

**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
UNESP Faculdade de Medicina de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais**

**Efeito da interleucina-15 sobre a
atividade fungicida de neutrófilos
humanos contra
*Paracoccidioides brasiliensis***

Elisandra Garcia Tavian

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Doenças
Tropicais da Faculdade de Medicina
de Botucatu - UNESP, para obtenção
do título de mestre**

**Orientadora: Prof^a Adjunta Ângela Maria
Victoriano de Campos Soares**

**Botucatu
2007**

Elisandra Garcia Tavian

**“EFEITO DA IL-15 SOBRE A
ATIVIDADE FUNGICIDA DE
NEUTRÓFILOS HUMANOS CONTRA
Paracoccidioides brasiliensis”**

**Orientadora: Prof^a Adj. Ângela Maria
Victoriano de Campos Soares**

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

Botucatu
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Tavian, Elisandra Garcia.

Efeito da IL-15 sobre atividade fungicida de neutrófilos humanos contra *Paracoccidioides brasiliensis* / Elisandra Garcia Tavian. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação de Mestrado (mestrado – Doenças Tropicais) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2007

Orientadora: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares

1.Paracoccidioidomicose – Aspectos imunológicos 2.
Paracoccidioides brasiliensis 3. Fungicidas

CDD

616.969

Palavras-chave: Ânion superóxido (O_2^-); Atividade fungicida; Interleucina-15; Neutrófilos; *Paracoccidioides brasiliensis* ; Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Mensagem



Certeza

***De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de
terminar...***

***Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro...***

(Fernando Sabino)

Dedicatória



Dedico esse trabalho:

Aos meus pais (in memorian), Ana e Jair João Tavian que me deram a vida.

Aos meus tios amados e queridos:

Terezinha (in memorian) e Antonio Garcia Bono, que me ensinaram a viver com dignidade.

Patrícia e Hélio Garcia Bono pelo respeito e confiança.

Aos meus primos queridos Marco Antonio, Carlos Alberto, Cristiane, Júlia e Mateus pelo carinho e dedicação.

À minha orientadora

***Professora Dr^a Ângela Maria Victoriano de Campos
Soares***

*Pelo exemplo de determinação pessoal e profissional, nessa
trajetória que me conduziram ao desenvolvimento e
amadurecimento.*

Minha eterna gratidão e carinho.

Agradecimentos



Agradeço à todos que participaram da minha trajetória com muito carinho e admiração

À Deus.

A toda minha família, que sempre torceram por mim.

Aos meus queridos amigos Ana Cristina, Andréia, Alessandra, Valquíria, Guilherme, Laís, Luzia, Luciana, Mariana, Daniela e Maria Aparecida, Antonio Marcos pelos momentos de conforto.

Às minhas amigas e companheiras Daniela e Gisela, pelo convívio familiar, no qual formaram-se laços mais que co-sangüíneos.

Aos amigos do Departamento Keila, Tiago, Paula Regina, Camila, Érika, Magda, Sérgio, Renata, Naila, Graziela, Priscila, Vanessa, Juliana, Helan, Bruno, Sandra, Assis, Raquel, Fabiane, Claudio, Ana Carolina, Michele e Marcus Vinicius pela agradável convivência.

Aos amigos do Laboratório Ana Paula, Michele, Guilherme, Luciane, Ariany e Diego pela ajuda, incentivo, compreensão e companheirismo na realização desse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia pela dedicação diária: Lula, Sônia, Luis e Nice.

Aos funcionários do Departamento de Doenças Tropicais: Solange e José e aos funcionários da Pós-Graduação: Natanael, Janete e Regina pela atenção.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia Prof^a Alexandrina, Prof Sílvio, Prof Ramon pela dedicação e compreensão e em especial à Prof^a Maria Terezinha pela contribuição e enriquecimento científico na realização desse trabalho.

À Prof^a Sueli do Departamento de Doenças Tropicais e ao Prof^o José Maurício do Departamento de Imunologia pela valiosa colaboração na banca de qualificação.

Ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, em especial à Prof^a Jussara, coordenadora do programa.

Sumário



1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	11
3.MATERIAL DE MÉTODOS	13
3.1 INDIVÍDUOS TESTADOS.....	14
3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE NEUTRÓFILOS.....	14
3.3 CULTIVO DO <i>P. brasiliensis</i>	15
3.4 TESTE DE VIABILIDADE E OBTENÇÃO DO <i>P. brasiliens</i>	15
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA.....	16
3.6 DETERMINAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	17
3.7 DETERMINAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO.....	18
3.8 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTES DE CULTURAS DE NEUTRÓFILOS.....	18
3.9 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS.....	19
3.9.1 DETERMINAÇÃO DO TNF- α	19
3.9.2 DETERMINAÇÃO DA IL-8.....	20
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4.RESULTADOS	21
4.1 EFEITO DA IL-15 SOBRE A ATIVIDADE FUNGICIDA DE EUTRÓFILOS HUMANOS.....	22
4.2 EFEITO DA IL-15 SOBRE A PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO NEUTRÓFILOS HUMANOS DESAFIADOS COM Pb18.....	24
4.3 EFEITO DA IL-15 SOBRE A PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ POR NEUTRÓFILOS HUMANOS DESAFIADOS COM Pb18.....	26
4.4 EFEITO DA CATALASE (CAT) SOBRE A ATIVIDADE FUNGICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS CONTRA O Pb18, INDUZIDA PELA IL-5.....	28
4.5 EFEITO DA IL-15 SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF- α E IL-8 POR NEUTRÓFILOS HUMANOS DESAFIADOS COM Pb18.....	30
4.5.1 DETERMINAÇÃO DE TNF- α	30
4.5.2 DETERMINAÇÃO DE IL-8.....	30
5.DISSCUSSÃO	32
6.CONCLUSÕES	38
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
8.RESUMO	53
9.ABSTRACT	56

1. Introdução



A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica que se manifesta endemicamente na maioria dos países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo imperfeito e dimórfico, que se apresenta sob a forma de levedura *in vivo* e quando cultivado a 37°C em meios de cultura enriquecidos, e na forma de micélio à temperatura ambiente com variação de 4 a 28°C ¹.

Afeta principalmente trabalhadores rurais, que estão constantemente em contato com a vegetação e o solo. Na forma aguda da doença, jovens de ambos os sexos são afetados proporcionalmente. Porém, na forma crônica do adulto há predominância de homens com número reduzido de mulheres afetadas, sendo esse processo relacionado a um efeito protetor promovido pelos hormônios femininos. Estudos *in vitro* demonstram que estrógenos atuam inibindo a transformação de micélios ou conídios em leveduras, evento que proporciona a instalação da infecção ^{2,3}. Paralelamente, foi demonstrada a presença de receptores para estrógeno tanto na fase micelial como na leveduriforme do fungo ^{4,5}.

Acredita-se que os agentes infectantes do *P. brasiliensis* sejam propágulos micelianos presentes em água, plantas e solo, que penetrariam no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primeiramente os pulmões, provocando o chamado complexo primário pulmonar. Esse processo pode evoluir para a cura ou tornar-se latente caracterizando a paracoccidioidomicose-infecção, identificada pela ausência de sinais ou sintomas clínicos, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, que pode ser evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina ⁶. Ao contrário, o processo pode progredir para a paracoccidioidomicose-doença com conseqüente disseminação para outros órgãos como fígado, baço e adrenais pela via linfo-hematogênica ⁷. As manifestações clínicas da micose podem ser agrupadas em dois padrões que definem as formas aguda e crônica da doença. A forma aguda é habitualmente severa, de evolução rápida e compromete o

sistema fagocítico 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 ^{8,9}.

O estabelecimento da doença, disseminação e gravidade dependem de fatores inerentes ao próprio fungo, como sua virulência, composição antigênica, das condições ambientais; e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, e principalmente capacidade de desenvolver uma resposta imune eficaz. Em relação a este fator, estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos específicos e inespecíficos de defesa na determinação da resistência ao *P. brasiliensis* ^{8,10,11,12}.

A imunidade inespecífica ou inata apresenta grande importância no combate a fungos patogênicos. Dentre os vários mecanismos envolvidos nesta resposta, os representados pelas células fagocitárias desempenham papel central na resistência contra esses patógenos, com destaque para a participação na reação inflamatória e na atividade fungicida. Estas funções, no entanto, dependem de mecanismos de ativação dessas células, gerados pela interação com o próprio fungo ou com fatores da resposta imune inespecífica e específica, como a produção de citocinas ^{13,14,15}.

Neste contexto, macrófagos murinos ou monócitos humanos não ativados não apresentam atividade fungicida ou fungistática contra o *P. brasiliensis*, permitindo a multiplicação do mesmo no interior das células. Brummer et al. ¹⁶ demonstraram que macrófagos peritoneais e pulmonares de camundongos normais não ativados *in vitro*, são incapazes de limitar a multiplicação de leveduras do *P. brasiliensis* fagocitadas. As células fúngicas apresentaram intensa multiplicação no interior dos macrófagos, determinando a destruição dessa célula. Os autores discutem que este achado pode ter implicações importantes na patogênese da doença, sugerindo que, *in vivo*, provavelmente, o fungo se multiplique intracelularmente após a ingestão por macrófagos não

ativados, levando à destruição das células e a liberação de inúmeras formas de *P. brasiliensis*.

De forma semelhante, Moscardi-Bacchi et al.¹⁷, utilizando monócitos e macrófagos humanos normais, verificaram que estas células permitem o crescimento e a multiplicação intracelular do *P. brasiliensis*. Essa idéia é reforçada por estudos que avaliaram a capacidade fungicida de macrófagos alveolares de pacientes. Nos indivíduos que apresentavam teste intradérmico positivo a paracoccidioidina, os macrófagos mostraram capacidade de degradar o fungo, enquanto que nos pacientes com paracoccidioidina negativa, essa atividade não foi detectada, indicando que nos pacientes com resposta imune celular adequada, os macrófagos estariam sendo ativados, passando a apresentar atividade contra o fungo¹⁸.

