

Juliana Semim Cavalheiro

Produção de citocinas na paracoccidioidomicose experimental murina em períodos iniciais do processo infeccioso em linhagens selecionadas para resposta inflamatória aguda.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista – UNESP Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Silvio Luis de Oliveira

Botucatu – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Cavalheiro, Juliana Semim.

Produção de citocinas na Paracoccidiodomicose experimental murina em períodos iniciais do processo infeccioso em linhagens selecionadas para Resposta Inflamatória Aguda / Juliana Semim Cavalheiro. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Silvio Luis de Oliveira

Assunto CAPES: 40101096

1. Paracoccidiodomicose - Aspectos imunológicos - Estudos experimentais.

CDD 616.969

Palavras chave: Citocinas; *Paracoccidoides brasiliensis*; Resposta imune; Resposta Inflamatória Aguda

**Este trabalho foi realizado nos laboratórios do
Departamento de Microbiologia e Imunologia do
Instituto de Biociências - IB – Unesp Botucatu,
com auxílio financeiro da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -
CAPES**

Dedicatória

Aos meus pais José Carlos e Iracema:

Dedico á vocês este trabalho, as dificuldades forma grandes, a saudade maior ainda, vocês abvriam mão de seus sonhos para que mais uma vez eu pudesse realizar o meu. As palavras nunca serão suficientes para agradecer.

Amo vocês.

“Se um dia homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés e que tuas obras desmoronam, que não há ninguém á tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta a tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperança, as ultimas palavras que sempre estarão n’alma: Minha mãe, Meu pai”.

Rui Barbosa

Aos meus irmãos Patrícia e Rafael, com a certeza de que podemos contar uns com os outros.

A toda minha família que sempre se fez presente me apoiando e me dando forças para alcançar meus objetivos.

Obrigada a todos!

E de forma especial á minha avó Ana (in memorian)

.....Luz sempre presente na minha vida.

Pelo carinho e confiança,

Por me ensinarem sempre a dignidade e o respeito,

Minha gratidão é eterna....

Agradecimentos

- Primeiramente a Deus por mais esta conquista, dando-me coragem e sabedoria para continuar a luta.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira, pelos ensinamentos, disponibilidade e pronta atenção para elucidar tantas dúvidas..., pela oportunidade de ingressar na pesquisa científica, mas especialmente pela confiança e Amizade...
- Aos Docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia: por estarem sempre próximos nos momentos que precisei e colaborando para o desenvolvimento do meu projeto...Obrigada a todos!
- Aos Docentes da FMVZ, em especial ao Dr. Antonio Carlos Paes, por ter me dado a oportunidade de ingressar na pós-graduação.
- Aos amigos e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia: Luis Alquati, Pedro Oyan, Isaltino, Benedito Placidelli, Luis Severino dos Santos, Maria Antônia Palma, Lourdes Alves, pela dedicação de todos os dias e pela ajuda prestada.
- Aos meus colegas pós-graduandos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial ao Bruno, Helanderson, João Gustavo, Maria Cristina, Michele, Ana Paula, Fabiane e todos que estiveram comigo nestes anos de luta e conquistas.
- Aos amigos e funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pela ajuda prestada.
- As secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Sônia Faraldo e Leonice Garcia, que nunca mediram esforços para me ajudar

- A secretária do Curso de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Solange Sako Cagliari pela disponibilidade em me ajudar sempre.
- Aos funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu pelo apoio em todos esses anos.
- As bibliotecárias, Luciana Pizzani, Selma Maria de Jesus e em especial á Rosemary Cristina da Silva (Meire), pelas correções pertinentes á tese.
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro prestado.

Lista de Abreviaturas:

AIRmax – Resposta Inflamatória Aguda máxima

AIRmin – Resposta Inflamatória Aguda mínima

Con-A – Concavalina A

ELISA – ensaio imuno-enzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

Ig – imunoglobulina

IL – interleucina

INF- γ – interferon-gama

MCCC – meio completo pra cultura de células

mL – mililitros

NO – óxido nítrico

P. brasiliensis – Paracoccidioides brasiliensis

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

PMNs – polimorfonucleares

TGF- β – fator transformador de granulócito

Th1 – linfócito T auxiliar tipo 1

Th2 – linfócito T auxiliar tipo 2

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

UFC – unidade formadora de colônia

Sumário

Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução	12
2. Objetivo	24
3. Delineamento experimental	25
4. Material e Métodos	26
4.1. Animais.....	26
4.2. Infecção pelo <i>P. brasiliensis</i>	26
4.2.1. Cultivo do <i>P. brasiliensis</i>	26
4.2.2. Preparo do Inoculo.....	27
4.2.3. Infecção e sacrifício dos animais.....	27
4.3. Avaliação da atividade macrofágica.....	28
4.3.1. Cultura de macrófagos peritoneais.....	28
4.3.2. Cultura de macrófagos esplênicos.....	29
4.3.3. Produção de óxido nítrico (NO).....	29
4.5. Grau de infecção.....	30
4.6. Obtenção de homogenatos.....	31
4.7. Produção de citocinas.....	31
4.8. Análise estatística.....	32
5. Resultados	30
5.1. Grau de infecção.....	30
5.2. Produção de óxido nítrico.....	35
5.3. Produção de citocinas.....	39
5.3.1. Produção de IL-1.....	39
5.3.2. Produção de IL-4.....	41
5.3.3. Produção de IL-6.....	43
5.3.4. Produção de IL-8.....	44
5.3.5. Produção de IL-10.....	46
5.3.6. Produção de IL-12.....	48
5.3.7. Produção de IFN- γ	50
5.3.8. Produção de TNF- α	52
6. Discussão	53
7. Conclusão	66
7. Referências Bibliográficas	67

Resumo:

A Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica humana causada por um fungo imperfeito e dimórfico denominado *Paracoccidioides brasiliensis* (*P.brasiliensis*), sendo os conídeos sua forma infectante.

Camundongos geneticamente selecionados para Resposta Inflamatória Aguda Máxima (AIRmax) e Mínima (AIRmin), foram usados como modelo experimental da paracoccidioidomicose. Os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com *P. brasiliensis* (cepa 18) e sacrificados após 6, 12 e 24 horas e 3, 7 e 14 dias de infecção.

Nestes períodos foram removidos fragmentos de baço, fígado e pulmão para avaliação do grau de infecção de células fúngicas nestes órgãos, avaliação da atividade macrofágica por macrófagos peritoneais e esplênicos pela determinação das concentrações de óxido nítrico e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias de sobrenadantes de homogenatos de pulmão e baço.

No presente trabalho observamos que as linhagens AIRmax apresentaram maior contenção do processo infeccioso que as linhagens AIRmin nos compartimentos analisados.

Quanto a produção de NO observamos que animais AIRmax produziram mais deste metabólito em períodos tardios, o que pode ter ajudado esta linhagem na maior contenção do processo infeccioso nos órgãos analisados.

Quanto a produção de citocinas observamos que a produção de INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, estão aumentadas nas linhagens AIRmax na maioria dos órgãos e períodos analisados, contribuindo para a maior resistência destas linhagens frente à infecção pelo fungo em relação aos AIRmin, com exceção da IL-4 e IL-10 que apresentaram sua produção diminuída na linhagem AIRmax e aumentada na linhagem AIRmin reproduzindo seu efeito biológico supressor.

Frente aos resultados observamos que a linhagem AIRmax apresentou maior contenção do processo infeccioso, com importante envolvimento das citocinas analisadas, sendo estes resultados possivelmente relacionados aos fatores geneticamente selecionados envolvidos com a resposta inflamatória aguda.

Palavras-chave: Paracoccidioides brasiliensis, Resposta imune, Resposta Inflamatória Aguda, Citocinas.

Abstract:

Paracoccidioidomycosis is a systemic human mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), an imperfect dimorphic fungus whose conidia are its infectant form. Mice genetically selected for Maximum (AIRmax) and Minimum (AIRmin) Acute Inflammatory Response were used as an experimental paracoccidioidomycosis model. The animals were intraperitoneally inoculated with *P. brasiliensis* (strain 18) and sacrificed after 6, 12 and 24 hours and after 3, 7 and 14 days of infection. In these periods, fragments from their spleen, liver and lung were removed for evaluation of the level of infection by fungal cells in those organs, evaluation of macrophagic activity by peritoneal and splenic macrophages through the determination of the concentrations of nitric oxide (NO) and production of pro- and anti-inflammatory cytokines of lung and spleen homogenate supernatants. In the present study, it was observed that the AIRmax lineages presented greater control of the infectious process than did the AIRmin lineages in the analyzed compartments. As regards NO production, it was found that AIRmax animals produced more of such metabolite in late periods, which may have helped that lineage with the greater control of the infectious process in the analyzed organs. Concerning cytokine production, it was observed that the production of INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 and IL-12 were increased for the AIRmax lineages in most analyzed organs and periods, thus contributing to the greater resistance exhibited by such lineages against infection with the fungus in relation to AIRmin, except for IL-4 and IL-10, which showed decreased production for the AIRmax lineage, reproducing its suppressive biological effect. From these results, it was observed that the AIRmax lineage showed greater control over the infectious process with an important involvement of the analyzed cytokines. These findings are probably related to the genetically selected factors involved with the acute inflammatory response.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, Immune Response, Acute Inflammatory Response, Cytokines.

1) Introdução:

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica humana que ocorre de forma endêmica na maioria dos países da América Latina, sendo o maior número de casos observado no Brasil, seguido pela Colômbia e Venezuela¹. Também conhecida como blastomicose sul-americana ou moléstia de Lutz-Splendore-Almeida, foi inicialmente descrita por Adolpho Lutz em 1908² e, seu agente etiológico foi caracterizado morfológica e biologicamente por Alfonso Esplendore em 1912³ e Floriano Paulo de Almeida em 1930⁴, sendo denominado *Paracoccidioides brasiliensis*⁵.

O *P. brasiliensis* é um fungo imperfeito e dimórfico, que se desenvolve sob a forma de levedura *in vivo*, nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado a 37° C em meios de cultura enriquecidos e, na forma de micélio, à temperatura ambiente, com variação de 4° a 28° C.

Os agentes infectantes do *P. brasiliensis* são propágulos da fase miceliana, representados por micélios e conídios, presentes em água, plantas e solo que penetram no hospedeiro pelas vias aéreas, atingindo primeiramente os pulmões. Estes conídios atingem os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares e transformam-se em leveduras que é a forma patogênica, provocando o chamado complexo primário pulmonar. Este complexo pode evoluir para cura, tornar-se latente ou progredir causando uma doença grave. A disseminação para outros órgãos como fígado baço e adrenais ocorre por via linfo-hematogênica.⁶

As manifestações clínicas da micose são as de doença granulomatosa e apresentam uma gama de sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais que definem as formas aguda e crônica da doença. A forma

aguda é habitualmente severa, de evolução lenta e gradual e as lesões permanecem localizadas ou envolvem mais de um órgão ou sistema, acometendo adultos com idade superior a 30 anos⁷.

Na forma aguda ou juvenil, a doença afeta ambos os sexos em igual proporção, indicando que o fungo infecta tanto homens como mulheres, e ocorre principalmente em crianças, adolescentes e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração, em geral 1 a 2 meses e sinais clínicos compatíveis com o envolvimento do sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado, linfonodo e medula óssea), caracterizado por hepato e/ou esplenomegalia . Nos pacientes com a forma aguda, as lesões são pouco freqüentes, ocorrendo em 15 a 20% dos casos e o acometimento pulmonar é raro, estando presente apenas em 5 a 11% dos pacientes⁷

A forma crônica no adulto é mais freqüente em indivíduos do sexo masculino entre 30 e 50 anos. Acredita-se que a maior resistência da mulher esteja relacionada à presença de estrógenos, que impedem a transformação de micélio para levedura na ocasião da infecção primária^{8,9}.

O aparecimento dos sinais clínicos caracteriza o início da paracoccidioidomicose doença que pode originar-se de diferentes vias: pela evolução direta do foco primário sem latência, por reativação do foco quiescente após latência (reinfecção endógena) ou por reinfecção exógena após exposição ao fungo¹⁰. O *P. brasiliensis* induz lesões granulomatosas crônicas que comprometem, especialmente os tecidos pulmonares, as mucosas e o sistema fagocítico mononuclear, podendo se disseminar para o fígado, baço, adrenais e outros órgãos. Esse envolvimento pulmonar é particularmente importante, devido à sua freqüência e presença de fibrose residual causada pela doença. As lesões

da mucosa oral, retal, intestinal e as cutâneas podem ser consideradas secundárias à disseminação hematogênica ou linfática do agente a partir dos pulmões ¹¹.

O estabelecimento da infecção ou doença, sua disseminação e gravidade dependem de fatores ligados ao fungo como virulência, das condições ambientais e principalmente dos fatores ligados ao hospedeiro, como idade, sexo, estado nutricional, e a capacidade de desenvolver uma resposta imune eficaz. Em relação a este último fator, estudos clínicos e experimentais tem sugerido a interação entre mecanismos inespecíficos e específicos de defesa que atuam na resistência ao *P.brasiliensis*. ¹²⁻²⁰

Respostas a infecções com características clínicas e patológicas polarizadas levaram ao conceito de heterogeneidade das reações imunológicas, estabelecendo-se assim, que clones de células T CD4⁺ podem ser classificados em subpopulações distintas com base no padrão de produção de citocinas ²¹. As duas populações mais facilmente discerníveis foram denominadas Th1 e Th2, sendo os clones Th1 produtores de interleucina 2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) e os clones Th2 os produtores das interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) ²²⁻²⁸. As células Th1 estão comprometidas com a resposta imune celular, enquanto as células Th2 estão mais envolvidas no processo de produção de anticorpos ²⁹.

Em relação á resposta imune celular, os vários estudos realizados ³⁰⁻³⁸ permitiram concluir que os pacientes com paracoccidioidomicose apresentam diferentes graus de comprometimento, variando desde total anergia até respostas aparentemente preservadas. A posição ocupada no espectro depende de múltiplos fatores tais como: fase da doença, resposta ao tratamento e forma clinica. O maior grau de anergia tem sido observado por ocasião do diagnóstico, ocorrendo tendência á

normalização da resposta com a evolução do tratamento. Em relação às formas clínicas podemos considerar que o comprometimento da resposta imune celular é mais intenso na forma aguda do que na forma crônica da doença.

De forma semelhante ao que ocorre com pacientes, uma acentuada depressão da resposta imune celular é detectada em modelos experimentais murinos susceptíveis à infecção³⁹⁻⁴⁰.

Trabalhos posteriores mostraram que na paracoccidiodomicose, a maior produção de anticorpos associada à infecção mais severa e disseminada poderia ser explicada pela composição dos isótipos produzidos em resposta ao fungo. Pacientes com a forma juvenil apresentam produção aumentada de IgG₄, enquanto que os pacientes com a forma crônica apresentam níveis maiores de IgG₁⁴¹⁻⁴². Na forma juvenil da doença, além de IgG₄, ocorre produção aumentada de IgE, IgA, eosinofilia periférica e baixos níveis de IL-8⁴², sugerindo que na paracoccidiodomicose humana existe predominância de uma resposta do tipo Th₂, resultando nas formas mais graves e disseminadas da doença.

Confirmando esses dados, animais sensíveis à infecção também apresentam altos níveis de anticorpos IgA, IgM, IgG₁ e IgG_{2b} específicos para o fungo e padrão de secreção de citocinas do tipo Th₂, enquanto que animais resistentes expressam um padrão Th₁⁴³⁻⁴⁵.

Os trabalhos citados acima mostram claramente que uma resposta protetora contra o *P.brasiliensis* depende de um padrão de resposta do tipo Th₁, envolvendo como principais citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-12⁴⁶⁻⁴⁸. A efetuação da resposta seria representada principalmente pelas células fagocitárias, principalmente monócitos que para atuarem na resposta inflamatória e fungicida necessitam de ativação fornecida por essas citocinas, particularmente IFN- γ e TNF- α .

O papel do IFN- γ nesse processo tem sido muito bem estabelecido através de modelos murinos experimentais de infecção e em pacientes com Paracoccidiodomicose, assim como da utilização de células *in vitro*⁴⁹⁻⁵³. Alguns trabalhos têm demonstrado que os metabólitos do O₂ não estão envolvidos na destruição do fungo pelas células murinas ativadas com essa citocina⁵²⁻⁵⁵, ocorrendo, no entanto, um envolvimento do óxido nítrico⁵⁶.

Outros trabalhos realizados por Soares et al⁵⁷ testaram a atividade supressora de algumas citocinas como a IL-10, onde foi observado que esta citocina, em concentrações adequadas, tem a capacidade de desativar células, inibindo a atividade fungicida induzida por TNF- α + INF- γ .⁵⁷

McEwen et al⁵⁸ demonstraram que neutrófilos de camundongos sensibilizados com *P. brasiliensis* e estimulados com o fungo morto, por via intraperitoneal, apresentavam maior atividade fungicida *in vitro*. Essa atividade se correlacionou com uma intensa produção de metabólitos do oxigênio, confirmando resultados anteriores de que produtos do metabolismo oxidativo, como a produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos, juntamente com a mieloperoxidase e íons de iodo, parecem estar envolvidos na destruição das formas de leveduras do fungo⁵⁹.

