

Magda Paula Pereira do Nascimento

**EFEITO MODULADOR DE CITOCINAS SOBRE A
FORMAÇÃO E ATIVIDADE FUNGICIDA DE
CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS OBTIDAS
DE MONÓCITOS HUMANOS ESTIMULADOS COM
ANTÍGENO DE *Paracoccidioides brasiliensis***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais (Área de concentração: Biologia Tropical) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Terezinha Serrão Peraçoli

**Botucatu
2008**

1.INTRODUÇÃO

Células gigantes multinucleadas (CGM) são consideradas componentes característicos de reações granulomatosas, induzidas por vários estímulos ⁽¹⁾ e parte integrante da resposta imune do hospedeiro contra doenças infecciosas crônicas causadas por bactérias, fungos, vírus e outros parasitas ⁽²⁾. A presença de CGM no granuloma da tuberculose foi primeiramente descrita por Langhans ⁽³⁾ em 1868. Embora a ocorrência dessas células tenha sido reconhecida e descrita há muito tempo, seu papel durante o desenvolvimento e/ou progressão e término da reação granulomatosa é ainda pouco conhecido ^(4,5).

As CGM se originam da fusão de monócitos ou macrófagos, mas pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos nessa fusão e como esse fenômeno ocorre *in vivo* ⁽⁴⁾. Segundo Mustafa et al. ⁽⁶⁾, embora desempenhem papel importante no controle da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, a função das CGM e das células epitelióides nos granulomas ainda não está completamente esclarecida.

A geração de CGM *in vitro* parece ocorrer como resultado da fusão e não da divisão celular ^(7,8), sendo o contato celular um pré-requisito para que ocorra a fusão ^(9,10). Segundo alguns autores, a fusão de macrófagos aderentes *in vitro* é um evento que ocorre no estágio final de maturação celular ^(11,12) e, esse fenômeno é aumentado pela adição de citocinas ^(13,14), anticorpos monoclonais ⁽¹⁵⁾ e mitógenos ⁽¹⁶⁾.

Most et al. ⁽⁴⁾ demonstraram que a formação de CGM *in vitro* é precedida por uma seqüência de mudanças na morfologia dos monócitos cultivados, sendo dependente do estágio de maturação dos monócitos em macrófagos. Os monócitos não estão completamente maduros quando são liberados da medula óssea e, a importância do processo de maturação pode ter relação direta com a função dessas células nos tecidos. Provavelmente, as CGM que são mais freqüentemente descritas em associação com respostas crônicas nos tecidos podem ser formadas em decorrência de mecanismos imunológicos envolvendo a produção de mediadores solúveis no local.

Sob o ponto de vista morfológico, CGM são geralmente classificadas em células gigantes do tipo Langhans ou do tipo corpo estranho. Células tipo

Langhans têm sido detectadas em doenças granulomatosas como tuberculose, esquistossomose, na sarcoidose ⁽¹⁷⁾ e na paracoccidioidomicose ^(18,19). Essas células são caracterizadas por um número relativamente pequeno de núcleos, menos de 20, em arranjo circular periférico, dentro da célula gigante. São ainda comumente observadas em granulomas imunes, contendo células epitelióides e macrófagos, associadas com partículas de microrganismos de difícil digestão, rodeadas por um halo de células mononucleares, principalmente linfócitos. Estas células, envolvendo os granulomas imunes são indicativas da presença de imunidade mediada por células T contra o agente irritante. Produtos dessas células ativadas, principalmente interferon-gama (IFN- γ) inicia a fusão dos monócitos e macrófagos para formar as CGM do tipo Langhans ⁽¹⁷⁾.

As células gigantes tipo corpo estranho possuem um número de núcleos maior que 20, que se dispõem de modo irregular dentro da célula. Essas células são observadas no granuloma do tipo corpo estranho, formado ao redor de fio de sutura, partículas de carbono e sílica ⁽²⁰⁾ materiais de difícil digestão, sendo rodeados por uma fina camada de macrófagos, não se observando halo de linfócitos ao redor do granuloma ^(5,17).

Estudos *in vitro* com o objetivo de avaliar as bases celulares e moleculares da formação de CGM, a partir de monócitos humanos empregando citocinas recombinantes, demonstraram que interleucina-4 (IL-4) e IL-13 induzem a formação de CGM do tipo corpo estranho, enquanto IFN- γ é a principal citocina envolvida na geração de CGM tipo Langhans ^(17,20,21,22,23). O emprego de anticorpos neutralizantes anti-IL-4 confirma a importância dessa citocina na indução da fusão de macrófagos ⁽²⁴⁾. Tanto IL-4 quanto IL-10 aumentam a expressão de receptores de manose na interface de fusão de macrófagos ⁽²²⁾. Inibidores de receptor de manose reduzem a fusão, indicando que esse receptor é importante para a formação de CGM do tipo corpo estranho ⁽²⁵⁾. Ainda segundo a literatura, a adição de IL-4 ou de IFN- γ , associadas a fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) ou IL-3 têm seu efeito otimizado para indução da formação de CGM tipo corpo estranho ou tipo Langhans, respectivamente ^(17,20,26).

Recentemente Helming & Gordon ⁽²⁷⁾, propuseram que a formação das CGM no granuloma é induzida pelo meio ambiente local, composto de citocinas

e sinais derivados de bactérias, parasitas ou outros materiais estranhos, que induziriam a expressão de fatores fusogênicos. Estes fatores podem então mediar a agregação de macrófagos e adesão de membranas de macrófagos adjacentes, promovendo o contato hidrofóbico entre as membranas de diferentes células e conduzindo subsequente reorganização da membrana e reparo.

Cardoso et al. ⁽²⁸⁾ relataram que a presença de CGM tipo Langhans e macrófagos epitelióides na reação inflamatória granulomatosa é muito importante, podendo auxiliar na diferenciação do diagnóstico entre micoses sistêmicas, tais como histoplasmose e blastomicose e outras doenças, como carcinoma celular tipo escamoso e leishmaniose. Portanto, CGM são formadas em resposta a patógenos intracelulares como micobactérias e fungos, que são resistentes à digestão por macrófagos ⁽²⁹⁾. A ausência dessas células na reação granulomatosa pode refletir resposta ineficiente do hospedeiro à infecção, como na hanseníase virchowiana, coccidioidomicose e histoplasmose disseminadas, ou na infecção por *Mycobacterium avium intracellulare*, que ocorre na síndrome da imunodeficiência adquirida ^(30,31).

De acordo com os experimentos de Hernandez-Pando et al. ⁽³²⁾, tanto as CGM tipo Langhans como tipo corpo estranho são capazes de produzir IL-1 α , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e fator de crescimento e transformação beta (TGF- β_1) conforme o tempo da lesão. Entretanto, é sabido que as CGM são resultantes da fusão de monócitos ou macrófagos ⁽⁴⁾ e que essas células são fontes importantes de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 em micoses sistêmicas, sendo também responsáveis pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β_1 . Todas essas citocinas apresentam atividades estimuladora ou supressora sobre macrófagos e linfócitos, interagindo com os receptores específicos, presentes nessas células e modulando sua função ⁽³³⁾. Citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-8 e GM-CSF são importantes no processo de ativação macrofágica, enquanto outras como IL-6, IL-10 e TGF- β_1 são consideradas fatores de desativação do macrófago ^(34,35). O balanço na produção dessas citocinas pode interferir tanto na resposta imune específica como inespecífica.

Vários autores têm descrito que o IFN- γ é a citocina mais importante na indução de fusão de monócitos e na geração subsequente de CGM ^(12, 21, 36,37). Essa citocina parece induzir a formação de CGM diretamente ^(21,38) ou aumentando a taxa de fusão induzida por outros estímulos ^(31,39). A importância dessa citocina foi demonstrada por estudos com modelos de inflamação granulomatosa. A inoculação de anticorpos anti-IFN- γ inibe ou reduz a formação de CGM em modelo de leishmaniose e esquistossomose ^(14,40). Esses anticorpos também inibem a formação de CGM *in vitro* ^(37,41). A produção espontânea de IFN- γ em tecidos inflamados de doenças granulomatosas como sarcoidose e doença de Crohn sugere a importância dessa citocina *in vivo*, na geração de CGM ^(42,43). A capacidade de monócitos do sangue periférico humano formar CGM em resposta ao IFN- γ , suporta a hipótese de que nas doenças granulomatosas, essas células se originam de monócitos circulantes, recrutados ao sítio inflamatório ⁽⁴⁴⁾. A produção local de citocinas solúveis pelas células pode controlar o tráfego de linfócitos e monócitos.

Fais et al. ⁽²¹⁾ demonstraram que a formação de CGM, induzida por IFN- γ , ocorria como resultado de uma seqüência de eventos envolvendo mudanças na morfologia de monócitos/macrófagos e rearranjo na expressão celular de moléculas de adesão por essas células. Assim, o IFN- γ é essencial para geração de CGM, por promover agrupamento de monócitos e adesão entre as células. Essa citocina modula os eventos seqüenciais, levando à fusão dos macrófagos e geração de CGM pela sua ação reguladora sobre moléculas de adesão, expressas por essas células. Assim, o aumento da expressão de ICAM-1, seu rearranjo e polarização na superfície celular, juntamente com a ligação ao seu receptor, antígeno funcional de leucócitos (LFA-1) na superfície de monócitos é essencial para a geração de CGM ⁽²¹⁾.

O fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) pertence ao grupo dos fatores do crescimento. Têm como funções acelerar a hematopoiese nos primeiros passos da diferenciação das células mielóides, resultando no aumento da produção de neutrófilos, monócitos e eosinófilos, além de estimular uma variedade de atividades funcionais destas células, incluindo fagocitose de organismos fúngicos por neutrófilos ou monócitos/macrófagos ⁽⁴⁵⁾. *In vitro*, o GM-CSF aumenta a atividade fagocítica

de neutrófilos ou monócitos contra *C. albicans*, *A. fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *C. neoformans*, *Penicillium marneffe*, *Trichosporon beigeli* and *Fusarium solani* ^(45,46,47,48,49) e a atividade fungicida contra *Paracoccidioides brasiliensis* ⁽⁵⁰⁾. O tratamento com GM-CSF diminuiu a carga fúngica e/ou aumentou a sobrevivência em modelos animais de candidíase, aspergilose e histoplasmose ^(51,52,53). Outros estudos *in vivo*, sugerem que o GM-CSF tenha um papel na produção de citocinas Th1, principalmente de IFN- γ ^(54,55). O GM-CSF foi utilizado em experimentos de Tambuyzer & Nouwen ⁽⁵⁶⁾ como fator estimulador de formação de CGM *in vitro* por micróglia de suínos. Porém, os autores relataram que o GM-CSF em altas concentrações bloqueou quase totalmente a formação de CGM.

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória necessária para o desenvolvimento das imunidades inata e adaptativa nas infecções fúngicas ⁽⁵⁷⁾, e tem sido utilizado, tanto em experimentos *in vivo* como *in vitro*, para induzir a formação de CGM e de granulomas, embora os resultados tenham sido conflitantes ⁽⁹⁾. Alguns estudos têm mostrado que essa citocina não induz formação de CGM a partir de monócitos ou macrófagos murinos ^(20,31,37,39,58). Entretanto, anticorpos anti-TNF- α podem tanto inibir a formação de CGM ^(39,59) e granulomas ^(59,60,61), como aumentar o índice de fusão dessas células ⁽⁹⁾. Segundo Kindler et al. ⁽⁶⁰⁾, o TNF- α é considerado o principal mediador de formação do granuloma, uma vez que a adição de anticorpos anti-TNF- α impede a sua formação ⁽⁶²⁾.

Na paracoccidioidomicose, o TNF- α é produzido pelos macrófagos em resposta aos componentes da parede celular do *P. brasiliensis* e desempenha papel importante na modulação da resposta granulomatosa ⁽⁶³⁾. Embora altos níveis de TNF- α tenham sido detectados no sangue e lavado broncoalveolar de pacientes com a micose ^(64,65,66) o papel preciso dessa citocina na formação do granuloma e inflamação ainda não está esclarecido. A expressão de TNF- α tem sido observada em lesões de mucosa oral, pele e nódulos linfáticos de pacientes com a doença ativa, estando presente em macrófagos, neutrófilos, CGM e em células dendríticas ^(67,68). Em granulomas de lesões de pele e mucosa de pacientes com a forma crônica da micose, avaliados antes do tratamento com sulfametoxazol-trimetoprim, observou-se imunomarcagem para

TNF- α distribuída de forma difusa envolvendo os granulomas e sobre células mononucleares e ceratinócitos. Nesta fase havia muitas células gigantes contendo fungos em seu interior. Após o tratamento, observou-se redução dos depósitos de TNF- α nas lesões constituídas por granulomas densos e bem organizados, contendo raras células gigantes. Esses resultados sugerem a participação dessa citocina na gênese e modulação da reação granulomatosa contra o *P.brasiliensis* e, provavelmente na indução de CGM ⁽⁶⁹⁾.

O TGF- β_1 é um importante agente imunossupressor *in vivo*. Foi descrito em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida e na tuberculose. A produção elevada de TGF- β_1 por células mononucleares, isoladas de sangue periférico, sugere que essa citocina contribui para a imunossupressão sistêmica, observada nessas patologias ^(70,71). Além disso, o TGF- β_1 tem sido identificado em CGM do tipo Langhans e em células epitelióides, presentes no granuloma pulmonar de pacientes com tuberculose ativa ⁽⁷¹⁾. Também, a análise imunohistoquímica de biópsias de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com paracoccidiodomicose mostrou a expressão de TNF- α , TGF- β_1 e da enzima iNOS em CGM e em macrófagos em contato com células leveduriformes do *Paracoccidioides brasiliensis* ⁽⁶⁷⁾. Parise-Fortes et al. ⁽⁶⁹⁾ também detectaram a expressão de TGF- β_1 na derme, em citoplasma de macrófagos e de CGM, em biópsias de pele e mucosa de pacientes com a forma crônica de paracoccidiodomicose, avaliados antes e aos 20 dias de tratamento com sulfametoxazol-trimetoprim. O depósito de TGF- β_1 foi mais acentuado nas áreas de fibrose das lesões avaliadas após o tratamento.

