

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES  
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para ausência de capa, folha de rosto, ficha catalográfica e anexos, não incluídos pela autora no arquivo original.

<b>CAPÍTULO I</b> .....	02
<b>1. Revisão da Literatura</b> .....	02
<b>2. Referências Bibliográficas</b> .....	12
<b>CAPÍTULO II</b> .....	22
<b>Efeito da Interleucina-6 sobre a atividade fungicida e produção de citocinas por monócitos humanos, infectados <i>in vitro</i> com cepa virulenta de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>.</b>	
<b>Resumo</b> .....	23
<b>Abstract</b> .....	24
<b>1. Introdução</b> .....	25
<b>2. Delineamento experimental</b> .....	28
<b>3. Material e métodos</b> .....	28
<b>4. Resultados</b> .....	35
<b>5. Discussão</b> .....	40
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	47
<b>ANEXOS</b> .....	53

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO DA LITERATURA

A imunidade inata ou inespecífica apresenta grande importância no combate a fungos patogênicos. Dentre os vários mecanismos naturais de defesa, os monócitos e macrófagos desempenham papel central na resistência aos fungos, devido a sua participação na reação inflamatória e na atividade fungicida. Tais atividades são dependentes de mecanismos de ativação desses fagócitos, induzidos pelos fungos e, principalmente, por citocinas produzidas pelas células durante a interação com o parasita<sup>1-4</sup>. Distúrbios da atividade funcional dessas células podem ocasionar o desenvolvimento da doença ou a morte do microrganismo e, ainda, influenciar o padrão da resposta imune adaptativa. A interação entre o fungo e as células do hospedeiro pode determinar várias alterações metabólicas, responsáveis pelos sintomas clínicos, apresentados por pacientes com infecção fúngica.

Os monócitos/macrófagos são células do sistema mononuclear fagocitário, importantes na defesa do hospedeiro<sup>5</sup>. Essas células podem ser ativadas em consequência da interação com microrganismos e seus produtos, tais como endotoxinas e componentes da parede celular<sup>5-7</sup> e também por meio de citocinas, como interferon-gama (IFN- $\gamma$ )<sup>8</sup>, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>7,9-12</sup>. O macrófago, quando ativado após a exposição a esses estímulos, apresenta alterações metabólicas, como o aumento das atividades fagocítica, microbicida e citotóxica<sup>13,14</sup>, modificações bioquímicas<sup>15</sup>, maior capacidade de aderência e de espraiamento sobre superfícies de vidro<sup>14,16</sup>, expressão elevada de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade<sup>6</sup> e, maior produção de metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio<sup>17-20</sup>. Monócitos e macrófagos são células com grande capacidade para a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e fator transformador do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ). Todas essas citocinas apresentam atividade estimuladora ou supressora sobre os macrófagos, interagindo com os receptores específicos presentes nessas células e modulando a sua função<sup>21,22</sup>.

Citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8 e GM-CSF são importantes no processo de ativação do macrófago, enquanto que IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  são consideradas fatores de desativação dessa célula<sup>23,24</sup>. O desequilíbrio na produção tanto de citocinas supressoras como estimulatórias pode afetar a resposta inata ou ainda causar distúrbios na resposta imune específica, mediada por linfócitos T e B<sup>25</sup>.

Os macrófagos podem ser ativados durante o processo inflamatório, em resposta à infecção por microrganismos, tais como o *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies relacionadas, sintetizando e liberando várias citocinas, como a IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-8<sup>26-29</sup>. Como mediadores inflamatórios, essas citocinas podem ser importantes moduladores da resposta imune local e sistêmica.

A Interleucina-1 é uma citocina multifuncional no processo de ativação celular, sendo sua atividade biológica semelhante à do TNF- $\alpha$ , e em menor proporção à da IL-6. Indução de IL-6, fatores estimuladores de colônias e quimiocinas estão envolvidos em muitas das atividades *in vitro* e *in vivo* mediadas pela IL-1<sup>30</sup>.

Apesar de ser descrita como pirógeno endógeno, a IL-1 é considerada potente citocina inflamatória, capaz de induzir a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), podendo auxiliar na ativação de monócitos<sup>29</sup>. A produção de IL-1 não é constitutiva, mas transitoriamente induzida por grande variedade de células e por diversos estímulos, tais como vírus, bactérias, lipopolissacáride (LPS) e éster de forbol. Além disso, há uma rede de citocinas que atua nessa indução. Dessa forma, IL-1 induz produção de TNF e vice-versa. Ambas induzem IL-6, que suprime a produção de IL-1 induzida por TNF ou endotoxinas e também inibe a produção de TNF induzida por endotoxinas. Isso demonstra que essas citocinas são capazes de estimular sua própria produção e regulação<sup>30</sup>. Efeitos sistêmicos da IL-1, como febre e diminuição do apetite, são vistos como dependentes de uma possível atividade humoral dessa citocina sobre o organismo e ocorrem como resultado de toxemia, septicemia, lesões extensas ou injeção intravenosa de antígenos<sup>27</sup>.

As células sanguíneas, no caso os leucócitos, também sintetizam TNF- $\alpha$ , outra citocina com atividades de amplo espectro imunorregulatório, metabólico e inflamatório<sup>31</sup>. Essa citocina promove inflamação, possivelmente

através da indução de moléculas de adesão, fatores quimiotáticos para macrófagos e neutrófilos, proteínas de fase aguda e geração de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e IL-6. Apesar de ser derivado principalmente de monócitos e macrófagos, outros tipos celulares incluindo linfócitos e neutrófilos também secretam TNF- $\alpha$  em resposta a vários estímulos<sup>32,33</sup>.

Quando produzida em quantidades apropriadas, as citocinas pró-inflamatórias exercem um papel benéfico como mediadores da resistência do hospedeiro a agentes infecciosos. Entretanto, sua superprodução pode levar à toxicidade local e sistêmica incluindo febre, caquexia, síndrome séptica e morte<sup>34</sup>.

Essas moléculas imunomoduladoras parecem ser de grande importância na ativação de mecanismos bactericidas intracelulares. O TNF recombinante tem sido associado *in vivo* e *in vitro* com morte de células tumorais e parasitas<sup>35,36</sup>. Considerada a citocina produzida mais precocemente em resposta a vários estímulos, o TNF foi detectado no soro dentro de 2h após a injeção intravenosa de LPS em voluntários saudáveis<sup>37</sup>. Além disso, está associado aos efeitos deletérios do LPS, indicando sua capacidade de influenciar numerosas vias biológicas, que podem ser importantes na resistência a doenças infecciosas<sup>38</sup>.

O TNF- $\alpha$  é capaz de induzir aumento na atividade microbicida de monócitos/macrófagos e, devido a essa propriedade, tem sido amplamente estudado em micoses sistêmicas causadas por *Blastomyces dermatitidis*<sup>39</sup>, *Candida albicans*<sup>40,41</sup>, *Cryptococcus neoformans*<sup>42</sup>, *Histoplasma capsulatum*<sup>43</sup> e *Paracoccidioides brasiliensis*<sup>44</sup>.

Com relação às células humanas, Denis & Gregg<sup>45</sup> relataram que macrófagos cultivados na presença de 1000 U/mL de TNF- $\alpha$  apresentaram aumento na fagocitose de *M. avium*, reduzindo, dessa forma, o crescimento da bactéria, assim como anteriormente observado por Bermudez & Young<sup>1</sup>, que verificaram associação entre presença de TNF recombinante e aumento da morte intracelular de *M. avium* por macrófagos humanos.

Por outro lado, a superprodução sistêmica de TNF- $\alpha$  pode estar relacionada com efeitos sistêmicos e não-protetores ou até mesmo deletérios,

como indução da febre, anorexia, diarreia e estado de caquexia<sup>46</sup>, também descritos na coccidioidomicose<sup>47</sup> e na tuberculose<sup>48</sup>.

O TNF- $\alpha$  atua ainda como indutor fisiológico na síntese e secreção de interleucina-6 por diversas células em resposta a um estímulo, como LPS<sup>34,49,50</sup>. Entretanto, a IL-6 também pode ser induzida diretamente por produtos microbianos, por uma via independente de TNF<sup>51</sup> e participa de um mecanismo de controle negativo que regula a produção de TNF- $\alpha$ <sup>52</sup>.

A interleucina-6 é uma citocina produzida por uma grande variedade de células e demonstra inúmeras atividades, inclusive sua importância como mediador chave no controle do crescimento, diferenciação e função celular<sup>53</sup>. Tem sido demonstrado que essa citocina promove o crescimento de plasmocitomas e hibridomas<sup>54</sup>, a secreção de imunoglobulinas por células B<sup>55</sup>, a estimulação de colônias por células progenitoras hematopoiéticas<sup>56</sup>, o desenvolvimento de células T citotóxicas<sup>57</sup>, ativação da função de neutrófilos<sup>58</sup> e o crescimento e diferenciação de timócitos e linfócitos T<sup>53,59</sup>. As origens celulares dessa citocina são tão diversas quanto seus efeitos, e incluem células monocíticas<sup>55,60</sup>, fibroblastos<sup>61</sup>, células endoteliais<sup>62</sup>, células T e B<sup>63</sup>, linfócitos grandes e granulares (LGL)<sup>60,64</sup> e neutrófilos<sup>49</sup>. Todos esses dados demonstram que a IL-6 possui tanto propriedades anti-inflamatórias<sup>65</sup> como pró-inflamatórias<sup>66</sup>.

A IL-6 é a principal citocina indutora de resposta de fase aguda em infecções, mediando a síntese e liberação de proteína C reativa e de outras proteínas de fase aguda que exercem papel anti-inflamatório<sup>67</sup>. Dessa forma, entende-se que a função dessa citocina seja a de desencadear um processo capaz de neutralizar os efeitos do TNF e de outros mediadores da inflamação<sup>68</sup>.

A produção de IL-6, por macrófagos e monócitos, ocorre após liberação de IL-1 $\beta$ , e pode ser aumentada por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ <sup>69</sup> e controlada pela produção de TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10<sup>70</sup>. Na análise de citocinas produzidas por monócitos de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM), observou-se menor capacidade de síntese de TNF- $\alpha$  e IL-6 após estímulo dessas células com LPS, associada a níveis elevados de IL-10 e TGF- $\beta$ . Esses resultados sugerem que

IL-10 e TGF- $\beta$  possam desempenhar papel inibidor na síntese das citocinas inflamatórias durante doença ativa<sup>44</sup>.

Bermudez et al.<sup>71</sup>, estudando a produção de IL-6 por macrófagos infectados com *M. avium* e seus efeitos na capacidade de inibir o crescimento ou morte intracelular da bactéria, sugerem que a IL-6 pode influenciar a resposta imune do hospedeiro, impedindo a ativação dessas células por TNF recombinante. De fato, a incubação de macrófagos com IL-6 diminuiu significativamente a expressão de receptores e produção de TNF nos macrófagos, sendo antagonista à atividade micobacteriostática e micobactericida mediada por TNF<sup>52,68,71,72</sup>.