Um papel fundamental dos PMNs no controle da paracoccidiodomicose foi demonstrado por Meloni-Bruneri et al⁶⁰ utilizando modelo experimental de camundongos susceptíveis e resistentes á doença. Os autores verificaram que os neutrófilos presentes em “air Pouch” de camundongos resistentes, quando comparados aos dos animais susceptíveis, tornaram-se progressivamente mais ativados quando estimulados *in vitro* com leveduras mortas de *P. brasiliensis*, através de uma maior liberação de metabólitos do O₂. Além disso, os

PMNs de camundongos resistentes apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento de células leveduriformes do fungo. Os autores ainda discutem que um intenso infiltrado neutrofílico, quando da inoculação via “air pouch”, esteve associado com respostas de hipersensibilidade tardia em ambas as linhagens, sugerindo que estas células estariam sujeitas à ativação por uma série de citocinas.

Dentro deste contexto, algumas dessas citocinas, tem sido testadas em relação à capacidade de ativar PMNs, para aquisição, por essas células, de atividade fungicida e ou fungistática contra o *P.brasiliensis*⁶¹⁻⁶³.

Os trabalhos citados acima reforçam a idéia de que estudos na paracoccidiodomicose devem ser direcionados, no sentido de avaliar além dos efeitos antifúngicos diretos dos PMNs, o seu papel regulador na resposta inflamatória e no direcionamento dos processos imunes a serem desenvolvidos pelo hospedeiro infectado, através de estudos objetivando avaliar a capacidade dessas células de produzirem citocinas pró e antiinflamatórias em resposta ao desafio com *P. brasiliensis*.

Os modelos experimentais de paracoccidiodomicose são desenvolvidos com o objetivo de reproduzir a doença humana, permitindo assim, estudos sobre a morfologia do agente nos tecidos, a patogenia da doença e a resposta tecidual ao fungo em diferentes fases da infecção⁶⁴. Muitos trabalhos experimentais têm como objetivo específico avaliar os mecanismos envolvidos na interação parasita-hospedeiro, através de estudos que correlacionem padrão morfológico das lesões, gravidade da doença e resposta imune⁶⁵⁻⁷⁰.

Modelos experimentais utilizando várias linhagens de camundongos consangüíneos foram avaliadas frente à infecção por *P. brasiliensis*, observando-se comportamentos polares de susceptibilidade. Foi

demonstrado que, camundongos da linhagem A/Sn mostraram-se resistentes, enquanto animais B10.A foram muito mais suscetíveis à infecção. Diferenças foram observadas quando as linhagens foram inoculadas com o fungo pelas vias intraperitoneal, intravenosa e intratraqueal. Nos animais A/Sn ocorre o desenvolvimento de uma doença crônica, benigna, restrita aos pulmões, com granulomas compactos de limites precisos, indicando contenção do processo infeccioso. Os parâmetros de resposta imune analisados confirmam essa hipótese. Os animais A/Sn mostraram respostas de hipersensibilidade do tipo tardio (HT) persistentes a partir das primeiras semanas de infecção, contra respostas discretas que evoluíram para anergia nos animais B10.A⁷¹⁻⁷².

No processo de ativação de macrófagos, os resultados demonstraram que, as células peritoneais e broncoalveolares dos animais A/Sn apresentam maior capacidade de liberação de H₂O₂, quando comparadas à dos animais B10.A⁷², além de um aumento persistente dos antígenos de classe II do complexo principal de histocompatibilidade, contra um aumento transitório dos mesmos, nos animais B10.A⁷³. Através desses dois parâmetros, pode-se concluir que macrófagos de animais A/Sn apresentam-se mais ativados que os dos B10.A⁷³.

Quanto à resposta imune humoral, os animais A/Sn e B10.A inoculados pela via intraperitoneal, apresentaram maiores títulos de anticorpos do isotipo IgG2a e IgG2b, respectivamente. No modelo de infecção intratraqueal, os animais A/Sn, apresentaram maiores níveis de IgG2a e IgG3, que surgem mais tardiamente na evolução da infecção, e IgG1 e IgG2b na linhagem B10.A, em uma fase mais precoce.

Os resultados obtidos até o momento no modelo murino isogênico de paracoccidiodomicose, levaram os autores a sugerir que, tanto na infecção intraperitoneal, como na intratraqueal, parece haver ativação

concomitante de células Th1 e Th2 na linhagem A/Sn (resistente), e ativação precoce e preferencial de células Th2 na linhagem B10.A (suscetível). O IFN- γ produzido principalmente pelas células Th1 estaria envolvido na maior resposta de HT apresentada pelos animais resistentes, assim como no processo de maior ativação de macrófagos com conseqüente aumento da atividade fungicida dessas células. O padrão de secreção das subclasses de imunoglobulinas dos animais resistentes confirma o envolvimento do IFN- γ no mecanismo de resistência, uma vez que essa citocina é o principal fator envolvido na indução do “switch” de IgG2 para IgG3 em resposta a antígenos timo independentes do tipo 2. Já a IL-4 e o TGF- β , citocinas de padrão Th2, definiriam a evolução da infecção em animais B10A⁷³⁻⁷⁷.

A IL-4, juntamente com o TGF- β , atuam negativamente sobre o processo de ativação de macrófagos, inibindo o “burst” respiratório⁷⁴. A IL-4 ainda estaria envolvida na expressão transitória de antígenos de classe II⁷⁵, enquanto que o TGF- β regula o “switch” de IgG2b⁷⁶.

Pelo exposto, os trabalhos experimentais realizados no modelo murino de paracoccidiodomicose, demonstram que linhagens diferentes dentro da mesma espécie podem apresentar maior ou menor susceptibilidade à infecção, envolvendo interações complexas entre a imunidade inata e adquirida, sendo que a influência de cada um destes compartimentos na determinação da resistência a infecção não está completamente esclarecido.

A potencialidade das respostas inflamatórias ou de resposta imune específica são caracteres complexos, que variam de forma contínua e têm uma distribuição normal numa população heterogênea, pois estão sob

controle poligênico, ou seja, são regulados pela interação aditiva de vários *loci* gênicos que segregam independentemente⁷⁷.

O laboratório de imunogenética do Instituto Butantan vem desenvolvendo linhagens de camundongos visando o estudo da regulação genética da imunidade específica e natural.

A partir de populações heterogêneas quanto à expressão de caracteres como a capacidade de produção de anticorpos contra antígenos complexos ou de reatividade inflamatória aguda obteve-se, pelo processo de seleção genética bidirecional, linhagens que expressam extremos desses fenótipos.

A seleção genética foi realizada através de várias gerações de acasalamentos entre os indivíduos que expressavam os fenótipos extremos do caráter estudado. Evitando cruzamentos consangüíneos, buscou-se atingir o máximo de separação fenotípica entre essas linhagens, ponto em que, admite-se que os alelos com efeito aditivo e oposto na determinação do caráter, estejam segregados em homozigose nas respectivas linhagens (limite de seleção).

O processo de seleção promove uma progressiva divergência entre as linhagens com concomitante redução da variância fenotípica interlinhagem. As linhagens selecionadas expressam fenótipos extremos não encontrados na população inicial, devido ao efeito aditivo de vários *loci* gênicos, responsáveis pela alta e baixa resposta, que são acumulados nas respectivas linhagens, durante o processo seletivo⁷⁸.

A resposta inflamatória representa o componente não específico da resposta do hospedeiro e apesar de estar bem caracterizada bioquímica e fisiopatologicamente, pouco se conhece sobre seu controle genético. Com este fim, foram desenvolvidas linhagens de camundongos

geneticamente selecionadas para a resposta inflamatória aguda (AIR) através do processo de seleção genética bidirecional.

Uma população geneticamente heterogênea obtida através do inter cruzamento das linhagens isogênicas A, DBA2, P, SWR, SLJ, CBA, BALB/c e C57BL/6, onde cada indivíduo possui a combinação aleatória de 12,5% do conjunto gênico de cada uma das oito linhagens isogênicas originais, constituiu a população inicial (F0) da seleção AIR, a qual apresentou um perfil de distribuição normal quanto ao caráter intensidade de resposta inflamatória aguda ⁷⁹.

A quantificação desta resposta foi feita considerando-se os parâmetros da concentração da proteína extravasada e do número de leucócitos infiltrados no exsudato formado, após injeção subcutânea de partículas de poliacrilamida (Biogel P100), segundo modelo de Fauve e colaboradores ⁸⁰. Utilizou-se essa substância insolúvel, não biodegradável e não antigênica, objetivando assim excluir a possibilidade do envolvimento da resposta imune específica na caracterização do fenótipo em estudo.

A diferença entre as linhagens no número de leucócitos infiltrantes ao foco inflamatório é em torno de 10 vezes, enquanto que na quantidade de proteína extravasada esta diferença é em torno de 2 vezes. Estimou-se que a divergência progressiva no fenótipo destas linhagens resulta da interação de 11 *loci* gênicos independentes, com efeito aditivo para o caráter ⁸¹.

O fenótipo que sofreu grande modificação nestas linhagens foi a habilidade em recrutar células polimorfonucleares para o foco inflamatório. Na população inicial estas células perfaziam um total de 71% dos leucócitos infiltrados e após a divergência entre as linhagens, a população de polimorfonucleares no exsudato da linhagem AIRmax

perfazia 95%, enquanto que nos AIRmin este percentual decresceu para 45%⁸².

A diferença nos parâmetros da AIR entre os animais AIRmax e AIRmin, ocorreu para outros agentes inflamatórios não relacionados entre si ou com o Biogel (agente selecionador), como o zymozan, a carragenina⁸³ e ao veneno de *Bothrops jararaca*⁸⁴.

Possíveis modificações na resposta imunológica específica foram investigadas e a análise da produção de diferentes isótipos de anticorpos frente a antígenos complexos revelou ser semelhante em ambas as linhagens, exceto pela maior produção nos animais AIRmax de IgE, cuja biossíntese é influenciada por fatores inflamatórios. A resposta mediada por células foi também investigada pela avaliação da hipersensibilidade tardia a antígenos de *Salmonella typhimurium* e a eritrócitos heterólogos e também se mostrou bastante semelhante para as duas linhagens⁸⁵.

A seleção genética para a resposta inflamatória aguda aparentemente não atingiu a reatividade imunológica específica destes animais, mostrando certa independência na regulação genética dos compartimentos natural e específico da imunidade. Apesar disto, as linhagens AIR mostraram diferenças quanto à resistência a infecções por *S. typhimurium* e por *Listeria monocytogenes*, sendo a linhagem AIRmax significativamente mais resistente do que os AIRmin, sugerindo que a capacidade de resposta inflamatória influenciou na resistência destes animais⁸⁵.

Pela grande diferença no potencial de resposta inflamatória presente nos animais da seleção AIR, estas linhagens constituem um modelo interessante e original na avaliação da influência da resposta imune inata em diversos fenômenos imunobiológicos.

Assim, devido às importantes modificações no sistema imunológico descritos no curso da infecção pelo *P. brasiliensis*, nos propusemos a investigar o desenvolvimento da infecção experimental nas linhagens selecionadas geneticamente para alta (AIRmax) e baixa (AIRmin) reatividade inflamatória.

Para tanto, avaliamos o grau de suscetibilidade ou resistência durante períodos iniciais desta infecção, bem como a produção de intermediários reativos do nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias e associadas com o padrão Th1 e Th2 de resposta.

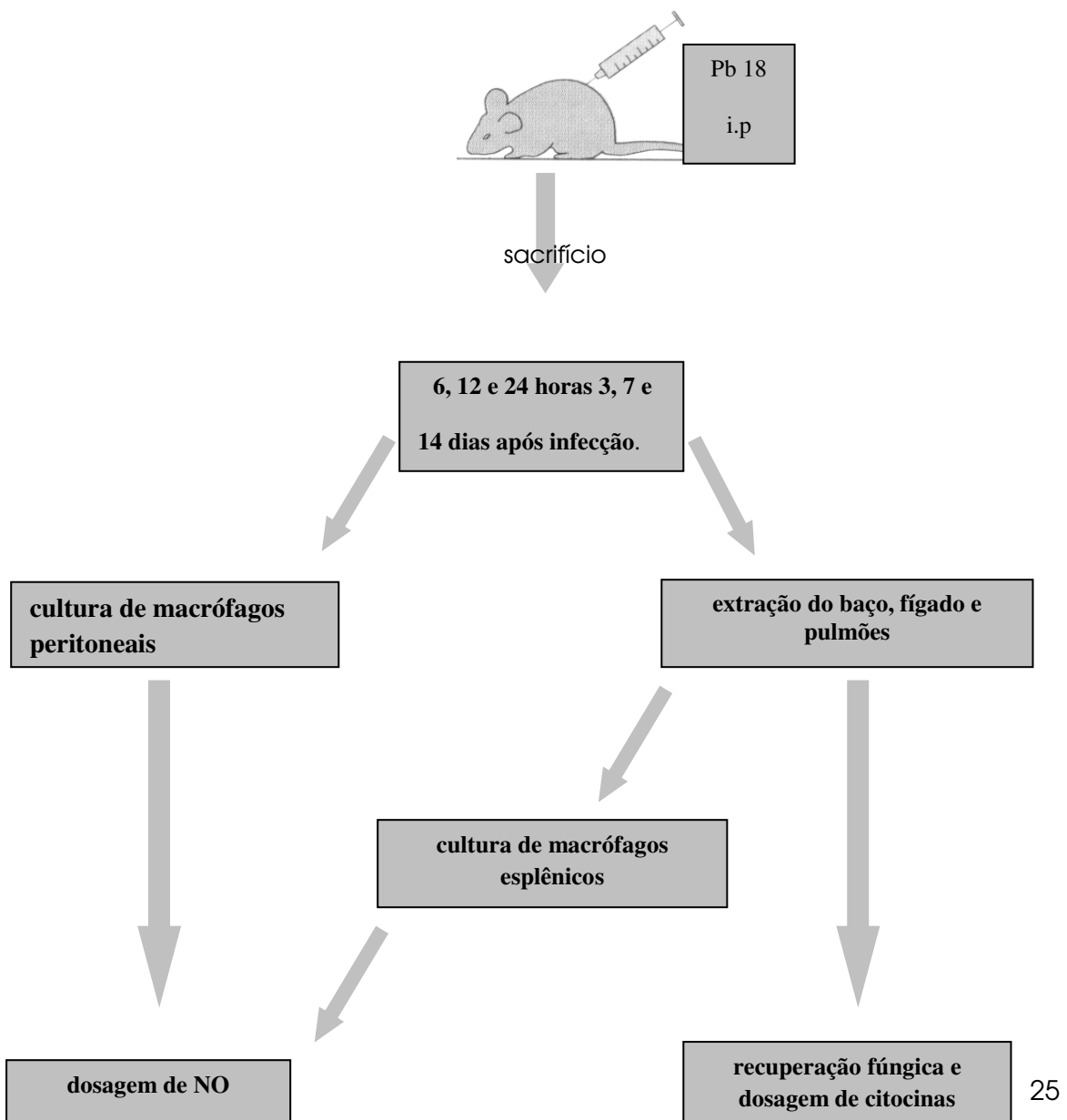
2. Objetivo:

Analisar os efeitos das modificações introduzidas pelo processo de seleção das linhagens da Seleção AIR em períodos iniciais da infecção pelo *P. brasiliensis* através da caracterização dos seguintes parâmetros:

- 1- Resistência dos camundongos AIRmax e AIRmin verificada pelo grau de disseminação de células fúngicas para os pulmões, baço e fígado;
- 2- Atividade de macrófagos peritoneais e esplênicos, pela determinação de óxido nítrico;
- 3- Produção de citocinas pró-inflamatórias e associadas ao padrão Th1 e Th2 de resposta: IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α .

3. Delineamento Experimental:

Camundongos machos AIRmax e AIRmin foram infectados com 5×10^6 células leveduriformes de *P. brasiliensis* pela via intraperitoneal e sacrificados após 6, 12 e 24 horas e 3, 7 e 14 dias. O lavado peritoneal foi utilizado para cultura de macrófagos peritoneais e posterior dosagem de óxido nítrico. Sequencialmente, fragmentos do baço, do fígado e dos pulmões foram removidos e macerados para a recuperação de fungos viáveis (3, 7 e 14 dias) e para a obtenção dos homogenatos para a dosagem de citocinas (baço e pulmões). Outros fragmentos desses órgãos foram estocados em formol para o exame histológico. Ao mesmo tempo, outra parte do baço foi macerada para a obtenção de macrófagos esplênicos e posterior dosagem de óxido nítrico.



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos das linhagens geneticamente selecionadas para alta (AIRmax) e baixa (AIRmin) reatividade inflamatória aguda, com 8-10 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Imunogenética do Instituto Butantan e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu.

4.2. Infecção pelo *P. brasiliensis*

4.2.1. Cultivo do *P. brasiliensis*

Foi utilizada a forma leveduriforme da cepa 18 do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb 18) mantida nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu. A cultura desta cepa é mantida com subcultivos semanais a 37° C no meio de cultura ágar glicose-peptona-extrato de levedura (GPY) contendo: 1,5% de glicose; 1% de peptona e 0,5% de extrato de levedura. As culturas foram utilizadas com seis dias de cultivo.

