂O₂ levels was obtained, compared to those detected in the absence of this scavenger.

In relation to NO₂⁻, similarly to H₂O₂ release and also similarly to MO cultures, there was a significant inhibition in this metabolite production in cocultures supernatants of MØ+Pb (= 2.46±0.53µM), compared to MØ (= 3.17±0.98). However, conversely to H₂O₂, GM-CSF (3.03±0.91µM) did not stimulate the cells to increase NO₂⁻ production, compared to MØ. Moreover, MØ+GM-CSF+Pb (1.89±0.39) did not release higher levels of NO₂⁻. Once more, as occurred in supernatants of MO cultures, the results showed that NO₂⁻ levels were very low in all cocultures supernatants, suggesting that they were not correlated with fungicidal

activity. Again, these results are associated with the lack of L-NMMA effect on fungicidal activity presented by GM-CSF-activated MØ.

Together, the results presented in tab. 2 and figs. 3 and 4 showed that the fungicidal activity presented by GM-CSF-activated MØ is mediated by H₂O₂, similarly to MO experiments. In experiments with MØ, once more, NO seems not to be involved.

Role of GM-CSF on the fungicidal activity of human monocyte-derived macrophages, after 7 days of culture in the presence of GM-CSF in vitro (G-MØ)

Fig. 5 shows an increased fungicidal activity of human monocyte-derived macrophages activated with GM-CSF, after 7 days of treatment in the presence of this cytokine (G-MØ), only with 125 and 250 U/mL (32.4% and 31.0%, respectively), in a similar way compared to fungicidal activity presented by GM-CSF-activated-MO and MØ. One may observe that the monocytes differentiation process into macrophages in the presence of GM-CSF, did not change significantly the responsiveness to GM-CSF preactivation, compared to macrophages culture without this cytokine.

Role of CAT and L-NMMA on fungicidal activity of GM-CSF activated G-MØ

As previous assays with MO and MØ, we attempted to detect the effector mechanisms involved in GM-CSF-activated G-MØ for *P. brasiliensis* killing, Fig. 6 shows that, similarly to monocyte (MO – fig. 2) and macrophage in absence of GM-CSF (MØ - fig. 4) cultures, CAT inhibited the fungicidal activity presented by GM-CSF-activated G-MØ, reinforcing the role of H₂O₂ as well in this process. Once again, L-NMMA could not abrogate fungicidal activity of G-MØ or GM-CSF-activated G-MØ, as verified in cells treatment with CAT (Fig. 6).

As seen in Tab. 3, H₂O₂ levels were significantly diminished after G-MØ challenge with Pb18 (G-MØ+Pb = 0.82±0.24nM), when compared to G-MØ alone (G-MØ = 1.82±0.63nM). However, when G-MØ were preactivated with GM-CSF (G-MØ+GM-CSF = 3.71±0.94nM), a significant increase in H₂O₂ production was detected. In G-MØ preactivated with GM-CSF and challenged with Pb (G-MØ+GM-CSF+Pb = 2.83±0.73nM), the H₂O₂ levels were similar to that detected in G-MØ+GM-CSF cultures. These data show that, differently of nonactivated G-MØ challenged with Pb (G-MØ+Pb), the challenge of activated cells with Pb (G-MØ+GM-CSF+Pb) did not lead to H₂O₂ inhibition. In all the cocultures treated with CAT, a significant inhibition in H₂O₂ levels was observed, compared to the ones detected in absence of this scavenger.

As to NO₂⁻, similarly to H₂O₂ release and also similarly to MO and MØ cultures, in cocultures supernatants of MØ+Pb (= 2.46±0.53µM), we detected a significant inhibition in this metabolite production, compared to MØ (= 3.17±0.98). However, conversely to H₂O₂, MØ+GM-CSF (3.03±0.91µM) did not stimulate the cells for increased NO₂⁻ production, compared to MØ. Moreover, MØ+GM-CSF+Pb (1.89±0.39) did not release higher levels of NO₂⁻, which were very low in all cocultures supernatants, suggesting that they were not correlated with fungicidal activity. Once again, these results are associated with the lack of L-NMMA effect on fungicidal activity of MO+GM-CSF cells.

Therefore, it follows, from the results shown in tab. 3 and figures 5 and 6, that the fungicidal activity presented by GM-CSF-activated G-MØ is mediated by H₂O₂, similarly to MO and MØ. Again, NO seems not to be involved.

DISCUSSION

The aim of this work was to investigate the role of GM-CSF on human mononuclear phagocytes activation and the effector mechanisms developed by these cells for *P. brasiliensis* killing. The results presented here allow us to consider the existence of an important fungicidal activity of GM-CSF-activated human monocytes and monocyte-derived macrophages against *P. brasiliensis*.