Resultados semelhantes foram obtidos por Denis & Gregg<sup>45</sup>, que observaram ser a incubação de macrófagos com IL-6 responsável pelo aumento significativo no crescimento de *M. avium* em macrófagos humanos, 4 a 7 dias após a infecção. O número de unidades formadoras de colônias, determinado em culturas de monócitos tratados com IL-6, foi maior que o obtido em culturas não tratadas. Segundo os autores, a IL-6, por si própria ou por um fator secretado por células tratadas com IL-6, promove a multiplicação extracelular de *M. avium*, sugerindo a sua utilização como fator de crescimento pelo parasita. Em outro estudo, Denis<sup>73</sup> também verificou maior crescimento de *L. monocytogenes* em culturas de macrófagos incubados com IL-6.

Outros trabalhos também têm demonstrado que a IL-6 exerce efeito modulador sobre a síntese de citocinas inflamatórias, uma vez que inibe a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  induzida por LPS em culturas de monócitos humanos, em culturas de células U937 e *in vivo*<sup>52,68</sup> ou em pacientes com câncer tratados com IL-6 recombinante<sup>65</sup>. Em modelo murino de choque séptico, Starnes et al.<sup>74</sup> observaram que a administração de anticorpo anti-IL-6 antes do desafio letal por *Escherichia coli* causava proteção contra morte e levava a um aumento na atividade biológica do TNF sérico, em comparação com animais controles. Os autores concluíram que a IL-6 é um mediador na infecção letal por *E. coli*, ou seja, faz parte de um *feedback* negativo, que bloqueia a produção de TNF- $\alpha$ .

Além disso, a IL-6 pode aumentar a replicação do HIV em linhagens de células monocíticas e tem um efeito sinérgico com TNF- $\alpha$  e com GM-CSF na expressão do HIV<sup>75</sup>. Breen et al.<sup>76</sup>, em culturas de monócitos de sangue

periférico de indivíduos infectados com HIV, detectaram altos níveis de IL-6 plasmática e de seu RNAm, sugerindo o envolvimento da IL-6 na patogênese da infecção por HIV, bem como nos diferentes estágios de infecção<sup>77</sup>.

A presença de citocinas com atividade potencialmente imunossupressora como TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-10, em fases iniciais da infecção por *M. avium*, pode ser a causa provável de resposta imune inadequada para induzir a morte do microrganismo<sup>78</sup>. Nesse mesmo sentido, foi observado um aumento nos níveis dessas citocinas em indivíduos infectados com HIV-1 em fase avançada da doença<sup>79,80</sup>, corroborando com outros trabalhos onde foi avaliada a atuação de citocinas como a IL-6 na síndrome induzida por enterotoxina estafilocócica B (SEB)<sup>72</sup> e a IL-10 na infecção de camundongos C57BL/6 desafiados com *Leishmania major*<sup>81</sup>. Juntas, essas citocinas supressoras regulam vários sinais da resposta inflamatória, inibindo-os ou atenuando-os frente à progressão da pleurisia<sup>82</sup>, assim como anteriormente visto em indivíduos co-infectados com HIV e *M. avium*<sup>83</sup>.

A IL-10 inibe ativação e produção de citocinas por células CD4<sup>+</sup> Th1<sup>84</sup>. Entretanto, essa habilidade é descrita como indireta, isto é, ocorre via inibição da função de monócitos/macrófagos através da diminuição na expressão de moléculas de classe II ligadas ao complexo de histocompatibilidade principal<sup>2,85-87</sup> e da síntese de citocinas. Dessa forma, a IL-10 inibe potencialmente a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  por monócitos/macrófagos ativado<sup>3,88</sup>.

Em adição aos efeitos indiretos sobre a síntese de citocinas por Th1, a IL-10 parece ser extremamente importante na diminuição da síntese de IFN- $\gamma$  por Th1, em culturas de células derivadas de animais infectados com parasitas como *Nippostrongylus brasiliensis* ou *Schistosoma mansoni*<sup>89,90</sup>.

O papel desativador da IL-10 sobre macrófagos ativado por IFN- $\gamma$  também tem sido detectado na atividade microbida contra *S. mansoni*<sup>91</sup>, *Trypanosoma cruzi*<sup>92</sup>, *C. albicans*<sup>93</sup> e *Toxoplasma gondii*<sup>94</sup>. De forma semelhante, vários autores detectaram níveis elevados de IL-10 em pulmão de animais com pneumonia causada por *Streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A neutralização dessa citocina levou a um aumento na produção local de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , resultando em maior atividade microbida

e redução da bacteremia, com conseqüente aumento da sobrevivência dos animais<sup>95</sup>.

O efeito dessa citocina sobre células mononucleares de sangue periférico de indivíduos sadios, estimuladas com *C. neoformans*, *C. albicans* e LPS, foi demonstrado pela atividade inibidora dessa citocina sobre a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1<sup>96</sup>. Em pacientes com paracoccidiodomicose, Romano et al.<sup>97</sup> verificaram o papel imunossupressor da IL-10 pela inibição dessa citocina por anticorpos anti-IL-10, deixando livre a via co-estimulatória mediada por CD28, que resultou em aumento na proliferação celular e nos níveis de IFN- $\gamma$ .

Resultados obtidos com neutralização de IL-10 evidenciaram restauração da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 no soro de pacientes infectados com *Neisseria meningitidis*<sup>98</sup>. Assim, a IL-10 pode exercer um importante papel funcional na regulação da resposta de macrófagos ao LPS em bacteremia e endotoxemia humana. Essas observações sugerem que a IL-10 desempenhe papel central na modulação da resposta inflamatória, representado por um importante *feedback* negativo na produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias<sup>99</sup>.

Em relação ao estudo de micoses sistêmicas, há relatos de que macrófagos ativados têm importante papel na resistência observada na coccidiodomicose, histoplasmose, blastomicose e paracoccidiodomicose<sup>100,101</sup>. Essas células realizam ingestão e inativação de microrganismos invasores e interagem com linfócitos T e B, promovendo produção de citocinas e reconhecimento e/ou processamento do antígeno<sup>100,102</sup>.

A produção de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, é observada em estudos *in vitro*, após estímulo de macrófagos e monócitos humanos com *Coccidioides immitis*<sup>47</sup>, *C. neoformans*<sup>103,104</sup>, *C. albicans*<sup>105</sup>, *Malassezia* spp<sup>106</sup> e *P. brasiliensis*<sup>107,108</sup>, demonstrando que essas células podem ser fontes importantes de citocinas inflamatórias.

Estudos experimentais e em pacientes com paracoccidiodomicose permitem sugerir que a resistência ao fungo parece ser dependente das atividades de células T e macrófagos, mediadas por IFN- $\gamma$  e outras citocinas, destacando-se o papel do TNF- $\alpha$ . O aumento dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  tem sido considerado como fator importante na defesa contra o *P. brasiliensis*<sup>109,110</sup>. Em modelos experimentais desta micose, o TNF- $\alpha$  tem sido considerado

citocina fundamental na defesa contra fungos patogênicos. Parise-Fortes et al.<sup>101</sup> verificaram que co-culturas de macrófagos peritoneais de hamsters desafiados com a cepa virulenta Pb18 de *P. brasiliensis* apresentavam, em estágios iniciais de infecção, altos níveis de TNF- $\alpha$ , limitando a disseminação do fungo, através da ativação macrofágica e, conseqüente, aumento da atividade fungicida.

Souto et al.<sup>111</sup> demonstraram que camundongos geneticamente deficientes do receptor de TNF- $\alpha$ , foram incapazes de controlar a infecção por *P. brasiliensis*, não desenvolvendo resposta granulomatosa ao agente agressor. Depleção de TNF- $\alpha$ , durante infecções murinas com *H. capsulatum* e *C. albicans* reduziu a eliminação dos fungos, levando à morte dos animais<sup>112,113</sup>.

Embora os mecanismos envolvidos na destruição do fungo por monócitos e macrófagos ativados não estejam ainda totalmente esclarecidos, a atividade fungicida de monócitos humanos contra o *P. brasiliensis* parece ser dependente da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por essas células após ativação com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ <sup>114</sup>. O efeito sinérgico entre essas duas citocinas é essencial para a resistência do hospedeiro contra infecções por microrganismos intracelulares<sup>115</sup> e para uma eficiente atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*<sup>108,116</sup>.

Experimentos utilizando células murinas têm demonstrado que macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  ou linfocinas não purificadas adquirem a capacidade de digerir o *P. brasiliensis*, podendo desempenhar funções efetoras importantes contra o fungo<sup>39</sup>. Cano et al.<sup>4</sup> verificaram que macrófagos cultivados em presença de linfocinas obtidas de células de baço de animais imunizados aumentaram a capacidade de destruir conídios do fungo. Através de estudos ultra-estruturais de leveduras de *P. brasiliensis* no interior de macrófagos ativados foi possível demonstrar que, após 4 horas de interação, ocorre a desintegração citoplasmática e o esvaziamento das células fúngicas restando apenas a parede celular<sup>117</sup>. Por outro lado, o tratamento prévio de monócitos humanos com IL-10 inibe atividade fungicida dessas células ativadas com TNF- $\alpha$ <sup>118</sup>. Moreira et al.<sup>119</sup>, empregando macrófagos peritoneais de camundongos ativados com IFN- $\gamma$ , detectaram a participação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de

óxido nítrico (NO) na atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* e demonstraram o papel inibitório da IL-10 sobre a atividade fungicida induzida tanto por IFN- $\gamma$  quanto por TNF- $\alpha$ . Portanto, a atividade fungicida da célula fagocitária parece depender do balanço entre citocinas estimuladoras e supressoras produzidas pela célula, durante a interação com fungo.

Na paracoccidioomicose, níveis endógenos elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  foram detectados em sobrenadantes de culturas de monócitos<sup>44</sup> e no plasma e lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes, confirmando o elevado estado de ativação dessas células durante a doença ativa<sup>108</sup>. Por outro lado, níveis elevados de TNF- $\alpha$  têm sido associados à patogênese de outras doenças infecciosas, como tuberculose<sup>48</sup>, meningite meningocócica<sup>120</sup> e tripanossomíase<sup>121</sup> levando a uma toxicidade sistêmica, representada por sinais clínicos como febre, anorexia, diarreia e perda de peso<sup>46</sup>.

Assim, a produção sistêmica exacerbada de citocinas, durante as infecções fúngicas, pode ser responsável pelos diversos sintomas e distúrbios metabólicos, séricos e hematológicos encontrados com frequência em pacientes com outras micoses sistêmicas e provavelmente na paracoccidioomicose.