Esses resultados deixam clara a importância da ativação para que as células fagocitárias adquiram atividades antifúngicas. Nesse sentido, macrófagos murinos ativados por IFN- γ ou linfocinas não purificadas, adquirem a capacidade de digerir o fungo, podendo desempenhar funções efectoras importantes contra o *P. brasiliensis*^{19,16}. Cano et al.²⁰ verificaram que macrófagos cultivados em presença de linfocinas obtidas de células de baço de animais imunizados aumentaram a sua capacidade de destruir conídios, assim como inibiram a transformação de conídios em levedura²¹.

No que se refere a células humanas, os resultados obtidos por Moscardi-Bacchi et al.¹⁷ revelam que monócitos e macrófagos de indivíduos normais quando ativados por IFN- γ inibem o crescimento intracelular do *P. brasiliensis*. De forma similar, trabalhos em nosso laboratório mostraram que a pré-incubação de monócitos com IFN- γ não induz essas células a uma eficiente atividade fungicida contra cepa virulenta do *P. brasiliensis*. Essa atividade é adquirida somente após pré-incubação com TNF- α , ou TNF- α mais IFN- γ ²², bem como GM-CSF²³. Quando as células são desafiadas com cepa de baixa virulência, a pré-ativação apenas com IFN- γ é suficiente para aquisição de uma eficiente

atividade fungicida, demonstrando que na dependência da cepa utilizada, o processo de ativação das células fagocitárias pode necessitar de sinais dados por diferentes citocinas.

No que se refere aos mecanismos através dos quais os monócitos e macrófagos ativados exercem sua atividade fungicida, estudos em nosso laboratório demonstraram que a atividade fungicida de monócitos humanos ativados com TNF- α envolve a geração de metabólitos do oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ²⁴. Para os macrófagos murinos, os trabalhos têm demonstrado que a atividade antifúngica de macrófagos ativados com IFN- γ independe do metabolismo oxidativo, ocorrendo a participação dos metabólitos do nitrogênio como o NO ²⁵. No entanto, trabalho recente em nosso laboratório demonstrou que tanto a H₂O₂ como o NO participam da atividade fungicida de macrófagos murinos ativados com TNF- α ou IFN- γ ²⁶.

Os trabalhos citados acima deixam clara a necessidade de um processo de ativação das células mononucleares para a aquisição de atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*. Esse processo pode ocorrer nas primeiras fases de interação do fungo, durante o desenvolvimento de uma resposta inata. As fontes das principais citocinas envolvidas, o IFN- γ e TNF- α , nesta fase, seriam as células NK para o IFN- γ ^{27,28} ou os próprios macrófagos alveolares, no caso do TNF. Segundo Figueiredo et al. ²⁹, tanto cepas de *P. brasiliensis* quanto frações da parede celular, ricas em β -glucanas são capazes de induzir níveis elevados de TNF- α , sendo possível sua detecção em soro de camundongos inoculados por via intraperitoneal com o fungo. As frações e a β -glucana purificada estimularam a secreção *in vitro* de TNF- α por macrófagos murinos, sugerindo que essa citocina é produzida em resposta ao *P. brasiliensis* e regulada por vários constituintes da parede celular do fungo. Calvi et al. ²², estudando pacientes com paracoccidioidomicose, verificaram que a produção de TNF- α por monócitos infectados, *in vitro*, com a cepa de menor virulência (Pb 265), induzia níveis mais elevados de TNF- α em comparação à cepa virulenta (Pb 18). Além disso, níveis mais elevados

dessa citocina apresentaram correlação com a maior atividade fungicida dos monócitos, demonstrando a importância do TNF- α nesse mecanismo. Da mesma forma, a incubação de monócitos humanos com IFN- γ mais fração de parede do *P. brasiliensis* rica em beta glucana, induziu essas células a uma maior produção de TNF- α com conseqüente aquisição de maior atividade fungicida ³⁰. Assim, os níveis dessa citocina poderiam variar na dependência da virulência ou da composição da parede celular da cepa com a qual o indivíduo entra em contato, e conseqüentemente interferir na evolução da doença.

Durante a evolução da infecção, as citocinas ativadoras podem ser geradas por elementos da resposta imune adaptativa, como os linfócitos CD₄ Th1. Vários trabalhos mostram que uma resposta protetora contra o *P. brasiliensis* depende de um padrão de resposta Th1 envolvendo como principais citocinas o IFN- γ , TNF- α e IL-12 ^{31,32,33}.

Os trabalhos acima citados mostram o interesse da literatura em estabelecer os fatores de ativação e desativação, representados pelas citocinas, sobre as células fagocitárias mononucleares murinas e humanas, desafiadas com o *P. brasiliensis*. No entanto, outras células que merecem ser estudadas em relação a esses processos, são os neutrófilos, uma vez que a literatura tem chamado a atenção para o envolvimento dinâmico dessas células na defesa do hospedeiro contra os diversos microrganismos.

Assim, sugere-se que logo após a infecção, o *P. brasiliensis* interaja com os macrófagos alveolares induzindo a liberação de quimiocinas, que atraem neutrófilos. Nesse sentido, peptídeos de baixo peso molecular, detectados no sobrenadante de macrófagos peritoneais murinos incubados com o *P. brasiliensis* são capazes de atrair neutrófilos para a cavidade peritoneal ³⁴. Outros estudos mostraram uma associação entre as quimiocinas KC e MIP-1 α (CCL3) e a infiltração de neutrófilos durante a fase aguda da infecção ³⁵. Provavelmente como resultado desses processos, uma infiltração maciça destas células têm sido encontrada nos sítios inflamatórios durante as fases iniciais da doença ³⁶,

em lesões granulomatosas, com centros supurativos presentes na fase crônica³⁷ e naquelas observadas nas diferentes fases em animais de experimentação^{10,38,39}. Estudos utilizando animais depletados de neutrófilos durante as primeiras fases da infecção mostraram que essas células são extremamente importantes para os mecanismos de defesa do hospedeiro e que seus efeitos dependem do padrão genético do hospedeiro, sendo mais pronunciado nos animais com maior suscetibilidade⁴⁰.

Vários trabalhos têm demonstrado a capacidade estimuladora de várias citocinas sobre o "burst" respiratório ou atividade citotóxica de neutrófilos. Entre elas podem ser citadas IFN- γ , GM-CSF, IL-8, TNF- α e IL-15⁴¹⁻⁴⁷.

A necessidade de um processo de ativação de neutrófilos para destruição de *P. brasiliensis* tem sido detectada em alguns trabalhos. McEwen et al.⁴⁸, demonstraram que neutrófilos de camundongos sensibilizados com *P. brasiliensis* e estimulados com o fungo morto por via intraperitoneal, apresentaram maior atividade fungicida *in vitro*.

Meloni-Bruneri et al.⁴⁹, desenvolveram trabalho utilizando camundongos suscetíveis e resistentes à doença, infectados por via intraperitoneal e subcutânea "air pouch". Os resultados demonstram que neutrófilos de camundongos resistentes encontram-se ativados e apresentam maior atividade fungicida contra o fungo, quando comparados com células de animais suscetíveis. Os autores ainda discutem que um intenso infiltrado neutrofílico quando da inoculação via "air pouch" esteve associado com resposta de hipersensibilidade tardia em ambas as linhagens. No entanto, outros estudos mostraram que neutrófilos humanos não ativados apresentam atividade fungistática⁵⁰ e fungicida contra o *P. brasiliensis*⁵¹. No entanto, esses efeitos antifúngicos são significativamente aumentados após a ativação com IFN- γ , IL-1 e GM-CSF. As citocinas TNF- α e IL-8 não apresentaram efeito sobre essas atividades^{50,52}.

Em nosso laboratório, realizamos trabalho semelhante com o objetivo de avaliar o efeito de citocinas como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF sobre a atividade fungicida de neutrófilos humanos desafiados *in vitro* com cepa de alta virulência do fungo ⁵³. Além disso, os mecanismos antifúngicos efetores destas células foram avaliados, sendo este o primeiro trabalho na literatura com esse objetivo. Nossos resultados mostraram que neutrófilos não ativados não desenvolvem atividade antifúngica. No entanto, uma significativa atividade fungicida é obtida após a incubação com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF. Adicionalmente, os resultados mostraram a participação do ânion superóxido (O_2^-) e H_2O_2 como moléculas efetoras dos neutrófilos ativados contra o fungo.

Em conclusão, os resultados dos trabalhos citados acima reforçam a idéia de que os neutrófilos possuem um envolvimento dinâmico na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* uma vez que as atividades dessas células podem ser reguladas por elementos da resposta imune inata e específica. Dentro deste contexto, outras citocinas merecem ser investigadas no sentido de avaliar seus efeitos reguladores sobre essas células.

A IL-15 é uma citocina produzida por macrófagos e outras células não linfóides, incluindo os fibroblastos, queratinócitos, placenta e células endoteliais ⁵⁴. Essa citocina possui atividades biológicas semelhantes às da IL-2 atuando sobre várias células do sistema imune como os linfócitos T, T $\gamma \delta$, B, células natural killer, eosinófilos, mas principalmente monócitos e neutrófilos. A similaridade funcional entre IL-15 e IL-2 pode ser explicada pela semelhança entre as subunidades dos receptores para essas citocinas.

A interleucina-15 (IL-15) compartilha com a interleucina-2 (IL-2) as cadeias beta (IL-2R β) e gamma (IL-2R γ), sendo a cadeia alfa específica para IL-15. Apesar das similaridades entre IL-15 e IL-2, essas citocinas regulam diferentes mecanismos do sistema imune. A IL-2 modula basicamente a resposta imune adquirida dependente de células T. Já, a participação da IL-15 na resposta adaptativa, que envolve

principalmente a indução de uma resposta Th1, resulta de um amplo espectro das ações imunoregulatórias dessa citocina, na resposta imune inata ⁵⁵. Assim, durante uma resposta imune inata, essa citocina induz o desenvolvimento e ativa as células NK, NKT, T γ δ e as fagocitárias como monócitos e neutrófilos ⁵⁵⁻⁶⁴.