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória produzida por monócitos e macrófagos, capaz de diminuir a produção de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 em monócitos /macrófagos estimulados com LPS. Além disso, exerce efeito inibidor sobre o *burst* respiratório, atividade microbicida, expressão de moléculas de classe II e apresentação de antígenos para as células T ^(72,73). A IL-10 exerce atividade supressora indireta sobre a síntese de IFN- γ , porque está relacionada principalmente com a sua capacidade de inibir a atividade das células apresentadoras de antígeno, através da diminuição da expressão de moléculas de classe II ligadas ao complexo principal de histocompatibilidade ⁽⁷⁴⁾ e de moléculas co-estimulatórias como ICAM-1, B7-1 E B7.2 ⁽⁷⁵⁾. Segundo

Redpath et al. ⁽⁷⁶⁾, a produção de IL-10 por macrófagos poderia representar um mecanismo comum de imunossupressão induzido por um grupo diverso de microorganismos intracelulares, que têm a capacidade de infectar e se multiplicar em macrófagos. Assim, a IL-10 parece ser uma citocina chave, que limita a injúria tecidual durante infecções, por diminuir a duração e intensidade das respostas imune e inflamatória ⁽⁷⁷⁾.

Estudos *in vitro* sobre a função de CGM demonstraram que estas células possuem atividade microbida contra patógenos intracelulares. Células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, geradas por incubação de monócitos humanos com IFN- γ e/ou sobrenadante de cultura de células contendo citocinas e *Mycobacterium tuberculosis*, apresentam a capacidade de seqüestrar e limitar o crescimento e disseminação da bactéria para células adjacentes ⁽²³⁾. De acordo com Gasser & Most ⁽⁹⁾, a capacidade de fusão celular é gradualmente perdida durante a maturação dos macrófagos. Monócitos são capazes de fundirem-se com outros monócitos, bem como com macrófagos ⁽⁴⁾. Portanto, a fusão de monócitos recém-migrados ao sítio da reação granulomatosa, pode ser benéfica, protegendo o hospedeiro contra a infecção, uma vez que monócitos têm maior capacidade de matar microorganismos intracelulares como micobactérias do que os macrófagos ^(78,79). Alguns resultados de experimentos, principalmente *in vitro*, indicam que as CGM representam uma adaptação celular para aumentar a atividade fagocítica e a degradação ou eliminação de agentes irritantes, que são resistentes à eliminação pelo macrófago isolado ⁽³¹⁾.

Células gigantes multinucleadas, derivadas de monócitos de sangue periférico, apresentam atividade oxidativa elevada contra *Cândida albicans in vitro* ⁽³¹⁾. Além disso, a função dessas células na reação granulomatosa parece estar relacionada com a produção de mediadores moleculares que regulam a formação do granuloma. Seitzer et al. ⁽⁸⁰⁾ relataram que CGM, formadas a partir de células mononucleares do sangue periférico humano e incubadas com larvas de *Nippostrongylus brasiliensis*, produzem RNA mensageiro para IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Os autores consideram a CGM um constituinte ativo da reação granulomatosa e possivelmente envolvida na formação e *turnover* do

granuloma e na destruição do agente agressor. Essas células, juntamente com células epitelióides, macrófagos e outros tipos celulares como linfócitos T, granulócitos e fibroblastos, são considerados marcadores histológicos do granuloma^(80,81).

A paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é encontrada principalmente em países da América Latina sendo considerada endêmica em algumas áreas no Brasil, principalmente nas áreas rurais, constituindo-se numa das mais prevalentes e importantes micoses⁽⁸²⁾. Caracteriza-se por inflamação crônica supurativa, supressão da imunidade celular e alta quantidade de anticorpos^(83,84). A doença pode manifestar-se sob múltiplas formas, variando de benigna e localizada a severa e disseminada, dependendo da extensão da depressão da imunidade celular^(85,86).

Pacientes com a forma ativa da micose apresentam uma gama de sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais que definem as formas aguda e crônica⁽⁸⁷⁾. A forma aguda é geralmente grave, de evolução rápida, afeta predominantemente jovens de ambos os sexos e compromete preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear. A forma crônica tem duração prolongada, instalação lenta, gradual e afeta principalmente indivíduos do sexo masculino acima de 30 anos de idade. As manifestações pulmonares são evidentes em 90% dos adultos doentes e as lesões podem permanecer localizadas (forma unifocal) ou disseminar por via linfática pulmonar ou linfohematogênica, envolvendo outros órgãos ou sistemas (forma multifocal)^(84,85,88).

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem de fatores ligados ao fungo, como virulência e composição antigênica, das condições ambientais e principalmente de fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro, durante a interação com o fungo, como idade, sexo, estado nutricional, constituição genética e capacidade de resposta imunológica. Em relação a este último fator, estudos clínicos e experimentais têm sugerido a interação entre mecanismos inespecíficos e específicos de defesa, que atuam na resistência ao *P. brasiliensis*^(84,86,89,90,91).

A paracoccidioidomicose é imunologicamente caracterizada por uma reação granulomatosa crônica comprometendo especialmente tecidos

pulmonares, mucosas e o sistema fagocítico mononuclear, com disseminação para fígado, baço, adrenais e outros órgãos ^(84,88). Essa reação tecidual representa uma resposta do hospedeiro ao fungo, na tentativa de bloquear e restringir o fungo, impedindo sua multiplicação e disseminação pelos tecidos do hospedeiro ⁽⁸⁴⁾. A evolução do granuloma parece estar relacionada à resposta imune do hospedeiro e aos componentes de parede liberados pelo fungo ⁽⁹²⁾. A formação do granuloma é provavelmente modulada por fatores solúveis secretados por agentes infecciosos, bem como por mediadores originados das células inflamatórias. Nos granulomas, macrófagos diferenciam-se em células epitelióides, chamados macrófagos diferenciados, e/ou fundem-se para formar as CGM ⁽⁹³⁾. Também, leucócitos polimorfonucleares podem ser observados em contato com o fungo, na área central e, envolvendo o granuloma há um halo de células mononucleares ⁽¹⁹⁾. Esse granuloma epitelióide pode estar presente tanto na forma aguda como crônica da doença. Apresenta-se de forma complexa, associando-se tanto a lesões pouco definidas, com grande quantidade de fungos, quanto a lesões epitelióides, que circunscrevem os fungos presentes ⁽⁹⁴⁾.

A análise imunohistoquímica da composição das células presentes nos granulomas epitelióides, obtidos de biópsias de pele ou mucosa de pacientes com paracoccidioidomicose tem demonstrado a presença de um agrupamento central de células HLA-DR⁺, representadas por macrófagos e células epitelióides envolvidas por manto periférico de células T com predomínio da população CD4⁺. Estes achados sugerem que os linfócitos T e as células HLA-DR⁺ estão ativamente envolvidas no processo de formação do granuloma e na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* ⁽⁹⁵⁾. Portanto, macrófagos e linfócitos T parecem ser as células centrais na morfogênese do processo inflamatório e sua atuação sinérgica, tem papel importante na formação e modulação do granuloma, através da produção de citocinas e outros mediadores no sítio inflamatório ⁽¹⁹⁾. É provável que na paracoccidioidomicose o TNF- α , detectado em altos níveis do plasma de pacientes e de animais, atue modulando e amplificando a resposta imune e promovendo a atividade fungicida mediada por macrófagos ^(63,69,96,97).

A multicelularidade, o pleomorfismo celular, a participação do sistema imune modulando a lesão e a complexidade de fatores envolvidos na mediação

da formação do granuloma limitam a compreensão do processo ⁽⁶²⁾. Fortes evidências indicam que a maioria dos macrófagos presentes nos granulomas derivam de monócitos do sangue ^(98,99). Entretanto, não está claro, qual a extensão da proliferação, migração e ativação de outras células típicas que influenciam o início da lesão ^(11,100). Segundo Vigna et al. ⁽⁶²⁾, a tendência de agregação dos fagócitos ao redor de partículas estranhas, formando um granuloma, é um antigo fenômeno revolucionário de defesa do organismo.

O principal significado biológico da formação do granuloma é a limitação da infecção na área local ⁽¹⁰¹⁾, prevenindo, assim, a disseminação do parasita nos tecidos sadios. De acordo com Hogan et al. ⁽¹⁰²⁾, a inflamação granulomatosa é um importante componente da resposta imune contra muitos patógenos intracelulares e alguns antígenos não-degradados. Estas respostas são iniciadas pelos linfócitos CD4+ T com a acumulação de macrófagos, e outras células efectoras em resposta às citocinas de célula T ⁽¹⁰³⁾.

Segundo Parise-Fortes et al. ⁽⁶⁹⁾ na PCM a destruição ou o sucesso da implantação do fungo no tecido do hospedeiro depende não somente das características do fungo, mas principalmente da citocina presente no meio durante o confronto fungo-fagócito na inflamação granulomatosa. Monócitos e macrófagos são os elementos de imunidade inata, mais relevantes, durante a relação fungo-hospedeiro, na reação granulomatosa. Desta forma, se o fungo induzir precocemente a produção de citocinas com atividade supressora ou anti-inflamatória, como IL-10 e TGF- β_1 ^(34,35), poderá desativar o macrófago tecidual, instalando-se nos tecidos e se reproduzir, disseminando-se para vários órgãos e sistemas ⁽¹⁰⁴⁾.

Na paracoccidioidomicose humana há evidências de que monócitos do sangue periférico se encontram ativados pela infecção, produzindo níveis elevados de citocinas com atividade pró-inflamatória, além de outras com ação anti-inflamatória ⁽¹⁰⁵⁾. Vários estudos histopatológicos realizados com pacientes e com animais experimentalmente infectados com *P.brasiliensis* têm descrito a presença de CGM em lesões granulomatosas desta micose ^(18,94,106). Em estudo empregando modelo experimental de paracoccidioidomicose em hamsters, infectados com diferentes cepas de *P.brasiliensis*, verificou-se que a presença de CGM nas lesões, contendo fungos em seu interior, estava

associada à maior sobrevivência dos animais à infecção, sugerindo que essas células desempenham papel importante na defesa contra o fungo ⁽¹⁰⁶⁾.

Em estudo recente, avaliamos a cinética de formação das CGM e sua participação na atividade fungicida contra *P. brasiliensis* a partir de monócitos de indivíduos saudáveis. A fusão dos monócitos humanos *in vitro* e a formação de CGM foram estimuladas por IFN- γ , antígenos de *P. brasiliensis* (AgPb) e meio condicionado obtido de células mononucleares estimuladas por Concanavalina A. Os resultados mostraram que a estimulação com IFN- γ e AgPb induziu aumento estatisticamente significativo na fusão de monócitos e na geração de CGM, após 72 horas de cultura. A avaliação da atividade fungicida demonstrou que tanto monócitos como CGM derivadas de monócitos estimulados por AgPb ou IFN- γ são capazes de matar o fungo. Assim, a atividade fungicida de monócitos e de CGM estimulados por IFN- γ e AgPb poderia ser explicada pela produção de TNF- α induzida tanto por IFN- γ como por componentes da parede celular do *P. brasiliensis* ⁽¹⁰⁷⁾. Estes dados foram confirmados por Siqueira et al. ⁽¹⁰⁸⁾, demonstrando que monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis produzem níveis elevados de TNF- α após infecção *in vitro* com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* desde 4hs de co-cultivo, sugerindo ser o TNF- α um componente essencial para a defesa do hospedeiro contra infecções.

Embora as CGM tenham sido documentadas bem antes do século passado em lesões de tuberculose ⁽³⁾, sendo consideradas característica histológica de inflamação crônica, ainda pouco se conhece sobre os sinais que induzem sua formação, os mecanismos moleculares envolvidos na fusão de macrófagos ou seu significado fisiológico nos sítios de inflamação crônica ⁽¹⁰⁹⁾.

Portanto, o desenvolvimento de um modelo *in vitro* envolvendo CGM formadas a partir de diferentes associações de antígeno de *P. brasiliensis* com citocinas, bem como o estudo da atividade fungicida dessas células contra *P. brasiliensis* poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos que ocorrem *in vivo* nas lesões de pacientes com paracoccidioidomicose.

2. OBJETIVOS:

1. Avaliar o efeito modulador das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e GM-CSF) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β_1) na indução de CGM a partir de monócitos humanos, estimulados com antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* (AgPb).
2. Realizar contagem diferencial de CGM tipo Langhans e CGM tipo corpo estranho, após a formação dessas células *in vitro* a partir de monócitos de indivíduos saudáveis, estimulados com AgPb e citocinas pró- e anti-inflamatórias.
3. Avaliar a atividade fungicida das CGM, formadas a partir de monócitos de indivíduos saudáveis estimulados com AgPb e citocinas pró- e anti-inflamatórias, contra a cepa 18 de *P. brasiliensis*.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Monócitos do sangue periférico foram obtidos de indivíduos saudáveis e cultivados *in vitro* na ausência de estímulo ou na presença de antígenos de *P. brasiliensis* (AgPb) ou AgPb+IFN- γ , AgPb+GM-CSF, AgPb+IL-10, AgPb+TGF- β_1 ou AgPb+TNF- α por 72 h para avaliar o papel modulador das citocinas sobre a geração de CGM.

A avaliação da atividade fungicida das CGM induzidas por citocinas e AgPb foi realizada após 72 h de cultivo. O sobrenadante das culturas foi retirado e as células desafiadas com células leveduriformes viáveis da cepa Pb18 de *P. brasiliensis*. Após 4h de incubação com o fungo a 37°C e 5% de CO₂, a atividade fungicida das CGM foi avaliada por meio da recuperação de fungos viáveis obtida por plaqueamento das culturas em meio BHI-agar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Indivíduos estudados

Foram avaliados monócitos do sangue periférico de 20 indivíduos saudáveis, doadores 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, tendo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, OF. nº. 432/2006-CEP (Anexo 1).

4.2. Cultivo de *P. brasiliensis*

Foi utilizada a amostra Pb18 de *P. brasiliensis*, proveniente da Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. A cepa foi mantida por incubação a 36°C na forma de levedura, com subcultivos semanais, em meio de cultura GPY, contendo 2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 2% de ágar. As células leveduriformes foram utilizadas após 5 e 6 dias de cultivo, para preparo de antígeno e infecção *in vitro* das culturas contendo CGM.