Stimulation of monocyte/macrophage for antimicrobial activity by GM-CSF is reported by a number of studies in vivo and in vitro, evidencing that this cytokine activates neutrophils, monocytes and macrophages, and enhances the ability of these cells to kill intracellular parasites, such as *Candida albicans*^[17], *Aspergillus fumigatus*^[18,19], *Histoplasma capsulatum*^[20,21], *Trypanosoma cruzi*^[23], *Mycobacterium avium*^[24], *M. lepraemurium*^[25], and MAC^[26].

Since GM-CSF increased the fungicidal activity of human monocytes and macrophages against *P. brasiliensis* strain 18 (Pb18), we were interested in clarifying the mechanisms by which the cells would exert this activity. Our results clearly demonstrated that CAT inhibited the fungicidal activity of the cells tested. Moreover, despite of the Pb18 inhibits H₂O₂ release, as shown in previous works^[33], when the cells are activated by GM-CSF, a compensatory effect on this production was detected, and H₂O₂ concentrations were enough for a fungicidal effect. Thus, this work provides evidence that the mechanism by which GM-CSF-activated cells kill *P. brasiliensis* is mediated by H₂O₂. Previous works in our laboratory^[11] showed that this metabolite is also effective in *P. brasiliensis* killing for IFN- γ and TNF- α -activated human phagocytes, similarly to other microorganisms^[17,20,23,34,35].

On the other hand, our results indicate that NO is not involved in Pb18 killing by human phagocytic cells, since L-NMMA did not revert the fungicidal activity presented by phagocytes and NO₂⁻ levels in all cocultures were very low, including the ones preactivated with GM-CSF. Production of NO and subsequent formation of peroxynitrite^[36] have been found to be a potent antifungal mechanism of mononuclear cells^[36-38]. This mechanism has been shown to be efficient in the

inhibition of replication and killing of fungi^[9,39] and other microorganisms by murine mononuclear phagocytes. Previous results from our group have demonstrated that killing of Pb18 by IFN- γ and TNF- α -activated peritoneal murine macrophages is mediated by NO and H₂O₂^[40].

Although it is known that NO is abundantly synthesized by phagocytes from mice and rats, its secretion by human mononuclear phagocytes has become a controversial issue^[24,37,40,41]. MacMICKING et al.^[40] and ALBINA^[42] have reported that human monocytes/macrophages express nitric oxide synthase type II (NOS2) as protein synthesis, in response to various stimuli. Furthermore, while it has been found to be a potent antifungal compound of phagocytes in mice, its antifungal role has not been established in human^[37-39]. Specifically, in this work, NO does not appear to be involved in the fungicidal activity of human phagocytes against Pb18 yeasts.

In relation to the role of GM-CSF on in vivo macrophage activation for *P. brasiliensis* killing we suggest that this process might occur in early phases of the contact host/fungus, i.e., during an innate immune response. Some works have reported that cells, other than activated T lymphocytes, may be involved in GM-CSF production, such as NK cells. Although there are no reports demonstrating that this cytokine is produced by these cells in response to *P. brasiliensis*, some works have reported the release of PMN-activation factors by *Candida*-stimulated NK, such as TNF- α , IFN- γ and GM-CSF^[25,43,44]. GM-CSF was also readily induced by MAC from LGL and monocytes, coupled to its ability to induce bactericidal activity of monocytes^[44].

Literature reports many mechanisms by which GM-CSF may be involved in killing of Pb18 yeasts. Some works indicate that GM-CSF can induce TNF- α secretion in vitro^[14,45], what suggests an indirect action of GM-CSF on fungicidal activity. Works of our laboratory have demonstrated that TNF- α is important as a second signal for monocytes/macrophages *P. brasiliensis* killing^[10]. However, this factor may also act directly, as reported by many authors. WILLIAMS et al.^[14], described an increased expression of receptors over macrophages surfaces, like CD11a/CD18, CD11b/CD18 and CD11c/CD18 (LFA), which augment the

adhesion-dependent phenomena; and FC γ -RII receptors (CDw32), which bind immunoglobulins during phagocytosis. The increase in receptors expression may contribute to macrophage phagocytic ability. Yet, this cytokine augments antibody-dependent cellular cytotoxic activity (ADCC), the oxidative burst, and the generation of superoxide anion by macrophages and monocytes^[12,14-16,45].

In relation to the GM-CSF therapeutic potential, JONES^[11] discusses some observations and led to the recommendation that cytokines could be used in patients with fungal infections, associated with severe neutropenic pneumonia. The author points out the use of GM-CSF for its hematopoiesis role as well by its potential advantage of macrophage activation. One recommended approach for GM-CSF use is based on its effect on incorporation and action of antifungals on macrophages. TASCINI et al.^[46] observed an increased anti-cryptococcal activity of human monocytes from patients with AIDS, after treatment with GMCSF plus fluconazol.

Additional investigations must be carried out for a better understanding of the role of GM-CSF on phagocytic cells-*P. brasiliensis* interactions in an attempt to suggest its role as a new therapeutic strategy in the treatment of paracoccidioidomycosis.