As ações da IL-15 na resposta imune específica e inata fazem com que essa citocina tenha um importante envolvimento em infecções murinas e humanas por vários microrganismos, incluindo *Toxoplasma gondii* ⁶⁵, *Leishmania infantum* ^{59,66}, *Cryptococcus neoformans* ⁶⁴, *Candida albicans*, ⁶¹, *Aspergillus fumigatus* ⁶⁷, *Fusarium* spp e *Scedosporium* spp ⁶⁸, *Salmonella choleraesuis* ⁵⁸, *Escherichia coli* ⁶⁹, *Listeria monocytogenes* ⁷⁰, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* ^{60,71,72} e diferentes vírus como HIV ⁷³, herpes-vírus ^{74,75} ou vírus da hepatite C ⁷⁶.

No caso de infecções por microrganismos intracelulares como algumas bactérias, protozoários e fungos, destacamos o papel da IL-15 no mecanismo de ativação de monócitos/macrófagos e neutrófilos, que garante um importante mecanismo de defesa já em períodos precoces da infecção durante o desenvolvimento da resposta imune inata. Propõe-se que a IL-15, IL-12 e IL-18 produzidas por macrófagos e células dendríticas infectados, atuam em sinergismo ativando células NK que aumentam a sua atividade citotóxica e liberam IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, citocinas ativadoras de monócitos e macrófagos. Esse processo de ativação pode ocorrer também via liberação de IFN- γ por células NKT e gamma delta, estimuladas por IL-15 ^{77,63}. Além disso, a atuação da IL-15 em sinergismo com as outras citocinas como a IL-18 e IL-12, com conseqüente liberação de IFN- γ durante a resposta imune inata é responsável pela indução da resposta imune específica de células Th1 e CD8⁺ contra microrganismos intracelulares ⁶³.

Os trabalhos relatados acima mostram a importância da IL-15 no processo de ativação das células fagocitárias atuando indiretamente, através da indução da produção de IFN- γ por células da imunidade inata.

No entanto vários outros trabalhos mostram a capacidade da IL-15 em ativar essas células diretamente, de uma forma autócrina.

Assim, essa citocina induz aumento na produção de quimiocinas como a IL-8 e proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) levando a um acúmulo de neutrófilos e monócitos nos sítios inflamatórios ⁶². Adicionalmente, vários trabalhos têm demonstrado que macrófagos monócitos ou neutrófilos primados com IL-15 e desafiados com microrganismos, particularmente fungos como *C. albicans* ^{61,78}, *C. neoformans* ⁶⁴, *A. fumigatus* ⁶⁷, *Fusarium* spp e *Scedosporium* spp ⁶⁸ aumentam significativamente sua atividade microbicida. Considerando os resultados acima, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de trabalhos com objetivo de verificar o papel da IL-15 nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*, com enfoque para a sua atuação sobre as células fagocitárias.

2. Objetivos



- 1- Avaliar o efeito da IL-15 sobre a atividade fungicida de neutrófilos humanos desafiados com cepa virulenta do *P. brasiliensis*.
 - 2- Avaliar se a atividade fungicida induzida pela IL-15 ocorreria via liberação de metabólitos do oxigênio como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.
 - 3- Avaliar se essa atividade estaria associada a alterações nos níveis das citocinas IL-8 e TNF- α .
-

3. Material e Métodos



3.1 INDIVÍDUOS TESTADOS

Foram avaliados neutrófilos do sangue periférico de 20 indivíduos normais, doadores do banco de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. O consentimento dos indivíduos para participação no presente trabalho foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (OF. 394/2005-CEP).

3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Sangue periférico de indivíduos normais foi obtido por punção venosa, sendo 20mL colocados em tubos de ensaio estéreis contendo 20 U/mL de heparina (Liquemine-Roche). As amostras foram deixadas em repouso por 30 minutos em 20mL de solução de dextran 3% diluído em NaCl 0,85% para sedimentação das hemácias. O sobrenadante rico em células foi centrifugado por 5 minutos a 200 xg. O "pellet" obtido foi ressuspenso em 5mL de PBS, pH 7.2. A suspensão celular foi transferida para um gradiente de Ficoll-Hypaque. O sedimento contendo polimorfonucleares e hemáceas foi lavado com 0,2% de NaCl por 1 minuto, e 1,6% de NaCl por 5 minutos e centrifugados a 200 xg para lise das hemáceas. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Após esse processo, a suspensão celular foi ressuspensa em meio de cultura de células completo: MCCC (RPMI 1640 Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y.), suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co, ST Louis, MO, USA), 40 ug/mL de gentamicina e 10% de soro autólogo inativado, sendo a identificação e a viabilidade celular realizada adicionando 50uL da suspensão celular em 50uL do corante azul tripan 0,2%. Em seguida, foi ajustada a concentração para 2×10^6 neutrófilos/mL, com posterior plaqueamento da suspensão celular

(100 μ L/orifício) em placas de microculturas de fundo chato com 96 orifícios, para os ensaios de atividade fungicida, dosagem de H₂O₂ e O₂⁻. Nos ensaios para dosagem de citocinas essa mesma suspensão foi distribuída em placas de microculturas de 96 orifícios (100 μ L/orifício). As células foram incubadas durante 18 horas, em tensão de 5% de CO₂ a 37°C, na presença ou não de IL-15 recombinante humana nas diferentes concentrações: 12,5, 25, 50, 100, 250 ng/mL

3.3 CULTIVO DO *P. brasiliensis*

Foi utilizada a cepa de alta virulência de *P. brasiliensis* (Pb18) mantida em nosso laboratório através do cultivo em meio (GPY), contendo 2% de glicose, 1% de peptona e 0,5% de extrato de levedura à 37°C, em tubos de 20x20 mm, com subcultivos semanais. As culturas foram utilizadas após 5 ou 6 dias de cultivo.

3.4 TESTE DE VIABILIDADE E OBTENÇÃO DAS SUSPENSÕES DE *P. brasiliensis*

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas conforme descrito acima. Após o crescimento, essas células foram removidas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4 mm de diâmetro e aproximadamente 10mL de meio RPMI, com posterior homogeneização em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37°C durante 3 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação.

Após este período, os sobrenadantes dessas suspensões foram coletados, sendo alíquotas dos mesmos utilizados para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que apresentaram aspecto brilhante (refringente), uma vez que as células

mortas apresentam coloração escura. Foram utilizadas suspensões com viabilidade maior ou igual a 90%.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA

Após o período de incubação de 18 horas com as diferentes concentrações de IL-15 (conforme descrito no item 3.2), as culturas de neutrófilos foram desafiadas por 4 h, com 0,1mL da suspensão fúngica (4×10^4 fungos/mL : relação fungo/neutrófilo de 1:50) diluída em MCCC acrescido de 10% de soro autólogo fresco, como fonte de complemento para o processo de opsonização. Em alguns experimentos o desafio com o fungo foi realizado na presença ou ausência de catalase (CAT=10000U/mL) ou superóxido dismutase (SOD=450U/mL). Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas as suspensões do fungo em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com os neutrófilos. Após um período de 4 h os sobrenadantes das coculturas foram coletados, e os poços contendo as culturas foram submetidos a diversas lavagens com água destilada. Este processo permite que os neutrófilos sejam removidos da placa, lisados, com conseqüente liberação dos fungos que foram 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 culturas contendo apenas as suspensões do fungo, que foram consideradas como culturas controles.

Ao final do processo, o material obtido, a partir das lavagens com água destilada, das culturas controles e das culturas experimentais resultaram em um volume de 2 mL. Essas suspensões, contendo fungos viáveis ou não foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 20 segundos, seguida de plaqueamento em triplicatas em placas (100 μ L / placa) contendo meio de cultura BHI ágar (OXOID LTD. England), na concentração de 47g/L, acrescido de 4% de soro de cavalo, 50 μ g/mL de gentamicina e 5% de extrato aquoso. O extrato aquoso foi preparado

segundo o método de Kurita et al.⁷⁹, a partir de filtrado de culturas leveduriformes do fungo (cepa 192), cultivadas em meio GPY a 37°C e com agitação (120 rpm) durante 7 dias. A atividade fungicida foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após 10 dias de semeadura e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ AF} = 1 - \left[\frac{\text{média das UFC das placas semeadas com as culturas experimentais}}{\text{média das UFC das placas semeadas com as culturas controles}} \right] \times 100$$

3.6 DETERMINAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂).

A produção de H₂O₂ foi determinada segundo método descrito por Russo et al.⁸⁰. Após o período de incubação de 18 horas com as diferentes concentrações de IL-15 (conforme descrito no item 3.2), as culturas de neutrófilos foram desafiadas por 4 h, com 0,1mL da suspensão fúngica (4X10⁴ fungos /mL : relação fungo/neutrófilo de 1:50) diluída em vermelho fenol contendo 140Mm de NaCl; 10Mm de tampão de fosfato pH 7; 5,5 Mm de dextrose; 0,56 Mm de vermelho fenol; 0,01mg/mL de peroxidase de raiz forte tipo II (Sigma), e 10% de soro autólogo fresco. Após 4 horas, a reação foi interrompida pela adição de 0,01mL de NaOH 1N. As amostras foram ensaiadas com triplicatas e a absorbância foi determinada em leitor automático de ELISA, com filtro de 620nm, contra um branco constituído por solução vermelho fenol de NaOH a 1N. Os resultados das dosagens de H₂O₂ foram expressos em nanomoles de H₂O₂/2x10⁶ células, a partir de curva-padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H₂O₂ em tampão vermelho fenol. Em nossas condições experimentais a curva foi realizada com concentrações de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 e 8.0 nm de H₂O₂.