4.3. Teste de viabilidade do *P. brasiliensis*

A cepa 18 de *P. brasiliensis* foi cultivada de acordo com o item acima. Após o crescimento, as células leveduriformes foram removidas da superfície de cultivo com auxílio de alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4mm de diâmetro e aproximadamente 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y.) e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex (Technal, São Paulo, Brasil) por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37°C durante 5 min para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, sendo utilizada uma alíquota para contagem das células leveduriformes em câmara

hemocitométrica, tipo Neubauer. A viabilidade das células fúngicas foi determinada, utilizando-se microscópio com contraste de fase, segundo método descrito por Soares et al. ⁽¹¹⁰⁾. Foram consideradas viáveis as células com aspecto brilhante e, células mortas as com coloração opaca e escura. Foram empregadas nos experimentos, suspensões fúngicas com, no mínimo, 95% de viabilidade.

4.4. Preparo de antígeno “cell-free” de *Paracoccidioides brasiliensis*

O antígeno de *P. brasiliensis* (AgPb) foi preparado segundo Camargo et al. ⁽¹¹¹⁾ a partir de células leveduriformes da amostra Pb18 cultivada por 5 dias, conforme descrito no item 4.1. O crescimento fúngico correspondente a três tubos foi pesado e, cerca de 300 mg de células foram ressuspensos em 1 mL de solução salina tamponada com fosfatos 0,15M, pH 7,2, (PBS) estéril. A suspensão fúngica foi homogeneizada em agitador de tubos tipo Vortex (Technal) por 30 seg e, em seguida centrifugada durante um minuto a 1000 g. O sobrenadante obtido foi esterilizado por filtração em membrana Millipore 0,22µm e denominado “antígeno *cell-free*”, sendo a concentração protéica determinada pelo método de Lowry et al. ⁽¹¹²⁾ e, as alíquotas armazenadas a – 20°C.

4.5. Preparo do extrato-aquoso de células fúngicas

A amostra Pb192 de *P. brasiliensis* foi cultivada em meio de cultura GPY, contendo 2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 2% de ágar por incubação a 36°C. As culturas foram utilizadas após 5 dias de cultivo para o preparo do extrato aquoso segundo o método de Kurita et al. ⁽¹¹³⁾. O crescimento de um tubo de cultura de Pb192 foi retirado com alça de platina e colocado em frasco contendo 250 mL de GPY, sendo incubado a 36°C com agitação constante de 140 rpm por 7 dias. Após o período, o meio foi distribuído em frascos plásticos que foram centrifugados a 2500 rpm por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado fúngico foi pesado, sendo adicionado volume de água destilada estéril suficiente para obtenção de suspensão fúngica a 10%. A seguir, a suspensão foi autoclavada a 127°C por

15 min e deixada em repouso por 3 dias à temperatura ambiente. Após esse período, os frascos contendo essa suspensão foram centrifugados a 400 g por 15 min, o sobrenadante retirado com esterilidade e denominado extrato aquoso. As alíquotas desse extrato foram armazenadas a – 20°C até o momento de uso.

4.6. Isolamento e cultura de monócitos

Sangue periférico de indivíduos saudáveis, doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP – Campus de Botucatu foi obtido por punção venosa sendo 20 mL colocados em tubo estéril, contendo 20 U/mL de heparina (Liquemine, Roche). As células mononucleares foram obtidas por meio de separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), segundo a técnica descrita por Bøyum ⁽¹¹⁴⁾. O anel rico em células mononucleares foi lavado, inicialmente, com solução gelada de EDTA 0,01M em PBS, por 10 min a 200 g e logo após com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) por mais 10 min a 200 g. Após esses procedimentos as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal (Gibco) inativado (RPMI completo). A identificação, contagem e a viabilidade dos monócitos foram realizadas por incorporação de vermelho neutro. Para isso, 50 µL da suspensão de células mononucleares foram incubadas por 10 min a 37°C com 0,45 mL da solução do corante a 0,02%. Os monócitos foram diferenciados dos linfócitos por apresentarem citoplasma de coloração vermelha. Assim, a concentração celular foi ajustada para 2×10^6 monócitos viáveis/mL após contagem em câmara hemocitométrica.

4.7. Formação de células gigantes multinucleadas

A cultura de monócitos para geração de CGM foi realizada conforme técnica descrita por Enelow et al. ⁽³¹⁾. A suspensão de células mononucleares contendo 2×10^6 monócitos/mL foi colocada em volume de 50 µL, como uma única gota no centro do orifício de placa para cultura de células contendo 24

orifícios de 16 mm de diâmetro (Limbro, Flow Lab. Inc., USA) para produzir uma monocamada densa de monócitos aderentes. As culturas foram incubadas por 60 min a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂. Após esse período, os orifícios da placa foram lavados com meio RPMI 1640 (Gibco) para retirada das células não-aderentes e os monócitos cultivados, sem estímulo, com 1 mL de meio RPMI completo (cultura controle). Outros orifícios receberam meio RPMI completo, adicionado de associações de AgPb e citocinas, conforme descrito a seguir:

1. Meio RPMI completo
2. Meio RPMI completo + AgPb
3. Meio RPMI completo + AgPb + GM-CSF
4. Meio RPMI completo + AgPb + IFN- γ
5. Meio RPMI completo + AgPb + IFN- γ + GM-CSF
6. Meio RPMI completo + AgPb + IL-10
7. Meio RPMI completo + AgPb + IL-10 + GM-CSF
8. Meio RPMI completo + AgPb + TGF- β_1
9. Meio RPMI completo + AgPb + TGF- β_1 + GM-CSF
10. Meio RPMI completo + AgPb + TNF- α
11. Meio RPMI completo + AgPb + TNF- α + GM-CSF

As culturas foram observadas diariamente, utilizando-se microscópio invertido (Nikon), para avaliação do agrupamento e fusão celular. Após 3 dias, as células foram fixadas com metanol e coradas com corante May-Grunwald-Giemsa (Sigma) (MGG), para avaliação microscópica das CGM e do índice de fusão. Foram consideradas CGM, células contendo 3 ou mais núcleos por célula. A taxa de fusão dos monócitos foi determinada pela análise das células em microscópio (Nikon) utilizando-se objetiva (20 x) e ocular (10 x). No mesmo campo microscópico, foram contados o número de núcleos dentro da CGM e o número total de núcleos. Pelo menos 500 núcleos foram contados em cada experimento. O índice de fusão foi calculado pela seguinte fórmula:

IF = (número de núcleos dentro de GCM / numero de núcleos contados) x 100.

4.8. Avaliação da atividade fungicida

Culturas contendo CGM foram preparadas conforme descrito no item 4.7. Após 3 dias de cultivo, o sobrenadante da cultura foi aspirado e as células incubadas com 1mL de suspensão da amostra Pb18, contendo 4×10^4 células leveduriformes/mL, viáveis e diluídas em meio RPMI 1640 (Gibco) adicionado de 10% de soro AB humano não inativado. Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas suspensões de células fúngicas, diluídas em RPMI, em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com as CGM, sendo consideradas culturas controles.

Após o período de 4h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as células submetidas a diversas lavagens com água destilada. Este processo permite que os monócitos 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 consideradas como culturas experimentais. O mesmo procedimento foi realizado com as suspensões controles, contendo apenas o fungo.

Ao final do processo, o material obtido a partir de lavagens das culturas controles e das experimentais com água destilada, contendo fungos viáveis ou não, foi centrifugado e ressuspenso em volume de água destilada. Em seguida, 100 μ L dessas suspensões fúngicas foram semeados em três placas contendo meio de cultura ágar-infusão de cérebro-coração (BHI-ágar – Difco Lab., Michigan, USA), suplementado com 4% de soro de cavalo e 5% de extrato aquoso, preparado segundo Kurita et al. ⁽¹¹³⁾, conforme descrito no item 4.4. A suspensão foi semeada, com auxílio de bastões de vidro em forma de L, por toda a superfície do meio de cultura e as placas incubadas em estufa a 36°C.

A atividade fungicida das CGM foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) após 10 dias de semeadura e calculada através da seguinte fórmula:

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

4. 9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Instat, San Diego, Califórnia, USA. Os dados referentes à geração de CGM e à atividade fungicida das CGM contra o *P.brasiliensis*, nos diferentes tratamentos, foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) para amostras dependentes e as médias comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer ⁽¹¹⁵⁾. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito de GM-CSF sobre a formação de CGM *in vitro* a partir de monócitos humanos estimulados com antígenos de *P. brasiliensis*

Culturas de monócitos obtidos de sangue periférico humano foram incubadas na presença ou ausência de 100 ug/mL de AgPb e de concentrações de GM-CSF variando de 50 a 1000 UI/mL e, o índice de fusão dessas células para geração de CGM foi avaliado após três dias de cultivo a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Os resultados estão representados na Figura 1 e mostram que o estímulo com AgPb ou AgPb adicionado de diferentes concentrações de GM-CSF resultou em índices de fusão significativamente mais elevados do que os obtidos nas culturas controles, não estimuladas. Os índices de fusão obtidos nas culturas tratadas com AgPb+100 UI/mL de GM-CSF foram significativamente maiores quando comparados aos das culturas estimuladas apenas com AgPb e com AgPb+GM-CSF nas concentrações de 250, 500 e 1000 UI/mL. Os valores baixos de índices de fusão obtidos com concentrações maiores de GM-CSF sugerem efeito tóxico desta citocina sobre os monócitos.

A análise das culturas mostrou que os índices de fusão para formação de CGM com concentrações de 50, 100 e 200 UI/mL de GM-CSF foram os que mantiveram a viabilidade das células e não apresentaram diferença estatística entre si. Em vista destes resultados a dose de 100 UI/mL de GM-CSF foi escolhida para os estudos de indução e modulação da formação de CGM.

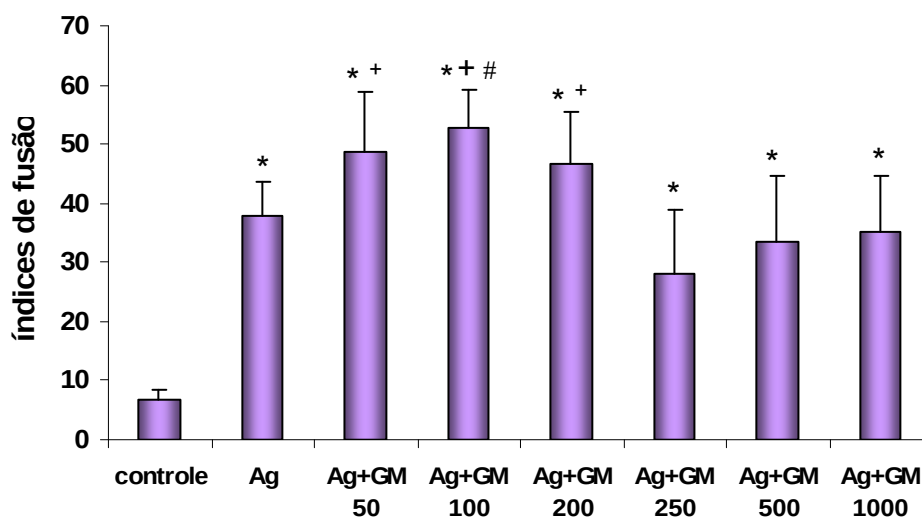


Figura 1. Índices de fusão obtidos após três dias de cultivo de monócitos humanos na ausência (controle) ou na presença de antígenos de *P.brasiliensis* (Ag) e de diferentes concentrações de Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de dez experimentos independentes.

*($p < 0,001$) vs controle; +($p < 0,05$) vs Ag+GM 250, Ag+GM 500, Ag+ GM 1000;

#($p < 0,05$) vs Ag (ANOVA)

5.1. Efeito de IFN-gama sobre a formação de CGM *in vitro* a partir de monócitos humanos estimulados com antígenos de *P. brasiliensis*

Os resultados representados na Figura 2 mostram que os índices de fusão obtidos após três dias de incubação nas culturas estimuladas com AgPb+300 UI/mL de IFN- γ foram significativamente maiores em comparação aos das culturas controle, não estimuladas e das estimuladas com AgPb+IFN- γ nas concentrações de 50 e 100 UI/mL. O estímulo das células com AgPb apenas, resultou em índices de fusão semelhantes aos obtidos com o tratamento empregando AgPb+300 UI de IFN- γ .

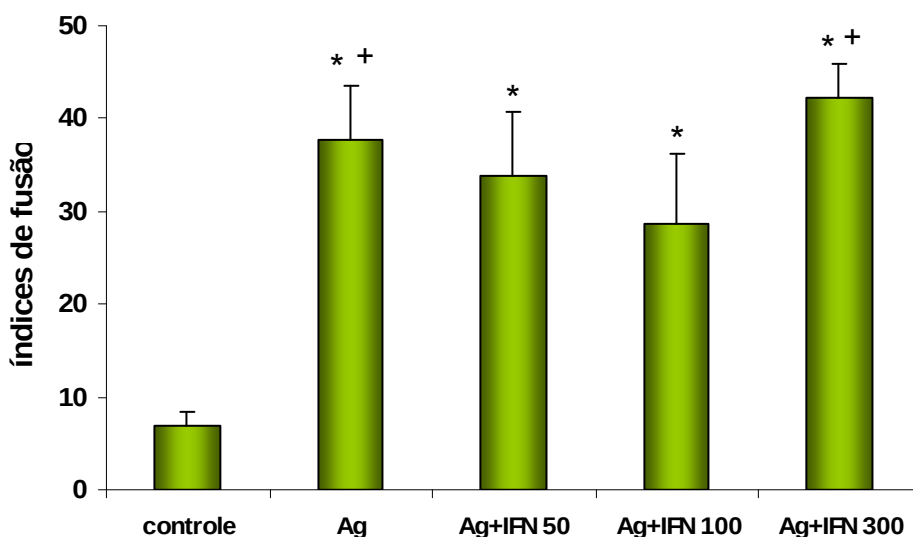


Figura 2. Índices de fusão obtidos após três dias de cultivo de monócitos humanos na ausência (controle) ou na presença de antígenos de *P.brasiliensis* (Ag) e de diferentes concentrações de interferon-gama (IFN). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de dez experimentos independentes.