4.2.2. Preparo do inóculo de *P. brasiliensis*

As células leveduriformes foram transferidas da superfície de meio de cultura com auxílio de alça de platina para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4mm de diâmetro e solução salina tamponada estéril, pH 7,2 (PBS), e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex, por 3 ciclos de 10 segundos cada. A seguir, a suspensão de leveduras foi mantida a 37°C durante 5 minutos, para sedimentar grumos não desfeitos durante a agitação. O sobrenadante, contendo células isoladas ou com poucos brotamentos foi colhido e a viabilidade das células fúngicas, estabelecida por contagem em câmara hemocitométrica, tipo Neubauer, em microscópio de contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis às de aspecto brilhante e refringente, uma vez que as células mortas mostraram-se opacas e de coloração escura. Após a contagem, a concentração de células fúngicas foi padronizada para 5×10^6 leveduras viáveis/mL. Foram empregadas para inóculo, culturas de *P. brasiliensis* que apresentaram, pelo menos, 90% de viabilidade.

4.2.3. Método de infecção e sacrifício dos animais

Um conjunto de 96 animais da seleção AIRmax e AIRmin (48 animais de cada linhagem) foi infectado com *P. brasiliensis* por via intraperitoneal, com 0,5 mL de suspensão contendo 5×10^6 /ml de células leveduriformes viáveis do fungo, utilizando-se seringa de 1,0 mL e agulha hipodérmica 10x4. Este conjunto foi subdividido em 6 grupos de 16 camundongos (8 de cada linhagem), isto é, um grupo para cada período da infecção. Como controles foram incluídos 36 animais (18 de cada linhagem) subdivididos em 6 grupos de 6 camundongos (3 de cada linhagem), isto é, um grupo controle para cada período da infecção.

Os camundongos foram previamente anestesiados com pentobarbital sódico, por via intraperitoneal, e sacrificados por deslocamento cervical

nos seguintes períodos: 6, 12 e 24 horas e 3, 7 e 14 dias após a infecção. Este procedimento recebeu parecer favorável da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina desta universidade, protocolo n° 490, segundo os Princípios Éticos em Experimentação Animal (COBEA).

4.3. Avaliação da atividade macrofágica

4.3.1. Cultura de macrófagos peritoneais

Os animais foram colocados no interior de uma câmara asséptica de fluxo laminar e fixados em decúbito dorsal em suporte de dissecação. A parede abdominal foi exposta rebatendo-se a pele da região. A seguir 5 mL de PBS gelado foram injetados na porção mediana superior do abdômen. A cavidade massageada e o líquido peritoneal obtido com uma seringa hipodérmica de 10 mL com agulha 25x7. O material obtido foi colocado em tubos de vidro, mantidos em banho de gelo e centrifugados a 200g por 10 minutos. Após centrifugação a suspensão celular foi ressuspensa em meio completo para cultura de células (MCCC), ou seja, meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de L-glutamina. Alíquotas de 50 µL desta suspensão foram incubadas a 37°C durante 10 minutos com 0,45 mL de solução de vermelho neutro a 0,02%. Os macrófagos foram identificados através da incorporação pelo corante, contados em câmara de Neubauer e a concentração celular ajustada para $2,0 \times 10^6$ macrófagos/mL de MCCC. Volumes de 0,1 mL desta suspensão foram distribuídos em microplacas de cultura, contendo 96 wells. Após um período de incubação de 2 horas a 37°C em tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes foram retiradas através da lavagem da placa. As células aderentes foram incubadas com MCCC por 24 horas a 37°C em tensão de 5% de CO₂, para coleta de sobrenadantes para dosagem de NO.

4.3.2. Cultura de macrófagos esplênicos

Após a obtenção do lavado peritoneal, parte do baço foi retirada, colocada em placas de Petri 20 x 100mm contendo 5 mL de meio de cultura de células RPMI 1640 , e macerado com ajuda de uma peneira de nylon. O material foi recolhido e centrifugado em tubos de 20 x 200mm, durante 10 minutos, a 1500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o botão celular desprendido, e adicionou-se 1 mL de água destilada estéril para hemólise, acrescentando imediatamente 10 mL de meio de cultura de células RPMI 1640. Essa suspensão foi novamente centrifugada durante 10 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 mL de MCCC. A concentração final foi acertada para 2×10^6 células/mL, após contagem em câmara de Neubauer por coloração pelo vermelho neutro. A seguir, 0,1mL dessa suspensão foram distribuídos em placas de microcultura de 96 orifícios de fundo chato. Essas células foram incubadas a 37°C em tensão de 5% de CO₂ por 24 horas, para coleta de sobrenadantes para dosagem de NO.

4.3.3. Determinação da liberação de Óxido Nítrico (NO)

Com os sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais e esplênicos foi realizada a dosagem da produção de NO pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Aos sobrenadantes foram adicionados 100µL do reagente de Griess, que contém n-(1-naftil)-etilenediamina (NEED – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluído a 0,1% em água destilada, e sulfanilamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluída a 1% em H₃PO₄ 5%. Estes reagentes, NEED e sulfanilamida, foram misturados em volumes iguais no momento da reação. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. As amostras foram lidas em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm contra um branco constituído por

reagente de Griess. Os resultados foram expressos na concentração μmolar (μM) do NO liberado, comparando-se a densidade óptica a uma curva com concentrações conhecidas de NO.

4.5. Grau de infecção

Para determinar a resistência dos animais à infecção, estes foram sacrificados conforme descrito no item 4.2.3, porém, este parâmetro foi avaliado apenas nos períodos de 3, 7 e 14 dias após o inóculo. Fragmentos do baço, fígado e pulmões foram removidos, pesados, e transferidos individualmente para graal de porcelana, sendo macerados com auxílio de pistilo e homogeneizados em 1mL de solução salina estéril. Alíquotas de 100 μL dessa suspensão foram semeadas, em duplicatas, com auxílio de bastões de vidro em L, em placas de Petri 20 x 100mm, contendo Brain Heart Infusion Agar, suplementado com 5% de fator de crescimento (filtrado de cultura de células leveduriformes da cepa 192 de *P. brasiliensis*, cultivada sob agitação a 36°C em meio de Casals⁸⁶, durante 7 dias⁸⁷; 4% de soro equino; 50 mg/mL de gentamicina). A seguir, as placas de Petri foram vedadas e incubadas a 35°C por períodos de até 20 dias. A leitura das placas foi feita pela contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) e o resultado expresso pelo número de UFC por g de órgão (log 10).

4.6. Obtenção de homogenatos

Os sobrenadantes dos macerados dos pulmões e baço de animais infectados e controles, foram obtidos utilizando o mesmo material proveniente do experimento de recuperação fúngica. Após a retirada das alíquotas de 100 µL descrito no item 5., o restante do macerado diluído em 2mL de solução salina estéril, aproximadamente 1,5mL, foi recolhido em microtubos de 2,0mL e centrifugado à temperatura de 20° C durante 15 minutos a 2000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi colhido e armazenado a - 70° C para posterior dosagem de IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α .

4.7. Produção de citocinas

Os níveis de IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α presentes em sobrenadantes de homogenatos dos pulmões e baço, de animais infectados e normais, foram determinados pelo método de ELISA de captura, segundo metodologia indicada pelo fabricante (R&D Systems).

Microplacas de poliestireno com 96 orifícios, fundo chato, Maxi Sorp – NUNC™, foram sensibilizadas com 100µL de anticorpo monoclonal de captura por orifício na concentração determinada para cada citocina, diluído em TCB (tampão carbonato-bicarbonato), sendo incubadas “overnight” a 4°C em câmara úmida. A seguir, os poços foram lavados 3 vezes com solução salina tamponada (PBS) adicionada de 0,05% de Tween 20 e os sítios livres foram bloqueados com 100µL de solução protéica pobre em gordura para saturação dos sítios de ligação e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após nova seqüência de lavagens, as amostras foram aplicadas no volume de 50 µL/orifício e incubadas a 37°C durante duas horas. Lavou-se novamente todos os orifícios e aplicou-se, em

seguida, o anticorpo policlonal biotilado de detecção diluído em PBS nas concentrações previamente estabelecidas para cada citocina. Após 2 horas de incubação a 37°C e mais três lavagens, a avidina-biotina peroxidase (Sigma) foi adicionada numa diluição 1:10000 em PBS e a reação foi incubada novamente a 37°C por 1 hora. Para revelação, depois da última seqüência de lavagens, utilizou-se uma solução de OPD e H₂O₂ (10 mg de OPD-ortofenilenodiamina-SIGMA, e 100 µL H₂O₂ para cada 12,5 mL de tampão citrato-fosfato pH=5,0). Após 15 minutos a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL H₂SO₄ 4N a cada poço. As leituras foram feitas em um leitor de ELISA com filtro de 492 nm. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

4.8. Análise estatística

Os procedimentos estatísticos foram desenvolvidos empregando-se o programa Graph Pad Instat, San Diego, Califórnia - USA. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste de Análise de Variância seguido do teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer⁸⁸. As estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Grau de infecção

A resistência à infecção pelo *P. brasiliensis* foi analisada nas linhagens AIRmax e AIRmin através da obtenção do número de UFC a partir de macerados de fragmentos dos pulmões, baço e fígado no 3º, 7º e 14º dias de infecção.

Os dados obtidos no pulmão e baço apresentam maior recuperação fúngica com diferença estatística significativa dos AIRmin em relação aos AIRmax em todos os períodos analisados (Figuras 1 e 2).

No fígado, a recuperação continuou sendo maior nos AIRmin, entretanto, aos 14 dias os AIRmax mesmo aparentemente apresentando maior contenção fúngica que os AIRmin, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura3).

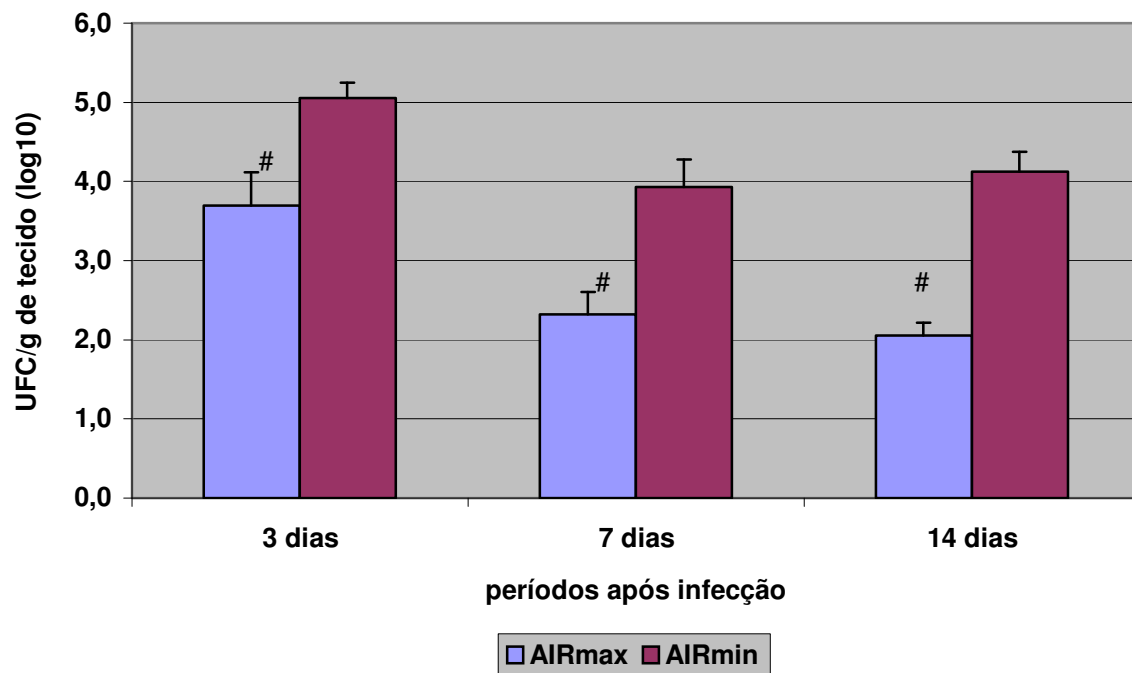


Figura 1 - Recuperação de fungos viáveis, a partir de fragmentos do baço, em camundongos AIRmax e AIRmin, infectados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colônias/g de tecido, e representam a média \pm desvio padrão obtida dos resultados de oito animais por linhagem, avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$).

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

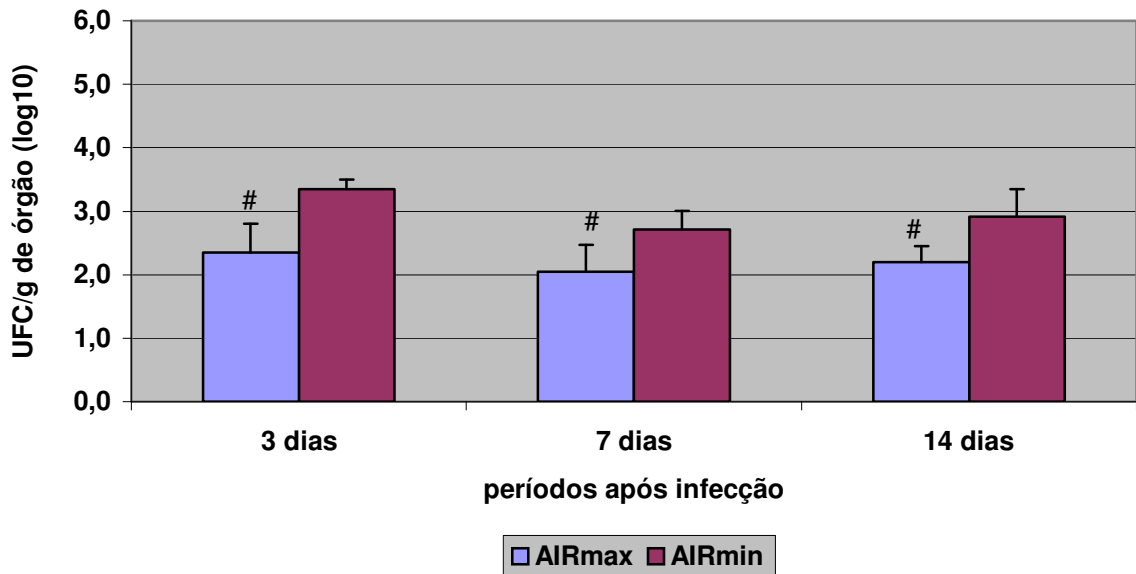


Figura 2 - Recuperação de fungos viáveis, a partir de fragmentos dos pulmões, em camundongos AIRmax e AIRmin, infectados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colônias/g de tecido, e representam a média \pm desvio padrão obtida dos resultados de oito animais por linhagem, avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

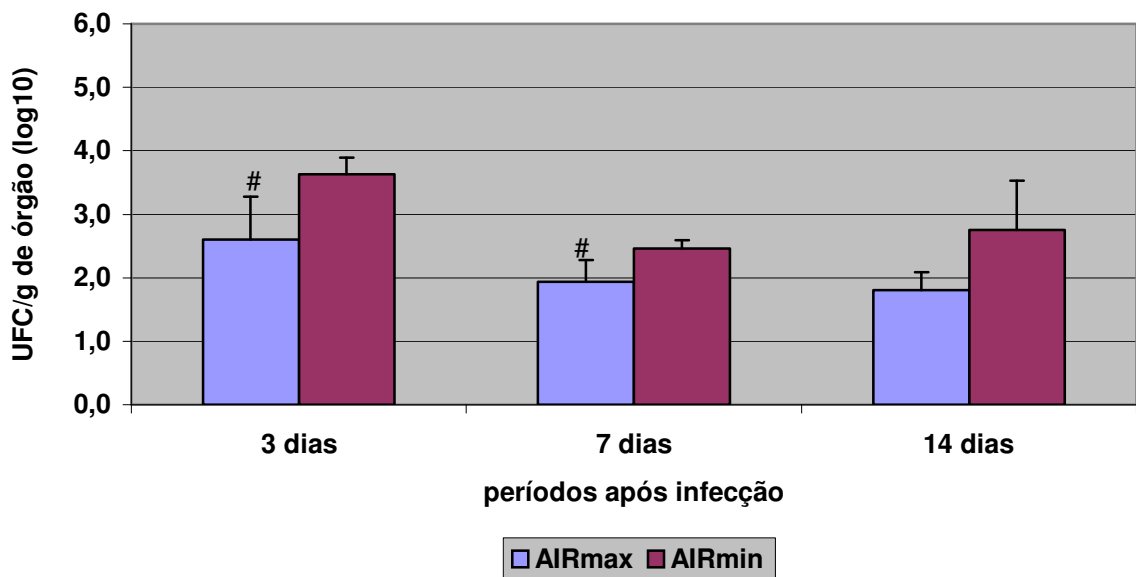


Figura 3 - Recuperação de fungos viáveis, a partir de fragmentos do fígado, em camundongos AIRmax e AIRmin, infectados com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colônias/g de tecido, e representam a média \pm desvio padrão obtida dos resultados de oito animais por linhagem, avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

5.2. Produção de Óxido Nítrico (NO)

Os intermediários reativos do nitrogênio foram avaliados através da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos esplênicos e peritoneiais de camundongos AIRmax e AIRmin não infectados (grupo controle) ou infectados por *P. brasiliensis* nos períodos de 6, 12 e 24 horas e 3, 7 e 14 dias.

No baço, os animais controles AIRmin produziram mais NO que os AIRmax. Durante a infecção, a linhagem AIRmin em relação ao seu respectivo controle apresentou maior produção nos períodos de 12 e 24 horas e 3 dias, enquanto que os AIRmax infectados apresentaram maior produção que seus controles em 12 horas, 3, 7 e 14 dias.

Entre os animais AIRmax e AIRmin infectados, observou-se maior produção dos AIRmin no período de 12 horas, e apesar da grande produção de NO pelos animais AIRmin em 24 horas, esta não foi estatisticamente significativa. A partir do terceiro dia os animais AIRmax começaram a produzir mais NO que os AIRmin, sendo essa diferença estatisticamente significativa no 7º e 14º dias (Figura 4).