3.7 DETERMINAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO (O_2^-).

A liberação do ânion superóxido foi determinada segundo método descrito por Russo et al.⁸⁰.

Após o período de incubação de 18 horas com as diferentes concentrações de IL-15 (conforme descrito no item 3.2), os neutrófilos foram desafiados por 4 h, com 0,1mL da suspensão fúngica (4×10^4 fungos/mL : relação fungo/neutrófilo de 1:50) diluída em solução salina de Hank's livre de vermelho fenol, contendo 160µm de citocromo C (Sigma). Foram utilizados como blank da reação o citocromo C diluído. As placas foram incubadas a 37°C e a 5% de CO_2 por 4h e a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 550nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada através da seguinte relação:

$$\text{CONCENTRAÇÃO } O_2^- \text{ (nmol)} = \frac{DO \times 100}{6,3}$$

3.8 OBTENÇÃO DE SOBRENADANTES DE CULTURAS DE NEUTRÓFILOS PARA DOSAGEM DE CITOCINAS.

Após o período de incubação de 18 horas com as diferentes concentrações de IL-15 (conforme descrito no item 3.2), os neutrófilos foram desafiados por 4 h, com 0,1mL da suspensão fúngica (4×10^4 fungos/mL : relação fungo/ neutrófilo de 1:50) diluída em MCCC acrescido de 10% de soro autólogo fresco . Após este período, os sobrenadantes foram aspirados, centrifugados a 400g e alíquotas desse material foram conservadas à -80°C até o momento de sua utilização para dosagem da IL-8 e TNF- α .

3.9 DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS

3.9.1 Determinação de TNF- α

As placas de 96 orifícios e fundo plano (Maxsorb-Nunc Life Tech. Inc., MD, USA) foram sensibilizadas por 18h a 5°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-TNF- α humano (R&D Systems), diluído em PBS, pH 7.4, na concentração de 2 μ g/mL. Após esse período, os orifícios foram lavados 3 vezes com 300 μ L de PBS, pH 7.2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado colocando-se em cada orifício 300 μ L de PBS contendo 5% sacarose, 0.5% de Tween 20, 1% de soro albumina bovina (BSA) e 0,005% de NaN₃ (azida sódica) e incubada à temperatura ambiente, por 2 horas. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e em alguns orifícios foi adicionado 100 μ L de TNF- α recombinante humano (R&D Systems) diluído de forma seriada em concentrações variando de 39 a 5000pg/mL, para obtenção de curva padrão; e nos orifícios restantes foram colocados 100 μ L dos sobrenadantes gerados conforme descrito no item 3.8. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, foram retiradas as amostras, realizada nova lavagem da placa e adicionado o anticorpo revelador policlonal de cabra anti-TNF- α humano conjugado com biotina (R&D Systems), na concentração de 100ng/mL, seguindo-se incubação por 2 horas a temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST e adicionado, 100 μ L de avidina conjugada com peroxidase (Sigma) diluída em PBS contendo 0,1% de BSA na concentração de 1:10.000, por 30 minutos à 37°C. Em seguida, adicionou-se 100 μ L do substrato enzimático, constituído por 12,5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5.0 contendo 1mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma) e 10 μ L de H₂O₂ a 30% (Sigma). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos, a reação foi bloqueada pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland) com comprimento de onda de 492

nm. Os níveis de TNF- α nos sobrenadantes de culturas de neutrófilos foram calculados utilizando-se curva padrão.

3.9.2 Determinação de IL-8

Para determinação de IL-8 nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos, foi utilizado o mesmo protocolo de dosagem dos níveis de TNF- α . O anticorpo monoclonal de camundongo anti-IL-8 humana (R&D Systems) foi empregado nas concentração de 4 μ g/mL. Da mesma forma, foi utilizada uma curva padrão com 100 μ L de IL-8 recombinante humana (R&D Systems) em diluições seriadas nas concentrações variando de 8000pg/mL até 62,5pg/mL. O anticorpo revelador policlonal de cabra conjugado com biotina (R&D Systems), foi usado na concentração de 100ng/mL. A incubação com avidina conjugada com peroxidase foi realizada na concentração de 1:5000 por 30 minutos à temperatura ambiente 30°C. Os níveis de IL-8 nos sobrenadantes das culturas foram calculados utilizando-se curva padrão.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad Instat San Diego, Califórnia – USA. Diferenças significativas entre os diversos grupos foram determinadas pelo teste de Análise de Variância para amostras dependentes, e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer, assumindo como verdadeira cada hipótese em que a probabilidade de erro foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados



4.1 Efeito da IL-15 sobre a atividade fungicida de neutrófilos humanos desafiados com o Pb18.

A Figura 1 mostra os resultados referentes à atividade fungicida de neutrófilos humanos não ativados (células controles) ou ativados com IL-15 em diferentes concentrações e desafiados com Pb18. Podemos observar que o tratamento com IL-15 nas concentrações de 12.5, 25, 50, 100 e 250 ng/mL induziu uma atividade fungicida significativamente mais elevada quando comparada à detectada por culturas de neutrófilos controles, sendo a atividade máxima detectada com IL-15 na concentração 100ng/mL.

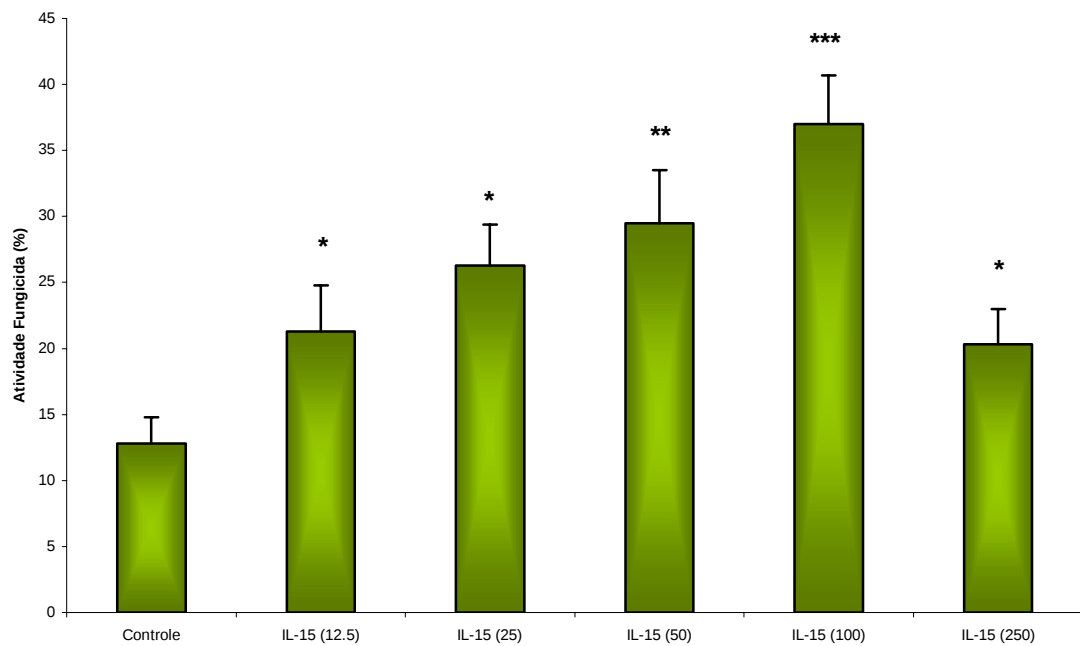


Figura 1. Atividade fungicida de neutrófilos humanos não ativados (controle) ou ativados com diferentes concentrações de IL-15 e desafiados com Pb 18. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão das porcentagens de atividade fungicida, obtidas a partir de culturas de neutrófilos do sangue periférico de 20 indivíduos.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ X controle

4.2 Efeito da IL-15 sobre a produção de ânion superóxido (O_2^-) por neutrófilos humanos desafiados com Pb18.

Uma vez estabelecido que a IL-15 aumenta a atividade fungicida de neutrófilos desafiados com Pb 18, objetivamos avaliar se essa atividade estaria relacionada com um aumento do metabolismo oxidativo dessas células. Para isso, foram quantificados os níveis de ânion superóxido e H_2O_2 liberados por culturas de células não ativadas (células controles) ou ativadas com diferentes concentrações de IL-15 e desafiadas ou não com o fungo (Figura 2). Observamos que as células controles liberaram níveis basais do metabólito que no entanto, apresentaram-se significativamente elevados após a incubação com a citocina, em todas as concentrações. Novamente a dose de 100ng/mL mostrou-se mais eficaz. Após o desafio com Pb18, as culturas controles liberaram níveis mais elevados de anion superóxido quando comparadas às culturas não desafiadas. No entanto, esses níveis foram significativamente mais elevados nas culturas de células previamente ativadas com IL-15 nas concentrações de 25, 50 e 100ng/mL. Os resultados em conjunto, mostram que a ativação com IL-15 aumenta a produção de ânion superóxido que no entanto, é ainda mais elevada após o desafio com o fungo mostrando um efeito somatório de ambos os estímulos para a produção desse metabólito.