LEGENDS FOR FIGURES

FIG. 1. Monocytes (2×10^6 /mL) were preincubated in the absence (MO) or presence of GM-CSF (G) in different concentrations (1, 10, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 U/mL) for 18h and challenged with *P. brasiliensis* during 4h for fungicidal activity *in vitro*. Results are expressed as Mean (M) \pm SEM of 11 subjects

FIG. 2. Monocytes (2×10^6 /mL) (MO) activated with GM-CSF (125 U/mL) during 18h were incubated in the absence or presence of CAT (20,000 U/mL) or L-NMMA (450 U/mL), challenged concomitantly with *P. brasiliensis* during 4h, and assessed for fungicidal activity *in vitro*. Results are expressed as Mean (M) \pm SEM of 11 subjects

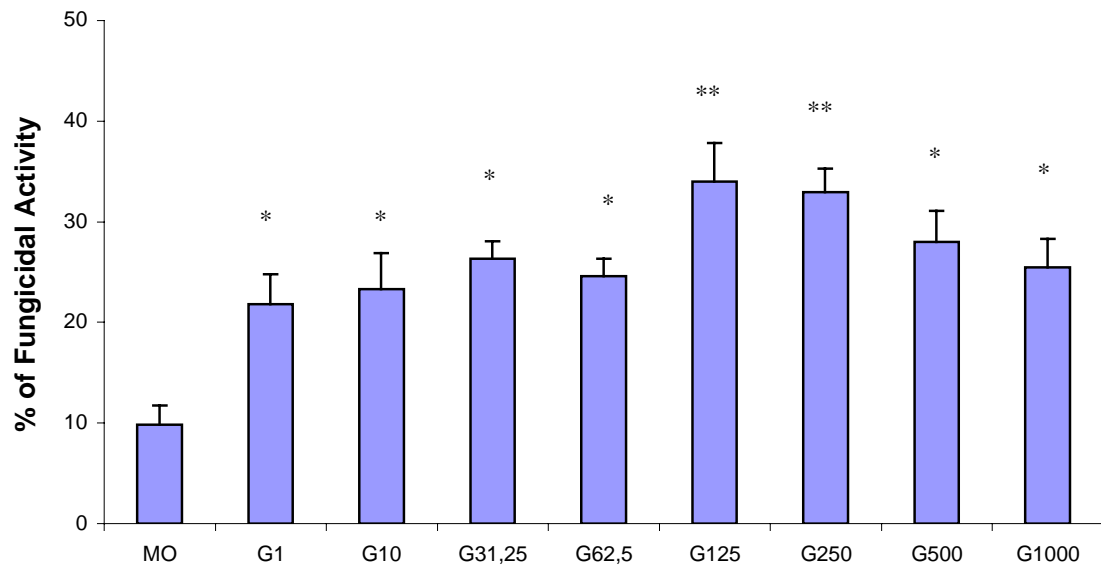
FIG. 3. Monocyte-derived macrophages (2×10^6 /mL) incubated with CTCM for 7 days (M \emptyset) were activated with GM-CSF (G) different concentrations (1, 10, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 and 1000 U/mL) during 18h. Following, they were challenged with *P. brasiliensis* during 4h and assessed for fungicidal activity *in vitro*. Results are expressed as Mean (M) \pm SEM of 8 subjects

FIG. 4. Monocyte-derived macrophages (2×10^6 /mL) incubated with CTCM for 7 days (M \emptyset) were activated with GM-CSF during 18h (GM-CSF); preincubated in the absence or presence of CAT (20000U/mL) or L-NMMA (450U/mL) and challenged concomitantly with *P. brasiliensis* during 4h. Following, they were assessed for fungicidal activity *in vitro*. Results are expressed as Mean (M) \pm SEM of 8 subjects

FIG. 5. Monocyte-derived macrophages (2×10^6 /mL) by incubation in the presence of GM-CSF for 7 days (G-M \emptyset) were activated with GM-CSF (G) in different concentrations (1, 10, 31,25, 62,5, 125, 250, 500 and 1000 U/mL) during 18h. Following, they were challenged with *P. brasiliensis* during 4h and assessed for fungicidal activity *in vitro*. Results are expressed as Mean (M) \pm SEM of 8 subjects