Macrófagos obtidos do lavado peritoneal das linhagens AIRmax e AIRmin controles não apresentaram diferenças significantes na produção de NO. Porém, ambas as linhagens infectadas produziram mais NO que seus respectivos controles a partir de 12 horas da infecção.

Entre os animais infectados, a linhagem AIRmin apresentou maior produção que os AIRmax apenas no período de 12 horas, sendo que os AIRmax apresentaram maior produção com diferença estatística em 24 horas, 7 dias e 14 dias (Figura 5).

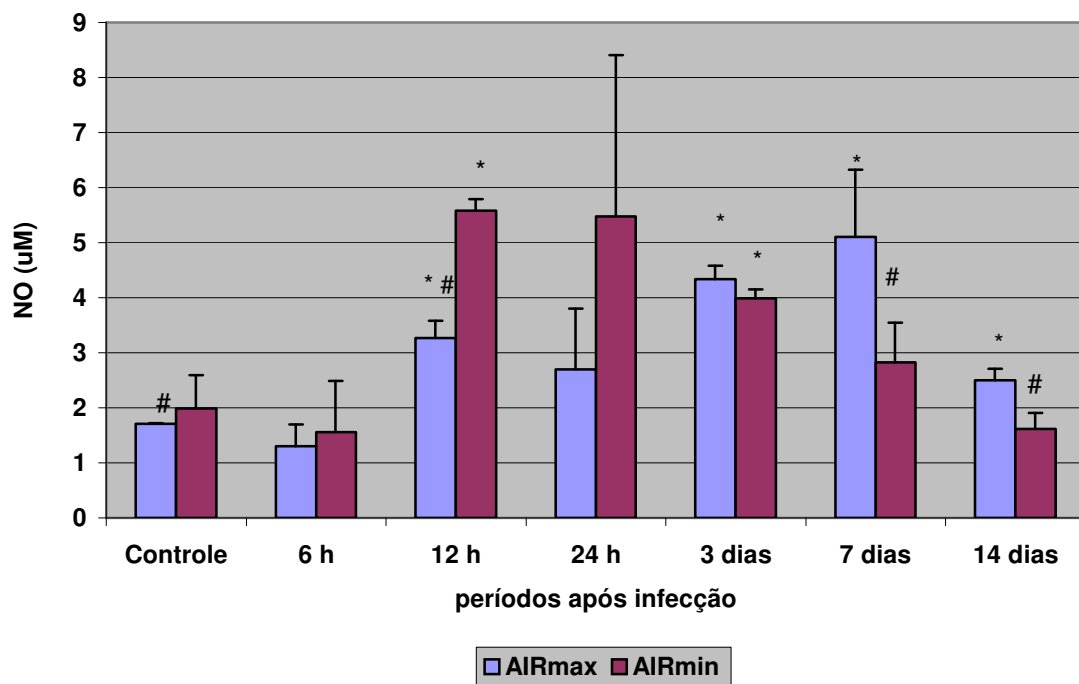


Figura 4 - Produção de NO por macrófagos esplênicos em camundongos AIRmax e AIRmin, infectados ou não com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em micromoles de NO/2x10⁵ células e representam a média ± desvio padrão obtida dos resultados de oito animais por linhagem, avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey (p<0,05)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

* : indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

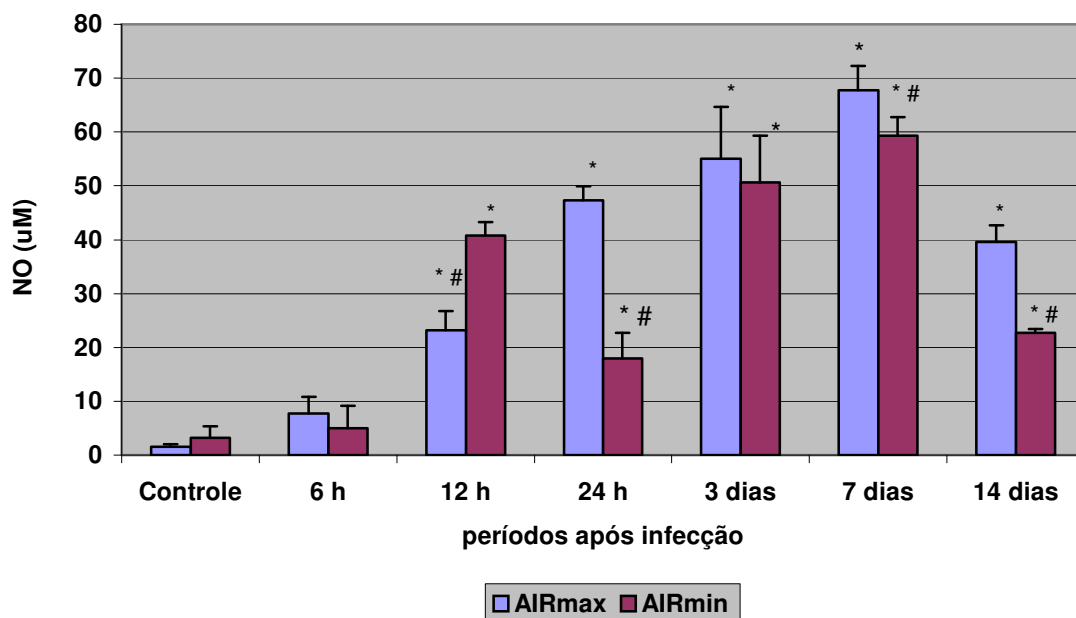


Figura 5 - Produção de NO por macrófagos peritoneais em camundongos AIRmax e AIRmin, infectados ou não com *P. brasiliensis*. Os resultados são expressos em micromoles de NO/ 2×10^5 células e representam a média \pm desvio padrão obtida dos resultados de oito animais por linhagem, avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

5.3. Produção de citocinas

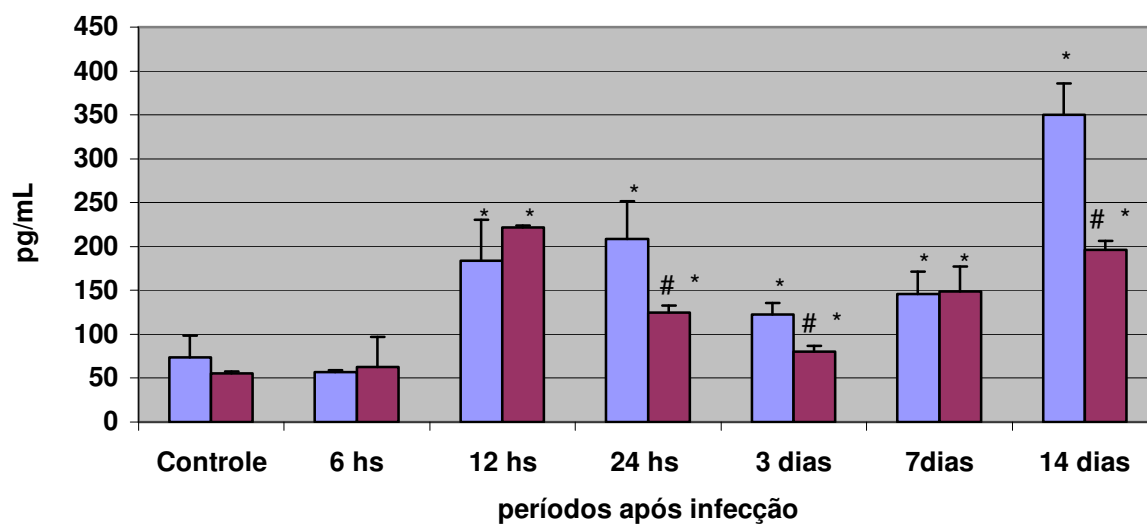
A produção de citocinas IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α , foi analisada nos camundongos AIRmax e AIRmin, infectados ou não com *P. brasiliensis*, através da técnica de ELISA, a partir de homogenatos do pulmão e baço nos períodos de 6, 12 e 24 horas e 3, 7 e 14 dias de infecção.

5.3.1. Produção de IL-1

O perfil da produção de IL-1 no pulmão e baço está demonstrado na figura 6. Em relação ao pulmão, não houve diferença significativa entre os animais AIRmax e AIRmin controles. Os animais infectados das duas linhagens apresentaram produção de IL-1 maior que seus respectivos controles durante todos os períodos estudados. Entre os animais infectados, os AIRmin produziram mais IL-1 que os AIRmax em 6 e 12 horas, porém sem diferença estatística. Os AIRmax produziram mais IL-1 em 24 horas e 3 dias e grande produção no 14^o dia.

A produção de IL-1 no baço da linhagem AIRmax controle foi maior que a obtida na linhagem AIRmin controle. Entretanto, no decorrer da infecção uma diminuição estatisticamente significativa foi observada nos AIRmax em relação a seu respectivo controle em 6 e 12 horas, seguida de um aumento gradual até o 14^o dia, mas com diferença estatística apenas no 3^o dia. Os AIRmin infectados produziram mais IL-1 que seu controle em 6 horas e 3, 7 e 14 dias. Quando comparados AIRmax e AIRmin infectados em cada período estudado, observou-se que os AIRmin produziram mais IL-1 em 6 horas, a partir de 24 horas, a linhagem AIRmax apresentou uma maior produção que os AIRmin, estatisticamente significativa em 24 horas, 3 e 14 dias.

IL-1 Pulmão



IL-1 Baço

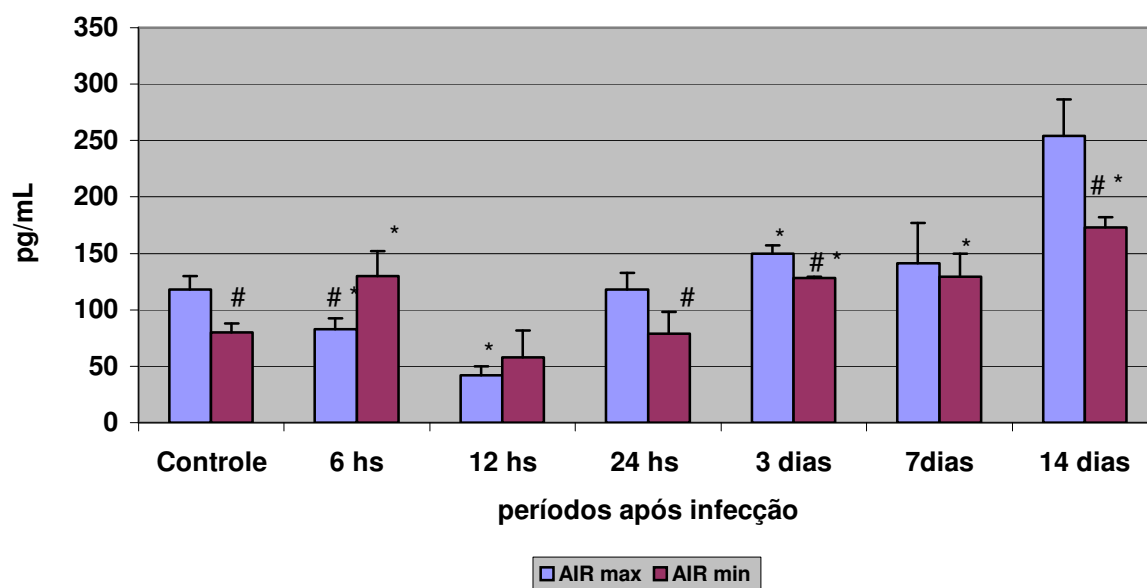


Figura 6 - Níveis de IL-1 em homogenatos de pulmão e baço de camundongos AIRmax e AIRmin infectados ou não com *P.brasiliensis*. Os resultados são expressos em picograma/mL e representam a média \pm desvio padrão obtidos dos resultados de oito animais por linhagem avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

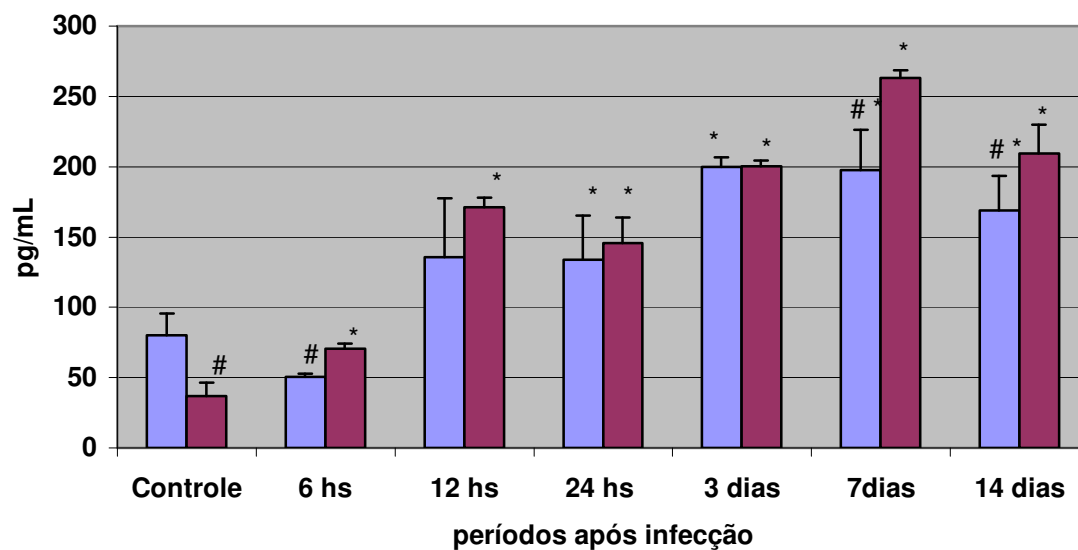
*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

5.3.2. Produção de IL-4

A produção de IL-4 no pulmão (figura 7) de camundongos AIRmax controles foi significativamente superior aos AIRmin controles. Durante a infecção os AIRmin apresentaram maior produção que seus respectivos controles, sendo que o mesmo só foi observado nos AIRmax após 24 horas de infecção. Os AIRmin infectados produziram mais IL-4 que os AIRmax infectados em 6, 12 e 24 horas, entretanto esta produção não foi estatisticamente significante, sendo apenas no 7° e 14° dias.

No baço (figura 7), tanto os camundongos AIRmax como os AIRMin produziram grande quantidade de IL-4. Uma inibição na síntese da citocina foi observada em ambas as linhagens infectadas em relação a seus respectivos controles em 6 e 12 horas e no 7° e 14° dias apenas nos AIRmax. Entre os animais infectados a linhagem AIRmin apresentou maior produção de IL-4 em relação aos AIRmax no período de 6 horas, mesmo apresentando inibição em relação a seu respectivo controle. Este aumento também foi observado em 3 dias e 14 dias, com os AIRmax só apresentando maior produção que os AIRmin no 7° dia.

IL-4 Pulmão



IL-4 Baço

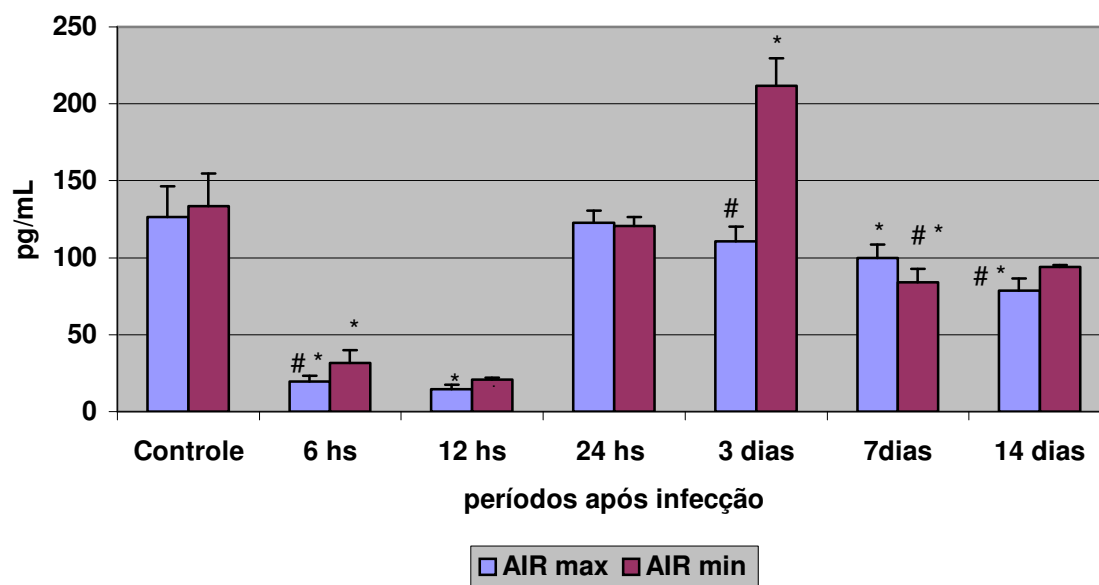


Figura 7 - Níveis de IL-4 em homogenatos de pulmão e baço de camundongos AIRmax e AIRmin infectados ou não com *P.brasiliensis*. Os resultados são expressos em picograma/mL e representam a média \pm desvio padrão obtidos dos resultados de oito animais por linhagem avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

5.3.3. Produção de IL-6

A produção de IL-6 no pulmão dos animais controles AIRmax apresentou-se significativamente maior que os animais controles. Os AIRmax infectados apresentaram maior produção de IL-6 em relação aos respectivos controles apenas em 24 horas e 3 dias, com inibição significativa no 14º dia. Os AIRmin infectados apresentaram aumento de IL-6 em relação a seus respectivos controles apenas em 24 horas, com decréscimo no 3º dia e diferença estatística no 7º e 14º dia. Entre os animais infectados a linhagem AIRmax produziu mais IL-6 em relação aos AIRmin a partir de 24 horas da infecção (figura 8).