*($p < 0,001$) vs controle; +($p < 0,05$) vs Ag+IFN 100 (ANOVA)

5.3. Efeito de IL-10 sobre a formação de CGM *in vitro* a partir de monócitos humanos estimulados com antígenos de *P. brasiliensis*

A figura 3 mostra os resultados de índices de fusão obtidos nas culturas de monócitos tratadas ou não com AgPb ou AgPb+IL-10 nas concentrações de 50, 100 e 200 UI/mL. Os índices de fusão detectados nas culturas estimuladas apenas com AgPb foram significativamente mais elevados em comparação aos índices obtidos após estímulo com AgPb e adição das diferentes concentrações de IL-10 e aos das culturas controle, não estimuladas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos com IL-10 e os das culturas controle. Os resultados indicam que a adição de IL-10, nas diferentes concentrações empregadas, às culturas estimuladas com AgPb inibe a formação de CGM.

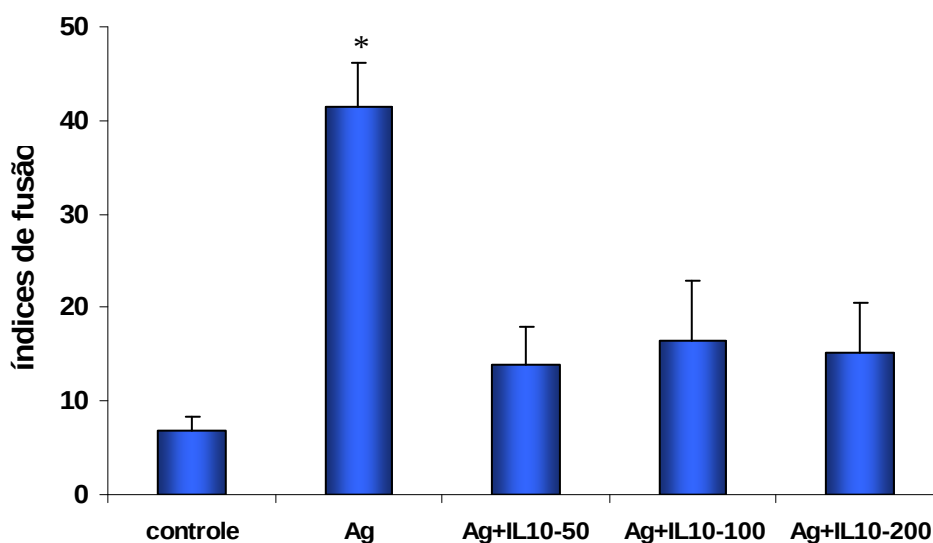


Figura 3. Índices de fusão obtidos após três dias de cultivo de monócitos humanos na ausência (controle) ou na presença de antígenos de *P. brasiliensis* (Ag) e de diferentes concentrações de Interleucina-10 (IL-10). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de dez experimentos independentes.

*($p < 0,001$) vs controle, IL10-50, IL10-100, IL10-200 (ANOVA).

5.4. Efeito de TGF- β_1 sobre a formação de CGM *in vitro* a partir de monócitos humanos estimulados com antígenos de *P. brasiliensis*

Os resultados dos índices de fusão obtidos após cultivo dos monócitos na presença ou ausência de AgPb e de diferentes concentrações de TGF- β_1 (Figura 4) mostram que esta citocina apresenta efeito modulador negativo sobre a geração de CGM. Os índices de fusão foram significativamente menores quando comparado aos resultados obtidos com o estímulo por AgPb apenas. Os menores índices de fusão foram obtidos com as doses de 250 e 500 pg/mL de TGF- β_1 , cujos resultados não diferiram estatisticamente dos obtidos nas culturas controle, não estimuladas.

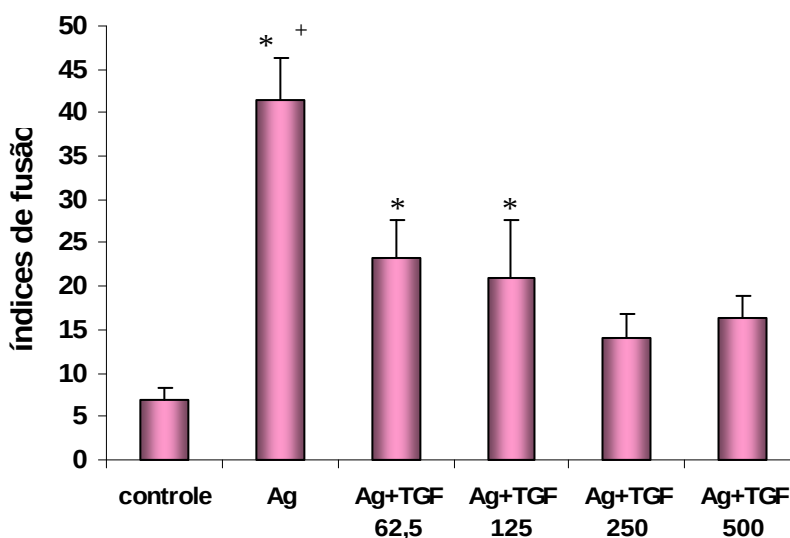


Figura 4. Índices de fusão obtidos após três dias de cultivo de monócitos humanos na ausência (controle) ou na presença de antígenos de *P.brasiliensis* (Ag) e de diferentes concentrações de Fator de crescimento e transformação (TGF). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de dez experimentos independentes.

*($p < 0,05$) vs controle; +($p < 0,01$) vs Ag+TGF 62,5; Ag+TGF 125; Ag+TGF 250; Ag+TGF 500 (ANOVA).

5.5. Efeito de TNF-alfa sobre a formação de CGM *in vitro* a partir de monócitos humanos estimulados com antígenos de *P. brasiliensis*

A Figura 5 representa os resultados das culturas de monócitos estimulados com AgPb ou com AgPb+TNF- α nas concentrações de 50, 100 e 200 UI/mL para a indução da formação de CGM. Os índices de fusão nestas culturas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, quando comparados entre si. Entretanto, foram significativamente maiores do que os determinados nas culturas controle, não estimuladas.

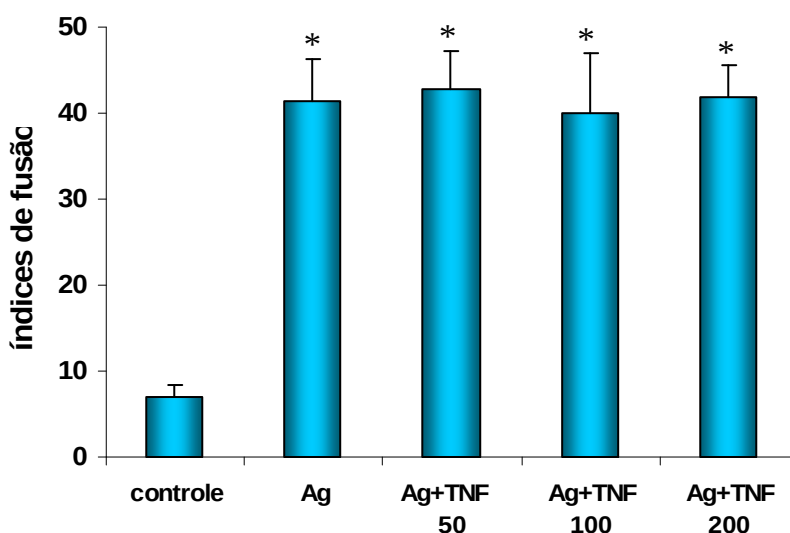


Figura 5. Índices de fusão obtidos após três dias de cultivo de monócitos humanos na ausência (controle) ou na presença de antígenos de *P.brasiliensis* (Ag) e de diferentes concentrações de Fator de necrose tumoral alfa (TNF). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de dez experimentos independentes.

*($p < 0,001$) vs controle

5.6. Efeito modulador de diferentes citocinas sobre a formação de CGM a partir de monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, estimulados com antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*

O efeito modulador das diferentes citocinas sobre a formação de CGM induzida por AgPb pode ser melhor visualizado na figura 6. Assim, monócitos humanos foram cultivados na ausência de estímulo (controle), na presença de AgPb ou das seguintes associações: AgPb+GM-CSF, AgPb+IFN, AgPb+IFN+GM-CSF, AgPb+IL-10, AgPb+IL-10+GM-CSF, AgPb+TGF, AgPb+TGF+GM-CSF, AgPb+TNF ou AgPb+TNF+GM-CSF. As concentrações das citocinas empregadas para o estudo do efeito modulador foram: GM-CSF (100 UI/mL), IFN- γ (300 UI/ml), IL-10 (50 UI/mL), TGF- β_1 (250 pg/mL) e TNF- α (50 UI/mL).

Os resultados mostram que os índices de fusão obtidos nas culturas estimuladas com AgPb e tratadas com GM-CSF, IFN, TNF, IFN+GM-CSF, IL-10+GM-CSF, TGF+GM-CSF e TNF+GM-CSF foram significativamente mais elevados do que nas culturas controle, não estimuladas. A adição de GM-CSF às culturas estimuladas com AgPb ou com AgPb+IFN- γ , causou aumento estatisticamente significativo dos índices de fusão, quando comparados aos da cultura estimulada apenas com o antígeno. Além disso, o tratamento das culturas com AgPb+IL-10+GM-CSF e AgPb+TGF+GM-CSF induziu índices de fusão maiores do que os obtidos no tratamento com IL-10 ou TGF. Esses resultados mostram que o GM-CSF reverteu, em parte, o efeito inibidor da formação de CGM induzido por IL-10 e TGF- β_1 .

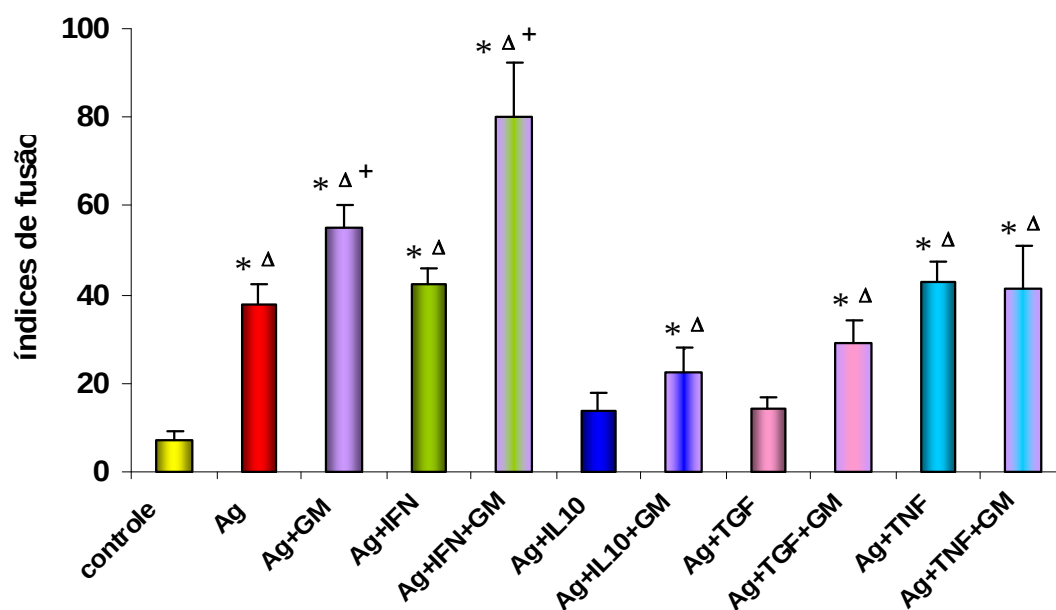


Figura 6. Índices de fusão obtidos após três dias de cultivo de monócitos humanos na ausência (controle) ou na presença de antígenos de *P.brasiliensis* (Ag) e de diferentes associações de citocinas com AgPb e GM-CSF (GM). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de dez experimentos independentes.

*($p < 0,001$) vs controle; Δ ($p < 0,05$) vs Ag+IL10, Ag+TGF; +($p < 0,01$) vs Ag, Ag+GM, Ag+IFN, Ag+IL10+GM, Ag+TGF+GM, Ag+TNF, Ag+TNF+GM (ANO

5.7. Efeito de citocinas sobre a formação de CGM tipo Langhans e tipo Corpo estranho estimuladas *in vitro* com antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis*

Na tabela 1 estão expressos os resultados de formação de CGM tipo Langhans e tipo Corpo estranho produzidos após incubação de monócitos humanos na presença de AgPb ou AgPb associado às diferentes citocinas empregadas. Assim, os monócitos foram estimulados com AgPb ou AgPb+IFN- γ (300 UI/mL), AgPb+GM-CSF (100 UI/mL), AgPb+IL-10 (50 UI/mL), Ag+TGF- β_1 (250 pg/mL) e AgPb+TNF (50 UI/mL) por três dias a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂. Os resultados mostraram que há um predomínio de formação de CGM tipo corpo estranho com todos os estímulos empregados, embora haja um discreto aumento de CGM tipo Langhans quando os monócitos foram estimulados com AgPb+IFN.

Tabela 1. Células gigantes multinucleadas (CGM) tipo Langhans e tipo Corpo estranho detectadas em cultura de monócitos humanos estimulados com antígenos de *P.brasiliensis* (AgPb) ou com AgPb adicionado das citocinas Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), Interferon-gama (IFN- γ), Interleucina-10 (IL-10), Fator de crescimento e transformação (TGF- β_1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)

Estímulo	% CGM – Langhans	% CGM – Corpo estranho
AgPb	8,6 $\pm$ 2,4 *	91,4 $\pm$ 6,3 ⁺
AgPb + GM-CSF	14,3 $\pm$ 3,5 *	85,7 $\pm$ 4,8 ⁺
AgPb + IFN- γ	20,2 $\pm$ 3,1 * Δ	79,8 $\pm$ 5,9 ⁺ $\diamond$
AgPb + IL-10	1,1 $\pm$ 0,3	98,9 $\pm$ 1,2 ⁺
AgPb + TGF- β_1	10,4 $\pm$ 4,7 *	89,6 $\pm$ 6,2 ⁺
AgPb + TNF- α	14,9 $\pm$ 3,5 *	85,1 $\pm$ 5,7 ⁺

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de cinco experimentos independentes.