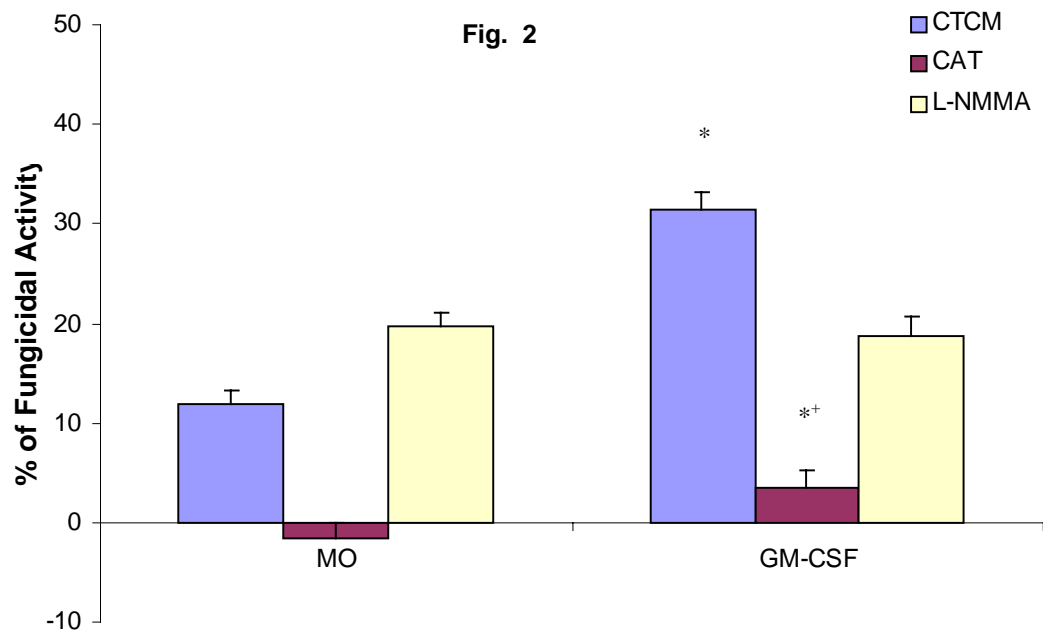
FIG. 6. Monocyte-derived macrophages (2×10^6 /mL) by incubation with GM-CSF 250 U/mL for 7 days (G-M \emptyset) were activated with GM-CSF 125 U/mL by 18h and preincubated in the presence of scavengers, CAT (20000U/mL) or L-NMMA (450U/mL), challenged concomitantly with *P. brasiliensis* during 4h, and assessed for fungicidal activity *in vitro*. The results are expressed as Mean (M) \pm SEM of 8 subjects