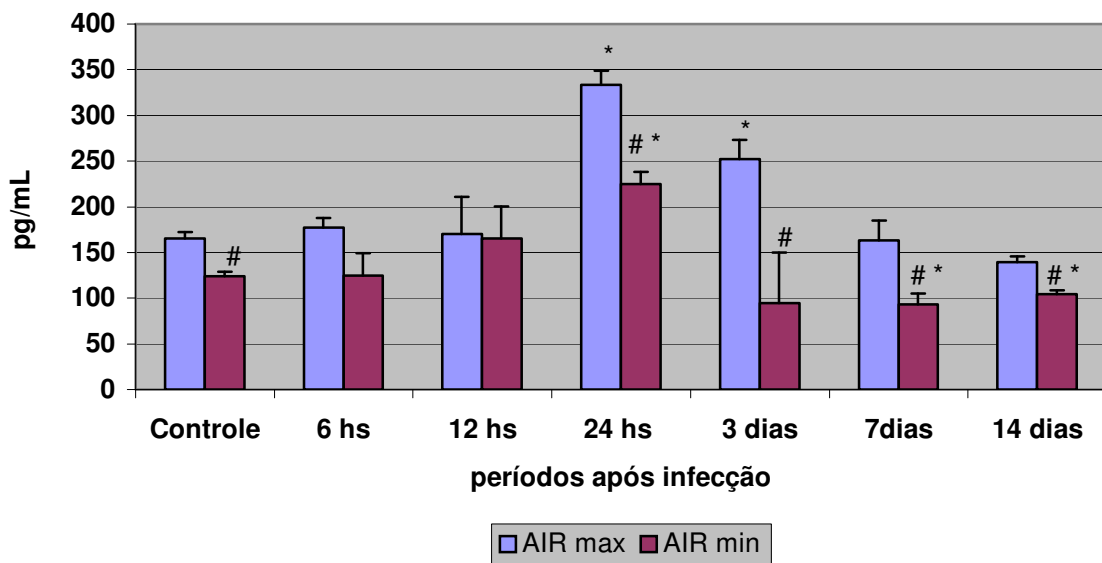


Figura 8 - Níveis de IL-6 em homogenatos de pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin infectados ou não com *P.brasiliensis*. Os resultados são expressos em picograma/mL e representam a média \pm desvio padrão obtidos dos resultados de oito animais por linhagem avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

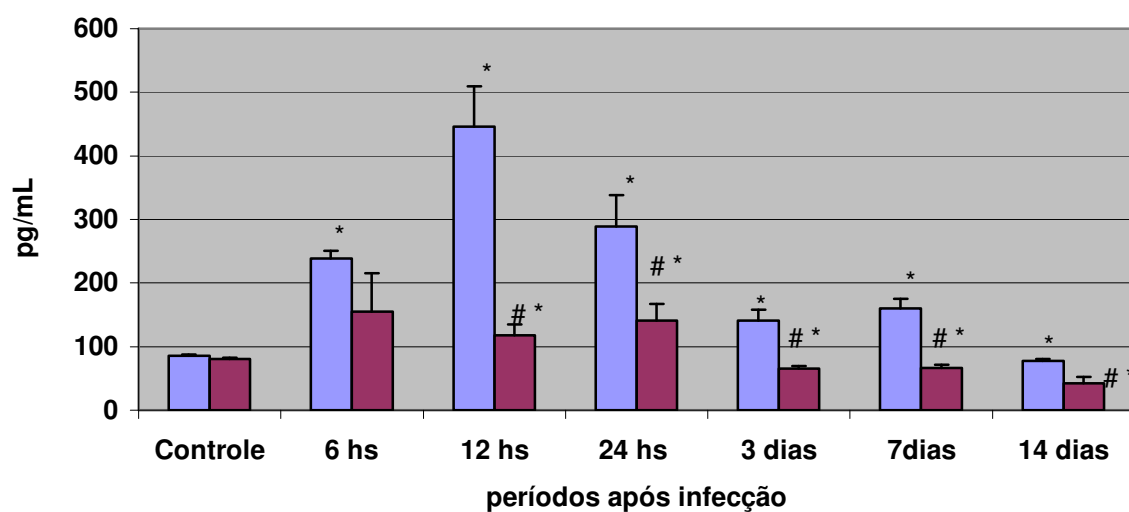
*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

5.3.4. Produção de IL-8

A produção de IL-8 não apresentou diferença entre as linhagens AIRmax e AIRmin controles no pulmão. A síntese desta citocina no pulmão de animais infectados AIRmax foi maior que seus respectivos controles de 6 horas a 7 dias, e no 14º dia uma inibição foi detectada. Os AIRmin infectados em relação a seus controles apresentaram pequeno aumento na produção de IL-8 em 6 horas com significância estatística em 12 e 24 horas seguida de inibição aos 3, 7 e 14 dias. Os camundongos AIRmax infectados apresentaram maior produção significativa de IL-8 em relação aos AIRmin infectados a partir de 12 horas de infecção (figura 9).

No baço não observou-se nenhuma diferença significativa na produção de IL-8 entre os controles das duas linhagens. A linhagem AIRmax apresentou aumento na produção da citocina em relação a seus controles em 6, 12, 24 horas e 3 dias, com inibição no 14º dia. Os AIRmin infectados em relação a seus controles apresentaram aumento significativo em 6, 24 horas e 3 dias com diminuição aos 7 e 14 dias. A análise entre as linhagens demonstrou que os AIRmax produziram mais IL-8 que os AIRmin estatisticamente significativa em 6, 12, 24 horas e 3 e 14 dias (figura 9).

IL-8 Pulmão



IL-8 Baço

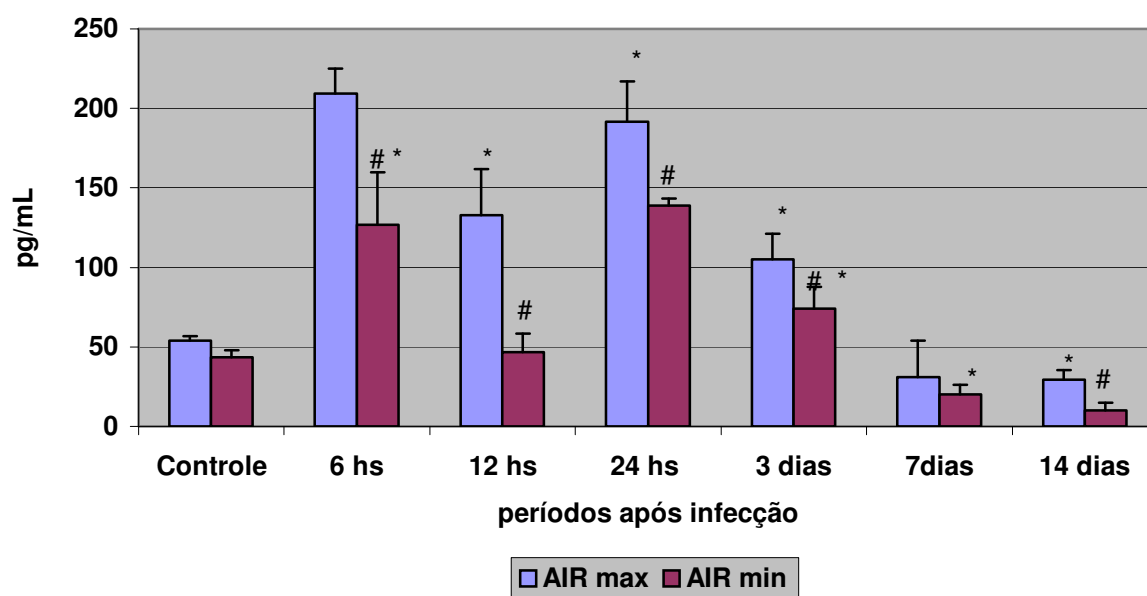


Figura 9 - Níveis de IL-8 em homogenatos de pulmão e baço de camundongos AIRmax e AIRmin infectados ou não com *P.brasiliensis*. Os resultados são expressos em picograma/mL e representam a média \pm desvio padrão obtidos dos resultados de oito animais por linhagem avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

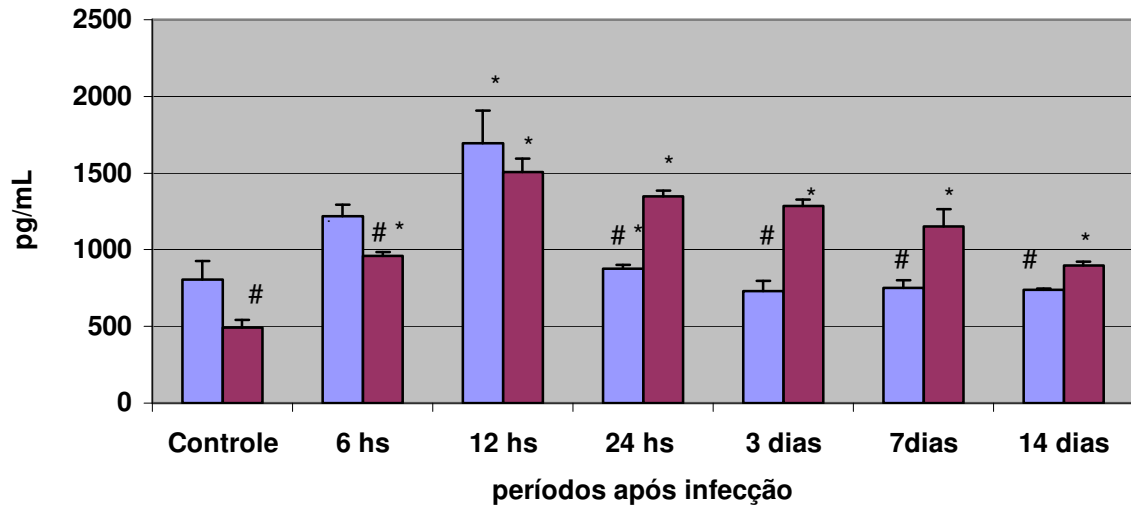
5.3.5. Produção de IL-10

No pulmão a produção de IL-10 apresentou-se maior nos camundongos AIRmax controles em relação aos AIRmin controles. Comparando a síntese desta citocina entre as linhagens infectadas e seus respectivos controles, observamos que a linhagem AIRmax infectada apresentou maior produção em 6, 12 e 24 horas e a linhagem AIRmin infectada demonstrando maior produção durante todos os períodos analisados.

Diferenças na produção da IL-10 entre as linhagens infectadas foram detectadas. Os animais AIRmax apresentaram maior produção estatisticamente significante apenas em 6 horas, enquanto os AIRmin produziram mais IL-10 que os AIRmax a partir de 24 horas da infecção (figura 10).

Em relação ao baço, a produção de IL-10 dos animais das duas linhagens variou no decorrer da infecção em relação a seus respectivos controles. Estes quando comparados entre si, apresentaram a linhagem AIRmin com maior produção que os AIRmax. Aumento significante na síntese de IL-10 foi observada nos animais AIRmax infectados em relação a seus controles apenas em 6 e 24 horas com inibição significante no 7^o e 14^o dias; os AIRmin apresentaram maior produção que os animais não infectados apenas em 6 horas, com inibição significativa a partir de 24 horas do experimento. Diferenças significantes interlinhagens só foram observadas em 12 horas (AIRmin > AIRmax) e 24 horas (AIRmax > AIRmin) (figura10).

IL-10 Pulmão



IL-10 Baço

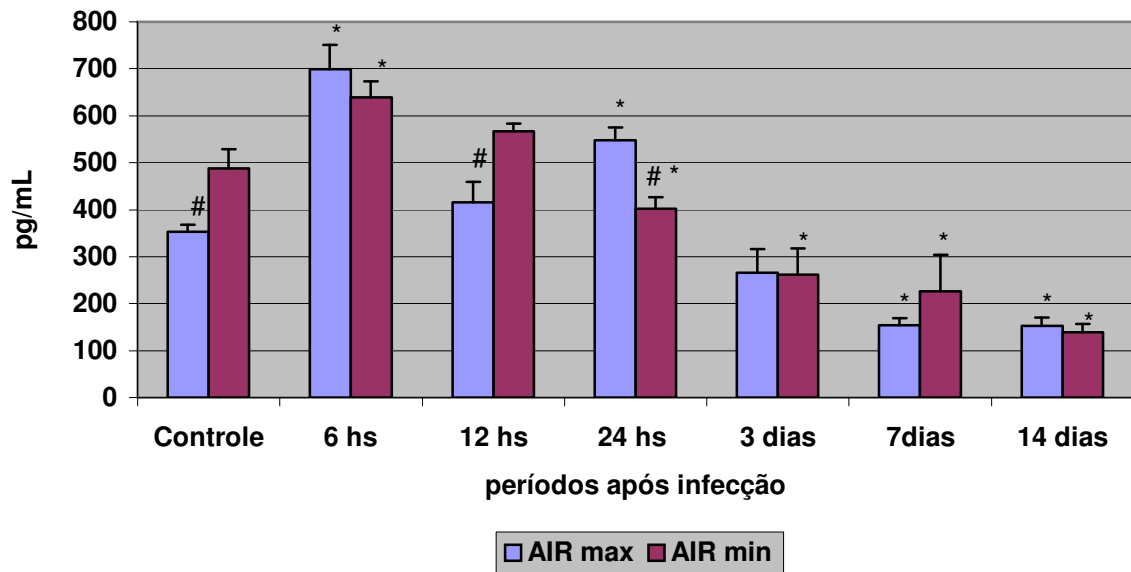


Figura 10 - Níveis de IL-10 em homogenatos de pulmão e baço de camundongos AIRmax e AIRmin infectados ou não com *P.brasiliensis*. Os resultados são expressos em picograma/mL e representam a média \pm desvio padrão obtidos dos resultados de oito animais por linhagem avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

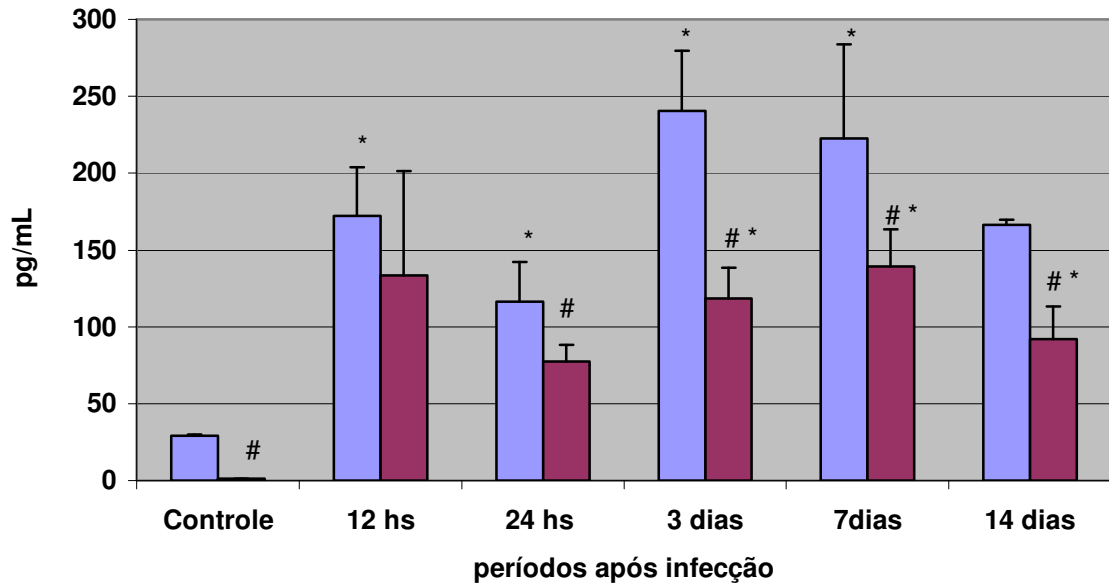
*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

5.3.6. Produção de IL-12

No pulmão dos animais AIRmax controles demonstrou-se mais IL-12 que os AIRmin controles. Durante todos os períodos analisados as linhagens AIRmax e AIRmin infectadas produziram mais IL-12 que seus respectivos controles. Comparando-se a produção desta citocina entre as linhagens infectadas, obsevou-se maior síntese nos AIRmax durante todos os períodos.

No baço, as linhagens AIRmax e AIRmin controles não apresentaram diferenças significantes na produção de IL-12. As duas linhagens infectadas produziram mais citocinas em relação a seus respectivos controles a partir de 12 horas do experimento. Entre as linhagens infectadas os animais AIRmax produziram mais IL-12 que os AIRmin nos períodos de 12, 24 horas, 3 e 14 dias (figura 11).