Os resultados da literatura, referentes à interação fungo-célula fagocitária, têm sugerido que componentes da parede celular ou da cápsula de fungos patogênicos são importantes na modulação da resposta imune do hospedeiro, por sua capacidade de induzir a produção de citocinas, contribuindo tanto para a regressão como para a patogênese da doença. Alguns componentes da cápsula de *C. neoformans* como glicuronoxilomanana, galactoxilomanana e manoproteínas apresentam capacidade de promover a síntese de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10<sup>34,104,122-124</sup>. As manoproteínas são as melhores indutoras de IL-6 e TNF- $\alpha$ , quando comparadas às galactoxilomananas e glicuroxilomananas<sup>122,123,125</sup>. Assim, o emprego dos componentes de cápsula e da parede fúngica pode ser muito importante para elicitar a resposta inflamatória, formação de granulomas e distúrbios imunes, que podem interferir com a resposta específica e inespecífica do hospedeiro.

Outros componentes da parede fúngica podem estar envolvidos com a estimulação de macrófagos e indução da síntese de citocinas. Em *B.*

*dermatitidis*, a  $\alpha$ -glucana tem papel importante na exposição de proteínas antigênicas que estimulam a resposta imunitária, facilitando a destruição da levedura. A  $\alpha$ -glucana parece esconder a molécula WI-1, capaz de ligar-se a receptores CD14 e estimular a síntese de TNF- $\alpha$ <sup>126,127</sup>. Esta glucana também foi detectada na fração F2 da parede celular de *P. brasiliensis*, parecendo estar envolvida com a diminuição da interação fungo/fagócito, facilitando a adaptação fúngica ao hospedeiro e propiciando a evasão do *P. brasiliensis* dos mecanismos de defesa<sup>128</sup>.

O estudo do perfil de citocinas produzido durante a infecção *in vitro* de monócitos de indivíduos saudáveis, com cepas de alta ou baixa virulência de *P. brasiliensis*, demonstrou que cepas virulentas do fungo induzem precocemente e, em níveis elevados, tanto as citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , como IL-10, com atividade antiinflamatória, em comparação com cepa pouco virulenta. Esses resultados sugerem que cepas virulentas do fungo podem ser responsáveis por um desequilíbrio prolongado na produção de citocinas, durante a infecção do hospedeiro<sup>107</sup>.

Em conjunto, os trabalhos da literatura sugerem que, enquanto na paracoccidiodomicose os mecanismos ativadores das células fagocitárias, via liberação de citocinas produzidas por células CD4+ ou pela própria célula fagocitária estão parcialmente entendidos, não há relatos com relação ao papel de citocinas supressoras sobre a atividade das células fagocitárias. A interferência sobre a produção de citocinas ativadoras do macrófago, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , poderia representar um mecanismo através do qual o fungo promoveria a sua sobrevivência no interior das células.

A IL-6 poderia desempenhar um importante papel nesse processo, uma vez que há indicação de que essa citocina possa ter papel patogênico sobre o desenvolvimento de algumas infecções. Adicionalmente, na paracoccidiodomicose, níveis elevados de IL-6 são observados no soro<sup>129</sup> e em cultura de monócitos de pacientes com a doença ativa<sup>44</sup>. Entretanto, não há trabalhos analisando o papel dessa citocina na interação *P. brasiliensis*/células fagocitárias. Portanto, o estudo da produção de IL-6, por monócitos humanos infectados com *P. brasiliensis*, bem como a análise de seu efeito sobre a atividade fungicida e a produção de citocinas por essas células, poderiam contribuir para o melhor conhecimento desse processo.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- 1 - BERMUDEZ LE, YOUNG LS. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. J Immunol 1988; 140: 3006-13.
- 2 - DE WAAL MALEFYT R, HAANEN J, SPITS H, RONCAROLO MG, te VELDE 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.
- 3 - DE WAAL MALEFYT R, ABRAMS J, BENNETT B, FIGDOR CG, de VRIES JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1991; 174: 1209-20.
- 4 - CANO LE, ARANGO R, SALAZAR ME, BRUMMER E, STEVENS DA, RESTREPO A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. J Med Vet Mycol 1992; 30: 161-8.
- 5 - ADAMS DO; HAMILTON TA. Macrophages as destructive cells in host defense. In: GALLIN JI, GOLDSTEIN JM, SKYDERMAN RS, editors. Inflammation: basic principles and correlates. New York: Raven Press, 1997.
- 6 - MOONIS M, AHMAD I, BACHHAWAT BK. Macrophages in host defence - an overview. Indian J Biochem Biophys 1992; 29:115-22.
- 7 - FIGUEIREDO F, ALVES LM, SILVA CL. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. Clin Exp Immunol 1993; 93:189-94.
- 8 - NATHAN CF, MURRAY HW, WIEBE ME, RUBIN BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. J Exp Med 1983; 158: 670-89.
- 9 - HOFFMAN M, WEINBERG JB. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased Ia antigen expression by peritoneal macrophages. J Leukoc Biol 1987, 42: 704-7.
- 10 - REED SG, NATHAN CF, PIHL DL, RODRICKS P, SHANEBECK K, CONLON PJ et al. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon-gamma. J Exp Med 1987; 166: 1734-46.
- 11 - NAKANE A, MINAGAWA T, KATO K. Endogenous tumor necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. Infect Immun 1988; 56: 2563-9.
- 12 - WILLIAMS DM, MAGEE DM, BONEWALD LF, SMITH JG, BLEICKER CA, BYRNE GI et al. A role *in vivo* for tumor necrosis factor alpha in host defense against *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1990; 58:1572-6.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Annu Inter Med 1997; 126: 36-47.

- 13 - MACKENESS GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med* 1964; 120:105-10.
- 14 - RABINOVITCH M. Macrophages spreading *in vitro*. In: Mononuclear phagocytes, characteristics, physiology & function. Oxford: Van Furth, 1975.
- 15 - KARNOVSKY ML, LAZDINS JK. Biochemical criteria for activated macrophages. *J Immunol* 1978; 121: 809-13.
- 16 - MACKENESS GB, BLANDER RV. Cellular immunity. *Prog Allergy* 1967; 11:89-91.
- 17 - MURRAY HW, CARTELLI DM. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest* 1983; 72: 32-44.
- 18 - MARTIN JH, EDWARDS SW. Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. *J Immunol* 1993; 150: 3478-86
- 19 - MARTIN JH, EDWARDS SW. Interferon-gamma enhances monocyte cytotoxicity via enhanced reactive oxygen intermediate production. Absence of an effect on macrophage cytotoxicity is due to failure to enhance reactive nitrogen intermediate production. *J Immunol* 1994; 81: 592-7.
- 20 - ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. Cytokines In:----- Editors Cytokines. Cellular and Molecular Immunology 4ed, Philadelphia: Saunders Company, 2000: 235-69.
- 21 - HAMBLIN AS. Cytokines and cytokine receptors. Oxford: Oxford University Press; 1993, 90 p.
- 22 - VANKAYALAPATI R, WIZEL B, SAMTEN B, GRIFFITH DE, SHAMS H, GALLAND MR et al. Cytokine profiles in immunocompetent persons infected with *Mycobacterium avium* complex. *J Infect Dis* 2001; 183: 478-84.
- 23 - LOHMANN-MATTHES ML, STEINMULLER C, FRANKE-ULLMAM G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7: 1678-89.
- 24 - TSUNAWAKI S, SPORN M, DING A, NATHAN C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988; 334: 260-2.
- 25 - GORDON S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* 1998; 149: 685-8.
- 26 - BAGGIOLINI M, WALZ A, KUNKEL SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84: 1045-9.
- 27 - DINARELLO CA. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv Immunol* 1989; 44: 153-205.
- 28 - TRACEY KJ, CERAMI A. Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease. *Curr Opin Immunol* 1989; 1: 454-61.

- 29 - AKIRA S, HIRANO T, TAGA T, KISHIMOTO T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 1990; 4: 2860-7.
- 30 - MANTOVANI A. The Interleukin-1 system. In: THÈZE J., editors. *The cytokine Network and Immune Functions*. New York: Oxford University Press, 1999: 85-96.
- 31 - VILCEK J, LEE TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions *J Biol Chem* 1991; 266: 7313-6.
- 32 - CUTURI MC, MURPHY M, COSTA-GIOMI MP, WEINMANN R, PERUSSIA B, TRINCHIERI G. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165: 1581-94.
- 33 - BAZZONI F, CASSATELLA MA, LAUDANNA C, ROSSI F. Phagocytosis of opsonized yeast induces tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA accumulation and protein release by human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 223-8.
- 34 - LEVITZ SM, TABUNI A, KORNFELD H, REARDON CC, GOLENBOCK DT. Production of tumor necrosis factor alpha in human leukocytes stimulated by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1994; 62: 1975-81.
- 35 - MANNEL DN, MOORE RN, MERGENHAGEN SE. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect Immun* 1980; 30: 523-30.
- 36 - SILBERSTEIN DS, DAVID JR. Tumor necrosis factor enhances eosinophil toxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1055-9.
- 37 - MICHIE HR, MANOGUE KR, SPRIGGS DR, REVHAUG A, O'DWYER S, DINARELLO CA et al. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med* 1988; 318: 1481-6.
- 38 - DESIDERIO JV, KIENER PA, LIN PF, WARR GA. Protection of mice against *Listeria monocytogenes* infection by recombinant human tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 1989; 57: 1615-7.
- 39 - BRUMMER E, HANSON LH, RESTREPO A, STEVENS DA. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol* 1988; 140: 2786-9.
- 40 - KULLBERG BJ, VAN'T WONT JW, 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.
- 41 - REDMOND HP, SHOU J, GALLAGHER HJ, KELLY CJ, DALY JM. Macrophage-dependent candidacidal mechanisms in the murine system. Comparison of murine Kupffer cell and peritoneal macrophage candidacidal mechanisms. *J Immunol* 1993; 150: 3427-33.
- 42 - FLESCHE IE, SCHWAMBERGER G, KAUFMANN SH. Fungicidal activity of IFN-gamma-activated macrophages. Extracellular killing of *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 1989; 142: 3219-24.
- 43 - BULLOCK WE. Interactions between human phagocytic cells and *Histoplasma capsulatum*. *Arch Med Res* 1993; 24:219-23.