Fig. 1

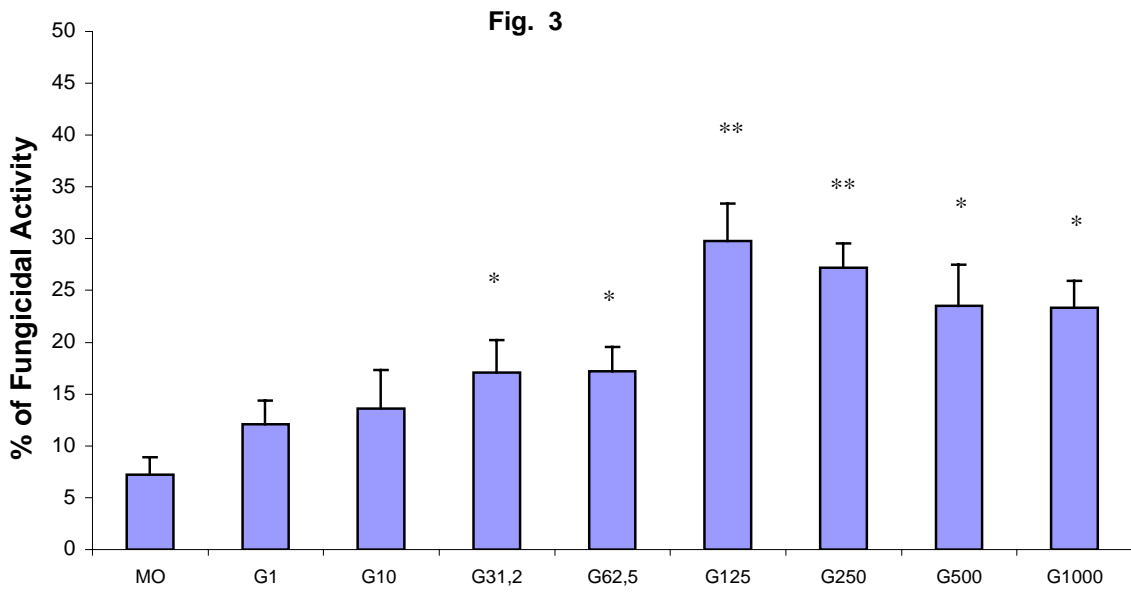


* $p < 0,05$ vs MO, ** $p < 0,01$ vs MO

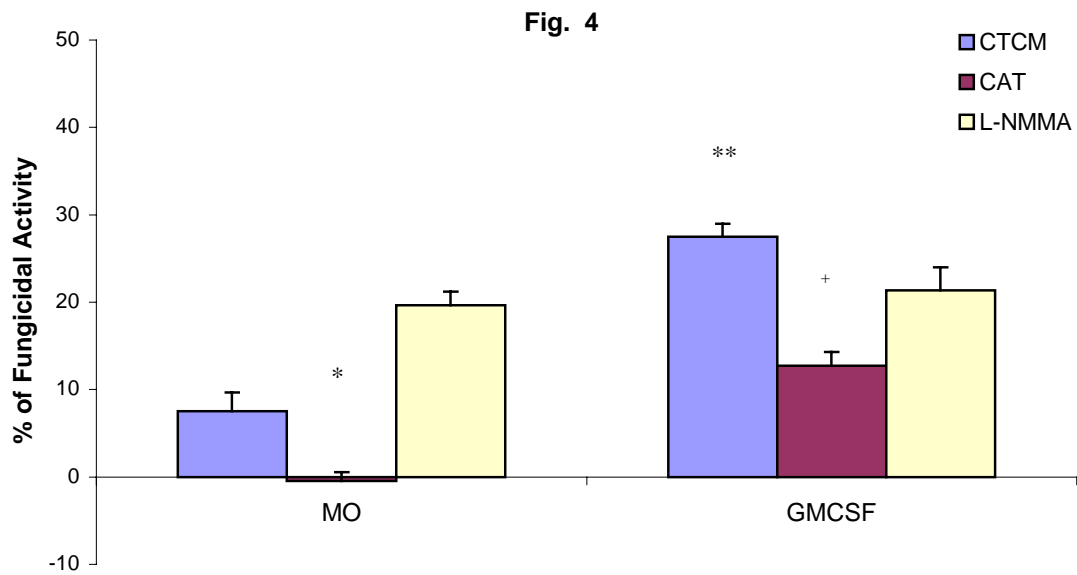
Fig. 2



* $p < 0,05$ vs MO, + $p < 0,05$ vs MO+GM-CSF

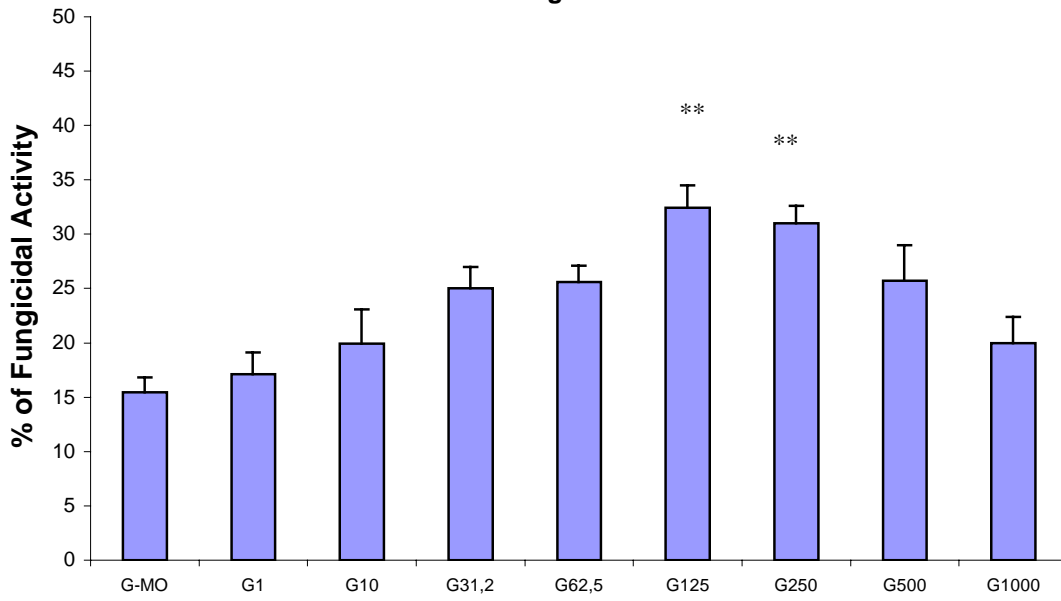


* $p < 0,05$ vs $M\emptyset$, ** $p < 0,01$ vs $M\emptyset$



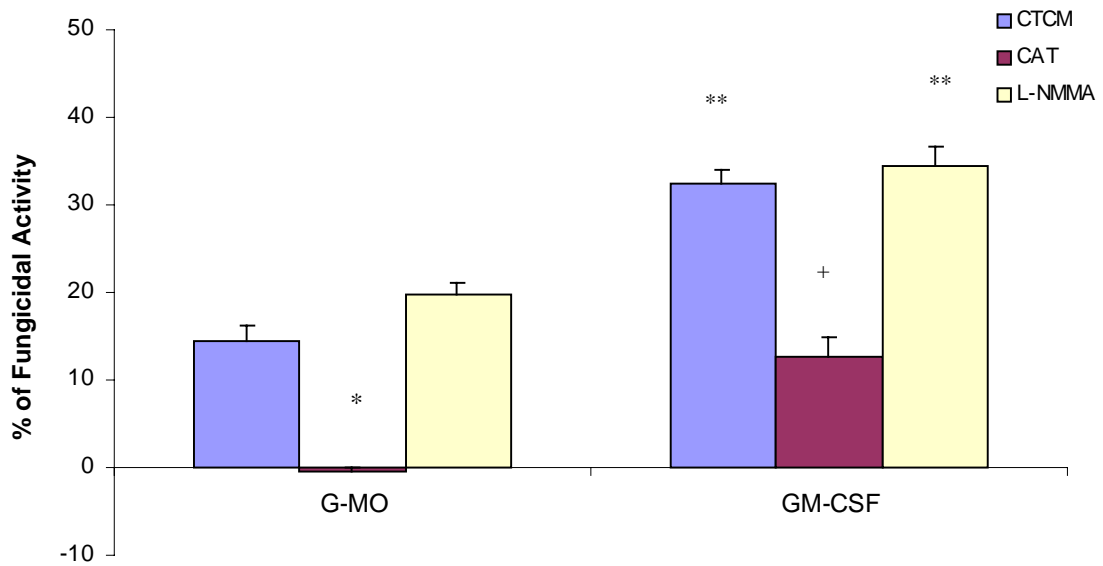
* $p < 0,05$ vs $M\emptyset$, ** $p < 0,01$ vs $M\emptyset$, + $p < 0,05$ vs $M\emptyset + GM-CSF$