IL-12 Pulmão



IL-12 Baço

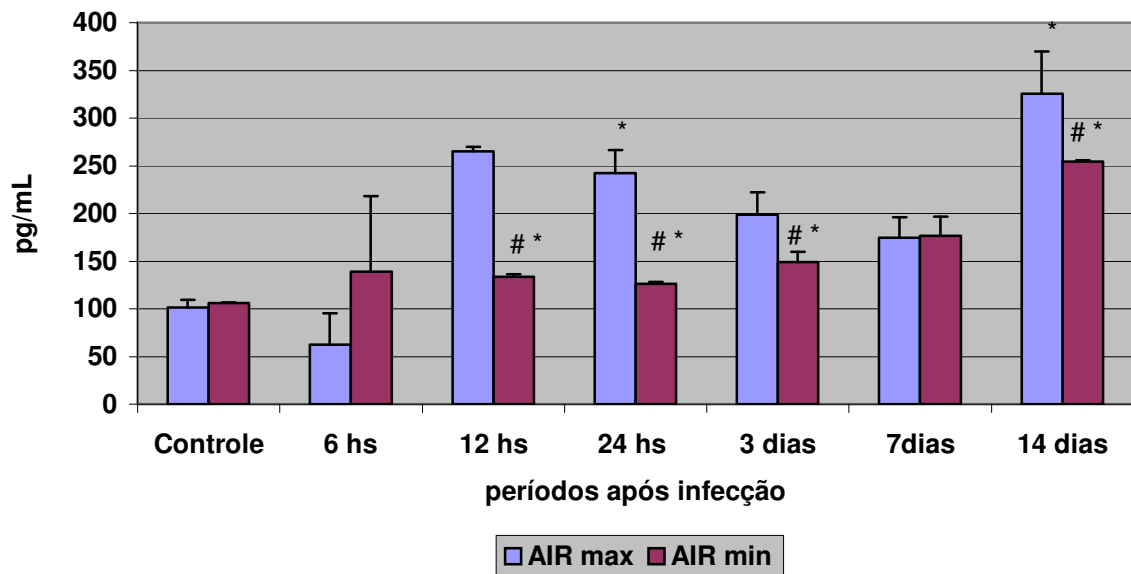


Figura 11 - Níveis de IL-12 em homogenatos de pulmão e baço de camundongos AIRmax e AIRmin infectados ou não com *P.brasiliensis*. Os resultados são expressos em picograma/mL e representam a média \pm desvio padrão obtidos dos resultados de oito animais por linhagem avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

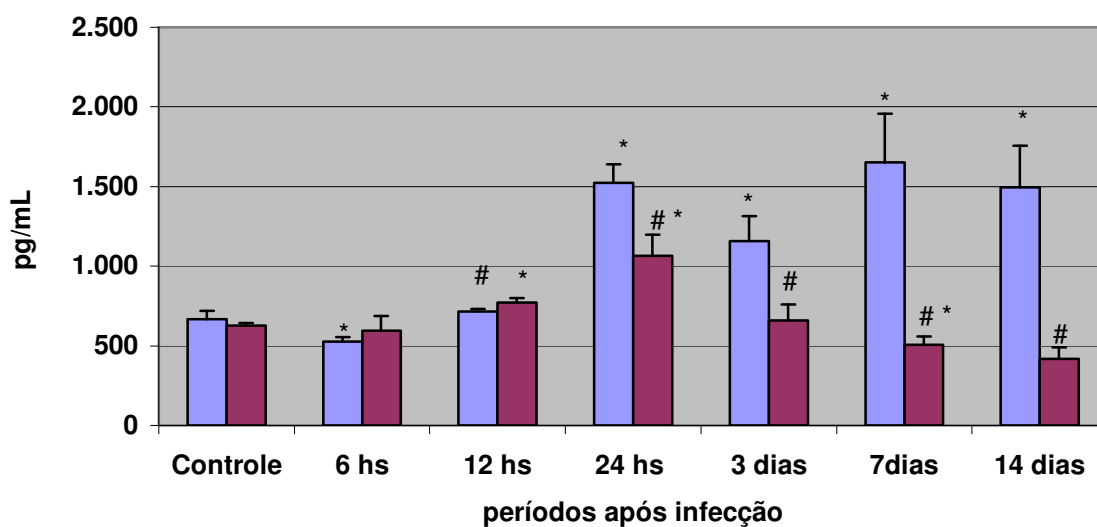
*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

5.3.7. Produção de IFN- γ

A produção de IFN- γ não apresentou diferença significativa entre os controles AIRmax e AIRmin no pulmão. Os animais AIRmax no início da infecção (6 horas) apresentaram inibição da produção de IFN- γ em relação a seus respectivos controles. No entanto, a partir de 24 horas um aumento significativo foi observado. Os AIRmin infectados apresentaram maior produção que seus respectivos controles em 12 e 24 horas com inibição no 7^o e no 14^o dia. Produção diferenciada de IFN- γ foi observada nos camundongos infectados AIRmin em relação aos AIRmax em 12 horas (AIRmin > AIRmax). Após esse período, os animais AIRmax produziram muito mais IFN- γ que ao AIRmin durante os períodos de 24 horas, 3, 7 e 14 dias.

A produção esplênica de IFN- γ não apresentou diferença significativa entre os animais controles das linhagens AIRmax e AIRmin. A linhagem AIRmax infectada apresentou inibição na produção desta citocina em relação aos controles em 6 e 24 horas, com aumento significante no decorrer dos outros períodos. A linhagem AIRmin infectada apresentou inibição em relação aos controles em 6, 12, 24 e 14 dias. Entre as linhagens infectadas os AIRmin produziram mais IFN- γ apenas no período de 6 horas, com os AIRmax apresentando maior produção estatisticamente significante aos 3, 7 e 14 dias (figura 12).

IFN- γ Pulmão



IFN- γ Baço

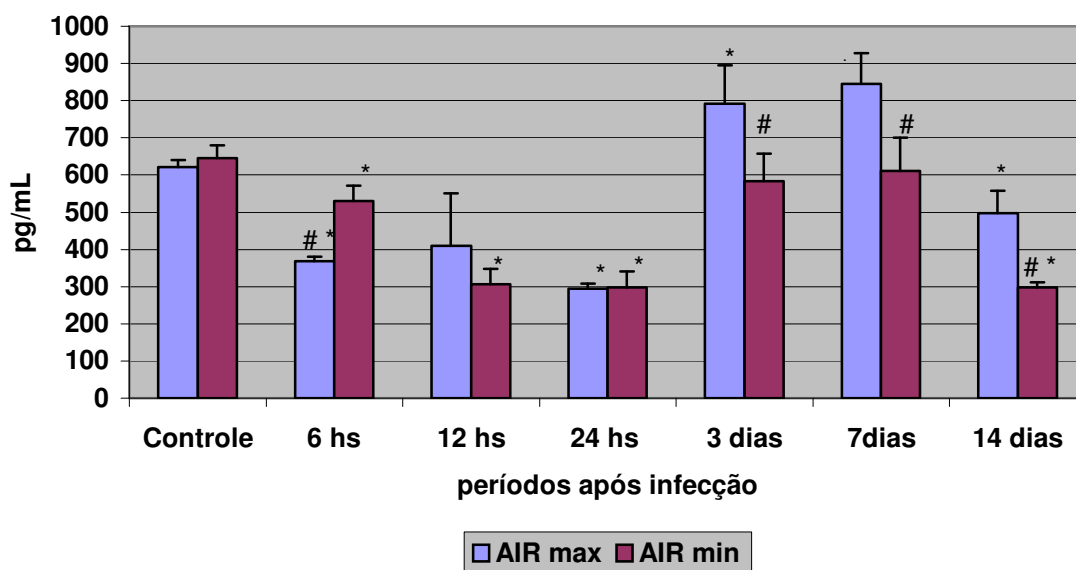


Figura 12 - Níveis de IFN- γ em homogenatos de pulmão e baço de camundongos AIRmax e AIRmin infectados ou não com *P.brasiliensis*. Os resultados são expressos em picograma/mL e representam a média \pm desvio padrão obtidos dos resultados de oito animais por linhagem avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

5.3.8. Produção de TNF- α

A produção de TNF- α nos pulmões dos animais controles das linhagens AIRmax e AIRmin não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si. Aumento significativo na síntese de TNF- α foi observado nos animais AIRmax infectados em relação a seus respectivos controles em 12 e 24 horas e 3 e 7 dias e nos AIRmin infectados versus AIRmin controles em 24 horas, 3 e 7 dias.

Diferenças na produção de TNF- α interlinhagens foram observadas desde o início da infecção com as linhagens AIRmax produzindo níveis estatisticamente superiores de TNF- α em 12 e 24 horas e no 7^o e 14^o dias (figura 13).

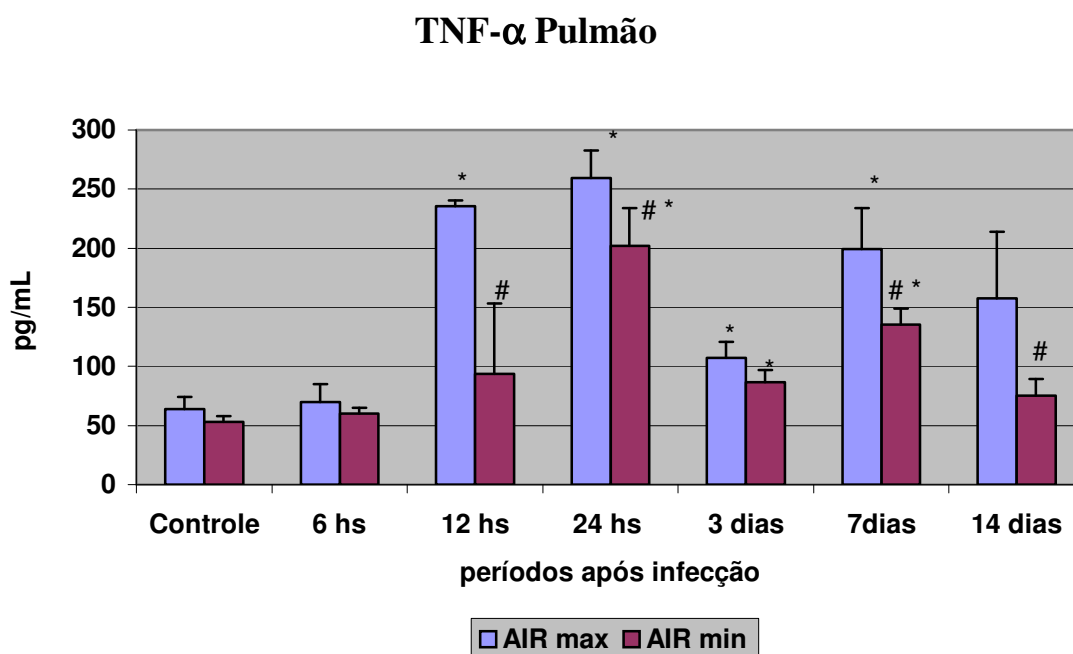


Figura 13 - Níveis de TNF- α em homogenatos de pulmão de camundongos AIRmax e AIRmin infectados ou não com *P.brasiliensis*. Os resultados são expressos em picograma/mL e representam a média \pm desvio padrão obtidos dos resultados de oito animais por linhagem avaliados em cada período. Análise estatística: Teste de Tukey ($p < 0,05$)

#: indica diferença estatística interlinhagens (AIRmax x AIRmin) em cada período.

*: indica diferença estatística dos animais infectados em relação ao respectivo grupo controle.

6. Discussão:

Neste trabalho, utilizamos como modelo experimental camundongos fenotipicamente selecionados para a máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) reação inflamatória aguda, obtidos através do modelo de seleção genética bidirecional ⁸⁹.

Observamos que as linhagens AIRmax apresentaram maior contenção do processo infeccioso que as linhagens AIRmin, nos compartimentos analisados, pulmão, fígado e baço.

A análise da recuperação fúngica em períodos precoces da infecção não foi detectada antes do terceiro dia. A resistência dos camundongos AIRmax observada pela menor disseminação de células fúngicas para os órgãos analisados pode estar relacionada à ativação adequada das células fagocíticas em períodos precoces pós-infecção.

Kashino e colaboradores ⁹⁰ ao bloquearem a ação dos macrófagos peritoneais verificaram o aumento da susceptibilidade dos camundongos das linhagens resistentes e suscetíveis ao *P. brasiliensis*, sem que houvesse alteração no influxo de células inflamatórias no início da reação, demonstrando que o sistema mononuclear fagocítico está envolvido nos mecanismos de resistência a infecção. Parise-Fortes et al. ⁹¹, também pesquisaram a importância dos macrófagos na infecção paracoccidiodomicótica e relacionaram a ativação precoce destas células ao controle da disseminação do fungo.

A principal diferença entre as linhagens AIRmax e AIRmin está relacionada a concentração de células polimorfonucleares no foco

inflamatório. Entretanto, não podemos descartar outros mecanismos pró-inflamatórios contribuindo na contenção do processo infeccioso.

Está muito bem descrito na literatura, que os macrófagos derivados de monócitos desempenham importante papel na defesa do hospedeiro. Estas células estão implicadas nos mecanismos de resistência inata contra o fungo pela sua capacidade microbicida direta ou pela síntese de citocinas e intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio.

No presente trabalho a atividade macrofágica das linhagens AIR, foi analisada através da dosagem de intermediários reativos do nitrogênio, que apresentaram grande importância no controle da multiplicação de patógenos intracelulares durante os estágios iniciais de infecções⁹².

Macrófagos da linhagem AIRmin produziram mais NO que os AIRmax em períodos precoces da infecção, 6 a 24 horas no baço e 12 horas no peritônio. Após 24 horas de infecção a linhagem AIRmax sintetizou mais NO que a linhagem AIRmin a partir de 24 horas no peritônio e a partir de 3 dias no baço. Esta diferença na produção deste metabólito pode ter ajudado a linhagem AIRmax na maior contenção do processo infeccioso observado nos órgãos analisados.

Vários estudos demonstraram correlação direta entre a produção de NO e a atividade microbicida dos macrófagos frente a inúmeros microrganismos intracelulares, como *L. major*⁹³ e *T. cruzi*⁹⁴. Essa atividade microbicida foi bloqueada quando os macrófagos foram tratados com inibidores específicos da síntese de NO⁹⁴. Da mesma forma, animais resistentes a esses patógenos liberaram altas concentrações deste metabólito e, quando tratados com inibidores da enzima NO sintase, tornaram-se suscetíveis a infecções⁹⁵.

A produção de citocinas pró-inflamatórias e de perfil Th1 e Th2 foram também analisadas nas linhagens AIR.

Nenhuma diferença foi observada em relação á produção de IFN- γ nas linhagens AIR quando comparada entre si. Durante a infecção observamos que após 24 horas a linhagem AIRmax produziu mais IFN- γ que a linhagem AIRmin no pulmão, e após o 3º dia no baço. Nestes períodos este aumento na produção de IFN- γ pela linhagem AIRmax correlacionou-se com a menor recuperação fúngica, enquanto a linhagem AIRmin apresentou menor produção desta citocina e aumento da recuperação do fungo. Estes dados sugerem o envolvimento do IFN- γ no controle da multiplicação do fungo nestas linhagens.

Cano e colaboradores ⁹⁶ demonstraram que independente do *background* genético dos animais, o IFN- γ exerce um papel protetor contra a infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis*, sendo considerado como principal mediador de resistência contra esta micose. Neste trabalho, os autores observaram que camundongos da linhagem B10.A, considerados suscetíveis a paracoccidiodomicose, apresentaram altos níveis de IFN- γ pulmonar na 4ª e 8ª semanas de infecção, sugerindo uma proteção local no controle do crescimento do fungo.

Estudos têm demonstrado que a depleção endógena de IFN- γ exacerba infecções por bactérias ⁹⁷, protozoários ⁹⁸ e fungos ⁹⁹. A proteção contra essas doenças correlaciona-se com a expressão da resposta imune mediada por células e *killing* do parasita por macrófagos ativados. Um dos mecanismos pelo qual o IFN- γ poderia mediar a resistência ao *P. brasiliensis* é pela ativação de macrófagos, por inibir a multiplicação dos fungos.

Moscardi-Bacchi et al.¹⁰⁰, utilizando monócitos e macrófagos de indivíduos normais, verificaram que estas células permitem o crescimento e a multiplicação intracelular do *P.brasiliensis*. Entretanto, quando as células são ativadas *in vitro* com IFN- γ , estas são capazes apenas de inibir o crescimento intracelular do fungo, sem no entanto exercerem atividade fungicida. De forma contrária, Brummer e colaboradores¹⁰¹ demonstraram que macrófagos peritoneais e pulmonares de camundongos ativados com citocinas, especialmente IFN- γ , não somente impediram a multiplicação como apresentaram atividade fungicida contra o fungo, demonstrando assim o papel essencial dessa citocina na resistência à paracoccidiodomicose.

Vários autores têm demonstrado o papel do IFN- γ nos mecanismos de resistência a agentes patogênicos. A ativação *in vitro* de macrófagos pulmonares de camundongos com IFN- γ inibiu o crescimento de *Coccidioides immitis*¹⁰² e *B. dermatides*¹⁰¹. Watanabe et al.¹⁰³, descreveram que a atividade fungicida de macrófagos é independente de intermediários reativos do oxigênio. Por outro lado, Kullberg et al.¹⁰⁴, atribuíram a esses metabólitos a inibição do crescimento deste fungo em macrófagos peritoneais e leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico ativados com esta citocina. Posteriormente demonstrou-se que o tratamento de macrófagos humanos com IFN- γ é necessário para a inibição da replicação do *Histoplasma capsulatum*.¹⁰⁵

Outras substâncias também são capazes de promover alterações na atividade dos macrófagos¹⁰⁶. O fator de necrose tumoral (TNF α e β) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) também promovem aumento da atividade microbicida dos macrófagos, embora tenham um espectro de ação mais reduzido¹⁰⁷. Muitos autores têm relatado que a associação de diferentes estimuladores, como o IFN- γ e o

TNF- α , pode ter um efeito sinérgico na atividade funcional macrofágica ¹⁰⁸. Perfect et al.¹⁰⁹, demonstraram que fatores do hospedeiro, como IFN- γ e produtos microbicidas, como endotoxinas, podem interagir sinergisticamente para iniciar a atividade citotóxica de macrófagos murinos.