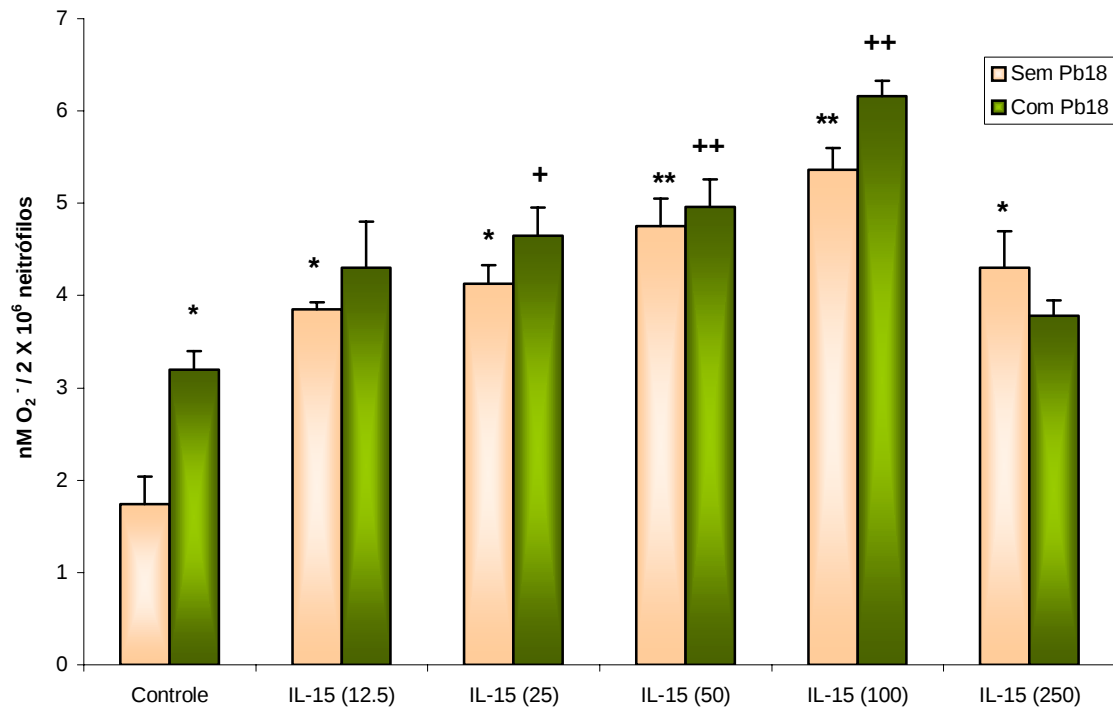


Figura 2: Produção de ânion superóxido por neutrófilos humanos não ativados (controle) ou ativados com diferentes concentrações de IL-15 e desafiados ou não com Pb 18. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão das concentrações de anion superóxido detectadas em culturas de neutrófilos do sangue periférico de 20 indivíduos.

* $p < 0,05$ X Controle sem Pb18

** $p < 0,01$ X Controle sem Pb18

+ $p < 0,05$ X Controle com Pb18

++ $p < 0,01$ X Controle com Pb18

4.3 Efeito da IL-15 sobre a produção de H₂O₂ por neutrófilos humanos desafiados com o Pb18.

Na Figura 3 estão representados os níveis de H₂O₂ liberados por neutrófilos humanos não ativados (células controles) ou ativados com diferentes concentrações de IL-15 e desafiados ou não com o fungo. Observamos que a IL-15 estimulou as células a produzirem níveis maiores de H₂O₂, quando comparados aos liberados pelas células controles, com valores máximos detectados com a concentração de 100ng/mL. Após o desafio com Pb18, as culturas controles liberaram níveis mais elevados de H₂O₂ quando comparadas às culturas não desafiadas. No entanto, esses níveis foram significativamente mais elevados nas culturas previamente ativadas com IL-15 em todas as concentrações. Os resultados em conjunto, mostram que de forma semelhante aos referentes à determinação de anion superóxido, a ativação com IL-15 aumenta a produção do metabólito que no entanto, é ainda mais elevada após o desafio com o fungo mostrando um efeito somatório de ambos os estímulos para a produção desse metabólito.

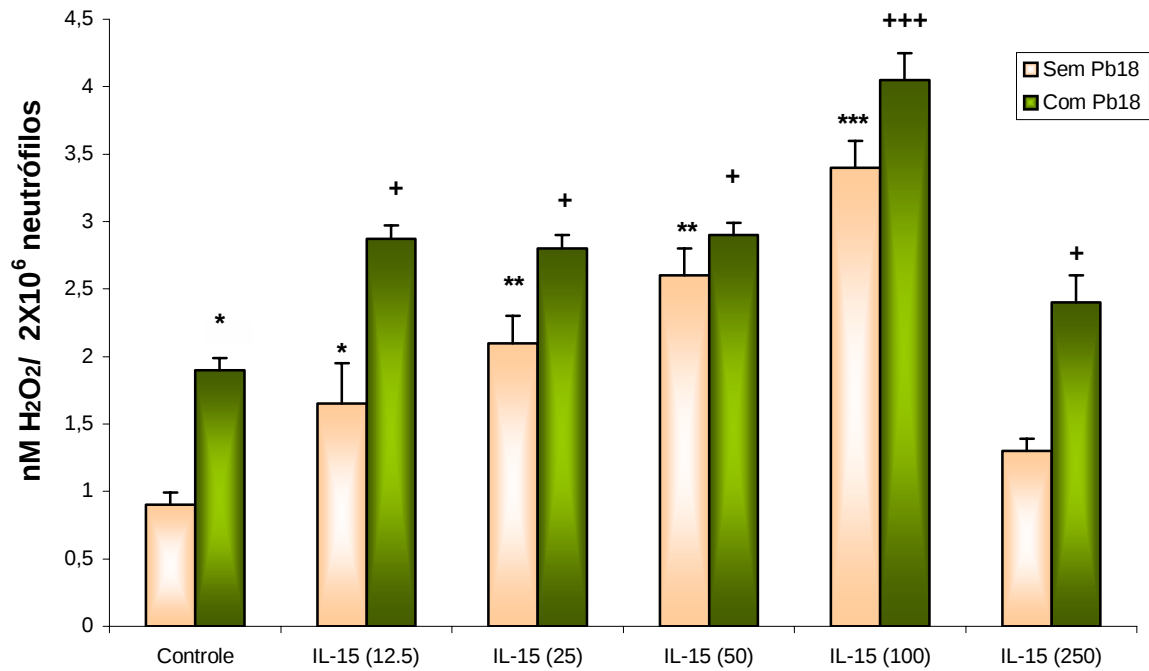


Figura 3. Produção de H₂O₂ por neutrófilos humanos não ativados (controle) ou ativados com diferentes concentrações de IL-15 e desafiados ou não com Pb 18. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão das concentrações de H₂O₂ detectadas em culturas de neutrófilos do sangue periférico de 20 indivíduos.

*p<0,05 X Controle sem Pb18

**p<0,01 X Controle sem Pb18

***p<0,001 X Controle sem Pb18

+p<0,05 X Controle com Pb18

+++p<0,001 X Controle com Pb18

4.4 Efeito da catalase (CAT) sobre a atividade fungicida de neutrófilos humanos contra o Pb 18, induzida pela IL-15.

Para comprovarmos a participação da H_2O_2 como molécula efetora da atividade fungicida induzida pela IL-15, realizamos experimentos nos quais essa atividade foi testada na ausência ou presença de CAT. (Figura 4). Novamente, detectamos atividade fungicida significativa após a incubação com IL-15 (resposta máxima na concentração = 100ng/mL). No entanto, após a incubação com CAT, as culturas desenvolveram atividades fungicidas menores quando comparadas às suas respectivas culturas não incubadas com a enzima. Essas diferenças foram estatisticamente significativas nas culturas ativadas com IL-15 25, 50 e 100 ng/mL, em relação às culturas sem CAT.

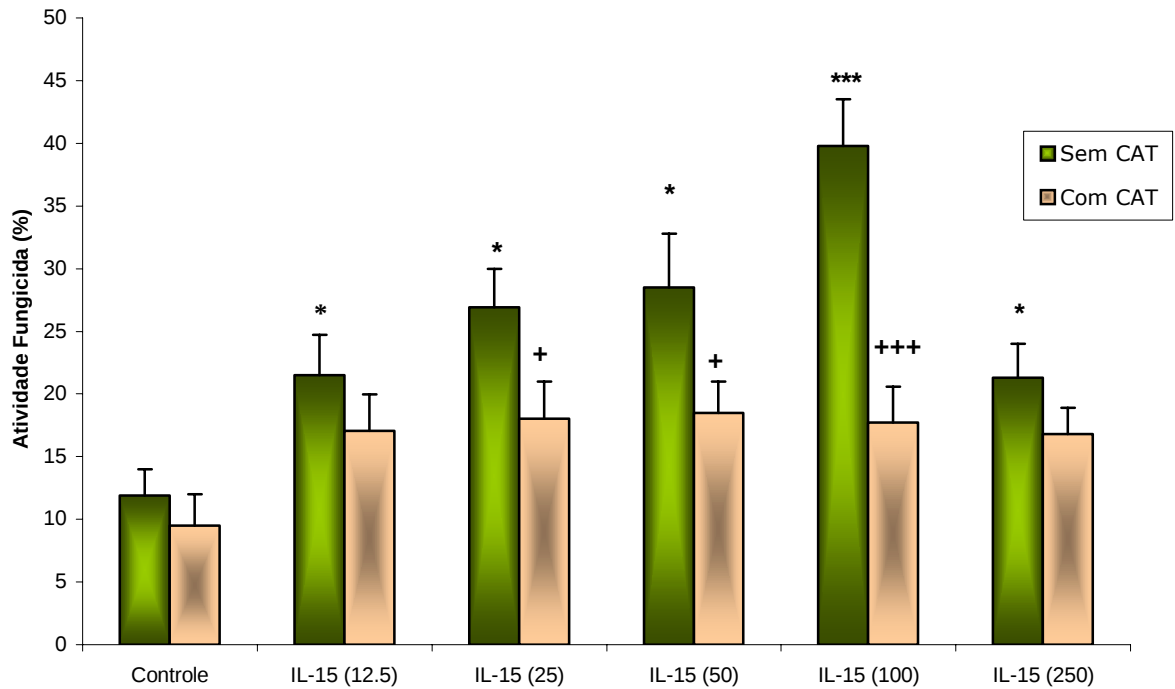


Figura 4. Atividade fungicida de neutrófilos humanos não ativados (controle) ou ativados com diferentes concentrações de IL-15 e desafiados com Pb 18 na ausência ou presença de catalase. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão das porcentagens de atividade fungicida, obtidas a partir de culturas de neutrófilos do sangue periférico de 20 indivíduos.