- 44 - PERAÇOLI MT, KUOKAWA CS, CALVI SA, MENDES RP, PEREIRA PC, MARQUES SA et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, 2003; 5: 413-8.
- 45 - DENIS M, GREGG EO. Recombinant tumour necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunology* 1990; 71: 139-41.
- 46 - TRACEY KJ, CERAMI A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994; 45: 491-503.
- 47 - DOOLEY DP, COX RA, HESTILOW KL, DOLAN MJ, MAGEE DM. Cytokine induction in human coccidioidomycosis. *Infect Immun* 1994; 62: 3980-3.
- 48 - ROOK GA, TAVERNE J, LEVETON C, STEELE J. The role of gamma-interferon, vitamin D<sub>3</sub> metabolites and tumor necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology* 1987; 62: 229-34.
- 49 - CICCONE NA, LINDERMAN A, CONTENT J, VANDENBUSSCHE P, LUBBERT M, GAUSS J et al. Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood* 1990; 75: 2049-52.
- 50 - VAN SNICK J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 253-78.
- 51 - HAVELL EA, SEHGAL PB. Tumor necrosis factor-independent IL-6 production during murine listeriosis. *J Immunol* 1991; 146: 756-61.
- 52 - SCHINDLER R, MANCILLA J, ENDRES S, GHORBANI R, CLARK SC, DINARELLO CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75: 40-7.
- 53 - KISHIMOTO T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989; 74: 1-10.
- 54 - VAN DAMME J, OPDENAKKER G, SIMPSON RJ, RUBIRA MR, CAYPHAS S, VINK A et al. Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmocytoma growth factor induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1987; 165: 914-9.
- 55 - TOSATO G, SEAMON KB, GOLDMAN ND, SEHGAL PB, MAY LT, WASHINGTON GC et al. Monocytes-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science* 1988; 239: 502-4.
- 56 - IKEBUCHI K, WONG GG, CLARK SC. Interleukin-6 enhancement of interleukin-3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9035-9.
- 57 - TAKAI Y, WONG GG, CLARK SC, BURAKOFF SJ, HERRMANN SH. B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1988; 140: 508-12.
- 58 - BORISH L, ROSENBAUM R, ALBURY L, CLARK S. Activation of neutrophils by recombinant interleukin-6. *Cell Immunol* 1989; 121: 280-9.

- 59 - LOTZ M, JIRIK F, KABOURIDIS P, TSOUKAS C, HIRANO T, KISHIMOTO T et al. B cell stimulating factor 2/interleukin-6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med* 1988; 167:1253-8.
- 60 - BLANCHARD DK, MICHELINI-NORRIS MB, PEARSON CA, FREITAG CS, DJEU JY. *Mycobacterium avium*-intracellulare induces interleukin-6 from human monocytes and large granular lymphocytes. *Blood* 1991; 77: 2218-24.
- 61 - KOHASE M, MAY LT, TAMM I, VILCEK J, SEHGAL PB. A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor and interleukin-1. *Mol Cell Biol* 1987; 7:273-80.
- 62 - SIRONI M, BREVIARIO F, PROSERPIO P, BIONDI A, VECCHI A, VAN DAMME J et al. IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 1989; 142: 549-53.
- 63 - HORII Y, MURAGUCHI A, SUEMATSU S, MATSUDA T, YOSHIZAKI K, HIRANO T et al. Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *J Immunol* 1988; 141:1529-35.
- 64 - AVANZI GC, CESSANO A, BRIZZI MF, CLARK SC, PEGORARO L, MATERA L. Biological and molecular evidence for the production of IL-6 by human natural killer cells in culture. *Life Sci* 1989; 45:2621-6.
- 65 - TILG H, TREHU E, ATKINS MB, DINARELLO CA, MIER JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 1994; 83: 113-8.
- 66 - LOISA P, RINNE T, LAINE S, HURME M, KAUKINEN S. Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003; 47: 319-25.
- 67 - GAULDIE J, RICHARDS C, HARNISH D, LANSDORP P, BAUMANN H. Interferon beta 2/B cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7251-5.
- 68 - ADERKA D, LE J, VILCEK J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 1989; 143: 3517-23.
- 69 - AKIRA S, TAGA T, KISHIMOTO T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993; 54, 1-78.
- 70 - MUSSO T, ESPINOZA-DELGADO I, PULKKI K, GUSELLA GL, LONGO DL, VARESIO L. Transforming growth factor-beta downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes. *Blood* 1990; 76: 2466-9.
- 71 - BERMUDEZ LE, WU M, PETROFSKY M, YOUNG LS. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infect Immun* 1992; 60: 4245-52.
- 72 - MATTHYS P, MITERA T, HEREMANS H, VAN DAMME J, BILLIAU A. Anti-gamma interferon and anti-interleukin-6 antibodies affect staphylococcal enterotoxin B

induced weight loss, hypoglycemia, and cytokine release in D-galactosamine-sensitized and unsensitized mice. *Infect Immun* 1995; 63: 1158-64.

73 - DENIS M. Growth of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages and its modulation by cytokines; activation of bactericidal activity by interleukin-4 and interleukin-6. *Can J Microbiol* 1991; 37: 253-7.

74 - STARNES HF Jr, PEARCE MK, TEWARI A, YIM JH, ZOU JC, ABRAMS JS. Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal *Escherichia coli* infection and lethal tumor necrosis factor-alpha challenge in mice. *J Immunol* 1990; 145: 4185-91.

75 - POLI G, BRESSLER P, KINTER A, DUH E, TIMMER WC, RABSON A et al. Interleukin-6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Exp Med* 1990; 172: 151-8.

76 - BREEN EC, REZAI AR, NAKAJIMA K, BEALL GN, MITSUYASU RT, HIRANO T et al. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J Immunol* 1990; 144: 480-4.

77 - HONDA M, KITAMURA K, MIZUTANI Y, OISHI M, ARAI M, OKURA T et al. Quantitative analysis of serum IL-6 and its correlation with increased levels of serum IL-2R in HIV-induced diseases. *J Immunol* 1990; 145: 4059-64.

78 - CHAMPSI J, YOUNG LS, BERMUDEZ LE. Production of TNF-alpha, IL-6 and TGF-beta, and expression of receptors for TNF-alpha and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection. *Immunology* 1995; 84: 549-54.

79 - ZAITSEVA M, LEE S, LAPHAM C, TAFFS R, KING L, ROMANTSEVA T et al. Interferon gamma and interleukin 6 modulate the susceptibility of macrophages to human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* 2000; 96: 3109-17.

80 - HAVLIR DV, TORRIANI FJ, SCHRIER RD, HUANG JY, LEDERMAN MM, CHERVENAK KA et al. Serum interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumor necrosis factor (TNF) alpha, soluble type II TNF receptor, and transforming growth factor beta levels in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals with *Mycobacterium avium* complex disease. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 298-303.

81 - VIANA da COSTA A, HUERRE M, DELACRE M, AURIAULT C, CORREIA COSTA JM, VERWAERDE C. IL-10 leads to a higher parasite persistence in a resistance mouse model of *Leishmania major* infection. *Parasitol Int* 2002; 51: 367-79.

82 - FRÖDE TS, SOUZA GE, CALIXTO JB. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine* 2002; 17: 149-56.

83 - DENIS M, GHADIRIAN E. Interaction between *Mycobacterium avium* and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in bronchoalveolar macrophages of normal and HIV-1-infected subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 487-95.

84 - FIORENTINO DF, BOND MW, MOSMANN TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-95.

- 85 - FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, VIEIRA P, MOSMANN TR, HOWARD M, MOORE KW et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3444-51.
- 86 - DING L, SHEVACH EM. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 1992; 148: 3133-9.
- 87 - HSU DH, MOORE KW, SPITS H. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2-induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int Immunol* 1992; 4: 563-9.
- 88 - FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, MOSMANN TR, HOWARD MH, O'GARRA A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991; 147: 3815-22.
- 89 - STREET NE, SCHUMACHER JH, FONG TA, BASS H, FIORENTINO DF, LEVERAH JA et al. Heterogeneity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 1990; 144: 1629-39.
- 90 - SHER A, FIORENTINO D, CASPAR P, PEARCE E, MOSMANN T. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. *J Immunol* 1991; 147: 2713-6.
- 91 - GAZZINELLI RT, OSWALD IP, JAMES SL, SHER A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 1792-6.
- 92 - GAZZINELLI RT, OSWALD IP, HIENY S, JAMES SL, SHER A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2501-6.
- 93 - CENCI E, ROMANI L, MENCACCI A, SPACCAPELO R, SCHIAFFELLA E, PUCETTI P et al. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1034-8.
- 94 - OSWALD IP, GAZZINELLI RT, SHER A, JAMES SL. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 1992; 148: 3578-82.
- 95 - MEHRAD B, STANDIFORD TJ. Role of cytokines in pulmonary antimicrobial host defense. *Immunol Res* 1999; 20: 15-27.
- 96 - LEVITZ SM, TABUNI A, NONG SH, GOLENBOCK DT. Effects of Interleukin-10 on human peripheral blood mononuclear cell responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1996; 64: 945-51.
- 97 - ROMANO CC, MENDES-GIANNINI MJ, DUARTE AJ, 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.
- 98 - BRANDTZAEG P, OSNES L, OVSTEBØ R, JOO GB, WESTVIK AB, KIERULF P. Net inflammatory capacity of human septic shock plasma evaluated by a monocyte-

based target cell assay: identification of interleukin-10 as a major functional deactivator of human monocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 51-60.

99 - MOORE KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, O'GARRA A. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.

100 - FROMTLING RA, SHADOMY HJ. An overview of macrophage-fungal interactions. *Mycopathologia* 1986; 93:77-93.

101 - PARISE-FORTES MR, DA SILVA MF, SUGIZAKI MF, DEFAVERI J, MONTENEGRO MR, SOARES AM et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol* 2000; 38: 51-60.

102 - VAN FURTH R. Human monocytes and cytokines. *Res Immunol* 1998; 149: 719-20.

103 - CROSS CE, BANCROFT GJ. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and beta-glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. *Infect Immun* 1995; 63: 2604-11.

104 - VECCHIARELLI A, RETINI C, PIETRELLA D, MONARI C, TASCINI C, BECCARI T et al. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta secretion from human monocytes. *Infect Immun* 1995; 63: 2919-23.

105 - JOUALT T, BERNIGAUD A, LEPAGE G, TRINEL PA, POULAIN D. The *Candida albicans* phospholipomannan induces *in vitro* production of tumor necrosis factor-alpha from human and murine macrophages. *Immunology* 1994; 83: 268-73.

106 - KESAVAN S, WALTERS CE, HOLLAND KT, INGHAM E. The effects of *Malassezia* on pro-inflammatory cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Med Mycol* 1998; 36: 97-106.

107 - KUROKAWA CS, PERAÇOLI MTS, ARAUJO JR JP, CALVI SA, SUGIZAKI MF, SOARES AMVC. Cytokine production from human monocytes infected *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 125-6.

108 - CALVI SA, PERAÇOLI MT, MENDES RP, MARCONDES-MACHADO J, FECCHIO D, MARQUES SA et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect* 2003; 5: 107-13.