Fig. 5



**p<0,01 vs G-MØ

Fig. 6



*p<0,05 vs G-MØ, **p<0,01 vs G-MØ, +p<0,05 vs G-MØ+GM-CSF

LEGENDS FOR TABLES

Table 1. Production of H₂O₂ and NO₂⁻ in cocultures of monocytes preactivated with GM-CSF (125U/mL) during 18h, before the challenge with *P. brasiliensis* during 4h, in absence or presence of scavenger of H₂O₂ release (CAT) or inhibitor of NO production (L-NMMA). Results are expressed as M±SEM of 8 experiments

Tab. 2. Production of H₂O₂ and NO₂⁻ in cocultures of monocyte-derived macrophages (MØ), preactivated with GM-CSF (125U/mL) during 18h before the challenge with *P. brasiliensis* during 4h, in absence or presence of scavenger of H₂O₂ (CAT) or inhibitor of NO (L-NMMA) release. Results are expressed as M±SEM of 8 experiments

Tab. 3. Production of H₂O₂ and NO₂⁻ in cocultures of monocyte-derived macrophages in the presence of GM-CSF for 7 days (G-MØ), preactivated with GM-CSF (125U/mL) during 18h before the challenge with *P. brasiliensis* during 4h, in absence or presence of scavenger of H₂O₂ (CAT) or inhibitor of NO (L-NMMA) release. Results are expressed as M±SEM of 8 experiments

Tab. 1.

Monocytes treatment	H ₂ O ₂ release (nmoles/2x10 ⁵ cells)	NO ₂ ⁻ release (µmoles/2x10 ⁵ cells)
MO	1.97±0.43	2.38±0.75
MO+ CAT/L-NMMA*	0.55±0.12♦	1.64±0.45+♦
MO+ Pb	0.81±0.24+	1.46±0.49+
MO + Pb + CAT/L-NMMA	0.34±0.08♦	1.19±0.31+♦
MO + GM-CSF	3.13±0.63+•	2.54±0.69
MO + GM-CSF + CAT/L-NMMA	0.92±0.46♦	1.84±0.51+♦
MO + GM-CSF + Pb	2.88±0.52+•	1.39±0.52+
MO + GM-CSF + Pb + CAT/L-NMMA	1.12±0.44♦	1.16±0.39+♦

+ = p<0,05 vs MO; • = p<0,05 vs MO+Pb, ♦ = p<0,05 vs cocultures without CAT or L-NMMA. * = (CAT/L-NMMA) = CAT was used for H₂O₂ assays, and L-NMMA was used for NO₂⁻ assays. MO = Monocytes cultured only with CTCM; MO+Pb = MO challenged with Pb; MO+GM-CSF = MO preactivated with GM-CSF 125U/mL

Tab. 2.

Monocytes treatment	H₂O₂ release (nmoles/2x10⁵ cells)	NO₂⁻ release (μmoles/2x10⁵ cells)
MØ	1.34±0.53	3.17±0.98
MØ+ CAT/L-NMMA*	0.91±0.31+♦	1.94±0.47+♦
MØ+ Pb	0.71±0.23+	2.46±0.53+
MØ + Pb + CAT/L-NMMA	0.39±0.12+♦	1.42±0.41b+♦
MØ + GM-CSF	2.33±0.64+•	3.03±0.91
MØ + GM-CSF + CAT/L-NMMA	1.02±0.36♦	2.1±0.44a+♦
MØ + GM-CSF + Pb	2.17±0.6+•	1.89±0.39+
MØ + GM-CSF + Pb + CAT/L-NMMA	0.89±0.27+♦	1.22±0.27+♦

+ = p<0,05 vs MØ; • = p<0,05 vs MØ+Pb, ♦ = p<0,05 vs cocultures without CAT or L-NMMA. * (CAT/L-NMMA) = CAT was used in cultures for H₂O₂ dosage assays, and L-NMMA was used in cultures for NO₂⁻ dosage assays. MØ = Macrophages cultured only with CTCM during 7 days; MØ+Pb = MØ challenged with Pb; MO+GM-CSF = MØ preactivated with GM-CSF 125U/mL

Tab. 3.