+p<0,05 X IL-15 (25),IL-15 (50) sem CAT

+++ p<0,001 X IL-15 (100) Sem CAT

4.5 Efeito da IL-15 sobre a produção de TNF- α e IL-8 por neutrófilos humanos desafiados com o Pb18.

4.5.1 Determinação de TNF- α

Não foram detectados níveis significativos dessa citocina, nos sobrenadantes de todas as culturas testadas.

4.5.2 Determinação de IL-8

Os resultados referentes à dosagem dessa citocina podem ser analisados na Figura 5. Neutrófilos não ativados liberaram baixos níveis de IL-8, no entanto, foram significativamente aumentados após a incubação com a IL-15 nas diferentes concentrações. Células controles desafiados com o fungo liberaram altos níveis de IL-8 quando comparados aos não desafiados. No entanto, esses níveis não mostraram-se significativamente alterados quando essas células foram previamente ativadas com IL-15.

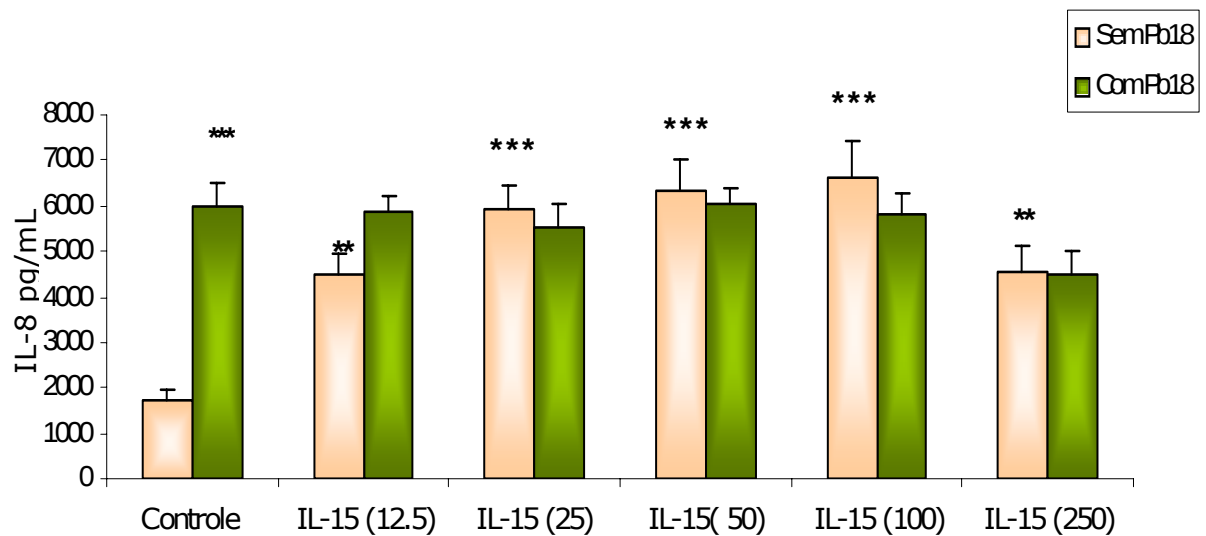


Figura 5. Produção de IL-8 por neutrófilos humanos, não ativados (controle) e tratados com IL-15 em diferentes concentrações e desafiados ou não com Pb18. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão das concentrações de IL-8 detectadas em culturas de neutrófilos do sangue periférico de 20 indivíduos.

** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ X Controle sem Pb18

5. *Discussão*



A IL-15 produzida por monócitos e macrófagos ativados podem contribuir de forma substancial para os mecanismos de defesa do hospedeiro contra infecções intracelulares em períodos precoces da infecção, durante o desenvolvimento da resposta imune inata ⁶³. A sua participação pode ocorrer através da ativação de vários tipos celulares. No entanto, vários trabalhos têm destacado a sua importância no processo de ativação das células fagocitárias atuando indiretamente, através da indução da produção de IFN- γ por células da imunidade inata, como as NK, ou diretamente, de uma forma autócrina ⁵⁵⁻⁶⁴.

Neste contexto, o primeiro objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito da IL-15 sobre a atividade fungicida de neutrófilos humanos desafiados com cepa virulenta do *P. brasiliensis*. Como já descrito por outros trabalhos em nosso laboratório, detectamos que neutrófilos não ativados não desenvolvem atividade fungicida contra o fungo ^{53,83}. No entanto, uma atividade fungicida significativa foi detectada após a ativação dessas células com IL-15, sendo observado um efeito dose dependente, com a concentração de 100 ng/mL induzindo a maior atividade.

Esses resultados concordam com a literatura uma vez que, vários trabalhos realizados *in vitro* têm mostrado a capacidade dessa citocina induzir as células fagocitárias a apresentarem atividade microbicida eficiente. Culturas de linhagens de monócitos humanos ou de macrófagos derivados de monócitos incubadas com IL-15 desenvolvem atividade microbicida anti *L. infantum*. Os autores comentam que essa atividade pode ser via atuação direta da IL-15 ou indireta, via estimulação por essa citocina da produção de IL-12.

No entanto, a maioria dos trabalhos refere-se a atuação dessa citocina sobre a atividade dessas células contra infecções fúngicas. Assim, a pré-incubação de monócitos humanos com IL-15 aumenta a atividade fungicida dessas células contra *C. albicans* ⁶¹. Resultados semelhantes foram detectados com neutrófilos ativados e desafiados com esse fungo ⁷⁸. Neutrófilos ativados com IL-15 ainda adquirem capacidade

de lisar hifas do gênero *Aspergillus* ⁶⁷. Essa citocina ainda aumenta a capacidade dos neutrófilos de destruir outros fungos causadores de infecções importantes do ponto de vista médico como *Fusarium* spp e *Scedosporium* spp ⁶⁸. Outros autores demonstram também que a IL-15 é uma citocina importante na ativação das funções de neutrófilos de pacientes infectados pelo vírus HIV, por retardar apoptose e aumentar as capacidades quimiotática e fungicida dessas células ⁸².

Com objetivo de investigar se o mecanismo através do qual a IL-15 ativa neutrófilos para que essas células desenvolvam atividade fungicida é dependente do metabolismo oxidativo, avaliamos a capacidade dessas células produzirem metabólitos como O_2^- e H_2O_2 .

No que se refere ao O_2^- , os resultados mostraram um efeito estimulador da IL-15. No entanto, os níveis tornam-se ainda maiores após o desafio com o fungo, mostrando que ocorre um sinergismo entre a atuação da IL-15 e do próprio fungo na indução da produção do metabólito. Os níveis máximos desse metabólito foram detectados após a incubação das células com IL-15 na concentração de 100ng/mL e posterior desafio com o fungo. A capacidade da IL-15 ativar neutrófilos para um aumento do “burst” respiratório foi comprovada pelos experimentos de detecção de H_2O_2 . Como esperado, o perfil de resposta da produção de H_2O_2 foi semelhante ao do O_2^- com respostas máximas na concentração de 100ng/mL de IL-15.

Em conjunto, os dados de H_2O_2 e O_2^- permite-nos estabelecer uma associação entre níveis maiores desse metabólito e maior atividade fungicida das células, sugerindo o envolvimento do metabolismo oxidativo como um mecanismo efetor importante das células ativadas com IL-15 na destruição do fungo. No que se refere a H_2O_2 , sua participação efetiva foi demonstrada em experimentos nos quais uma redução significativa da atividade fungicida foi obtida após a incubação das culturas com CAT. Esses resultados concordam com os de Calvi et al. ²², que demonstraram ser a H_2O_2 um importante metabólito para atividade fungicida de monócitos humanos ativados com $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ e

aos de Carmo et al.²⁴ que demonstraram que a atividade fungicida de monócitos humanos ativados com TNF- α , contra cepa virulenta do fungo é mediada por H₂O₂, uma vez que esse processo é significativamente inibido na presença de CAT.

No presente trabalho, como a atividade fungicida não foi totalmente abolida na presença de CAT, outros metabólitos podem estar envolvidos no processo de destruição do fungo por neutrófilos ativados com IL-15. A participação efetiva do ânion superóxido foi testada através de ensaios com superóxido dismutase (SOD), catalisador desse metabólito. No entanto, nossos experimentos relativos a esses ensaios não foram conclusivos, o que não nos permite considerar de forma definitiva, no presente trabalho, a participação desse metabólito. No entanto, estudos anteriores em nosso laboratório, mostraram que de forma semelhante a IL-15, as citocinas IFN- γ , TNF- α e GM-CSF ativam neutrófilos humanos com conseqüente aquisição de atividade fungicida por essas células. Essa atividade foi significativamente diminuída após a incubação das coculturas com CAT e com SOD, mostrando que o O₂⁻ é um metabólito envolvido na destruição do fungo. Além disso, podemos sugerir a participação do metabolismo não oxidativo na destruição do fungo por neutrófilos ativados, como a atuação de peptídeos encontrados no interior dos grânulos azurofílicos dessas células e que podem ser degranulados após o processo de ativação com IL-15. Estudos têm demonstrado que essa citocina age aumentando a expressão de CD11b, marcador de superfície nos neutrófilos, ocorrendo degranulação e desenvolvimento de atividades antifúngicas⁷⁸.