* (p<0,05) vs AgPb+IL-10; Δ (p<0,05) vs AgPb, AgPb+IL-10, AgPb+TGF- β_1 ;

$\diamond$ (p<0.05) vs AgPb, AgPb+GM-CSF, AgPb+IFN- γ , AgPb+TGF- β_1 , AgPb+TNF- α ;

+ (p<0,01) vs CGM-Langhans (ANOVA)

Na figura 7 podem ser observados exemplos de CGM, formadas após três dias de cultivo com estímulo de AgPb+IFN- γ . As CGM apresentam maior número de núcleos dispostos irregularmente ou na periferia das células, dando aspecto de CGM tipo corpo estranho (A) ou de Langhans (B e C) respectivamente.

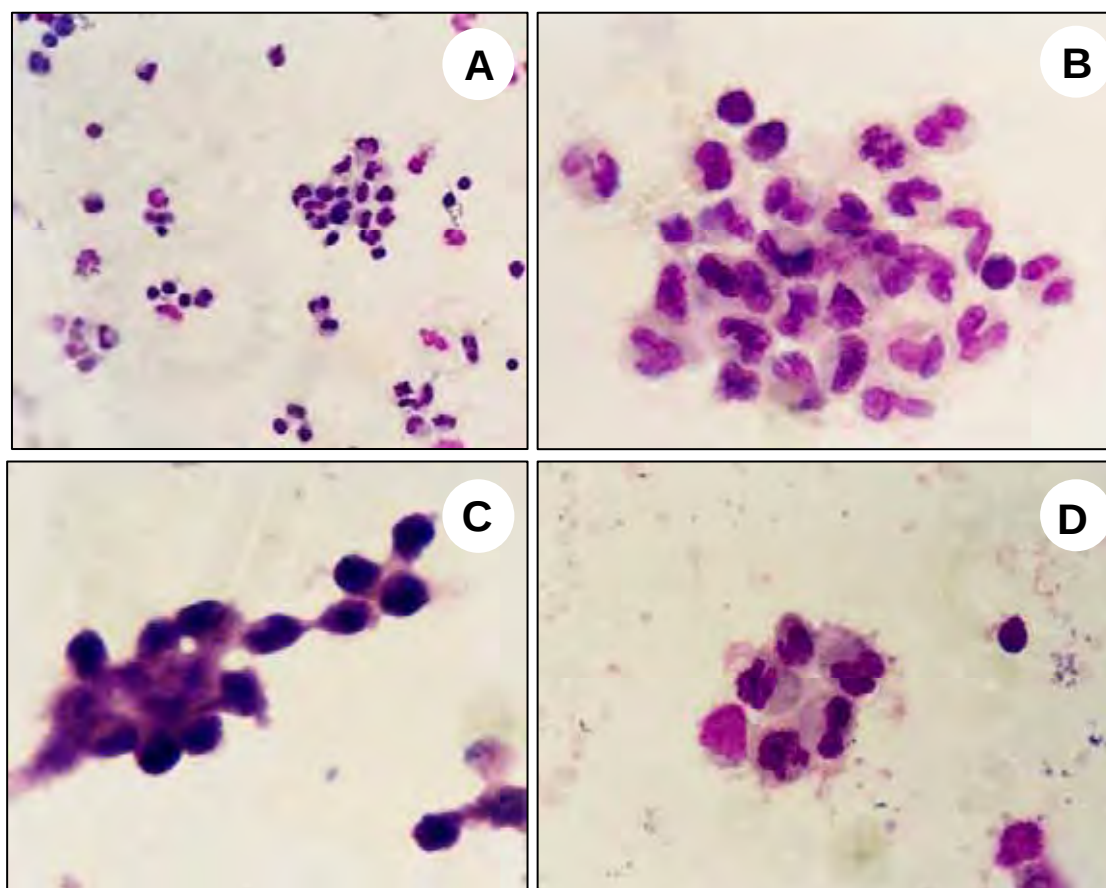


Figura 7. Formação de células gigantes multinucleadas após três dias de cultivo de monócitos na presença de antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* e IFN- γ (300 UI/mL). As células foram fixadas e coradas por May-Grunwald-Giemsa. A: Células gigantes tipo corpo estranho (200x) e B: (1000x); C: Célula gigante tipo Langhans em formação (1000x); D: Célula gigante tipo Langhans, contendo 6 núcleos (1000x).

5.8. Atividade fungicida de CGM obtidas de monócitos humanos estimulados com antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* (AgPb) ou com AgPb e citocinas pró e anti-inflamatórias

Na figura 7 estão representados os resultados da atividade fungicida de CGM após três dias de cultivo sem estímulo (controle) ou com os estímulos AgPb, IFN- γ , IL-10, TNF- α , TGF- β_1 e associações destas citocinas com AgPb e GM-CSF. A atividade fungicida foi avaliada pela recuperação de células fúngicas viáveis após plaqueamento em meio de cultura, conforme descrito no item 4.7 de material e métodos. Os resultados mostraram que CGM estimuladas apenas com AgPb, AgPb+GM-CSF ou IFN- γ tiveram atividade fungicida significativamente mais elevada quando comparada com as culturas controle e com as culturas estimuladas apenas com as citocinas IL-10, TGF- β_1 e TNF- α . A atividade fungicida das CGM obtidas após estímulo com associações de citocinas com o AgPb e GM-CSF foi estatisticamente mais elevada quando comparada com as citocinas isoladas, sugerindo que o GM-CSF eleva a capacidade de macrófagos de matar o fungo.

A adição de GM-CSF às culturas tratadas com IL-10 induziu pequena atividade fungicida, em comparação à observada nas culturas estimuladas com AgPb adicionado ou não das demais citocinas, porém significativamente maior do que nas culturas tratadas apenas com Ag+IL-10. A atividade fungicida resultante das culturas de monócitos tratadas com AgPb+TGF+GM-CSF ou AgPb+TNF+GM-CSF foi também estatisticamente significativa quando comparada com o resultado obtido de monócitos cultivados apenas com TGF- β_1 ou TNF- α respectivamente. Em conjunto, os resultados indicam que IL-10 e TGF- β_1 tiveram seu efeito supressor parcialmente revertido pela adição de GM-CSF.

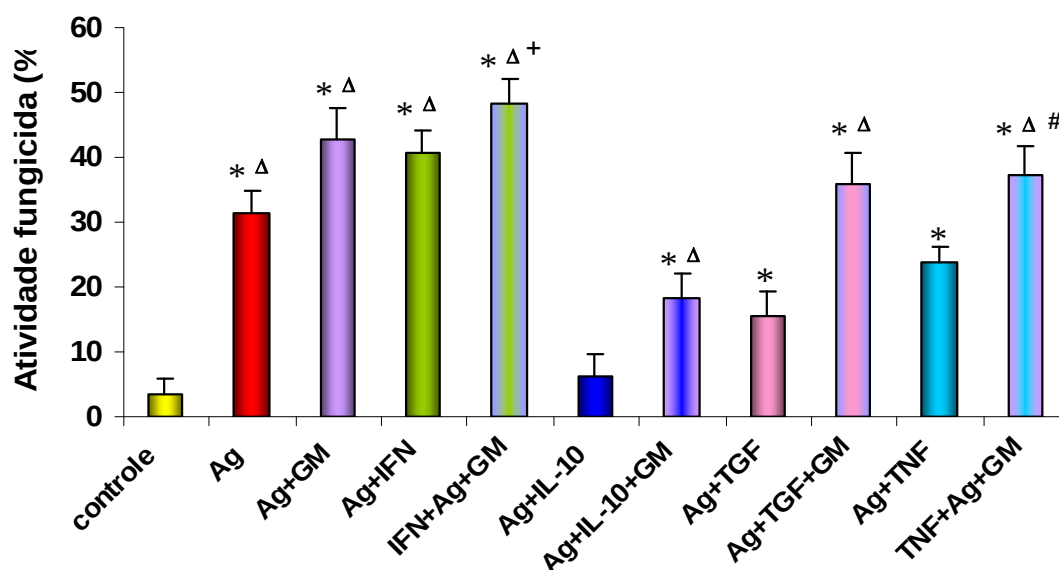


Figura 7. Atividade fungicida de CGM contra *P.brasiliensis* após ativação com antígenos de *P.brasiliensis* (Ag) ou com Ag adicionado das citocinas Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), Interferon-gama (IFN- γ), Interleucina-10 (IL-10), Fator de crescimento e transformação (TGF- β_1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão de dez experimentos independentes.

* ($p < 0,01$) vs controle; Δ ($p < 0,01$) vs Ag+IL-10; Ag+TGF; # ($p < 0,05$) vs Ag+TNF; + ($p < 0,01$) vs Ag, Ag+GM, Ag+IFN, Ag+IL-10+GM, Ag+TGF+GM, Ag+TNF, Ag+TNF+GM; # ($p < 0,05$) vs Ag+TNF (ANOVA).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo permitiu avaliar o efeito modulador de citocinas pró- e anti-inflamatórias na formação de CGM e na atividade fungicida dessas células contra o *P. brasiliensis*.

Utilizamos antígenos de *P. brasiliensis* (AgPb) para indução de CGM a partir de monócitos. Essa estimulação antigênica induziu aumento estatisticamente significativo na fusão de monócitos, após 72 horas de cultura, quando comparado com as células controle não estimuladas, concordando com resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório ⁽¹⁰⁷⁾. O AgPb empregado na indução de CGM é denominado *cell-free-antigen*, caracterizado por Camargo et al. ⁽¹¹¹⁾ e contém componentes da superfície celular do fungo, revelando grande complexidade de moléculas com massas variando de 10 a 110 KDa, quando analisado por SDS-PAGE. Por conter alta concentração da glicoproteína de 43 KDa (gp43), o *cell-free-antigen* é utilizado no diagnóstico da paracoccidiodomicose.

Outros autores empregaram antígenos de parasitas para estudo da formação de CGM *in vitro*. Silva-Teixeira et al. ⁽¹¹⁶⁾, utilizando antígenos obtidos de ovos e de verme adulto de *Schistosoma mansoni* para indução de CGM por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com esquistossomose, verificaram aumento do número de CGM, significativamente maior do que o induzido por derivado purificado de proteína (PPD). Segundo os autores, o processo de formação de CGM induzido por antígenos pode estar envolvido na regulação da resposta imune em várias condições inflamatórias. Na esquistossomose, estas células poderiam regular a resposta por bloqueio do acesso de outros tipos celulares como linfócitos T ao estímulo antigênico persistente, presente nos ovos do parasita ⁽¹¹⁶⁾. Heinemann et al. ⁽⁵⁹⁾ demonstraram que leveduras de *Candida albicans*, mortas pelo calor, eram capazes de induzir a formação de CGM dentro de 4-6 dias. Os autores detectaram TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante destas culturas e sugeriram que o TNF- α era importante na formação de CGM e proliferação de monócitos. Portanto, em nosso estudo, os resultados da formação de CGM induzidas por AgPb, sugerem que essas células podem ter papel relevante nos mecanismos

imunorregulatórios envolvidos na formação do granuloma frente aos antígenos do fungo.

O estudo do efeito modulador de CGM sobre a formação de CGM *in vitro* a partir de monócitos humanos estimulados com AgPb mostrou que essa citocina, empregada na concentração de 100 UI/mL estimulou a formação de CGM com índices de fusão significativamente mais elevados em comparação às culturas estimuladas apenas com AgPb. O aumento do índice de fusão confirma o efeito ativador do GM-CSF sobre monócitos, favorecendo o efeito de multinucleação dessas células induzida pelo AgPb. Entretanto, concentrações elevadas (250, 500 e 1000 UI/mL) desse fator de crescimento não induziram a formação de CGM adequadamente, apresentando índices de fusão inferiores quando comparado às culturas estimuladas com concentrações menores (50, 100 e 200 UI/mL) e com o AgPb, sugerindo que GM-CSF tem efeito tóxico, quando utilizado em altas concentrações.

Este fato está de acordo com os experimentos de Tambuyzer & Nouwen⁽⁵⁶⁾, que observaram completa inibição da formação de CGM quando células da micróglia de suínos foram estimuladas com altas concentrações de GM-CSF após 4 dias de incubação. Segundo esses autores, o GM-CSF atuou mais eficientemente como controlador do estado de ativação das células do que na multinucleação das CGM. Porém estes dados são conflitantes com os relatados por outros autores, demonstrando que o GM-CSF atua como agente indutor de formação de CGM^(117,118).

Segundo Dugast et al.⁽¹¹⁹⁾ o GM-CSF promove a diferenciação de monócitos em macrófagos, porém não induz a formação de CGM, sendo necessário a presença de IL-4 para a fusão dos macrófagos em CGM. O GM-CSF aumenta 3,6 vezes a geração de macrófagos a partir de monócitos⁽¹²⁰⁾. Entretanto, uma vez que os macrófagos são formados, purificados e transferidos para as culturas convencionais, o GM-CSF isoladamente não é capaz de induzir a diferenciação de macrófagos em CGM⁽¹¹⁹⁾. Deste modo, para o estudo da modulação da formação de CGM estimuladas com AgPb e GM-CSF associamos as citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (TGF- β_1 e IL-10).

No presente experimento, a adição de diferentes concentrações de IFN- γ nas culturas de monócitos estimuladas com AgPb para a geração de CGM mostrou que o efeito dessa citocina sobre o índice de fusão e de formação de CGM foi dose-dependente. Os índices de fusão obtidos com a concentração de 300 UI/mL de IFN- γ foram significativamente maiores do que os observados nas doses de 50 e 100 UI/mL, resultado semelhante ao descrito por outros autores ⁽²¹⁾.