109 - MENDES RP, SCHEINBERG MA, REZKALLAH-IWASSO MT, SCHEINBERG DA, MEIRA DA, MARCONDES-MACHADO J et al. Evaluation of tumor necrosis factor (TNF) in sera of patients with paracoccidioidomycosis (PBM). *Anais... Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*; 1991; Montreal, Canada, p.172.

110 - SILVA CL, FIGUEIREDO F. Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. *J Infect Dis* 1991; 164:1033-4.

111 - 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.

- 112 - WU-HSIEH BA, LEE GS, FRANCO M, HOFMAN FM. Early activation of splenic macrophages by tumor necrosis factor alpha is important in determining the outcome of experimental histoplasmosis in mice. *Infect Immun* 1992; 60: 4230-8.
- 113 - LOUIE A, BALTCH AL, SMITH RP, FRANKE MA, RITZ WJ, SINGH JK et al. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in murine model of systemic candidiasis. *Infect Immun* 1994; 62: 2761-72.
- 114 - CARMO JPM, PERAÇOLI MTS, CALVI SA, DIAS LA, TAVIAN EG, SOARES AMVC. Killing of high-virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes: the role of oxygen intermediates. *Ann Rev Biom Sci* 2002; special issue, p. 93.
- 115 - MARTÍN-OROZCO N, ISIBASI A, ORTIZ-NAVARRETE V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. *Immunology* 2001; 103: 41-8.
- 116 - SOARES AM, CALVI SA, PERAÇOLI MT, FERNANDEZ AC, DIAS LA, DOS ANJOS AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102: 480-5.
- 117 - 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.
- 118 - SOARES AM, SILVA WB, RODRIGUES DR, CALVI SA, DIAS LA, PERAÇOLI MT et al. IL-10 but not TGF-beta inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human activated monocytes. *Annual Rev Biomed Sci* 2002 (special issue) p. 89.
- 119 - MOREIRA AP, PERAÇOLI MTS, DIAS LA, MARTINS M, CALVI SA, SOARES AMVC. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* by peritoneal macrophages activated by IFN-gamma or TNF-alpha is mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 145.
- 120 - WESTENDORP RG, LANGERMANS JA, DE BEL CE, MEINDERS AE, VANDENBROUCKE JP, VAN FURTH R et al. Release of tumor necrosis factor: an innate host characteristic that may contribute to the outcome of meningococcal disease. *J Infect Dis* 1995; 171: 1057-60.
- 121 - TRUYENS C, TORRICO F, ANGELO BARRIOS A, LUCAS R, HEREMANS H, DE BAETSELIER P et al. The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. *Parasit Immunol* 1995; 17: 561-8.
- 122 - DELFINO D, CIANCI L, MIGLIARDO M, MANCUSO G, CUSUMANO V, CORRADINI C et al. Tumor necrosis factor-inducing activities of *Cryptococcus neoformans* components. *Infect Immun* 1996; 64: 5199-204.
- 123 - DELFINO D, CIANCI L, LUPIS E, CELESTE A, PETRELLI ML, CURRO F et al. Interleukin-6 production by human monocytes stimulated with *Cryptococcus neoformans* components. *Infect Immun* 1997; 65: 2454-6.

124 - VECCHIARELLI A, RETINI C, MONARI C, TASCINI C, BISTONI F, KOZEL TR. Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes. *Infect Immun* 1996; 64: 2846-9.

125 - CHAKA W, VERHEUL AF, VAISHNAV VV, CHERNIAK R, SCHARRINGA J, VERHOEF J et al. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcal glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein induce different levels of tumor necrosis factor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 1997; 65: 272-8.

126 - WRIGHT SD, RAMOS RA, TOBIAS PS, ULEVITCH RJ, MATHISON JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-3.

127 - WRIGHT SD, RAMOS RA, HERMANOWSKI-VOSATKA A, ROCKWELL P, DETMERS PA. Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J Exp Med* 1991; 173: 1281-6.

128 - KUROKAWA CS, SUGIZAKI MF, PERAÇOLI MTS. Virulence factors of systemic mycoses. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1998; 40: 125-35.

129 - SILVA CL, SILVA MF, FACCIOLI LH, PIETRO RC, CORTEZ SA, FOSS NT. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 314-20.

Efeito da Interleucina-6 sobre a atividade fungicida e produção de citocinas por monócitos humanos, infectados *in vitro* com cepa virulenta de *Paracoccidioides brasiliensis*.

K. Z. Siqueira<sup>1</sup>; A. M. V. C. Soares<sup>1</sup>; S.A. Calvi<sup>2</sup>; M. T. S. Peraçoli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências; UNESP 18618-000 – Botucatu – S.P., Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Faculdade de Medicina; UNESP 18618-000 – Botucatu – S.P., Brasil

\* Endereço para correspondência:

Dra Maria Terezinha Serrão Peraçoli  
Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP  
Distrito de Rubião Junior, s/n  
Botucatu – SP  
CEP 18600-000

## Resumo

O efeito interleucina-6 (IL-6) sobre a atividade fungicida e a produção de citocinas foi avaliado em cultura de monócitos humanos, infectados com cepa virulenta (Pb18) de *Paracoccidioides brasiliensis*. Monócitos de sangue periférico, obtidos de indivíduos saudáveis, foram pré-incubados por 24h na ausência ou presença de IL-6 recombinante humana e, a seguir, infectados com cepa virulenta Pb18 do fungo durante 4h e 18h na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica. A atividade fungicida de monócitos foi avaliada por plaqueamento das co-culturas em BHI-ágar e determinação da recuperação de fungos viáveis e, a produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-6 e IL-10 por monócitos foi determinada nos sobrenadantes das culturas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados demonstraram que a pré-incubação de monócitos com IL-6 e desafio com Pb18 durante 4h induziu aumento significativo na recuperação fúngica em comparação às culturas controles não-estimuladas com esta citocina. Monócitos infectados com *P. brasiliensis*, na ausência de IL-6, produziram níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 significativamente maiores após 18h de co-cultivo em comparação aos experimentos de 4h de incubação. O tratamento de monócitos com IL-6 induziu um efeito inibitório na produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 por essas células durante a infecção com *P. brasiliensis*, representado por 79,5% e 75,6% de redução nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10, respectivamente, após 18h de cultivo. Por outro lado, efeito estimulatório da IL-6 sobre a produção autócrina dessa citocina foi observado nessas culturas e revelado por acréscimo de 84,8% em 4h e 59,4% em 18h de co-cultura. A redução nos níveis de TNF- $\alpha$  e estimulação na produção de IL-6 podem ser responsáveis pelo aumento significativo no crescimento do fungo em monócitos humanos, induzido por tratamento prévio com IL-6. Em conjunto, esses resultados sugerem que a IL-6 pode exercer um efeito modulador sobre a interação monócito-*P. brasiliensis*, inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e promovendo o crescimento da cepa virulenta do fungo nessas células.

## Abstract

The effect of interleukin-6 (IL-6) on fungicidal activity and cytokine production was evaluated in human monocytes cultures infected with virulent strain (Pb18) of *Paracoccidioides brasiliensis*. Peripheral blood monocytes obtained from healthy individuals were pre-incubated for 24h with or without human recombinant IL-6, and then challenged with Pb18 by co-culture during 4h and 18h in a ratio of 50:1 monocytes:fungi. Fungicidal activity of monocytes was assessed by viable fungi recovery from co-cultures plating in BHI-agar, and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-6 and IL-10 production by monocytes were determined in culture supernatants by enzyme immunoassay (ELISA). The monocytes pre-incubation with IL-6, and further challenge with Pb18 during 4h led to significant higher fungi recovery when compared to non-treated co-cultures. Monocytes infected with *P. brasiliensis* in the absence of IL-6, produced significantly higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 after 18h of co-culture in comparison to experiments of 4h-incubation with the fungus. The pre-treatment of monocytes with IL-6 induced an inhibitory effect on TNF- $\alpha$  and IL-10 production by these cells during 18h of fungus infection, respectively represented by 79.5% and 75.6% reduction in TNF- $\alpha$  and IL-10 levels. On the contrary an autocrine stimulatory effect on IL-6 production was detected in these cultures, revealed by an elevation of 84.8% at 4h and 59.4% at 18h in IL-6 levels. The reduction in TNF- $\alpha$  levels and stimulation in IL-6 production might be responsible for the significant increase of fungus growth in human monocytes induced by previous treatment with IL-6. Together, the results suggest that IL-6 may exert a modulatory effect on monocyte-*P. brasiliensis* interaction by inhibiting TNF- $\alpha$  production and promoting the growth of a fungus virulent strain in these cells.

## 1. INTRODUÇÃO

A resposta imune inata, envolvendo principalmente monócitos e macrófagos, é considerada importante mecanismo de defesa contra fungos causadores de micoses sistêmicas. Esses fagócitos são responsáveis pela ingestão e inativação de partículas fúngicas, produção de citocinas e interação com células da imunidade adaptativa, desempenhando, assim, papel relevante na defesa do hospedeiro, durante a fase inicial das infecções<sup>1,2</sup>.

A ativação de monócitos e macrófagos representa um dos primeiros eventos na resistência a infecções intracelulares. A interação dessas células com patógenos intracelulares pela fagocitose, ou com seus produtos presentes na parede celular, induz à ativação e secreção de citocinas<sup>3</sup>. Essas células, quando estimuladas, desempenham importante papel na imunorregulação pela produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e fator transformador do crescimento-beta (TGF- $\beta$ )<sup>4</sup>. Todas essas citocinas apresentam atividade estimuladora ou supressora, exercendo seus efeitos tanto de forma autócrina como parácrina sobre os macrófagos, interagindo com os receptores específicos presentes nessas células e modulando a sua função<sup>5,6</sup>. Citocinas como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , IL-1 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) são importantes no processo de ativação do macrófago, enquanto que IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  são consideradas fatores de desativação dessa célula<sup>7,8</sup>. O desequilíbrio na produção de citocinas, com atividade estimuladora ou supressora por macrófagos, após a infecção por fungos patogênicos, pode determinar a evolução da doença ou a morte do microrganismo.

Estudos *in vitro*, envolvendo a interação de macrófagos e monócitos humanos com diferentes fungos, como *Coccidioides immitis*<sup>9</sup>, *C. neoformans*<sup>10,11</sup>, *C. albicans*<sup>12,13</sup>, *Malassezia* spp<sup>14,15</sup> e *P. brasiliensis*<sup>16,17</sup> evidenciaram a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 após o estímulo com os fungos, demonstrando que essas células podem ser fontes importantes de citocinas, após interação com os microrganismos.

Componentes da parede celular ou da cápsula de fungos patogênicos têm sido estudados e relacionados à produção de citocinas, modulando a resposta imune do hospedeiro e podendo contribuir tanto para a regressão

como para a patogênese da doença. O estímulo de monócitos com componentes da cápsula de *Cryptococcus neoformans*, como glicuroxilomananas, galactoxilomananas e manoproteínas, induz síntese de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por essas células<sup>10,18-20</sup>.