Os trabalhos na literatura mostram que as células ativadas com IL-15 podem exercer atividades antifúngicas através de mecanismos oxidativos e não oxidativos. Nesse sentido Vazquez et al.⁶¹, demonstraram que a capacidade de monócitos humanos ativados com IL-15 exercerem atividades contra *C. albicans* esteve associada a um aumento da produção do ânion superóxido. Por outro lado, estudos com PMNs de indivíduos normais ou pacientes com HIV mostraram que as

células de ambos indivíduos apresentaram atividade fungicida aumentada após incubação *in vitro* com IL-15. No entanto, esse aumento não esteve associado a uma maior liberação de ânion superóxido ⁸². Resultados semelhantes foram detectados por Musso et al. ⁷⁸ que sugeriu que a atividade anti *C. albicans* de neutrófilos humanos normais ativados com IL-15 depende de mecanismos não oxidativos, uma vez que a IL-15 aumentou a capacidade dos neutrófilos liberarem ânion superóxido em resposta a FMLP, mas não em resposta ao fungo. O aumento da atividade fungicida de neutrófilos contra espécies de *Aspergillus* induzido pela IL-15 também não foi acompanhada de um aumento do metabolismo oxidativo ⁶⁷. Resultados semelhantes foram observados quando PMNs humanos foram desafiados com *S. proliferans* e *F. solani* ⁶⁸. Na paracoccidioidomicose, o tratamento de monócitos humanos ativados com IL-15 e desafiados com cepa virulenta (Pb18) não interferiu com a produção de H₂O₂ e O₂⁻, sugerindo que essa atividade fungicida parece ser independente do metabolismo oxidativo ⁸³.

A IL-8 é secretada principalmente por monócitos e células endoteliais, mas pode ser expressa em quantidades menores por neutrófilos ^{84,85}. Adicionalmente outros trabalhos têm mostrado que a IL-15 estimula a expressão de mrna e a produção de IL-8 por monócitos humanos dentro de uma faixa de concentração efetiva para a ativação de neutrófilos ⁶². Neste contexto, tivemos por objetivo avaliar se a atividade fungicida induzida pela IL-15, poderia ser mediada pela IL-8. Testamos também a possível mediação pelo TNF- α , uma vez que trabalhos na literatura demonstraram a importância dessa citocina no processo de ativação de monócitos/macrófagos e neutrófilos para o desenvolvimento de atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* ^{22,24,26}. Detectamos que neutrófilos não ativados e não desafiados com o fungo liberam baixos níveis de IL-8, que no entanto, aumentam de forma significativa após a incubação com IL-15. Neutrófilos não ativados, desafiados com o fungo liberam níveis bastante elevados de IL-8. No entanto, as células ativadas produziram níveis semelhantes da citocina

após o desafio com o fungo, quando comparadas às células não desafiadas. Os resultados mostram que tanto o fungo, como a IL-15 são estímulos potentes para a produção de IL-8 por neutrófilos. No entanto, não ocorre uma somatória desses dois estímulos, provavelmente devido à existência de um limiar de ativação alcançado com a ativação somente com IL-15 ou com fungo. Adicionalmente os resultados mostram que não existe uma associação entre atividade fungicida induzida pela IL-15 e produção de IL-8.

Essa idéia foi confirmada por experimentos nos quais a pré-incubação de neutrófilos com IL-8 não induz essas células a liberarem maiores níveis de H_2O_2 , nem tão pouco a apresentarem atividade fungicida (dados não mostrados). Resultados diferentes foram detectados por outros autores^{67,68} que mostraram que a IL-15 aumenta a liberação de IL-8 por neutrófilos humanos em resposta a *Aspergillus*⁶⁷ *F. solani* e *S. prolificans*⁶⁸. A IL-15 ainda aumenta a liberação de IL-8 por neutrófilos em resposta a *C. albicans*. No entanto, a atividade fungicida contra esse fungo não foi alterada em ensaios com anticorpos anti IL-8 mostrando o não envolvimento dessa citocina no processo⁷⁸.

No que se refere ao $TNF-\alpha$, neutrófilos não ativados e mesmo ativados, não produziram concentrações detectáveis de $TNF-\alpha$, descartando o envolvimento dessa citocina nas atividades induzidas pela IL-15, testadas no presente trabalho. Esses resultados estão de acordo com os descritos na literatura que demonstraram que neutrófilos humanos não ativados ou mesmo ativados com IL-15 produziram baixos níveis de $TNF-\alpha$ em resposta a fungos filamentosos^{67,68}.

No seu conjunto, os resultados do presente trabalho mostram que a IL-15 tem um efeito modulador sobre neutrófilos humanos infectados *in vitro* com cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*, caracterizado por aumento da atividade fungicida por mecanismos dependentes do metabolismo oxidativo.

6. *Conclusões*



A IL-15 é capaz de induzir eficiente atividade fungicida em neutrófilos humanos contra *P. brasiliensis* por um mecanismo dependente da liberação da água oxigenada (H₂O₂).

O efeito da IL-15 não esteve associado a alterações nos níveis de IL-8 e TNF- α .

7. Referências Bibliográficas



1. Restrepo, A, and Tobón, AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier. 2005; 3062-8.
 2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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; 51:1999-203.
 6. Lacaz CS. South American Blastomycosis. An Fac Med São Paulo. 1956; 7- 120.
 7. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. Bailliere's Clin Trop Med Commun Dis. 1989 ; 4:185-220.
 8. 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.
 9. Mendes, RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, (Eds). Paracoccidioidomycosis. Boca Raton. CRC Press. 1994; p. 233-58.
-

10. Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Ciênc Cult (São Paulo). 1994; 46:455-61.
 11. 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. Boca Raton. CRC press. 1994. 175-86.
 12. Peraçoli MTS, Parise-Fortes M, Pereira da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. Rev Inst Med Trop. 1995. 37:129-36.
 13. Walsh TJ, Roilides E, Cortez K, Kottlilil S, Bailey J, Lyman CA. Control, immunoregulation, and expression of innate pulmonary host defenses against *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2005;43 Suppl 1:S165-72.
 14. Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infections. Br J Haematol. 2005; 129(5):583-96. Review.
 15. Mencacci A, Cenci E, Bacci A, Montagnoli C, Bistoni F, Romani L. Cytokines in candidiasis and aspergillosis. Curr Pharm Biotechnol. 2000; 1(3):235-51.
 16. 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.
 17. Moscardi-Bacchi M, Brummer E, Stevens DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: Inhibition by activated phagocytes. J. Med. Microbiol., 40:159-64, 1994.
-

-
18. Goihman-Yahr M, Isturiz G, Rotthenberg A. Los fagocitos y patogenia de la paracoccidioidomicosis. Interciencia, 1990; 200-5.
 19. Brummer E, Hanson HL, Restrepo A, Stevens DA. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitides*. J Immunol 1988; 140: 2786-9.
 20. Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. Infect Immun. 1992a; 60(5):2096-100.
 21. Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens D, Restrepo A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. J Med Vet Mycol 1992 b ; 30(2): 161-8.
 22. Calvi SA, Peraçoli MT, Mendes RP, Marconde-Machado J, Fecchio D, Marques SA, Soares AMVC. Effects of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect 2003; 5: 107-13.
 23. Carmo JPM, Peraçoli MTS, Calvi SA, Dias-Melicio LA, Tavian EG, Soares AMVC. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on human monocytes activation *in vitro* for high virulent *Paracoccidioides brasiliensis* killing. Annual Review of Biomedical Sciences. Special Issue, p. 94, 2002.
 24. Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC. TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. Med Mycol. 2006; 44: 363-368.
-

-
25. Gonzales A, Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *P. brasiliensis* conidia. *Infect Immun*. 2000; 68(5): 2546-52.
 26. Moreira AP, Dias-Melicio, LA, Peraçoli MTS, Calvi SA, Soares AMVC. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence H₂O₂ and NO effector mechanisms. *Can J Microbiol*. 2007; Submitted.
 27. Dunn PI, North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun*. 1991; 59: 2892-2900.
 28. Levitz SM, North EA. Gamma interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun* 1996; 64: 1595-99.
 29. Figueiredo F, Alves LM, Silva C L. Tumour necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions. *Clin Exp Immunol*. 1993; 93(2):189-94.
 30. Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peraçoli MT, Silva CL, Soares AM. A role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol* 2002; 40: 377-82.
 31. Calich VLG & Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31(5): 615-23.
-

-
32. Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FR, Fazioli RA, Vaz CA et al. IL-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. Clin Immunol 2002; 185-195.
 33. Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. IL12 and neutralization of endogenous IL10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. Cytokine 2002; 18(3): 149-57.
 34. Calich VL, Coppi Vaz CA, Burguer E. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. J Exp Pathol 1985; 66(1): 585-94.
 35. Souto JT, Alibert JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, Ferreira BR, Travassos LR, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis* infect mice is modulated by interferon-gamma. Am J Pathol 2003; 163:583-90.
 36. Franco M, Montenegro MRG. Anatomia Patológica. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. Paracoccidioidomycose. Sarvier-EDUSP 1982; 97-117.
 37. Figueiredo F, Silva CL, Alves LCM, Rossi MA. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. Braz J Med Biol Res 1986; 19:615A.
 38. Iabuki K, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of the lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. Mycopathologia 1979; 67:131-41.
-

-
39. Kerr IB, Araripe PCO, LenzI HL. Paracoccidioidomycosis in experimentally-infected rats. *Ver Inst Med Trop São Paulo* 1988; 30:336-50.
 40. Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol.* 2006; 79:1202-13.
 41. Baggiolini M, Walz a And KunkeL SL. Neutrophil-activating peptide 1 interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invst.* 1985; 84:1045-1049.
 42. Balazovich KJ, Almeida HI, And Boxer LA. Recombinant human G-CSF and GM-CSF prime human neutrophils for superoxide production through different signal transduction mechanisms. *J Lab Clin Med* 1991; 118:576-584.
 43. Musso T, Calosso L, Zucca M. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infect Immun* 1998; 66: 2640-47.
 44. Nathan CF. Respiratory burst in adherent human neutrophils: Triggered by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood* 1989; 73:301-306.
 45. Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino Jr MA. Activation of human polymorphonuclear neutrophil function by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1985; 135: 2069-73.
 46. Steinbeck MJ And Roth JA. Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev Infect Dis.* 1989; 11: 549-568.
-