A produção de TNF- α nas linhagens AIR só pode ser avaliada nos pulmões destes animais. A síntese desta citocina entre os animais controles não apresentou diferença significativa, entretanto durante todos os períodos, os animais AIRmax produziram mais TNF- α que os AIRmin, indicando também sua participação na contenção do processo infeccioso nesta linhagem.

O TNF- α é importante para o processo de ativação de macrófagos e para a aquisição de atividade fungicida por essas células, e os níveis desta citocina podem variar alterando a relação macrófago-fungo e conseqüentemente a evolução da doença. Nesse processo de ativação de macrófagos, estas células passam a secretar mais TNF- α em resposta à estimulação contínua provocada pelos componentes fúngicos ¹¹⁰, e também pela estimulação através do IFN- γ ¹¹⁶ e desse modo, o TNF- α atua para o acúmulo e diferenciação dos macrófagos em células epitelióides, e para persistência de granulomas bem formados e conseqüente inibição da replicação do fungo ¹¹¹. No entanto, o papel do TNF- α não se restringe apenas à ativação de macrófagos, que é considerado o mecanismo mais importante no processo de resistência contra fungos, impedindo afirmar que o fato de grandes concentrações dessa citocina signifique proteção contra a doença. Assim, o predomínio deste mecanismo protetor *in vivo* vai depender do balanço de todas as atividades exercidas pelo TNF- α ¹¹².

O TNF- α apresenta um importante papel na resposta imune do hospedeiro contra patógenos intracelulares. Vários autores demonstraram que TNF- α pode estimular atividades bactericidas e bacteriostáticas dos macrófagos. O TNF- α participa da resposta imune contra *Mycobacterium avium*^{113, 114}, *Mycobacterium tuberculosis*^{115, 116}, *Chlamydia trachomatis*¹¹⁷, *Listeria monocytogenes*^{118, 119}, *Candida albicans*¹²⁰ e *Legionella pneumophila*¹²¹.

Na paracoccidioidomicose, o papel do IFN- γ e do TNF- α , como citocinas reguladoras da função macrofágica, foi observado na infecção de camundongos C57Bl/6. Neste modelo ocorre elevação progressiva da expressão de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade em macrófagos peritoneais, até o 3º dia de infecção, associada à produção de altos níveis de IFN- γ pelas células esplênicas. O TNF- α foi detectado a partir do 30º dia, mantendo-se em níveis elevados durante o período da infecção e apresentando papel antagonista sobre expressão de moléculas de classe II induzido pelo IFN- γ , sugerindo um papel modulador sobre a ativação de macrófagos. A produção de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio por macrófagos peritoneais esteve diretamente relacionada com elevação dos níveis de TNF- α e IFN- γ , podendo assim, participar de mecanismos líticos ou fungicidas. Esses parâmetros poderiam estar interligados, refletindo o estado de ativação dos macrófagos e contribuindo para o controle da doença¹²².

Em outro estudo que relata a importância do TNF- α na resistência ao *P. brasiliensis*, os autores utilizaram como modelo experimental, camundongos nocauteados para o IFN- γ e o receptor p55 para TNF- α . Os animais sem IFN- γ infectados com cepa virulenta do fungo apresentaram

100% de mortalidade aos 16 dias de infecção com disseminação generalizada de células leveduriformes para o fígado, baço e pulmões. Esses dados sugerem que camundongos sem o gene funcional para o IFN- γ foram incapazes de conter e controlar a infecção apesar da intensa reação inflamatória e formação de granulomas incipientes associados a um grande número de leveduras. Além disso, os dados desses autores mostram que o TNF- α atuando através do receptor p55 é também importante para conter a disseminação e o crescimento do parasita e contribuir com a resposta inflamatória. A infecção nos camundongos nocauteados para o receptor p55 do TNF- α resultou também na disseminação fúngica e ausência de formação de granulomas ¹²³. Esses resultados estão de acordo também com os estudos que mostram que as atividades do TNF- α através do receptor p55 são importantes para formação do granuloma em resposta a bactérias e protozoários ^{124, 125}.

Os macrófagos além de serem as principais células produtoras de TNF- α também sintetizam IL-1, ambas mediadoras de respostas inflamatórias locais e sistêmicas ^{126, 127}.

A produção de IL-1 foi analisada no pulmão e baço das linhagens AIR. No pulmão não observamos diferença interlinhagens entre os animais controles. No baço os AIRmax controles apresentaram maior produção que as AIRmin controles. Entre os animais infectados, observamos maior produção da linhagem AIRmax em relação aos AIRmin a partir de 24 horas de infecção, principalmente no 3º e 14º dias, nos dois órgãos analisados. Estes resultados em conjunto com os obtidos com a análise da produção de IFN- γ e TNF- α também indicam o envolvimento desta citocina na contenção do processo infeccioso.

Macrófagos ativados por IFN- γ são importantes na destruição de células leveduriformes e conídios de *P. brasiliensis*¹⁰⁰. Em hamsters infectados com a cepa 18, foi detectado que em períodos precoces de infecção, macrófagos apresentaram maior expraimento do que os observados em animais na ausência de infecção. Esta habilidade foi associada com o aumento da produção de TNF- α e aumento da atividade fungicida.

A concentração de TNF- α manteve-se elevada durante o experimento, enquanto a IL-1 foi produzida em pequenas concentrações. Estes dados sugerem que durante os estágios iniciais da infecção, macrófagos ativados por TNF- α limitam a disseminação fúngica. Em adição, Kurita et al.⁶³, observaram que durante este período, neutrófilos ativados por IFN- γ , GMCSF e IL-1 apresentam um importante papel na defesa do hospedeiro devido ao aumento da atividade fungicida.

A interleucina-12 (IL-12) também é produzida por macrófagos em resposta a muitos microrganismos. A IL-12 secretada estimula as células NK e as células T a produzirem IFN- γ , que então ativa os macrófagos a eliminar microrganismos fagocitados. A produção de IL-12 foi analisada nas linhagens AIR, apresentando a linhagem AIRmax muito mais citocina no pulmão que a linhagem AIRmin. No baço este perfil foi observado nos períodos de 12, 24 horas, 3 dias e 14 dias. Estes dados indicam que a IL-12 também pode estar colaborando no controle da infecção.

Arruda e colaboradores (2002)⁴⁶ analisaram o papel protetor da IL-12 em camundongos contra a disseminação da infecção por *P. brasiliensis*. O efeito imunoterapêutico da administração de IL-12 exógena acarretou na menor disseminação da doença, confirmada pelo decréscimo da carga fúngica no fígado e baço. A administração da IL-12 não afetou o

crescimento do fungo no pulmão, mas induziu um aumento da inflamação devido ao grande influxo de células mononucleares. O tratamento com IL-12 em períodos precoces de infecção aumentou a produção de IFN- γ no pulmão.

A produção de IL-4, citocina de perfil Th2, também foi analisada nas linhagens AIR. No pulmão, apesar dos AIRmax controles apresentarem mais IL-4 que os AIRmin controles, durante a infecção observamos que os AIRmin produziram mais IL-4 que os AIRmax no 7º e 14º dias. No baço ambas linhagens apresentaram inibição da produção da citocina em relação a seus respectivos controles. No 3º dia de infecção um pico na produção de IL-4 nos AIRmin foi detectado, sendo muito superior aos AIRmax, e após este período, um decréscimo na produção foi novamente observado com os AIRmin produzindo mais IL-4 que os AIRmax apenas no 14º dia.

Em trabalho realizado por Pina e colaboradores (2004) ¹²⁸, foi demonstrado que a deficiência de IL-4 determinada geneticamente pode exercer um papel protetor na paracoccidiodomicose pulmonar. Para avaliar esse papel protetor da IL-4, os autores utilizaram camundongos deficientes de IL-4 (IL-4^{-/-}) e C57BL/6. Os macrófagos alveolares de camundongos IL-4^{-/-} foram mais eficientes *in vitro* no controle do crescimento fúngico que os macrófagos de animais C57BL/6 e apresentaram maior quantidade de óxido nítrico (NO). Comparado com os animais C57BL/6, os IL-4^{-/-} apresentaram aumento nos níveis de IFN- γ e aumento do influxo de polimorfonucleares nos pulmões. Adicionalmente, a deficiência de IL-4 resultou em significativa redução nos níveis de IL-12, GM-CSF, IL-3, MCP-1 e anticorpos específicos nos pulmões.

Em nossos experimentos, a menor produção de IL-4 pelos AIRmin pode ter colaborado também na contenção da infecção observada por esta linhagem no pulmão.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina que participa tanto na imunidade inata como na adquirida. É sintetizada pelos fagócitos mononucleares, pelas células endoteliais vasculares, fibroblastos e por outras células em resposta a microrganismos e a outras citocinas, notadamente a IL-1 e o TNF. A IL-6 na imunidade inata estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos e desse modo contribui para os efeitos sistêmicos da inflamação ¹²⁹.

A produção de IL-6 foi analisada no pulmão das linhagens AIR. Os animais controles AIRmax apresentaram maior produção de IL-6 que os AIRmin controles e durante toda infecção o mesmo perfil foi observado com aumento significativo a partir de 24 horas.

Gonzales e colaboradores (2003) ¹³⁰, demonstraram que durante estágios iniciais da infecção por conídios de *P. brasiliensis* inoculados por via intranasal em camundongos BALB/c, estes responderam com grande recrutamento de leucócitos no pulmão e significativa elevação nos níveis das citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1. As maiores concentrações destas citocinas foram encontradas no lavado broncoalveolar (BAL) e nos homogenatos de pulmão, mas não no soro, indicando que estas moléculas predominam em compartimentos pulmonares.

Em nosso experimento a linhagem AIRmax apresentou maior produção de IL-6 que a linhagem AIRmin no pulmão indicando sua participação em conjunto com TNF- α e IL-1 na contenção do processo infeccioso.

A interleucina-8 (IL-8) é um dos componentes da família das quimiocinas. È produzida por macrófagos, fibroblastos, plaquetas e linfócitos T. Está envolvida na inflamação e na migração celular, principalmente de monócitos e células T, induzindo também a quimiotaxia de neutrófilos e células T ¹²⁹. A regulação de IL-8 é exercida pelo IFN- γ ^{131, 132}.

A produção de IL-8 pelas linhagens AIRmax também podem estar contribuindo pela maior resistência desta linhagem em relação aos AIRmin após infecção por *P. brasiliensis*. Tanto no pulmão quanto no baço, observamos que os AIRmax produziram mais IL-8 que os AIRmin, mesmo que no final do período analisado tenha sido detectado inibição da produção em relação aos controles.

A influência da IL-8 na infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis*, foi estudada por Souto et al., que encontraram altos níveis de IFN- γ no pulmão de camundongos no 14^o dia de infecção. Esses autores detectaram ainda altos níveis de IL-8 no pulmão de camundongos *knockout* para o IFN- γ e relatam que o aumento daquela citocina não foi inibida devido a ausência de IFN- γ ¹³³.

Nossos dados estão de acordo com o encontrado por Souto et al., onde em nosso trabalho o IFN- γ pode estar regulando a produção de IL-8.

A produção de IL-10, citocina de perfil Th2, foi analisada nas linhagens AIRmax e AIRmin infectadas e seus respectivos controles. Estes apresentaram a linhagem AIRmax produzindo mais IL-10 que a AIRmin. Este aumento da linhagem AIRmax só foi observado após 6 e 12 horas de infecção. Após 24 horas os AIRmin produziram mais IL-10.

No baço, este perfil não foi observado. A linhagem AIRmin controle produziu mais citocina que a AIRmax controle. Entre as linhagens infectadas, este aumento dos AIRmin só foi observado em 12 horas, no período de 24 horas os AIRmax produziram mais IL-10. No decorrer da infecção, observamos inibição na produção de IL-10 em ambas linhagens.

Dentre as propriedades biológicas da IL-10 está a habilidade de bloquear a síntese de citocinas por células Th1, principalmente IFN- γ . Esta atividade supressora da IL-10 ocorre de forma indireta, uma vez que está principalmente relacionada com a sua capacidade de inibir a atividade das células apresentadoras de antígenos, através da diminuição na expressão de moléculas de classe II ligadas ao complexo principal de histocompatibilidade ¹³⁴. Outra forma indireta de supressão é através da inibição de citocinas liberadas por macrófagos ativados. Dentre as citocinas secretadas por essas células e que são inibidas pela IL-10 estão TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, IL-12 e a própria IL-10¹³⁵.

Os resultados aqui apresentados reproduzem o efeito biológico da IL-10 principalmente ao analisarmos os resultados obtidos no pulmão. Enquanto a produção de IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 estão aumentadas na linhagem AIRmax a produção de IL-10 está diminuída.

De acordo com Mosmann ¹³⁵, células esplênicas de camundongos infectados com *Nippostrongylus* ou *Schistosoma mansoni*, produziram grandes quantidades de IL-4 e IL-5 após estímulo com Con-A, mas com secreção extremamente baixa de IFN- γ . A adição de anticorpos anti IL-10 nestas culturas resultam na produção elevada de IFN- γ em resposta a Con-A ou antígenos do parasita, demonstrando que a resposta relacionada com Th1 foi de fato estimulada, mas que a IL-10 foi normalmente sintetizada nas culturas ativadas em níveis suficientemente elevados para inibir a

expressão deste perfil Th1. Obteve-se assim, resultados que reproduzem este efeito biológico da IL-10, principalmente na capacidade de suprimir a produção de IFN- γ .

Em conjunto os resultados obtidos na infecção das linhagens AIR indicam que estes animais apresentam comportamento distinto quanto à resistência ao *P. brasiliensis*. A linhagem AIRmax apresentou maior contenção do processo infeccioso que a linhagem AIRmin e demonstrou o importante envolvimento das citocinas analisadas nos mecanismos inflamatórios no início do processo infeccioso. Estas citocinas podem ser as responsáveis pelo recrutamento de leucócitos nos pulmões e outros órgãos durante os estágios iniciais da infecção, participando do controle da infecção e na organização da resposta imune do hospedeiro.

Os dados encontrados na infecção das linhagens AIR pelo *P. brasiliensis* possivelmente estão relacionados aos fatores geneticamente selecionados envolvidos com a resposta inflamatória aguda.

7. Conclusão

Neste trabalho, foram utilizados como modelo experimental camundongos geneticamente selecionados para a máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) reação inflamatória aguda e os resultados nos permite concluir que:

- 1) As linhagens apresentaram comportamento distinto quanto a resistência ao *Paracoccidioides brasiliensis*.
- 2) A linhagem AIRmax apresentou uma menor recuperação fúngica em todos os períodos e órgãos analisados, apresentando desta forma uma melhor contenção do processo infeccioso que a linhagem AIRmin.
- 3) A produção de intermediários reativos do nitrogênio (NO), aumentada na linhagem AIRmax pode ter ajudado na menor recuperação fúngica e na melhor contenção da infecção.
- 4) Valores decrescentes na taxa de recuperação fúngica coincidem com o aumento da produção de citocinas apresentada pela linhagem AIRmax, demonstrando que houve associação entre a menor recuperação e alta concentração de citocinas no início do processo infeccioso.
- 5) Citocinas de perfil Th2 como IL-4 e IL-10 apresentaram-se aumentadas no pulmão da linhagem AIRmin, o que pode ter colaborado com a maior sensibilidade desta linhagem frente a infecção.
- 6) A capacidade da resposta imune inata apresentada pelas linhagens AIR, demonstraram ser eficientes na contenção do processo infeccioso indicando a participação de genes de características quantitativas (QTL), relacionados aos fatores geneticamente selecionados envolvidos com a resposta inflamatória aguda.

8) Referências Bibliográficas:

1. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. J Med Vet Mycol. 1985; 23: 323-34.
2. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Bras Méd. 1908; 22: 141-4.
3. Splendore A. Un'affezione micotica com localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da fungí appartenenti alla tribu degli exoascei (*Zymonema brasiliense* n. sp.). In: Bertero G. Volume in onore del Prof. Celli nel 25^o anno di insegnamento. Roma: editora. 1912. p.421-58.
4. Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos do Brasil. Novo gênero para o parasita brasileiro. Ann Fac Med São Paulo. 1930; 5: 125-41.
5. Lacaz CS. SOUTH American Blastomycosis. An Fac Univ Med São Paulo. 1956; 29: 7-120.

Referências Bibliográficas elaboradas de acordo com o International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts to biomedical journal. Ann Inter Med; 126: 36-47.

6. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso My, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Bailiere's Clin Trop Med Commun Dis.* 1989; 4: 185-220.
7. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Mopreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis.* Boca Raton: CRC Press; 1994. 233-58.
8. Stover EP, Char G, Clemons KV, Stevens DA, Feldman D. Estradiol-binding proteins from micelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* 1986; 51:199-203.
9. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Delnegro G, editors. *Paracoccidioidomycosis.* Florida: CRC Press, Boca Raton, 1994. p.109-20.
10. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its forms. *Rev Soc Med Trop.* 1987; 20: 129-32.
11. Martinez R, Ferreira MS, Mendes RP, Telles Filho. Blastomicose sul-americana (Paracoccidioidomicose). In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de infectologia.* São Paulo: Atheneu; 1996. p.1801-3.