A produção de IL-6 tem sido relatada em infecções por *C. albicans*, *C. neoformans*, *C. immitis* e *P. brasiliensis*<sup>19,21-23</sup>. Em candidíase disseminada humana, níveis elevados de IL-6 foram associados à gravidade da doença, relacionando manoproteínas presentes na parede celular de *C. albicans* à produção de IL-6<sup>21</sup>.

Em fagócitos infectados com microrganismos patogênicos, a produção de IL-6 pode ser estimulada por citocinas pro-inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$ , e representa um mecanismo de controle da ativação da célula hospedeira<sup>24</sup>. Assim, a produção de IL-6 por macrófagos infectados com *Mycobacterium avium*, parece impedir a ativação dessas células por TNF, diminuindo a expressão de seus receptores<sup>25</sup>. Além disso, a IL-6 pode estar envolvida na patogênese da infecção por esse microrganismo e pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) devido a seu efeito promotor do crescimento desses microrganismos em cultura de macrófagos<sup>26-28</sup>.

Na paracoccidiodomicose, a produção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 por monócitos de pacientes com a doença em atividade, poderia estar associada à patogênese da micose<sup>29</sup>. Além disso, Kurokawa et al.<sup>16</sup> demonstraram que a infecção *in vitro* de monócitos de indivíduos saudáveis, com cepas de alta virulência de *P. brasiliensis*, induz precocemente, e em níveis elevados, tanto citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , quanto anti-inflamatórias, como a IL-10, quando comparada à cepa de baixa virulência. Portanto, o ambiente de citocinas presente na interação inicial fagócito-*P. brasiliensis*, parece ser importante para eliminação do fungo ou para permitir sua implantação e multiplicação nos tecidos do hospedeiro, causando doença progressiva.

Considerando que não há trabalhos na literatura analisando o envolvimento da IL-6 na paracoccidiodomicose, os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por monócitos infectados com cepa virulenta de *P. brasiliensis*, e analisar o efeito modulador da IL-6 sobre a

atividade fungicida e a produção de citocinas por essas células, durante a infecção *in vitro* com o fungo.

## 2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para avaliação comparativa da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por monócitos de indivíduos saudáveis, essas células foram infectadas *in vitro* com a cepa 18 de *P. brasiliensis*, considerada virulenta<sup>30</sup> na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica. As culturas foram incubadas à 37°C em tensão de 5% de CO<sub>2</sub>, por 4h e 18h para colheita dos sobrenadantes e determinação das concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  e, também por 48 e 72h para avaliação das concentrações de IL-10 pela técnica de ELISA.

Para o estudo do efeito da IL-6 sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 e sobre a atividade fungicida de monócitos humanos desafiados com cepa de alta virulência de *P. brasiliensis*, culturas de monócitos humanos de indivíduos saudáveis, foram incubadas por 24h, a 37°C em tensão de 5% de CO<sub>2</sub> com IL-6 recombinante humana. Após esse período, o sobrenadante das culturas foi retirado e as células incubadas com suspensão de células viáveis da cepa Pb18, na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica por 4h e 18h, para posterior avaliação da atividade fungicida sobre o *P. brasiliensis* e a determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 pela técnica de ELISA.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Casuística

Foram utilizadas amostras do sangue periférico de 15 indivíduos saudáveis, doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP – Câmpus de Botucatu. O consentimento dos indivíduos, para participação no presente trabalho, foi obtido após informação e esclarecimento sobre os objetivos da pesquisa e assinatura do formulário de consentimento livre e esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob protocolo nº 134/2002-CEP.

### **3.2. Cultivo do *P. brasiliensis***

Utilizou-se a cepa Pb18 de *P. brasiliensis*, proveniente da Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. A cepa foi mantida por incubação a 35°C na forma de levedura, com subcultivos semanais, em meio de cultura GPY, contendo 2% glicose, 1% peptona e 0,5% extrato de levedura. As células leveduriformes foram utilizadas após 6 dias de cultivo, para a infecção das culturas de monócitos.

#### **3.2.1. Teste de viabilidade do *P. brasiliensis***

As células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram removidas da superfície de cultivo, com alça de platina, transferidas para tubos estéreis contendo 10 mL de meio RPMI e pérolas de vidro de 4mm de diâmetro e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37°C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, sendo utilizada uma alíquota para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando microscópio com contraste de fase, segundo método descrito por Soares et al.<sup>31</sup>. Foram consideradas viáveis as células com aspecto brilhante, e células mortas as com coloração opaca e escura. Nos ensaios, foram empregadas suspensões fúngicas com, no mínimo, 90% de viabilidade.

### **3.3. Isolamento e cultura de monócitos**

Sangue periférico de indivíduos saudáveis foi obtido por punção venosa, sendo 10 mL colocados em tubos estéreis contendo 20 U/mL de heparina (Liquemine-Roche). As células mononucleares foram recuperadas por meio de separação em gradiente de Ficoll-Hypaque<sup>32</sup> e lavadas com solução salina tamponada com fosfato 0,1M pH 7,2 (PBS) e EDTA 0,01M (4°C), por 10 min a 200 g e, logo após, com meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y.) por mais 10 min a 200 g. Após este procedimento, as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco),

suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro AB humano inativado (meio RPMI completo), sendo a identificação e viabilidade dos monócitos realizada por incorporação de vermelho neutro. Para isso, as células totais foram diluídas 10 vezes em solução de vermelho neutro a 0,02% e incubadas a 37°C, durante 10 minutos. Os monócitos foram diferenciados por apresentarem citoplasma de coloração vermelha. A suspensão celular foi ajustada para  $2 \times 10^6$  monócitos/mL, e 100 µl foram distribuídos em placas de cultura de 96 orifícios (Linbro, Flow Lab., USA). Após incubação a 37°C em tensão de 5% de CO<sub>2</sub>, por 60 min, as células não aderentes foram eliminadas através de lavagem dos orifícios das placas com meio de cultura RPMI.

### **3.4. Avaliação da atividade fungicida**

O estudo da atividade fungicida de monócitos contra *P. brasiliensis* foi realizado conforme técnica descrita por Soares et al.<sup>31</sup>. Culturas de monócitos contendo  $2 \times 10^6$  células/mL em meio RPMI completo foram pré-incubadas com Interleucina-6 (IL-6) (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) na concentração de 50 ng/mL, previamente padronizada. Após 24h, os sobrenadantes das culturas foram retirados e os monócitos incubados com 100µL de solução de meio RPMI adicionado de 10% de soro AB fresco, contendo  $4 \times 10^4$  células leveduriformes de *P. brasiliensis*/mL, na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica (culturas experimentais). Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas suspensões de células fúngicas, diluídas em RPMI, e em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com os monócitos (culturas controles). Após períodos de 4h e 18h, os sobrenadantes das culturas foram coletados, e as células submetidas a diversas lavagens com água destilada. Este processo permitiu que os monócitos fossem removidos da placa e lisados, com conseqüente liberação dos fungos que foram, eventualmente, fagocitados. As suspensões obtidas através desse processo foram adicionadas aos sobrenadantes já coletados e consideradas como culturas experimentais. O mesmo procedimento foi realizado com as suspensões controles, contendo apenas o fungo.

Ao final do processo, o material obtido a partir de lavagens das culturas controles e das experimentais com água destilada, resultou em volume de aproximadamente 2 mL. Este material, contendo fungos viáveis ou não, foi centrifugado e ressuspenso em volume de água destilada que permitiu o crescimento de, no máximo, 200 colônias de fungos por placa, tornando a leitura das mesmas mais sensível. Em seguida, 100 µL das suspensões fúngicas em água destilada foram semeados em três placas contendo meio de cultura ágar-infusão de cérebro-coração (BHI-ágar – Difco Lab., Michigan, USA), suplementado com 4% de soro de cavalo e 5% de fator de crescimento, preparado a partir de filtrado de cultura de células leveduriformes da cepa Pb192 de *P. brasiliensis*, cultivadas em meio líquido durante 7 dias<sup>33</sup>. A suspensão foi semeada, com auxílio de bastões de vidro em forma de L, por toda a superfície do meio de cultura. A seguir, as placas de Petri foram incubadas em estufa a 36°C por 10 dias. A recuperação dos fungos viáveis foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de recuperação de fungos viáveis} = \frac{\text{média das UFC das culturas experimentais}}{\text{média das UFC das culturas controles}} \times 100$$

### **3.5. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos de indivíduos saudáveis**

Monócitos de indivíduos saudáveis, na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL, foram incubados na ausência ou presença de 50ng/mL de IL-6 (R & D Systems). Após 24h, os sobrenadantes das culturas foram retirados e os monócitos desafiados com 100µL de solução de meio RPMI adicionado de 10% de soro AB fresco, contendo células leveduriformes de *P. brasiliensis*, na proporção de 50 monócitos para uma célula fúngica. Após 4 e 18 h de cultivo, os sobrenadantes foram aspirados, centrifugados a 400 x g e, as alíquotas desse material, conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização para dosagem de citocinas.

### **3.6. Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos infectados com *P. brasiliensis***

Foram determinadas as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6 nos sobrenadantes de cultura de monócitos humanos tratados ou não com IL-6 e posteriormente desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* durante 4 e 18h e também após 48 e 72h para dosagem de IL-10.

#### **3.6.1. Dosagem de TNF- $\alpha$**

As placas de 96 orifícios e fundo plano (Maxsorb-Nunc Life Tech. Inc., MD, USA) foram sensibilizadas por 18 h a 5°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-TNF- $\alpha$  humano (R & D Systems), diluído em PBS, pH 7,2, na concentração de 4  $\mu$ g/mL. Após esse período os orifícios foram lavados 4 vezes com 300  $\mu$ L de PBS, pH 7,2, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado colocando-se em cada orifício 300  $\mu$ L de PBS contendo 5% de sacarose, 0,5% de Tween 20, 1% de soro albumina bovina (BSA) e 0,05% de NaN<sub>3</sub> (azida sódica), à temperatura ambiente, por 2 h. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100  $\mu$ L dos sobrenadantes obtidos nas culturas de monócitos e do TNF- $\alpha$  recombinante humano (R & D Systems), em diferentes concentrações, foram adicionados à placa. Após 18 h de incubação a 5°C e nova lavagem da placa, 100  $\mu$ L do anticorpo revelador policlonal de coelho anti-TNF- $\alpha$  humano (R & D Systems), na concentração de 200 ng/mL, foram colocados nos orifícios da placa, seguindo-se incubação por 2h à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente com PBST, sendo adicionado 100 $\mu$ L de anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Nordic Immunology, The Netherlands) na diluição de 1:8000 em PBST, seguido de incubação à temperatura ambiente por 60 min e de lavagem da placa com PBST. Após esse período, adicionou-se 100  $\mu$ L do substrato enzimático, constituído por 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo 1mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma, ST Louis, MO, USA) e 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Sigma). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min, a reação foi bloqueada pela adição de 50 $\mu$ L de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA

(Multiskan EFLAB, Helsinki, Finland), em comprimento de onda de 492 nm. Os níveis de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura de monócitos foram calculados, utilizando-se curva padrão, obtida com TNF- $\alpha$  recombinante humano (R & D Systems), em concentrações variando de 31,25 pg/mL a 2000 pg/mL.