-
47. Weisbart RH, Golde DW, Clark SC, Wong GG, Gasson JC. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature*. 1985; 314: 361-363.
 48. McEwen JG, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1987; 36: 603-8.
 49. Meloni-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DS, Calich VL, Lenz HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistance mice. *J Leukoc Biol*. 1996; 59:526-33.
 50. Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 1999; 37: 261-67.
 51. Kurita N, Oarada M, Brummer E. Fungicidal activity of human peripheral blood leukocytes against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med Mycol*. 2005; 43(5): 417-22.
 52. Kurita N, Oarada M, Miyaji M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2000; 38(2): 177-82.
 53. Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi AS, Peraçoli MT, Soares AMVC. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol*. 2007; 45(1):27-33.
 54. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdieh M, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*. 1994; 13;264 (5161):965-8.
-

-
55. Carson W, Caligiuri MA. Interleukin-15 as a potential regulator of the innate immune response. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(1):1-9. Review.
 56. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, Anderson D, Eisenmann J, Grabstein K, Caligiuri MA. Interleukin 15 (IL-15) is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med.* 1994; 80(4):1395-403.
 57. Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, Marien MJ, Boiani N, Grabstein K, Caligiuri MA. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest.* 1995; 96(6):2578-82.
 58. Nishimura H, Hiromatsu K, Kobayashi N, Grabstein KH, Paxton R, Sugamura K, Bluestone JA, Yoshikai Y. IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by Salmonella infection. *J Immunol.* 1996; 156 (2):663-9.
 59. D'Agostino P, Milano S, Arcoleo F, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, Caruso R, Chifari N, Vitale G, Mansueto S, Cillari E. Interleukin-15, as interferon-gamma, induces the killing of *Leishmania infantum* in phorbol-myristate-acetate-activated macrophages increasing interleukin-12. *Scand J Immunol.* 2004; 60(6):609-14.
 60. Maeurer MJ, Trinder P, Hommel G, Walter W, Freitag K, Atkins D, Storkel S. Interleukin-7 or interleukin-15 enhances survival of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun.* 2000; 68(5):2962-70.
-

-
61. Vazquez N, Walsh TJ, Friedman D, Chanock SJ, Lyman CA. Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. Infect Immun. 1998; 66(1):145-50.
 62. Badolato R, Ponzi AN, Millesimo M, Notarangelo LD, Musso T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. Blood. 1997; 90(7): 2804-9.
 63. Yoshikai Y, Nishimura H. The role of interleukin-15 in mounting an immune response against microbial infection. Microbes Infect. 2000; 2(4):381-9.
 64. Mody CH, Spurrell JC, Wood CJ. Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes. J Infect Dis. 1998; 178(3):803-14.
 65. Khan IA, Kasper LH. IL-15 augments CD8⁺ T cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunol. 1996 ; 157:2103-8.
 66. Milano S, Di Bella G, D'Agostino P, Barbera C, Caruso R, La Rosa M, Ferlazzo V, Vitale G, La Russa C, Gambino G, Chifari N, Mansueto S, Cillari E. IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. Clin Exp Immunol. 2002; 127(2):360-5.
 67. Winn RM, Gil-Lamaignere C, Roilides E, Simitsopoulou M, Lyman CA, Maloukou A, Walsh TJ. Selective effects of interleukin (IL)-15 on antifungal activity and IL-8 release by polymorphonuclear leukocytes in response to hyphae of *Aspergillus* species. J Infect Dis. 2003; 188:585-90.
-

-
68. Winn RM, Gil-Lamaignere C, Roilides E, Simitsopoulou M, Lyman CA, Maloukou A, Walsh TJ. Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp. *Cytokine*. 2004; 31(1): 1-8.
 69. Takano M, Nishimura H, Kimura Y, Mokuno Y, Washizu J, Itohara S, Nimura Y, Yoshikai Y. Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in *Escherichia coli* infection in mice. *Infect Immun*. 1998; 66(7):3270-8.
 70. Hirose K, Suzuki H, Nishimura H, Mitani A, Washizu J, Matsuguchi T, Yoshikai Y. Interleukin-15 may be responsible for early activation of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral infection with *Listeria monocytogenes* in rats. *Infect Immun*. 1998; 66(12):5677-83.
 71. Doherty TM, Seder RA, Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol*. 1996; 156(2):735-41.
 72. Jullien D, Sieling PA, Uyemura K, Mar ND, Rea TH, Modlin RL. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J Immunol*. 1997; 158(2):800-6.
 73. Chehimi J, Marshall JD, Salvucci O, Frank I, Chehimi S, Kaweckí S, Bacheller D, Rifat S, Chouaib S. IL-15 enhances immune functions during HIV infection. *J Immunol*. 1997; 158(12):5978-87.
 74. Flamand L, Stefanescu I, Menezes J. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J Clin Invest*. 1996; 97(6):1373-81.
 75. Atedzoe BN, Ahmad A, Menezes J. Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J Immunol*. 1997; 159(10):4966-72.
-

-
76. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, Yoshioka K, Yoshika Y. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease.. Clin Exp Immunol. 1997; 109(3):458-63.
 77. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. Annu Rev Immunol. 1999; 17:19-49.
 78. Musso T, Calosso L, Zucca M. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. Infect Immun 1998; 66: 2640-47.
 79. Kurita N, Sano A, Coelho KIR, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M. Na improved culture médium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis* J Méd Vet 1993; 31:201-5.
 80. Russo M, Teixeira HC, Marcondes MC, Barbuto JA. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophage. Baz J Med Bio Res. 1989; 22:1271-3.
 81. Costa DL, Dias-Melicio La, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian ET, Peraçoli MTS, Soares AMVC. Effect of Interleukin-10 the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-Interferon activated human neutrophils. Microbiol Immunol. 2007; 51(1):73-80.
 82. Mastroianni CM, D'ettore G, Lichtner M, Mengoni F, D'agostino C, Corpolongo A, Massetti AP, Vincenzo V. Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection. Bood 2000; 96:1979-84.
-

83. Bannwart CF, Nakaira ET, Nascimento MPP, Soares AMVC, Peraçoli MTS. Interleukin-15 enhances fungicidal activity of human monocytes infected *in vitro* *Paracoccidioides brasiliensis*. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2006; 13(2).
 84. Bazzoni F, Cassatela MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produces and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/intreleukin 8. J Exp Med. 1991; 173:771-74.
 85. Wei S, Liu DJ, Blanchard DK, Djeu JY. Induction of IL-8 gene expression in human polymorphonuclear neutrophils by recombinant IL-2. J Immunol. 1994; 152:3630-36.
-

8. *Resumo*



A IL-15 é uma citocina próinflamatória produzida principalmente por monócitos e macrófagos em resposta a agentes infecciosos, desempenhando importante papel modulador na imunidade inata e adaptativa. No caso de infecções por microrganismos intracelulares como algumas bactérias, protozoários e fungos destaca-se o papel da IL-15 no mecanismo de ativação de monócitos/ macrófagos e neutrófilos, processo que representa um importante mecanismo de defesa já em períodos precoces da infecção durante o desenvolvimento da resposta imune inata. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da IL-15 sobre a atividade fungicida de neutrófilos humanos desafiados com cepa virulenta do *P. brasiliensis* (Pb 18). Adicionalmente, testamos se essa atividade seria mediada por produtos do metabolismo oxidativo como anion superóxido e H_2O_2 e se estaria associada a alterações nos níveis das citocinas IL-8 e TNF- α . Neutrófilos do sangue periférico de indivíduos saudáveis, foram incubados na ausência ou presença de IL-15 (12,5 a 250 ng/mL) por 18h a 37°C em tensão de 5% de CO_2 , infectados com Pb 18 por 4h e avaliados quanto a atividade fungicida, produção de ânion superóxido, H_2O_2 e quantificação nos sobrenadantes das citocinas TNF- α e IL-8. A pré-incubação de neutrófilos com IL-15 induziu um aumento significativo na atividade fungicida dessas células de maneira dose dependente. Adicionalmente após a ativação, foi detectado um aumento na produção de anion superóxido e H_2O_2 por essas células, sugerindo a participação desses metabólitos como moléculas efetoras da atividade fungicida. O desafio das células em presença de catalase,

levou a uma diminuição significativa da atividade fungicida comprovando o papel da H_2O_2 nesse processo. No entanto, os níveis de $TNF-\alpha$ e IL-8 não foram alterados após a ativação com IL-15, sugerindo que a sua atuação não é mediada por essas citocinas. Em conjunto, os resultados mostram que a IL-15 tem um efeito modulador direto sobre neutrófilos humanos infectados *in vitro* com cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*, caracterizado por aumento da atividade fungicida mediada por mecanismos dependentes do metabolismo oxidativo.

9. *Abstract*



Interleukin-15 is a cytokine produced by a wide range of different cell types, including macrophages in response to lipopolysaccharide or microbial infection. This cytokine may play a crucial role in the activation of phagocytic cells against pathogens, mainly during innate immune response. The effects of IL-15 on human polymorphonuclear leukocyte fungicidal activity against high virulent *P. brasiliensis* strain were investigated. Pré-treatment with IL-15 for 18h, increased neutrophils fungicidal activity in a concentration dependent manner. In addition, exposure to IL-15 induced enhanced neutrophil oxidative burst evaluated by superoxide anion and H₂O₂ release. Catalase inhibits fungicidal activity confirming a role for H₂O₂ in fungus Killing. In contrast, IL-8 and TNF- α levels were not affected by IL-15 suggesting that its effects were not mediated by these cytokines. Together, the results showed that IL-15 is a potent stimulant of antifungal activities of human neutrophils, at least in part, by a mechanism dependent on oxidative metabolism.