Monocytes treatment	H₂O₂ release (nmoles/2x10⁵ cells)	NO₂⁻ release (μmoles / 2x10⁵ cells)
G-MØ	1.82±0.63	2.93±1.05
G-MØ+ CAT/L-NMMA	0.41±0.17+♦	1.35±0.85+♦
G-MØ+ Pb	0.82±0.24+	1.23±0.71+
G-MØ + Pb + CAT/L-NMMA	0.31±0.12+♦	0.77±0.25+♦
G-MØ + GM-CSF	3.71±0.94+•	3.22±0.97
G-MØ + GM-CSF + CAT/L-NMMA	2.14±0.6♦	2.74±0.89♦
G-MØ + GM-CSF + Pb	2.83±0.73+•	0.97±0.21+
G-MØ + GM-CSF + Pb + CAT/L-NMMA	1.68±0.13♦	1.21±0.4+♦

+ = p<0,05 vs MØ; • = p<0,05 vs MØ+Pb, ♦ = p<0,05 vs cocultures without CAT or L-NMMA. * (CAT/L-NMMA) = CAT was used in cultures for H₂O₂ dosage, and L-NMMA was used in cultures for NO₂⁻ dosage. G-MØ = Macrophages cultured in CTCM+GM-CSF 250 U/mL during 7 days; G-MØ+Pb = G-MØ challenged with Pb; G-MØ+GM-CSF = G-MØ preactivated with GM-CSF 125U/mL

REFERENCES

1. FRANCO, M, MENDES, RP, MOSCARDI-BACCHI, M, REZKALLAH-IWASSO, MT, MONTENEGRO, MR. Paracoccidioidomycosis. *Bailliere's Clin Trop Med Commun Dis*, 1989, 4:185-220
2. SAN-BLÁS, F, SAN-BLÁS, G. *Paaracoccidioides brasiliensis*. In: SZANISZLO, PJ. *Fungal Dimorphism*. New York: Plenum, 1985, p. 93-120
3. BRUMMER, E, SUN, SH, HARRISON, JL, PERLMAN, AM, PHILPOTT, DE, STEVENS, DA. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. *Infect. Immun.*, 58:2628-34, 1990
4. RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J. Med. Vet. Mycol.*, 23: 323-34, 1985.
5. MOONIS, M., AHMAD, I., BOCHHOWOT, B.W. Macrophages in host defence- An overview. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 29:115-22, 1992.
6. BRUMMER, E, HANSON, LH, STEVENS, DA. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. *J. Immunol.*, 140:2786-9, 1988a
7. BRUMMER, E, HANSON, LH, STEVENS, DA. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for non-oxidative mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.*, 10:945-52, 1988b.
8. 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.*, 57:2289-94, 1989.

9. GONZALEZ A, GREGORI W, VELEZ D, RESTREPO A, CANO L. Nitric oxide participation in the mechanism of gamma-interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.*, 68:2546-52, 2000
10. CALVI SA, PERAÇOLI MTS, MENDES RP, MACHADO JM, FECCHIO D, MARQUES SA, SOARES AMVC. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infection* 2002. (in press)
11. CARMO, JPM, PERAÇOLI, MTS, CALVI, SA, DIAS, LA, TAVIAN, EG, SOARES, AMVC. Killing of high-virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes: the role of oxygen intermediates. *Ann. Rev. Biom. Sci. (Special Issue)* : 93, 2002.
12. ARMITAGE, JO. Emerging applications of recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood*. 92(12):4491-4508, 1998.
13. JONES, TC. Use of Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) in prevention and treatment of fungal infections. *Eur. J. Canc.* 35(3):S8-S10, 1999.
14. WILLIAMS, MA. GM-CSF and stimulation of monocyte/macrophage function. *In vivo* relevance and *in vitro* observations. *Eur. J. Canc.* 35(3):S18-S22, 1999.
15. WILLIAMS, MA, KELSEY, SM, COLLIN, PW, GUTTERIDGE CN, NEWLAND AC. Administration of rHuGM-CSF activates monocyte reactive oxygen species secretion and adhesion molecule expression *in vivo* in patients following high-dose chemotherapy. *Br. J. Haematol.* 90:31-38, 1995.