### **3.6.2. Dosagem de IL-6**

A determinação de IL-6 no sobrenadante de cultura de monócitos foi realizada segundo o protocolo descrito para TNF- $\alpha$ , no item 3.6.1. O anticorpo monoclonal de camundongo anti-IL-6 (R & D Systems) foi empregado na concentração de 2  $\mu$ g/mL e o anticorpo revelador policlonal de coelho anti-IL-6 (R & D systems) na concentração de 500 ng/mL. Os níveis de IL-6 no sobrenadante de cultura de monócitos foram calculados, utilizando-se curva padrão obtida com IL-6 recombinante humana (R & D Systems), em concentrações, variando de 0,078 ng/mL a 100 ng/mL.

### **3.6.3. Dosagem de IL-10**

As placas foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IL10 (R & D Systems), na concentração de 2  $\mu$ g/mL, diluído em PBS, por um período de 18 h a 5°C. Após a sensibilização a placa foi lavada com PBST, bloqueada com 300  $\mu$ L de PBS contendo 5% de sacarose, 0,5% de Tween 20, 1% de soro albumina bovina (BSA) e 0,05% de NaN<sub>3</sub> (azida sódica). O período de bloqueio foi de 2h à temperatura ambiente, seguindo-se 4 lavagens da placa com PBST. A seguir, 100 $\mu$ L dos sobrenadantes gerados e da IL-10 recombinante humana (R & D Systems), diluída em tampão Tris - salina (Trizma - base 20mM, NaCL 150 mM) adicionado de 0,1% de BSA, foram adicionados à placa que foi incubada por 2 h à temperatura ambiente. Após a retirada das amostras da placa e posterior lavagem, adicionou-se solução contendo 25 ng/mL de anticorpo policlonal anti IL-10, conjugado com biotina (R & D Systems), com posterior incubação de 2 h à temperatura ambiente. A placa foi então lavada 4 vezes com PBST e incubada com estreptoavidina conjugada com peroxidase (Sigma), na concentração de 1:10.000 por 60 min a 37°C. O substrato utilizado foi o mesmo descrito para dosagem de TNF- $\alpha$  (item 3.6.1). O tempo de reação foi de 30 min e o bloqueio realizado com ácido sulfúrico 2

M. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan) em comprimento de onda de 492 nm. Os níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de monócitos foram calculados, utilizando-se curva padrão obtida com IL-10 recombinante humana (R & D Systems), em concentrações, variando de 15,6 a 2000 pg/mL.

### **3.7. Análise Estatística**

Os resultados referentes à produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por monócitos infectados com cepa 18 de *P. brasiliensis*, bem como a atividade fungicida dessas células, após cultivo na ausência ou presença de IL-6 foram avaliados por meio de teste *t* pareado para amostras dependentes. Todas as análises foram realizadas, empregando-se o programa estatístico INSTAT, Graph-Pad, San Diego, CA, USA, 2000, e o nível de significância adotado foi de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito da IL-6 sobre a atividade fungicida de monócitos humanos contra *P. brasiliensis*

Na Tabela 1 estão expressos os resultados da percentagem de recuperação de fungos viáveis da cepa Pb18 a partir de cultura de monócitos humanos, tratados ou não com 50 ng/mL de IL-6 por 24 horas, antes do desafio com amostra do fungo. A atividade fungicida foi avaliada nos períodos de 4h e 18 h de co-cultivo dos monócitos com o fungo.

**Tabela 1. Percentagem de recuperação de fungos viáveis da cepa Pb18 a partir de cultura de monócitos humanos (MO), tratados ou não com 50 ng/mL de IL-6 antes do desafio com *P. brasiliensis*, por 4 e 18 horas.**

Período de cultura	% recuperação de colônias *	
	MO + Pb18	MO + IL-6 + Pb18
4 horas	96,6 ± 22,7	117,1 ± 7,9 **
18 horas	84,5 ± 13,4	91,0 ± 5,1

Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão da percentagem de recuperação de colônias viáveis do fungo a partir de cultura de monócitos obtidos de 15 indivíduos saudáveis.

\* % de recuperação =  $\frac{\text{média das UFC das culturas experimentais}}{\text{média das UFC das culturas controles}} \times 100$

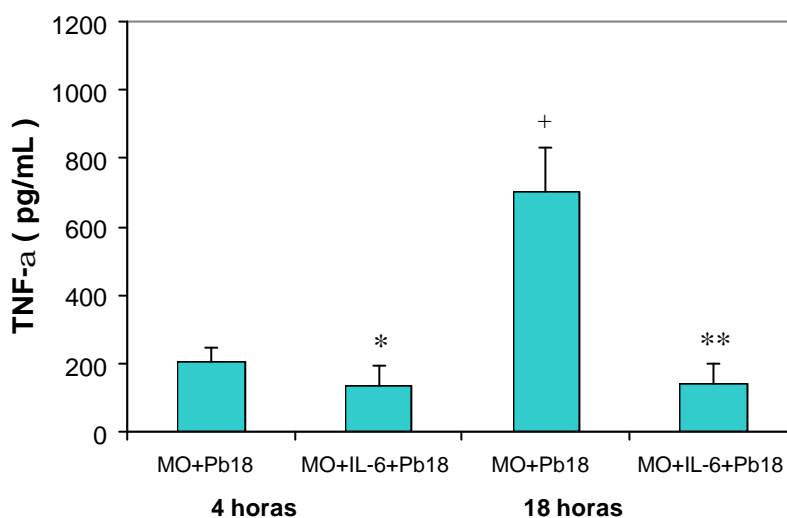
\*\* p < 0,05 (teste t pareado)

Os resultados mostram altas percentagens de recuperação de fungos viáveis tanto após 4 como 18 h nas culturas de monócitos não-estimulados e incubados (MO + Pb18) com o fungo. O pré-tratamento de monócitos com IL-6, seguido de desafio com a cepa virulenta Pb18 por 4h, proporcionou recuperação de fungos significativamente mais elevada do que a obtida a partir de culturas controle não tratadas com IL-6. Esse efeito não foi observado na co-cultura de monócitos com Pb18 por 18h. Os resultados sugerem que o tratamento prévio de monócitos com IL-6 parece estimular o crescimento do

fungo, interferindo com a atividade fungicida dessas células em período precoce de infecção com o fungo.

#### 4.2. Dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos infectados com *P. brasiliensis*

As concentrações das citocinas foram detectadas no sobrenadante de cultura de monócitos humanos tratados ou não previamente com IL-6 por 24 h e a seguir desafiados com a cepa Pb 18 de *P. brasiliensis* por 4 e 18h para TNF- $\alpha$  e IL-6 e também por 48 e 72h para IL-10.



**Figura 1. Concentrações de TNF- $\alpha$  detectadas nos sobrenadantes de cultura de monócitos tratados ou não com IL-6 e desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* em co-culturas de 4 e 18 horas. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos de 15 indivíduos saudáveis.**

\* ( $p < 0,05$ ) vs MO + Pb18 – 4 h; <sup>+</sup> ( $p < 0,01$ ) vs MO + Pb18 – 4 h

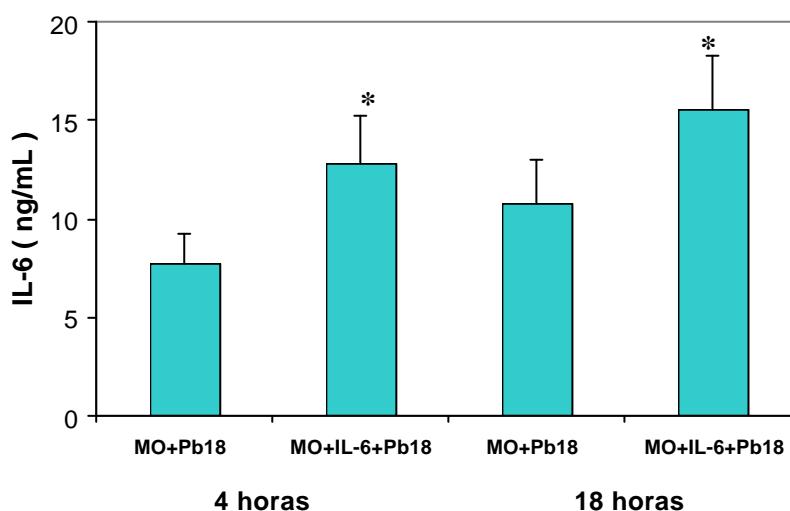
\*\* ( $p < 0,01$ ) vs MO + Pb18 – 18 h (test *t* pareado).

Observa-se que, na ausência de IL-6, a produção de TNF- $\alpha$  durante a infecção dos monócitos com o fungo foi significativamente mais elevada nos sobrenadantes obtidos de culturas 18h, em comparação com o tempo de 4h ( $p < 0,001$ ).

Quando os monócitos foram pré-incubados com IL-6 por 24 h e a seguir desafiados com Pb18, as concentrações de TNF- $\alpha$  detectadas no

sobrenadante das culturas foram significativamente menores que as obtidas nas culturas controle (MO + Pb18), após ambos os períodos de infecção com Pb18. Assim, a pré-incubação de monócitos com IL-6 induziu efeito inibitório significativo sobre a produção de TNF- $\alpha$ , quando as células foram desafiadas com a amostra virulenta do fungo, sendo esse efeito mais acentuado no período de 18h de co-cultivo monócito-*P. brasiliensis*. Os resultados sugerem o papel da IL-6 na regulação da síntese de TNF- $\alpha$  pelos monócitos infectados com *P. brasiliensis*.