12. Castro RM, Del Negro G. Particularidades clínicas da paracoccidioidomicose na criança. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo. 1976; 31: 194-8.
13. Mendes RP. Quadro clínico. In: Veronesi R, Foccacia R. Tratado de infectologia. Rio de Janeiro: Atheneu; 1997. p.1803.
14. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium – to – yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Infect Immun. 1984; 46: 436-53.
15. Lacerda GB, Arce-Gomes B, Queiros-Telles F. Increased frequency of HLA-B 40 in patients with paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. 1988; 26: 253-6.
16. Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: Tosta CE. Imunologia das Infecções. Uberaba: PUNEP; 1992. 15-36.
17. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Top Med Mycol. 1993; 5: 115-49.

18. Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Cienc Cult*. 1994; 46: 455-61.

19. Mussati CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press 1994; 175-86.

20. Peraçoli MTS, Parise-Fortes M, Pereira da Silva MF, Montenegro MR. Natural Killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 1995; 37: 129-36.

21. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986; 136: 2348-57.

22. Swain SL, McKenzie DT, Weinberg AD, Hancock W. Characterization of T helper 1 and 2 cell subsets in normal mice. Helper T cells responsible for IL-4 and IL-5 production are present as precursors that require priming before they developed into lymphokine-secreting cells. *J Immunol*. 1988; 141: 3445-55.

23. Kelso A, Gouch NM. Coexpression of granulocytes-macrophages colony stimulating factor, gamma interferon and IL-3 and IL-4 is random in murine alloreactive T-lymphocyte clone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 9189-93.

24. Bartlett WC, Michael A, Mccann J, Yuan D, Classen E, Noelle RJ. Cognate interactions between helper T cells and B cells. II dissection of cognate help by using a class II-restricted antigen-specific, IL-2 dependent helper T cell clone. *J Immunol*. 1989; 143: 1745-54.

25. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse help T cell. Th2 cells secreted a factor that inhibits cytokines production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989; 170: 2981-9.

26. Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW. Differential selection of Th1 and Th2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IFN- γ . *J Immunol*. 1989; 143: 15-22.

27. Street NE, Schumacher JH, Fong TA, Bass H, Fiorentino DF, Leverah JA, et al. Heterogeneity of mouse helper T cell. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J Immunol*. 1990; 144: 1629-39.

28. Swain SL, Weinberg AD. CD4⁺ cells subsets lymphokine secretion of memory cells and effector cells that develop from precursors *in vitro*. J Immunol. 1990; 144: 1788-90.
29. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. Clin Microbiol Rev. 1996; 9: 532-62.
30. Musatti CC, Rezkallah MT, Mendes E, Mendes NF. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. Cell immunol. 1976; 24: 365-78.
31. Mok PWY, Greer DL. Cell-mediated immune response in patients with paracoccidioidomycosis. Clin Exp Immunol. 1977; 28: 89-98.
32. Restrepo A, Restrepo M, Restrepo F, Aristizabal LH, Moncada LH, Vélez H. Immune response in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. Sabouradia. 1978; 16: 151-63.
33. Peraçoli MTS, Soares AMVC, Mendes RP, Marques AS, Guastale HA, Meira DA, et al. Cell-mediated immunity in patients with the chronic form of paracoccidioidomycosis. Early and late evaluation after treatment. Rev Iber Micol. 1988; 5: 69.

34. Chequer-Castro B. Policlonal B-cell activation in paracoccidioidomycosis. *Mycopatologia*. 1989; 108: 89-93.

35. Benard Durandy A, Assis CM, Hong MA, Orii NM, Sato MN, et al. Responses of T and B lymphocytes to a *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall extract in healthy sensitized and nonsensitized subjects. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53: 89-94.

36. Mota NGS, Rezkallah_iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop med Hyg*. 1995; 79:765-72.

37. Benard G, Hong MA, Del-negro GMB, Batista I, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *AM J Trop Méd Hyg*. 1996; 54: 7-12.

38. Benard G, Mendes-Giannini MJ, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis*. 1997; 175: 1263-7.

39. Castañeda E, Brummer E, Pappagianis D, Stevens DA. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. *Infect Immun.* 1988; 56:1171-7.
40. Fazioli RA, Singer-Vermes LM, Kashino, SS, Burger E, De Franco MF, Moscardi-Bacchi M, et al. Delayed-type hypersensitivity response in a isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1994; 126:137-46.
41. Baida H, Siselli PJ, Juvenale M, Del Negro GM, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, et al. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 1999; 1: 273-8.
42. Mamoni RL, Nouér AS, Oliveira SJ, Mussatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgA₄, IgE, IgA and TNF- β in sera from patients with juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2002; 40:153-9.
43. Almeida SR, Moraes JZ, Camargo ZP, Mariano M, Lopes JD, Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol.* 1998; 190: 68-76.

44. Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31: 615-23.
45. Kashino SS, Fazioli RA, Caffali-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th₁ immune response, whereas susceptibility is associated with absence of INF-gamma production. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20: 89-97.
46. Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FR, Fazioli RA, Vaz CA, et al. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol.* 2002; 103: 185-95.
47. Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine.* 2002; 18: 149-57.
48. Romano CC, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS, Benard G. The role of interleukin-10 in the differential expression of the interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin Immunol.* 2005; 114: 86-94.

49. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PMO, Blota MHSL. Cytokine and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002; 4: 139-44.

50. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, INF- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001; 13: 248-52.

51. Mello LM, Silva-Vergara ML, Junior VR. Patients with active infection with *Paracoccidioides brasiliensis* present a Th₂ immune response characterized by high interleukin-4 and interleukin-5 production. *Hum Immunol.* 2002; 63: 149-54.

52. Brummer E, Hanson LH, Stevens DA. Gamma interferon activation of macrophage for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int J Immunopharmacol.* 1988; 10: 945-52.

53. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages. Killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun.* 1989; 57: 2289-94.

54. Cano LE, Arango R, Salazar, ME, Brummer E, Stevens D, Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30: 161-6.
55. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1811-20.
56. Gonzáles A, Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *P. brasiliensis* conidia. *Infect Immun.* 2000; 68: 2546-52.
57. Soares AMVC, Silva WB, Rodrigues DR, Calvi SA, Dias LA, Peraçoli MTS, et al. IL-10 but not TGF- β inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human activated monocytes. *Ann Rev Biom. Sci.* 2002; 89.
58. McEwen JG, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36: 603-8.

59. McEwen JG, Sugar A, Brummer E, Restrepo A, Stevens DA. Toxic effect of products of oxidative metabolism on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Microbiol. 1984; 118: 423-28.
60. Meloni-Bruneri LH, Campa A, Abdalla DS, Calich VL, Lenzi HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistance mice. J Leukoc Biol. 1996; 59: 526-33.
61. Kurita N, Biswas SK, Oarada M, Sano A, Nishmura K, Miyaji M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 1999; 37: 19-24.
62. Kurita N, Oasada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 1999; 37: 261-67.
63. Kurita M, Oarada M, Miyagi M, Ito E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2000; 38: 177-82.

64. Coelho KIR, De Faveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS. Experimental Paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p.87-107.
65. Moscardi M, Franco MF. Paracoccidioidomicose experimental do camundongo. I - Aspectos imunopatológicos da infecção intraperitoneal. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1980; 22: 286-93.
66. De Faveri J, Rezkallah-Iwasso MT, Franco MF. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. Mycopathologia. 1982; 77: 3-11.
67. Peraçoli MTS, Mota NGS, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. Mycopathologia. 1982; 79:7-17.
68. Brummer E, Restrepo A, Stevens DA, Azzi R, Gomez AM, Hoyos GL, et al. Murine model of paracoccidioidomycosis. Production of fatal acute pulmonary or chronic pulmonary and disseminated disease: immunological and pathological observations. J Exp Pathol. 1984; 1: 241-55.

69. Moscardi-Bacchi M, Franco M. Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse. III. Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1985; 18: 101-8.
70. Carvalhaes MS, Da Silva WD, Birman EG, Sant'anna OA, Abrahamsohn P, Kipnis TL. Experimental paracoccidioidomycosis in high and low antibody producer mice. I. Evolution of the disease, its correlation with the humoral immune response and the patterns of tissue lesions. *Ann Inst Pasteur Immunol* 1986; 137: 127-41.
71. Ferreira CSA. Características imunopatológicas da paracoccidioidomicose experimental murina induzida por via intravenosa.[dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1993.
72. Teixeira HC. Ativação de macrófagos peritoneais e de linfócitos B esplênicos em camundongos resistentes e susceptíveis durante a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*. [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1991.
73. Cafalli-Favatti C. Expressão de moléculas de classe II do CPH, produção de H₂O₂ e caracterização isotópica de anticorpos em camundongos suscetíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*. [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1993.

74. Tsunawaki S, Sporn A, Ding A, Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature*. 1988; 334: 260-2.
75. Cao LE, Wolf RG, Meltzer M, Crawford RD. Differential regulation of class II MHC determinants on macrophages by interferon-gamma and IL-4. *J Immunol* 1989; 143: 3524-31.
76. McIntyre TM, Klinman DR, Rothman P, Lugo M, Dasch JR, Mond JJ, et al. Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *J Exp Méd*. 1993; 177: 1031-7.
77. Falconer DS. *Introducción a la genética cuantitativa*, México: Editorial Continental; 1970.
78. Biozzi G, Mouton D, Sant'anna OA, Passos HC, Gennari M, Reis MH, et al. Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1979; 85: 31-98.
79. Stiffel C, Ibañez OM, Ribeiro OG, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, et al. Genetics of acute inflammation: inflammatory reactions inbred lines of mice and in their interline crosses. *Expl Clin Immunogenet*. 1990; 7: 221-33.

80. Fauve RM, Jusforgues H, Hevin B. Maintenance of granuloma macrophages in serum-free medium. *J Immunol Methods*. 1983; 64: 345-51.
81. Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo LM, Maria DA, De Franco M, et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis*. 1998; 19: 337-46.
82. Ribeiro OG. Controle genético da inflamação. [dissertação]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1994.
83. Vasquez-Bravo YLA. Aspectos da resposta inflamatória aguda em linhagens de camundongos com reatividade máxima e mínima obtidas por seleção genética bidirecional. [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1996.
84. Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WHK, Vorraro F, Siqueira M, et al. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxin*. 2002; 40: 1571-79.

85. Araújo LMM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S, et al. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 2913-20.
86. Casals JB. Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. *J Clin Pathol.* 1979; 32: 719-22.
87. Singer-Vermes LM, Ciavaglia MC, Kashino SS, Burguer E, Calich VLG. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1992; 30: 261 -4.
88. Godfrey KAM. Statistic in practice. Comparing the means of several groups. *N Engl J Med* 1985; 313: 450-6.
89. Ibañez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, De Franco M, et al. Genetics of nonspecific immunity:I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur J Immunol.* 1992; 22: 2555-63.

90. Kashino SS, Fazioli RA, Moscardi-Bacchi M, Franco M, Singer-Vermes LM, Burger E, et al. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*. 1995; 130: 131-40.

91. Parise-Fortes MR, Silva MFP, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, Soares AMVC, et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol*. 2000; 38: 51-60.

92. De Groote MA, Fang FC. NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin Infect Dis* 1995; 21:5162-5.

93. Buchmuller-Rouiller Y, Mariel J. Correlation between enhanced oxidative metabolism and leishmanicidal activity in activated macrophages from healer and nonhealer mouse strains. *J Immunol*. 1986; 136: 3884-90.

94. Vespa GNR, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi* induced parasitemia and directly kills parasite *in vitro*. *Infect Immun*. 1994; 62: 5177-82.

95. Stenger S, Thuringh H, Rollinghoff M, Bogdan C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med*. 1994; 180: 783-93.
96. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 1998; 66: 800-06.
97. Nakane A, Nishikawa S, Sasaki S, Miura T, Asano M, Kohanawa M, et al. Endogenous interleukin-4, but not interleukin-10, is involved in suppression of host resistance against *Listeria monocytogenes* infection in interferon-depleted mice. 1996; 64:1252-58.
98. Suzuki Y, Remington JS. The effect of anti-IFN- γ antibody on the protective effect of Lyt-2⁺ immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J Immunol*. 1990; 144: 1954-6.
99. Aguirre K, Havell EA, Gibson GW, Johnson LL. Role of tumor necrosis factor and gamma interferon in acquired resistance to *Cryptococcus neoformans* in the central nervous system of mice. *Infect Immun*. 1995; 63: 1725-31.

100. Moscardi-Bacchi M, Brummer E, Stevens DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: Inhibition by activated phagocytes. J Med Microbiol. 1994; 40: 159-64.
101. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhanced killing of *P. brasiliensis* or *B. dermatitides*. J Immunol. 1988; 140: 2786-7.
102. Beaman L. Effects of recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor on *in vivo* interactions of human mononuclear phagocytes with *Coccidioides immitis*. Infect Immun. 1991; 59: 4227 - 9
103. Watanabe K, Kagaya K, Yamada T, Fakazawa Y. Mechanism for candidacidal activity in macrophages activated by recombinant γ -interferon. Infect Immun. 1991; 59: 521-8.
104. Kullberg BJ, Van T, Wont HW, Hoogstraten C, Van Furth R. Recombinant interferon-gamma enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. J Infect Dis. 1993; 168: 436-43.

105. Brummer E, Kurita N, Yoshida S, Nishimura K, Miyaji M. Fungistatic activity of human neutrophils against *Histoplasma capsulatum*: correlation with phagocytosis. J Infect Dis. 1991; 164: 158-62.
106. Fauve RM. Inflammation-induced remote superactivity of macrophages. Ann Inst Pasteur Immun. 1986; 137: 226-9.
107. Reed SG, Nathan CF, Pihl DL, Rodricks P, Shanebeck K, Condon PJ, et al. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. J Exp Med. 1987; 166: 1734-6.
108. Whicher JT, Evans SW. Cytokines in disease. Clin Chem. 1990; 36: 1269-80.
109. Perfect JR, Granger DL, Durack DT. Effects of antifungal agents interferon on macrophages cytotoxicity for fungi and tumor cells. Infect Dis. 1987; 156: 316-26.
110. Figueiredo F, Alves LMC, Silva CL. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. Clin Exp Immunol. 1993; 93: 189-94.

111. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassali P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 1989; 56: 731-40.

112. Calvi S. Efeito de citocinas sobre o estado de ativação e atividade fungicida de monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 1997.

113. Bermudez LE, Stevens P, Kolonoski P, Wu M, Young LS. Treatment of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in mice with recombinant interleukin-2 and tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1989; 143: 2996-3002.

114. Bermudez LE, Young LS. Tumor necrosis factor alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, activates macrophages to kill *Mycobacterium avium* complex. *J Immunol*. 1988; 140: 3006-13.

115. Kaufman SHE. In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. *Rev Infect Dis*. 1989; 11: 5448-53.

116. Rook GAW, Attrah RA, Foley N. The role of cytokine in the immunopathology of tuberculosis, and the regulation of agalactosyl IgG. *Lymphokine* 1989; 8: 323-8.
117. Williams DM, Magee DM, Bonewald LF, Smith JG, Bleicker CA, Byrne GI, et al. Role *in vivo* for tumor necrosis factor alpha in host defense against *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* 1990; 58: 1572-6.
118. Desiderio JV, Kiener PA, Lin PF, Warr GA. Protection of mice against *Listeria monocytogenes* infection by recombinant tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 1989; 57: 1615-7.
119. Nakane A, Minagawa T, Kato K. Endogenous tumor necrosis factor (cachetin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immun.* 1988; 56: 2563-9.
120. Djeu JY, Blanchard DK, Halkias D, Friedman H. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorfonuclear neutrophils: activation by IFN- γ and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1986; 137: 2980-6.
121. Blanchard DK, Djeu JY, Klein TW, Friedman H, STeward WE. Protective effects of TNF in experimental *Legionella pneumophila* infections of mice activation of PMN function. *J Leukocyte Biol.* 1988; 43: 429-34.

122. Bocca AL. Aspectos funcionais de macrófagos na paracoccidiodomicose experimental. [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1993.
123. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1811-20.
124. Pfeffer K, Matsuyama T, Kündig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell.* 1993; 73: 457-67.
125. Deckert-Schluter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, Schluter D. Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol.* 1998; 160: 3427-36.
126. Dinarello CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol.* 1989; 44: 153-205.
127. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Ann Rev Med.* 1994; 45: 491-503.

128. Pina A, Valente-Ferreira RC, Molinari-Madlum EEW, Vaz CAC, Keller AC, Calich VLG. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidiodomycosis associated with impaired Th2 response. *Infect Immun*. 2004; 72: 2369-378.
129. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cytokines. In: *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia: Saunders; 2000: 11: 235-69.
130. Gonzalez A, Sahaza JH, Ortiz BL, Restrepo A, Cano LE. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidoides brasiliensis* infection. *Med Mycol*. 2003; 41, 391-99.
131. Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2001; 158: 1433-40.
132. Flesch IE, Barsig J, Kaufmann SH. Differential chemokine response of murine macrophages stimulated with cytokines and infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunol* 1998; 10: 757-65.

133. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CML, Ferreira BR, et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . Am J Pathol. 2003; 163: 583-90.
134. De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Verde A, Figdor C, et al. 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.
135. Mosmann TR. Properties and functions of interleukin-10. Adv Immunol. 1994; 56:1-26.