16. GASSON, JC. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77:1131-1150, 1991.
17. SMITH, PD, LAMERSON, CL, BANKS, SM, SAINI, SS, WAHL, LM, CALDERONE, RA, WAHL, SM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments human monocyte fungicidal activity for *Candida albicans*. *J. Inf. Dis.* 161:999-1005, 1990.
18. ROLIDES, E, SEIN, T, HOLMES, A, BLAKE, C, PIZZO, PA, WALSH, TJ. Effects of macrophage colony-stimulating factor on antifungal activity of mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *J. Inf. Dis.* 172, 1028-134, 1995
19. ROILIDES E, BLAKE C, HOLMES A, PIZZO PA, WALSH TJ: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN- γ prevent dexamethasone-induced immunosuppression of antifungal monocyte activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J. Med. Vet. Mycol.* 34:63, 1996.
20. NEWMAN SL, GOOTEE L. Colony-stimulating factors activate human macrophages to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum* yeasts. *Infect. Immun.* 60:4593-600, 1992
21. DEEPE, JR., GIBBONS, R, WOODWARD, E. Neutralization of endogenous Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*. *J. Immun.*, 163: 4985-4993,1999
22. COLLINS HL, BANCROFT, GJ. Cytokine enhancement of complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of tumor necrosis factor- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Eur. J. Immunol.* 22:1447-1453, 1992

23. REED, SG, NATHAN, PIHL, DL, RODRICKS, P, SHANEBECK, K, CONLON PJ, GRABSTEINS, KH. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. J. Exp. Med. 166:1734-42, 1987
24. DENIS, M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill virulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. J. Leuk. Biol Res., 48:380-7,1991a
25. BLANCHARD, K, MICHELINI-NORRIDS, MB, PEARSON, CA, MCMILLEN, S, DJEU, JY. Production of Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) by monocytes and large granular lymphocytes stimulated with *Mycobacterium avium-M. intracellulare*: activation of bactericidal activity by GM-CSF. Inf Immun., 59(7):2396-402, 1991
26. DENIS, M. Modulation of *Mycobacterium lepraemurium* Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium*. J. Leuk. Biol Res., 22:205-12,1991b
27. SINGER-VERMES, L.M., M.C. CIAVAGLIA, S.S. KASHINO, AND V.L.G. CALICH. The source of growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Med. Vet. Mycol. 30: 261-264, 1992.
28. FAVA-NETTO, C., VEGAS, V.S., SCIANNAMEA, I.M., GUARNIERI, D.B. Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*: Estudo do tempo de cultivo do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 11:77-81, 1969.

29. BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest., suppl., 97:77-89, 1968.
30. PICK, G, KEISARI, A. A simple colorimetric method for measured of hydrogen peroxidase produced by cells in culture. J. Immunol. Methods, 38:161-72, 1980.
31. 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. Meth., 46:211-26, 1981.
32. GREEN, LC, WAGNER, DA, GLOGOWSKI, J, SKIPPER, PL, WISHNOK, JS, TANNENBAUM, SR. Analysis of nitrate, nitrite, and ¹⁵nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 126:131-138. 1982
33. CARMO, JPM, PERAÇOLI, MTS, CALVI, SA, DIAS, LA, RODRIGUES, DR, SOARES, AMVC. Inhibition of human monocyte oxidative burst by virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 34(II):143-4, 2001.
34. SASADA, M, KUBO, A, NISHIMURA, T, KAKITA, T, MORIGUCHI, T, YAMAMOTO, K, UCHINO, H. Candidacidal activity of monocyte-derived human macrophages: relationship between *Candida* killing and oxygen radical generation by human macrophages. J. Leuk. Biol. 41:289-294, 1987
35. LEHN, M, WEISER, WY, ENGELHORN, S, GILLIS, S, REMOLD, HG. IL-4 inhibits H₂O₂ production and antileishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by IFN- γ . J. Immunol., 143:3020-4, 1989
36. VAZQUEZ-TORRES, A, JONES-CARSON, J, BALISH, E. Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric-oxide producing macrophages. Infect. Immun., 64, 3127-3133, 1995

37. DENIS, M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? J. Leuk. Biol., 55, 682-684, 1994
38. MONCADA, S., HIGGS, A. The L-arginine nitric oxide pathway. N. Engl. J. Med., 329:2002-12, 1993.
39. 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., 59, 2291-2296, 1993
40. 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. 34(II):145, 2001
41. MaCKMICKING, J., XIE, Q., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol., 15:323-50, 1997.
42. ALBINA, JE. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? J. Leuk. Biol., 58:643-649, 1995
43. DJEU, JY, BLANCHARD, DK. Regulation of human polymorphonuclear neutrophils (PMN) activity against *Candida albicans* by large granular lymphocytes via release of a PMN-activating factor. J. Immunol. 139:2761-2767 1987.
44. BLANCHARD, DK, NORRIS, BM, DJEU, JY. Production of Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by large granular lymphocytes stimulated with *Candida albicans*: role in activation of human neutrophil function. Blood, 77(10):2259-2265, 1991

45. KREUTZ, M, HENNEMANN, B, ACKERMANN, GRAGE-GRIEBENOW, E, KRAUSE, SW. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates lipopolysaccharide (LPS)-binding and LPS-response of human macrophages: inverse regulation of tumour necrosis factor- α and interleukin-10. *Immunol.*, 98:491-6, 1999

46. TASCINI, C, VECCHIARELLI, A, PREZIOSI, R, FRANCISCI, D, BISTONI, F, BALDELLI, F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and fluconazol enhance anti-cryptococcal activity of monocytes from AIDS patients and normal subjects. *AIDS*, 13(1):49-55, 1999.