O IFN- γ , nos estudos de formação de CGM *in vitro*, induzida por diferentes estímulos, parece desempenhar um papel central entre as citocinas indutoras de fusão ⁽⁹⁾. Esta citocina atua promovendo o agrupamento de monócitos e a adesão celular, por mecanismo envolvendo mudança na expressão e distribuição celular de moléculas de ICAM-1 ⁽²¹⁾.

Atribui-se ao TNF- α a capacidade de atrair monócitos e induzir sua diferenciação em células epitelióides, bem como ativação de mecanismos microbicidas ^(121,122,123). Assim, para verificar o seu efeito na formação de CGM por monócitos estimulados com AgPb, utilizamos as concentrações de 50, 100 e 200 UI/mL. Observamos que, indiferentemente à dose utilizada, os índices de fusão obtidos foram mais elevados quando comparados à cultura controle, mas não mostraram diferença significativa, entre as doses de TNF- α empregadas, nem em relação ao estímulo das células com AgPb apenas. Este resultado talvez possa ser explicado pelo fato que, segundo Franitza et al. ⁽¹²⁴⁾, o TNF- α não tenha efeito quimioatrativo próprio, mas coopere com outras quimiocinas *in vitro* para atrair a migração de células inflamatórias, auxiliando na manutenção dessas células recrutadas para o desenvolvimento do granuloma.

Em outro experimento, o TNF- α não foi detectado no início da cultura, mas após o aparecimento das CGM, quando sua concentração foi determinada, sugerindo que o TNF- α está envolvido na multinucleação espontânea ⁽¹²⁵⁾. Também é observado que macrófagos primários, cultivados por longo período, induzem espontaneamente a secreção de TNF- α , que atua nos macrófagos via mecanismos autócrinos e parácrinos ⁽¹²⁶⁾.

A cinética de produção de citocinas muda durante o curso dos processos inflamatórios. As citocinas IL-1 α e TNF- α são sintetizadas em níveis elevados por CGM desde o início até que ocorra a maturação do processo inflamatório.

Considerando que as CGM são elementos celulares comuns da inflamação granulomatosa, IL-1 α e TNF- α são citocinas significativamente envolvidas no recrutamento e ativação de células infiltradas, bem como na formação do granuloma ⁽⁶⁰⁾, sendo razoável a proposta de que CGM contribuem para iniciação e manutenção dos processos inflamatórios.

Existem relatos que demonstram a presença de citocinas inflamatórias nas CGM, detectadas por imunocitoquímica ^(127,128). A detecção da transcrição de citocinas por RT-PCR tem sido mostrada, mas somente de maneira indireta utilizando-se modelos *in vitro* ^(80,118). A demonstração do gene de transcrição da citocina é importante, considerando a presença da citocina demonstrada imunohistologicamente causada pelas atividades fagocítica e endocítica que estas células normalmente manifestam, particularmente em ambiente inflamatório com alta produção de citocinas inflamatórias ⁽³²⁾.

Para o estudo do efeito modulador do TGF- β_1 sobre a formação de CGM, estimuladas por AgPb, utilizamos as doses de 62,5, 125, 250 e 500 pg/mL. Os resultados mostram que essa citocina modula negativamente a formação de CGM. Os índices de fusão foram significativamente menores quando comparado às culturas estimuladas apenas com o AgPb, não havendo diferença entre os resultados obtidos com as doses de TGF- β_1 empregadas. O TGF- β é uma importante molécula imunomodulatória, que em geral exerce efeitos imunossupressores, inibindo a proliferação de células T e B e das células hematopoiéticas ⁽¹²⁹⁾. Esta citocina em concentrações mais baixas é pró-inflamatória, enquanto em altas concentrações torna-se profundamente imunossupressora, diminuindo a produção de IFN- γ e TNF- α ⁽¹³⁰⁾ pelas células NK, antagonizando os efeitos do IFN- γ e diminuindo a expressão de moléculas de classe II ⁽¹³¹⁾. O TGF- β_1 também é potente fibrogênico ⁽¹³⁰⁾, sendo possível que as CGM estejam envolvidas na regulação da inflamação e na indução de fibrose e cicatrização da lesão ⁽³²⁾. Essa citocina parece ser importante na manutenção e balanço entre controle e destruição de organismos infecciosos e, por outro lado também pode prevenir o dano tecidual causado pela intensidade da resposta imune ⁽¹³²⁾.

O efeito da IL-10 sobre a geração de CGM a partir de monócitos, estimulados com AgPb, empregando-se as concentrações de 50, 100 e 200

UI/mL mostrou que a IL-10 inibe a formação de CGM. Os índices de fusão obtidos não foram estatisticamente significativos quando comparados à cultura controle, não estimulada. Considerando-se que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, nossos resultados estão de acordo com os de outros autores, que relatam o efeito regulatório dessa citocina sobre a produção de CGM estimuladas com M-CSF ⁽¹³³⁾. A IL-10 parece desempenhar papel importante na regulação da formação de granulomas em resposta à infecção pelo *Mycobacterium bovis*. Jacobs et al. ⁽¹³⁴⁾ demonstraram que camundongos geneticamente deficientes em IL-10, quando infectados com *M. bovis*, desenvolvem resposta imune eficiente para eliminação das micobactérias, com granulomas bem definidos, contendo grande quantidade de células T e macrófagos e expressando altos níveis de TNF- α e da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). Os autores sugerem que a imunidade celular está aumentada na ausência da IL-10, resultando em resposta granulomatosa de maior intensidade, capaz de acelerar a eliminação das micobactérias. A atividade supressora da IL-10 sobre macrófagos tem como principal função conter os efeitos deletérios da reação inflamatória produzida pelo TNF- α , descritos em doenças crônicas.

Além do estudo do efeito modulador de cada uma das diferentes citocinas, GM-CSF, IFN- γ , IL-10, TGF- β_1 e TNF- α sobre a formação de CGM induzidas por AgPb, avaliamos a modulação da formação de CGM, utilizando associações de AgPb + GM-CSF com citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (TGF- β_1 e IL-10). Verificamos que a formação de CGM foi significativamente mais elevada quando das associações com as citocinas inflamatórias em comparação com as associações com as citocinas anti-inflamatórias. Os monócitos estimulados com AgPb + GM-CSF + IFN- γ tiveram índices de fusão significativamente mais elevados quando comparados aos obtidos com os demais estímulos. Nossos resultados confirmaram sugestões prévias de que o IFN- γ é a principal citocina envolvida na indução de CGM (4,9,17,21,38,135).

Em estudo anterior demonstramos que a pré-incubação da cultura contendo IFN- γ com anticorpo monoclonal específico anti-IFN- γ impediu o agrupamento e a fusão celular dos monócitos, confirmando a importância

dessa citocina na formação de CGM ⁽¹³⁶⁾. Tem sido descrito que anticorpos anti-IFN- γ inibem a formação de CGM tanto *in vivo* ^(14,40) como *in vitro* ^(37,41), indicando que IFN- γ é necessário para todas as etapas da seqüência de formação de CGM ⁽²¹⁾.

Os resultados deste trabalho demonstraram que a associação do IFN- γ com o AgPb e GM-CSF, aumenta o efeito estimulador do IFN- γ . Dados da literatura mostraram que o IFN- γ duplicou a quantidade de CGM formadas, não havendo mudanças morfológicas significativas quando as células foram estimuladas com PMA, TNF- α ou vaso-I ⁽⁵⁶⁾.

Quando os monócitos foram estimulados com TNF- α associado ao AgPb e GM-CSF, os índices de fusão tiveram resposta semelhante aos monócitos estimulados apenas com o antígeno. Assim, podemos sugerir a hipótese de que as células sofreram multinucleação pela ação do antígeno e não do TNF- α , considerando relatos da literatura que enfatizam o efeito ambíguo do TNF- α na indução ou não de CGM ⁽⁹⁾.

As associações das citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) com o AgPb e GM-CSF mostrou que a adição de GM-CSF às culturas estimuladas com AgPb e tratadas com IL-10 e TGF- β_1 induziu índices de fusão significativamente maiores do que os obtidos no tratamento apenas com IL-10 ou TGF- β_1 e em relação às células não estimuladas (controle). Esses resultados sugerem que o GM-CSF reverteu, em parte, o efeito inibidor dessas citocinas anti-inflamatórias sobre a formação de CGM. Assim, os resultados obtidos sugerem que o GM-CSF exerce seu efeito ativador na geração de CGM quando associado, principalmente, às citocinas pró-estimulatórias (IFN- γ e TNF- α). Porém, tem seu efeito atenuado quando associado às citocinas anti-inflamatórias (TGF- β_1 e IL-10).

Quando avaliamos o efeito de IFN- γ , GM-CSF, IL-10, TGF- β_1 e TNF- α sobre a morfologia das CGM, diferenciadas em CGM tipo Langhans e tipo corpo estranho, observamos que embora tenha havido um discreto aumento de CGM do tipo Langhans quando os monócitos foram estimulados com AgPb+IFN- γ , ocorreu maior porcentagem de formação de CGM tipo corpo estranho em todas as culturas estimuladas com as citocinas. Esses resultados discordam da literatura que relata maior número de CGM tipo Langhans

induzidas por IFN^(21,137). Uma possível explicação para esse fato poderia estar relacionada ao tempo de incubação das culturas de monócitos para formação de CGM. Alguns autores, utilizaram um tempo mais longo, 7 a 14 dias de cultivo dos monócitos estimulados com IFN- γ para observação de número mais elevado de CGM tipo Langhans^(21,80,119,137). Em nosso estudo, o tempo de incubação empregado para geração de CGM, foi de três dias, conforme sugerido por outros autores^(9,17,138). Por outro lado, sugere-se que as CGM referidas como tipo corpo estranho sejam células tipo Langhans em estágios iniciais de formação, isto é, após a fusão dos macrófagos, porém antes da coalescência do núcleo no padrão circular^(19,20,26). Portanto, o tempo de incubação de três dias, parece não ter sido suficiente para o rearranjo desordenado dos monócitos das CGM tipo corpo estranho em arranjo circular e periférico das CGM tipo Langhans.

No presente trabalho também comparamos a atividade fungicida das CGM induzidas por diferentes associações de citocinas com AgPb e GM-CSF contra *P. brasiliensis*. Os resultados mostraram que CGM geradas por estímulo com AgPb+IFN- γ ou AgPb+IFN- γ + GM-CSF apresentaram atividade fungicida significativamente mais elevada em comparação com as células controle, não estimuladas e com as estimuladas com TNF- α , IL-10 e TGF- β_1 . Esses resultados confirmam nosso estudo anterior, demonstrando que IFN- γ e AgPb são bons estímulos para geração de CGM *in vitro* e para indução de atividade fungicida contra *P. brasiliensis*⁽¹⁰⁷⁾.

Estudos recentes sobre a atividade fungicida de monócitos humanos contra *P. brasiliensis* mostraram que o IFN- γ desempenha papel fundamental na ativação de monócitos e macrófagos e na inibição da multiplicação do *P. brasiliensis*. A atividade fungicida eficiente dessas células depende de um sinal de ativação inicial induzido pelo IFN- γ capaz de estimular a produção de TNF- α pelas células. Esta citocina, atuando de maneira autócrina sobre o monócito, seria responsável pelo processo final de ativação, representado pela maior produção de H₂O₂ e maior atividade fungicida dessas células contra a cepa de baixa virulência. Portanto, o efeito sinérgico entre IFN- γ e TNF- α parece ser essencial para uma eficiente atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*^(66,110,139).

A produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 por monócitos humanos infectados *in vitro* com amostras de *P. brasiliensis* de alta ou baixa virulência foi descrita por Kurokawa et al. ⁽¹⁴⁰⁾. Recentemente, Siqueira et al. ⁽¹⁰⁸⁾ demonstraram que monócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis produzem níveis elevados de TNF- α após infecção *in vitro* com a cepa Pb18 desde 4hs de co-cultivo. Assim, a elevada atividade fungicida de monócitos e de CGM estimulados por IFN- γ e AgPb poderia ser explicada pela produção de TNF- α induzida tanto por IFN- γ como por componentes da parede celular de *P. brasiliensis*, além de outras citocinas inflamatórias.

Seitzer et al. ⁽⁸⁰⁾, avaliando as propriedades de CGM induzidas *in vitro* por larvas de *Nippostrongylus brasiliensis* detectaram a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e enzima oxido nítrico sintase induzível (iNOS) por essas células. Segundo Enelow et al. ⁽³¹⁾ CGM são formadas sob condições inflamatórias, em decorrência de exposição das células a várias citocinas, sendo mais responsivas a esses mediadores do que macrófagos. Além disso, CGM podem também ser fonte de citocinas, que atuam modulando linfócitos e células epitelióides e sendo provavelmente responsáveis pelo padrão histológico do granuloma. Dessa forma, CGM podem representar um componente ativo, possivelmente envolvido na formação e *turnover* do granuloma, bem como na destruição eventual do agente irritante ^(32,80).

Embora o papel funcional das CGM permaneça desconhecido, Enelow et al. ⁽³¹⁾ demonstraram que CGM apresentam maior atividade fungicida contra *C. albicans*, do que macrófagos. De acordo com esses autores, essa superioridade das CGM pode ser devida à produção por essas células de enzimas oxidativas com maior atividade lítica em relação aos macrófagos, uma vez que não observaram diferença entre CGM e macrófagos quanto à capacidade fagocítica do fungo.

Observamos que monócitos tratados com IL-10 e TGF- β ₁, antes da infecção com o *P. brasiliensis*, tiveram sua função fungicida quase totalmente anulada. O TGF- β ₁ e IL-10 são citocinas supressoras que podem, assim explicar tal fato. Esses resultados são concordantes com relatos da literatura, mostrando que IL-10 e TGF- β ₁ suprimem a resposta imune antimicobacteriana e inibe a função dos macrófagos, resultando no aumento do crescimento

celular da bactéria ⁽¹³⁵⁾. A IL-10 é um importante mediador da inibição de óxido nítrico, diminuindo a expressão do iNOS, uma enzima induzida por IFN- γ e TNF- α ⁽¹⁴¹⁾. Embora este papel na infecção humana seja desconhecido, foi demonstrado que o óxido nítrico tem papel fungicida em camundongos infectados pelo *P. brasiliensis* ^(142,143). Em relação ao TGF- β_1 , experimentos de Hernandez-Pando et al., ⁽³²⁾, demonstraram que CGM produzem *in situ* citocinas inflamatórias e TGF- β_1 , que está associada ao processo de fibrose e cicatrização. Essa citocina parece ser importante na manutenção e balanço entre o controle e a destruição de organismos infecciosos e, por outro lado pode prevenir o dano tecidual causado pela intensidade da resposta imune ⁽¹³²⁾. O aumento da expressão de IL-10 e TGF- β_1 quando comparado a TNF- α e IFN- γ pelas CGM nos granulomas da tuberculose pode diminuir a regulação das funções microbidas, assim favorecendo a sobrevivência e persistência do bacilo no ambiente celular do granuloma. Estas CGM não são capazes de destruir o bacilo e, tornam-se menos susceptíveis à apoptose, podendo permanecer uma contínua fonte de citocinas pró-inflamatórias, causando patologia imune ⁽⁶⁾.

Entretanto quando os monócitos foram tratados com IL-10 ou TGF- β_1 adicionados de GM-CSF e AgPb o efeito supressor destas citocinas parece ter sido atenuado, resultando em atividade fungicida significativa. Esses dados sugerem que o GM-CSF exerceu efeito ativador sobre as células, aumentando a atividade fungicida.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho mostram que citocinas inflamatórias são importantes para geração e modulação de CGM estimuladas por AgPb e da atividade fungicida, enquanto citocinas anti-inflamatórias inibem essas atividades. O efeito ativador do GM-CSF sobre a atividade fungicida de CGM, mesmo quando essas células foram tratadas com citocinas anti-inflamatórias, sugere que o ambiente de citocinas presente na interação do *P. brasiliensis* com células na lesão paracoccidioidomicótica é importante para determinar o sucesso da relação fungo-hospedeiro na paracoccidioidomicose. O estudo do perfil de citocinas produzidas pelas CGM estimuladas por AgPb e o mecanismo fungicida envolvido na morte do fungo

por essas células poderá contribuir para a melhor compreensão do papel das CGM na interação com *P.brasiliensis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams DO. The granulomatous inflammatory response. A review. Am J Pathol 1976; 84:164-191.
2. Papadimitriou JM, Walters MN. Macrophage polykaryia. CRC Crit Rev Toxicol 1979; 6: 211-255.
3. Langhans T. Ueber Riesenzellen mit wandständigen Kernen in Tuberkeln und die fibrose Form des Tuberkels. Virchows Arch Patol Anat 1868; 42:382-404.
4. Most J, Spotl L, Mayr G, Gasser A, Sarti A, Dierich MP. Formation of multinucleated giant cells in vitro is dependent on the stage of monocyte to macrophage maturation. Blood 1997; 89:662-71.
5. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. Semin Immunol 2008; 20:86-100.
6. Mustafa T, Mogga SJ, Mfinanga SG, Morkve O, Sviland L. Immunohistochemical analysis of cytokines and apoptosis in tuberculous lymphadenitis. Immunology 2005;117:454-62.
7. van der Rhee HJ, van der Burgh-de Winter CP, Daems WT. The differentiation of monocytes into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells in subcutaneous granuloma. II. Peroxidatic activity. Cell Tissue Res 1979; 197:379-96.
8. Murch AR, Grounds MD, Marshall CA, Papadimitriou JM. Direct evidence that inflammatory multinucleated cells form by fusion. J Pathol 1982; 137:177-80.
9. Gasser A, Most J. Generation of multinucleated giant cells in vitro by culture of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG in combination with cytokine-containing supernatants. Infect Immun 1999; 67:395-402.
10. McNally AK, Anderson JM. Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. Exp Mol Pathol 2005; 79:126-35.
11. Mariano M, Spector WG. The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). J Pathol 1974; 113:1-19.
12. Kreipe H, Radzun HJ, Rudolph P, Barth J, Hansmann ML, Heidorn K, Parwaresch MR. Multinucleated giant cells generated in vitro. Terminally differentiated macrophages with down-regulated c-fms expression. Am J Pathol 1988; 130: 232-43.

13. McInnes A, Rennick DM. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J Exp Med* 1988; 167:598-611
14. McInnes A, Rennick DM. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J Exp Med* 1988; 167:598-611
15. Orentas RJ, Reinlib L, Hildreth JE. Anti-class II MHC antibody induces multinucleated giant cell formation from peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol* 1992; 51:199-209.
16. Hassan NF, Kamani N, Meszaros MM, Douglas SD. Induction of multinucleated giant cell formation from human blood-derived monocytes by phorbol myristate acetate in in vitro culture. *J Immunol* 1989; 143:2179-84.
17. Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:40-47.
18. Iabuki K, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum level of antibodies. *Mycopathologia* 1979;67:131-41.
19. De Brito T, Franco MF. Granulomatous infection. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1994; 36:185-192.
20. McNally AK, Anderson JM. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages: Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 1995; 147:1487-99.
21. Fais S, Burgio VL, Silvestri M, Capobianchi MR, Pacchiarotti A, Pallone F. Multinucleated giant cells generation induced by interferon-gamma. Changes in the expression and distribution of the intercellular adhesion molecule-1 during macrophages fusion and multinucleated giant cell formation, *Lab Invest* 1994; 71:737-44.
22. Defife KM, Jenney CR, McNally AK, Colton E, Anderson JM. Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *J Immunol* 1997; 158:3385-90.
23. Byrd TF. Multinucleated giant cell formation induced by IFN-gamma/IL-3 is associated with restriction of virulent *Mycobacterium tuberculosis* cell to cell invasion in human monocyte monolayers. *Cell Immunol* 1998; 188:89-96.

24. Kao WJ, McNally AK, Hiltner A, Anderson JM. Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly(etherurethane urea) in vivo. *J Biomed Mater Res* 1995; 29:1267-75.
25. McNally AK, DeFife KM, Anderson JM. Interleukin-4-induced macrophage fusion is prevented by inhibitors of mannose receptor activity. *Am J Pathol* 1996; 149:975-85.
26. Mizuno K, Okamoto H, Horio T. Heightened ability of monocytes from sarcoidosis patients to form multinucleated giant cells in vitro by supernatants of concanavalin A-stimulated monocuclear cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 151-6.
27. Helming L, Gordon S. The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology* 2007; 212:785-93.
28. Cardoso SV, Moreti MM, Costa IM, Loyola AM. Exfoliative cytology: a helpful tool for the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Oral Dis* 2001; 7:217-20
29. Enelow RI, Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. Induction of multinucleated giant cell formation from in vitro culture of human monocytes with interleukin-3 and interferon-gamma: comparison with other stimulating factors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992a; 6:57-62.
30. Jagadha V, Andavolu RH, Huang CT. Granulomatous inflammation in the acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol* 1985; 84:598-602.
31. Enelow RI, Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. Cytokine-induced human multinucleated giant cells have enhanced candidacidal activity and oxidative capacity compared with macrophages. *J Infect Dis* 1992; 166:664-668.
32. Hernandez-Pando R, Bornstein QL, Aguilar Leon D, Orozco EH, Madrigal VK, Martinez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology* 2000; 100:352-8.
33. Hamblin AS. Cytokines and cytokine receptors. Oxford: University Press, 1993, 90p.
34. Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988; 334:260-2.
35. Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Resp J* 1994; 7:1678-89.

36. Weimberg JB, Hobbs MM, Misukonis MA. Recombinant human gamma-interferon induces human monocyte polykaryon formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:4554-7.
37. Most J, Neumayer HP, Dierich MP. Cytokine-induced generation of multinucleated giant cells in vitro requires interferon-gamma and expression of LFA1. *Eur J Immunol* 1990; 20:1661-7.
38. Nagasawa H, Miyaura C, Abe E, Suda T, Horiguchi M, Suda T. Fusion and activation of human alveolar macrophages induced by recombinant interferon-gamma and their suppression by dexamethasone. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:916-21.
39. Takashima T, Ohnishi K, Tsuyuguchi I, Kishimoto S. Differential regulation of formation of multinucleated giant cells from concanavalin A-stimulated human blood monocytes by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol* 1993; 150:3002-10.
40. Belosevic M, Finbloom DS, Van Der Meide PH, Slayter MV, Nacy CA. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol* 1989; 143:266-74.
41. Fais S, Pallone F. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1995; 37:798-801.
42. Fais S, Capobianchi MR, Pallone F, Di Marco P, Boirivant M, Dianzani F, Torsoli A. Spontaneous release of interferon-gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon-gamma inducers. *Gut* 1991; 32:403-7.
43. Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J Clin Invest* 1985; 75:1488-95.
44. Sheffield EA. The granulomatous inflammatory response. *J Pathol* 1990; 160:1-2.
45. Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92:4491-508.
46. Lyman CA, Garrett KF, Pizzo PA, Walsh TJ. Response of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes to *Trichosporon beigeli*: host defense against an emerging opportunistic pathogen. *J Infect Dis* 1994; 170:1557-65.

47. Roilides E, Holmes A, Blake C, Venzon D, Pizzo PA, Walsh TJ. Antifungal activity of elutriated human monocytes against *Aspergillus fumigatus* hyphae; enhancement by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma. *J Infect Dis* 1994; 170:894-9.
48. Gaviria JM, van Burik JA, Dale DC, Root RK, Liles WC. Modulation of neutrophil-mediated activity against the pseudohyphal form of *Candida albicans* by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administered in vivo. *J Infect Dis* 1999; 179:1301-04.
49. Kudeken N, Kawakami K, Saito A. Mechanisms of the in vitro fungicidal effects of human neutrophils against *Penicillium marneffe* induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 472-8.
50. Rodrigues DR, Dias-Melício LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol* 2007; 45:27-33.
51. Mayer P, Schutze E, Lam C, Kricek F, Liehl E. Recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments neutrophil recovery and enhances resistance to infections in myelosuppressed mice. *J Infect Dis* 1991; 163:584-90.
52. Schelenz S, Smith DA, Bancroft GJ. Cytokine and chemokine responses following pulmonary challenge with *Aspergillus fumigatus*: obligatory role of TNF-alpha and GM-CSF in neutrophil recruitment. *Med Mycol* 1999; 37:183-194.
53. Deepe GS Jr, Gibbons R. Recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor modulates the course of pulmonary histoplasmosis in immunocompetent and immunodeficient mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3328-36.
54. Deepe GS Jr, Gibbons R, Woodward E. Neutralization of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor subverts the protective immune response to *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol* 1999; 163: 4985-93.
55. Khatami S, Brummer E, Stevens DA. Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in vivo on cytokine production and proliferation by spleen cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 125:198-201.
56. Tambuyzer BR, Nouwen EJ. Inhibition of microglia multinucleated giant cell formation and induction of differentiation by GM-CSF using a porcine in vitro model. *Cytokine* 2005; 31:270-9.
57. Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infections. *Br J Haematol*. 2005; 129(5):583-96.

58. Vignery A, Niven-Fairchild T, Shepard MH. Recombinant murine interferon-gamma inhibits the fusion of mouse alveolar macrophages *in vitro* but stimulates the formation of osteoclastlike cells on implanted syngenic bone particles in mice *in vivo*. J Bone Miner Res 1990; 5:637-44.
59. Heinemann DE, Peters JH, Gahr M. A human *in vitro* granuloma model using heat killed *Candida albicans* immobilized on plastic culture wells. Scand J Immunol 1997; 45:596-604.
60. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell 1989; 56:731-40.
61. Chensue SW, Warmington K; Ruth J, Lincoln P; Kuo MC, Kunkel SL. Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor.. Am J Pathol 1994; 145:1105-13.
62. Vigna AF, Almeida SR, Xander P, Freymuller E, Mariano M, Lopes JD. Granuloma formation *in vitro* requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. Microbes Infection 2006; 8:589-97.
63. Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. Clin Exp Immunol 1993; 93:189-194.
64. Silva CL, Silva MF, Faccioli LH, Pietro RC, Cortez SA, Foss NT. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. Clin Exp Immunol 1995; 101:314-20.
65. Fornari MC, Bava AJ, Guereño MT, Berardi VE, Silaf MR, Negroni R, Diez RA. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8:1036-38.
66. Calvi SA, Soares AM, Peraçoli MT, Franco M, Ruiz RL Jr, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Mattos MC, Mendes RP. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. Microbes Infect 2003; 5:1373-79.
67. Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. Cytokine 2003; 21:234-41.

68. Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol* 2003; 25:107-112.
69. Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peracoli MT. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol.* 2006;154:643-50
70. Kekow J, Wachsman W, McCutchan JA, Gross WL, Zachariah M, Carson DA, Lotz M. Transforming growth factor-beta and suppression of humoral immune responses in HIV infection. *J Clin Invest* 1991; 87:1010-6.
71. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol* 1995; 154: 465-73.
72. Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
73. Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994; 56:1-26.
74. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174:915-24.
75. Freeman GJ, Gray GS, Gimmi CD, Lombard DB, Zhou LJ, White M, Fingerhuth JD, Gribben JG, Nadler LM. Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J Exp Med* 1991; 174: 625-31.
76. Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 2001; 9:86-92.
77. Sharif MN, Tassiulas I, Hu Y, Mecklenbraüker I, Tarakhovsky A, Ivashkiv LB. IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: Implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis. *J Immunol.* 2004; 172:6476-81.
78. Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guérin. *J Exp Med.* 1994;180(4)1499-509.

79. Wilson CB, Tsai V, and Simpson JS. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages. Possible mechanism for survival of intracellular pathogens. 1980. J. Exp. Med. 1980;151:328-346.
80. Seitzer U, Scheel-Toellner D, Toellner KM, Reiling N, Haas H, Galle J, Flad HD, Gerdes J. Properties of multinucleated giant cells in a new in vitro model for human granuloma formation. J Pathol 1997; 182:99-105.
81. Mariano M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. Rev Inst Med Trop São Paulo 1995; 37:161-76.
82. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida, CRC Press; 1994. p.109-120.
83. San Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiological agent *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol 1993; 31:99-113.
84. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Top Med Mycol 1993; 5:115-149.
85. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations of paracoccidioidomycosis. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, CRC Press; 1994. p. 233-258.
86. 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, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida:CRS Press,1994:175-84.
87. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop 1987; 20:129-132.
88. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. Bail Clin Trop Med Commun Dis.1989; 4:185-220.
89. Calich VL, Singer-Vermes LM, Russo M, Vaz CAC, Burger E. Immunogenetics. In: Franco M, Lacaz, Cs, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis, Boca Raton , Florida, CRC Press,1994:151-168.

90. Peraçoli MT, Parise-Fortes MR, Da Silva MF, Montenegro MR. Natural Killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the syrian hamster. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1995; 37:129-136.
91. Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:156-62.
92. Figueiredo F, Silva CL, Alves LMC, Rossi MA. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. *Braz J Med Biol Res* 1986; 19:615A.
93. Lay G, Poquet Y, Salek-Peyron P, Puissegur MP, Botanch C, Bon H, Levillain F, Duteyrat JL, Emile JF and Altare F. Langhans giant cells from *M. tuberculosis*-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. *J Pathol* 2007; 211:76-85.
94. Montenegro MR, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo AM, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida, CRC Press; 1994. p. 131-150.
95. Moscardi-Bacchi M, Soares A, Mendes R, Marques S, Franco M. *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1989; 27:149-158.
96. Silva CL, Figueiredo F. Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. *J Infect Dis* 1991; 164:1033-4.
97. Parise-Fortes MR, da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, Soares AM, Peraçoli MT. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol* 2000; 38:51-60.
98. van Furth R, Diesselhoff-Den Dulk MM. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J.Exp. Med* 1970 ; 132:813-28.
99. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line. *Bull World Health Organ* 1972; 47:651-8.
100. Spector WG, Wynne KM. Proliferation of macrophages in inflammation. *Agents Actions* 1976; 6:123-6.
101. Saunders BM, Frank AA, Orme IM. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 1999; 98:324-8.

102. Hogan LH, Weinstock JV, Sandor M. TCR specificity in infection-induced granulomas. *Immunol Lett* 1999; 68:115-20.
103. Kaminagakura E, Bonan PR, Jorge J, Almeida OP, Scully C. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. *Oral Dis* 2007;13: 434-9.
104. Mendes RP, Campos-Soares AMV, Defaveri J, Peraçoli MTS. Imunologia das micoses pulmonares. In: Fernandes ALG, Mendes ESPS, Terra Filho M, editores. *Pneumologia – atualização e reciclagem*. São Paulo: Atheneu; 1999. p. 175-204.
105. Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, Soares AM. Production of pro and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 2003; 5:413-18.
106. Rhoden CR, Kurokawa CS, Sugizaki MF, Ruiz LS, Montenegro MR, Peraçoli MTS. Perfil de virulência de dez amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do grau de infecção em hamsters. *Anais, VII Encontro Internacional sobre paracoccidioidomicose*. Campos do Jordão, SP, abril-maio, 1999, p. 148.
107. do Nascimento MP, de Campos Soares AM, Dias-Melício LA, Parise-Fortes MR, Martins RA, Nakaira ET, Peraçoli MT. Fungicidal activity of human monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. *Mycopathologia* 2008; 166:25-33.
108. Siqueira KZ, Soares AMVC, Dias-Melicio LA, Calvi AS, Peraçoli MTS. Interleukin-6 treatment makes human monocyte permissive for *Paracoccidioides brasiliensis* growth by modulating cytokine production. *Med Mycol*, 2008 (*in press*).
109. McNally AK, Macewan SR, Anderson JM. Foreign body-type multinucleated giant cell formation requires protein kinase C beta, delta, and zeta. *Exp Mol Pathol* 2008; 84:37-45.
110. Soares AM, Calvi SA, Peraçoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102:480-5.
111. Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol* 1991; 29:31-8.
112. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.

113. Kurita N, Sano A, Coelho KI, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M. An improved culture medium for detecting live yeast phase cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol 1993; 31:201-5.
114. Bøyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. Scand J Clin Lab Invest 1968; 97:77-89.
115. Godfrey K. Statistics in practice. Comparing the means of several groups. N Engl J Med 1985; 313:1450-1456.
116. Silva-Teixeira DN , Ferreira MG, Nogueira-Machado JA, Doughty BL , Goes AM. Human giant cell formation induced in vitro by *Schistosoma mansoni* antigens. Braz J Med Biol Res 1993; 26: 609-13.
117. Lee TT, Martin FC, Merrill JE. Lymphokine induction of rat microglia multinucleated giant cell formation. Glia 1993; 8:51-61.
118. Lemaire I, Yang H, Lauzon W, Gendron N. M-CSF and GM-CSF promote alveolar macrophage differentiation into multinucleated giant cells with distinct phenotypes. J Leukoc Biol 1996; 60:509-18.
119. Dugast C, Gaudin A, Toujas L. Generation of multinucleated giant cells by culture of monocyte-derived macrophages with IL-4. J Leukoc Biol 1997; 61:517-21.
120. Lopez M, Martinache C, Canep S, Chokri M, Scotto F, Bartholeyns J. Autologous lymphocytes prevent the death of monocytes in culture and promote, as do GM-CSF, IL-3 and M-CSF, their differentiation into macrophages. J Immunol Methods 1993; 159:29-38.
121. Kobayashi K, Allred C, Cohen S, Yoshida T. Role of interleukin-1 in experimental pulmonary granuloma in mice. J Immunol 1985; 134:358-64.
122. Shikama Y, Kobayashi K, Kasahara K, Kaga S, Hashimoto M, Yoneya I, Hosoda S, Soejima K, Ide H, Takahashi T. Granuloma formation by artificial microparticles in vitro. Macrophages and monokines play a critical role in granuloma formation. Am J Pathol 1989;134:1189-9
123. Flory CM, Jones ML, Miller BF, Warren JS. Regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in monocyte chemoattractant protein-1-mediated pulmonary granuloma formation in the rat. Am J Pathol 1995; 146:450-62.
124. Franitza S, HersHKoviz R, Kam N, Lichtenstein N, Vaday GG, Alon R, Lider O. TNF-alpha associated with extracellular matrix fibronectin provides a stop signal for chemotactically migrating T cells. J Immunol 2000;165:2738-47.

125. Sorimachi K, Akimoto K, Tsuru K, Ieiri T and Niwa A. The involvement of tumor necrosis factor in the multinucleation of macrophages. *Cell Biol Intl* 1995a; 19:547-9.
126. Sorimachi K, Akimoto K, Okazaki M, Sunagawa M, Furusawa S, Niwa A. Cell death of human multinucleated giant macrophages induced by conditioned medium obtained from rat liver cells. *Cell Biol Int* 1995; 19:929-33.
127. de Graaf JH, Tamminga RY, Dam-Meiring A, Kamps WA, Timens W. The presence of cytokines in Langerhan's cell histiocytosis. 1996;180:400-6.
128. Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis *Immunology*. 1997;90(4):607-17.
129. Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, Koelsch S, Neudoerfl C, Palm N, Ruede E, Schmitt E. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J Immunol* 1998; 161:4709-18.
130. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:137-61.
131. Nandan D, Reiner NF. TGF-beta attenuates the class II transactivator and reveals an accessory pathway of IFN-gamma action. *J Immunol* 1997; 158:1095-101.
132. Omer FM, Kurtzhals JA, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: A role for TGF-beta? *Parasitol Today* 2000; 16:18-23.
133. Ikeda T, Ikeda K, Sasaki K, Kawakami K, Hatake K, Kaji Y, Norimatsu H, Harada M, Takahara J. IL-13 as well as IL-4 induces monocytes/macrophages and a monoblastic cell line (UG3) to differentiate into multinucleated giant cells in the presence of M-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253:265-272.
134. Jacobs M, Brown N, Allien N, Gulert R, Ryffel B. Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10. *Immunology* 2000;100:494-501.
135. Mustafa T, Wiker GH, Morkve O, Sviland L. Differential expression of mycobacterial antigen MPT64, apoptosis and inflammatory markers in multinucleated giant cells and epithelioid cells in granulomas caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *Virchows Arch* 2008; 452:449-56.

136. Do Nascimento MPP, Soares AMVC, Parise-Fortes MR, Martins RAR, Nakaira ET, Peraçoli MTS. Monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by interferon-gamma and *Paracoccidioides brasiliensis* antigen display fungicidal activity. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2005; 47(suppl.14).
137. Seitzer U, Haas H, Gerdes J. A human in vitro granuloma model for the investigation of multinucleated giant cell and granuloma formation. Histol Histopathol 2001; 16:645-53.
138. Zhu XW, Friedland JS. Multinucleated giant cells and the control of chemokine secretion in response to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Immunol 2006; 120:10-20.
139. Carmo JP, Dias-Melício LA, Calvi SA, Peraçoli MT, Soares AM. TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂-dependent mechanism. Med Mycol 2006; 44:363-8.
140. Kurokawa CS, Araujo JP Jr, Soares AM, Sugizaki MF, Peraçoli MT. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. Microbiol Immunol 2007; 51:421-8.
141. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. Life Sci 2004; 75(6):639-53.
142. Diniz SN, Cisalpino PS, Freire AT, Silva-Teixeira DN, Contigli C, Rodrigues-Junior V, Goes AM. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. Hum Immunol 2001; 62:799-808.
143. Nascimento FR, Calich VL, Rodriguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. J Immunol 2002; 168:4593-600.

8. RESUMO

Células gigantes multinucleadas (CGM) são células características, presentes em lesões granulomatosas, induzidas por agentes infecciosos e, sua formação pode ser modulada por citocinas produzidas por células da resposta imune. No presente trabalho avaliou-se o efeito modulador de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β_1) na formação de CGM *in vitro*, a partir de monócitos humanos, estimulados com antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* (AgPb) e sobre a atividade fungicida dessas células desafiadas com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis*. Monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram cultivados na ausência de estímulo (controle), com AgPb (100ug/mL) ou com associações de AgPb e GM-CSF (100 U/ml) com as citocinas: IFN- γ (300UI/mL), IL-10 (50U/mL), TGF- β_1 (250pg/mL) ou TNF- α (50U/mL). A formação de CGM foi avaliada após três dias de cultivo, estabelecendo-se o índice de fusão (IF) e a percentagem de CGM após fixação e coloração das células com May-Grunwald-Giemsa. Além disso, a atividade fungicida dessas células foi avaliada após 4 h de co-cultivo das CGM com 4×10^4 células leveduriformes viáveis da cepa Pb18 de *P. brasiliensis*, por plaqueamento das co-culturas em meio BHI-água e determinação da recuperação de fungos viáveis. O método estatístico empregado para comparação dos resultados foi análise de variância, com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a incubação de monócitos com AgPb+GM-CSF+IFN- γ induziu IF significativamente mais elevados em relação a todas as demais culturas: controle, apenas estimulados com AgPb ou AgPb adicionado das demais citocinas. A adição de TNF- α +AgPb+GM-CSF não resultou em IF maiores do que os obtidos na cultura estimulada apenas com o AgPb, enquanto as citocinas IL-10 e TGF- β_1 apresentaram efeito supressor sobre a geração de CGM. A incubação dos monócitos tanto com citocinas pró- como anti-inflamatórias induziu maior percentagem de CGM do tipo corpo estranho em relação à formação de CGM do tipo Langhans. A atividade fungicida das CGM estimuladas com AgPb+GM-CSF mostrou que o GM-CSF eleva a capacidade fungicida dessas células e reverte o efeito supressor da IL-10 e TGF- β_1 . A maior atividade fungicida foi

obtida pela geração de CGM induzida pela associação de AgPb+IFN- γ +GM-CSF. Em conjunto, os resultados sugerem que IFN- γ e GM-CSF apresentam efeito modulador positivo sobre a geração e atividade fungicida de CGM induzidas *in vitro* por antígeno de *P.brasiliensis* .

9. ABSTRACT

Multinucleated giant cells (MGC) are characteristic cells present in granulomatous lesions induced by infectious agents and also may be modulated by cytokines produced by cells of the immune response. The present study evaluated the modulatory effect of interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) pro-inflammatory cytokines, and interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor beta (TGF- β_1) anti-inflammatory cytokines on *in vitro* formation of MGC derived from human monocytes, stimulated with *Paracoccidioides brasiliensis* antigen (PbAg) and on fungicidal activity of these cells challenged with the Pb18 strain of *P. brasiliensis*. Peripheral blood monocytes obtained from healthy individuals were cultured for three days without stimulus (control) or with PbAg (100 ug/mL) or with association of PbAg and granulocyte macrophage colony stimulator factor (GM-CSF (100 U/mL) with the following cytokines: IFN- γ (300 UI/mL), IL-10 (50 UI/mL), TGF- β_1 (250 pg/mL) or TNF- α (50 UI/mL). The generation of MGC was evaluated by fusion index (FI) and the percentage of MGC formation after cell fixing and May-Grumwald-Giensa staining. Fungicidal activity of monocyte-derived MGC was evaluated 4h after co-culture of MGC with 4×10^4 viable yeast cells of Pb18 strain, by plating the cultures in BHI-agar and determination of viable fungi recovery. The statistical method employed for the comparison of the results was analysis of variance with the significance set at $p < 0.05$. The results showed that the incubation of monocytes with PbAg+GM-CSF+IFN- γ induced FI significantly higher than those observed in all the other cultures, such as control cultures, cultures stimulated with PbAg only or cultures stimulated with PbAg associated with the other cytokines. Stimulation with PbAg+TNF+GM-CSF did not result in FI higher than those obtained in the culture stimulated with PbAg only, while IL-10 and TGF- β_1 showed suppressor effect on MGC generation. The incubation of monocytes with both pro- and anti-inflammatory cytokines induced higher percentage of Foreign body-type MGC than Langhans-type MGC. Fungicidal activity of MGC stimulated with PbAg+GM-CSF in association with the other cytokines showed that GM-CSF increase the fungicidal activity of MGC and revert the suppressor effect of IL-10

and TGF- β_1 . The highest fungicidal activity was obtained by MGC generation after PbAg+IFN- γ +GM-CSF stimulation. Together the results suggest that IFN- γ and GM-CSF exert a positive modulatory effect on MGC generation stimulated with PbAg and on fungicidal activity of these cells against *P.brasiliensis*.