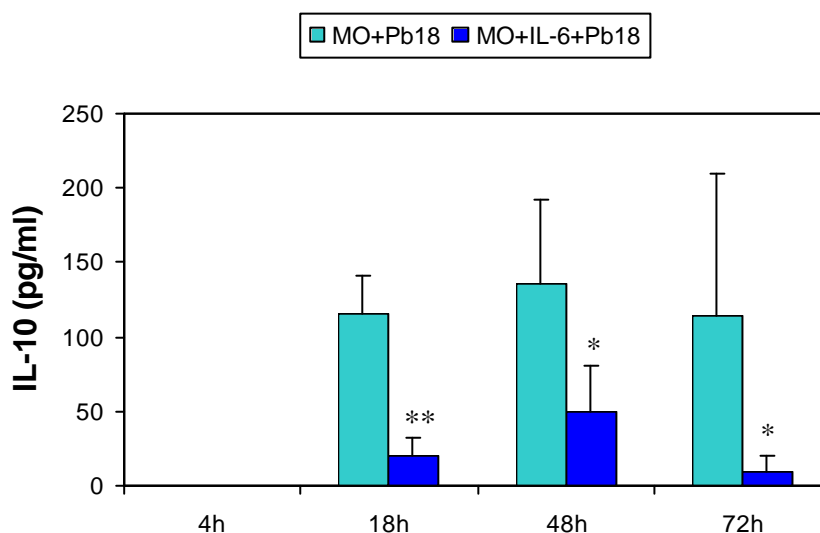
A análise dos resultados de IL-6 detectada no sobrenadante das co-culturas mostra que o *P. brasiliensis* é capaz de induzir a produção de IL-6 por monócitos durante a infecção dessas células *in vitro* (Figura 2). A comparação entre os níveis de IL-6 obtidos nas co-culturas, sem tratamento prévio com IL-6, não mostrou diferença significativa entre os períodos de 4 e 18 h, sugerindo produção precoce de IL-6 pelos monócitos infectados. Por outro lado, quando os monócitos foram pré-incubados com IL-6 e desafiados com a cepa Pb18, produziram concentrações significativamente mais elevadas de IL-6 em comparação com as culturas controle (MO + Pb18), tanto após 4h como 18h de infecção com o fungo. Os resultados sugerem um efeito estimulador da IL-6 sobre sua produção, durante a infecção de monócitos com *P. brasiliensis*.



**Figura 2.** Concentrações de IL-6 detectadas nos sobrenadantes de cultura de monócitos tratados ou não com IL-6 e desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* em co-culturas de 4 e 18 horas. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos de 15 indivíduos saudáveis.

\* ( $p < 0,05$ ) vs MO + Pb18 – (test  $t$  pareado).

Os resultados da concentração de IL-10 produzida por monócitos infectados *in vitro* com Pb18 em diferentes períodos de co-cultivo com o fungo estão apresentados na Figura 3. Observa-se que a IL-10 é sintetizada mais tardiamente, em relação à produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, por monócitos estimulados, uma vez que níveis dessa citocina não foram detectados após 4h de co-cultivo. Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de IL-10 obtidos nos períodos de 18, 48 ou 72 horas em sobrenadantes de cultura de monócitos infectados com *P. brasiliensis*. A pré-incubação dos monócitos com IL-6 levou à menor produção de IL-10 pelas células durante todos os períodos estudados, a partir de 18h de infecção com Pb18. De maneira semelhante aos resultados da produção de TNF- $\alpha$ , a pré-incubação com IL-6 resultou em inibição da síntese de IL-10 pelos monócitos infectados com *P. brasiliensis*.



**Figura 3: Concentrações de IL-10 detectadas nos sobrenadantes de cultura de monócitos tratados ou não com IL-6 e desafiados com a cepa Pb18 de *P. brasiliensis* em co-culturas de 4, 18, 48 e 72 horas. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão dos valores obtidos de 15 indivíduos saudáveis.**

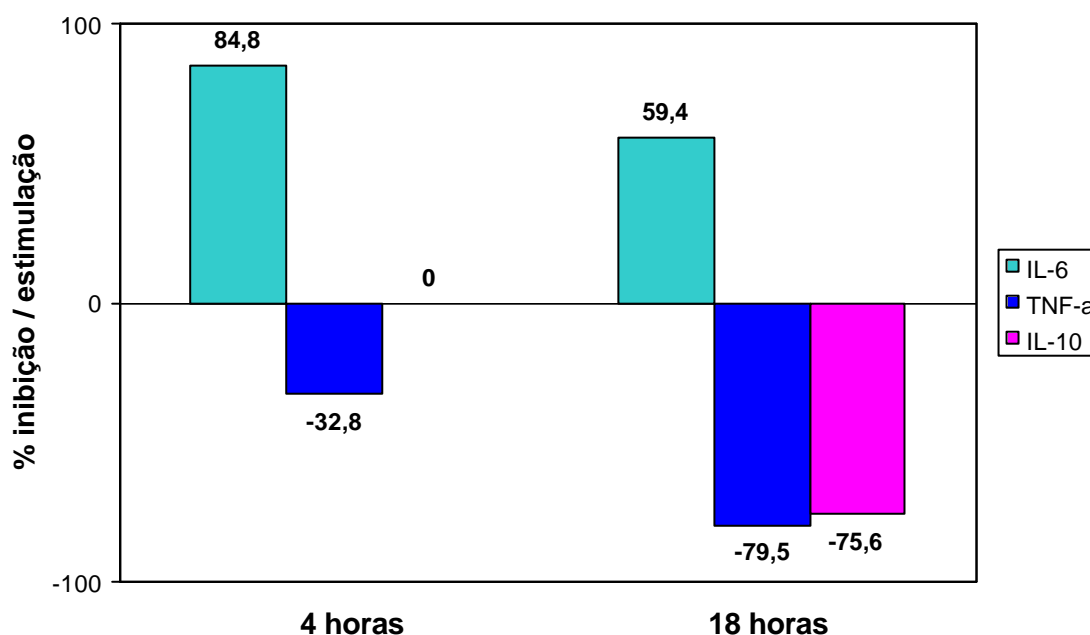
\*\* ( $p < 0,01$ ) vs MO+Pb18; \* ( $p < 0,05$ ) vs MO+Pb18 (teste *t* pareado)

Na figura 4 estão representados os resultados do efeito modulador da IL-6 sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por monócitos humanos infectados

com a cepa Pb18 nos períodos de 4 e 18h, que foi avaliado pela fórmula abaixo, sendo os resultados expressos em percentagem:

$$\text{Efeito IL-6 ( \% )} = 1 - \frac{\text{MO} + \text{IL-6} + \text{Pb18}}{\text{MO} + \text{Pb18}} \times 100$$

Observa-se que o efeito inibidor da IL-6 sobre a produção de TNF- $\alpha$  (79,5%) foi mais acentuado no período de 18h de co-cultivo monócito-*P. brasiliensis*. A inibição sobre a síntese de IL-10 foi observada apenas no período de 18h (75,6%). Por outro lado, o efeito estimulatório da IL-6 sobre a produção autócrina de IL-6 foi ligeiramente mais elevado após 4h (84,8%) de desafio com o fungo, em relação ao tempo de 18h (59,4%).



**Figura 4: Efeito da IL-6 sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 por monócitos desafiados com a cepa 18 de *P. brasiliensis* em co-culturas de 4 e 18h. Os valores são expressos como percentagem de estimulação ou inibição. Os valores das percentagens são também apresentados juntamente com as barras.**

Assim, os resultados obtidos demonstram que a IL-6 apresenta efeito modulador sobre monócitos humanos, infectados com cepa virulenta do *P. brasiliensis*, sendo esse efeito inibitório sobre a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 e estimulatório sobre a síntese de IL-6.

## 5. DISCUSSÃO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito modulador da IL-6 sobre a atividade fungicida e produção de citocinas por monócitos humanos, infectados *in vitro* com cepa virulenta de *P. brasiliensis*.

A análise dos resultados revelou que a incubação de monócitos de indivíduos saudáveis com o *P. brasiliensis* permite a recuperação de altas percentagens de fungos viáveis, indicando baixa atividade fungicida contra o fungo. Esses resultados estão de acordo com os anteriormente descritos por Calvi et al.<sup>34</sup>, que relataram ausência de atividade fungicida de monócitos humanos contra cepa virulenta Pb18 de *P. brasiliensis*, mesmo após processo de ativação dessas células com IFN- $\gamma$ . Por outro lado, os autores verificaram que capacidade fungicida significativa dessas células ocorria apenas após pré-ativação com IFN- $\gamma$  e desafio com cepa de baixa virulência do fungo Pb265, indutora de elevada produção de TNF- $\alpha$  pelos monócitos. A menor concentração dessa citocina, produzida pelos monócitos em contato com a cepa virulenta, justifica a incapacidade dessas células em destruir o fungo. Segundo os autores, a atividade fungicida eficiente dos monócitos depende de um sinal de ativação inicial induzido pelo IFN- $\gamma$  capaz de estimular a produção de TNF- $\alpha$  pelas células. Esta citocina, atuando de maneira autócrina sobre o monócito, seria responsável pelo processo final de ativação, representado pela maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e maior atividade fungicida dessas células contra a cepa de baixa virulência. Portanto, o efeito sinérgico entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  parece ser essencial para uma eficiente atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*<sup>31,34</sup>.

Já está bem estabelecido na literatura, que uma eficiente atividade microbicida de monócitos está relacionada com a produção de níveis elevados de TNF- $\alpha$ , detectados após pré-incubação com IFN- $\gamma$ , resultando na morte de microrganismos tais como *Listeria monocytogenes*<sup>35</sup>, *Toxoplasma gondii*<sup>35</sup>, *Leishmania major*<sup>36</sup> e *Histoplasma capsulatum*<sup>37</sup>. Além disso, um efeito sinérgico de ambas citocinas é necessário para ativar monócitos de sangue periférico para *killing* de *Legionella pneumophila*<sup>38</sup>, *Leishmania donovani*<sup>39</sup> e *Coccidioides immitis*<sup>40</sup>.

Trabalhos recentes sobre os mecanismos envolvidos na atividade fungicida de monócitos humanos contra o *P. brasiliensis* demonstraram a participação de  $H_2O_2$  no mecanismo efetor dessas células após ativação com  $IFN-\gamma$  e  $TNF-\alpha$ <sup>41,42</sup>. Monócitos humanos não estimulados com citocinas e desafiados com cepas de alta e baixa virulência do fungo, produzem níveis significativamente menores de  $H_2O_2$  durante a infecção com a cepa virulenta, em comparação com a cepa pouco virulenta, podendo esse efeito ser considerado um mecanismo de escape do *P. brasiliensis* dos mecanismos efetores dos monócitos. A recuperação da capacidade de produção de  $H_2O_2$  quando os monócitos foram pré-tratados com indometacina sugere que a baixa atividade fungicida contra a cepa virulenta poderia ser resultante da produção de prostaglandina induzida pelo fungo, com conseqüente inibição da produção de  $H_2O_2$  pela célula<sup>42</sup>.

No presente trabalho, a maior recuperação de fungos viáveis, obtida após pré-tratamento dos monócitos com IL-6 e desafio com o *P. brasiliensis* por 4 h de co-cultivo, indica o papel modulador dessa citocina na supressão da atividade fungicida dos monócitos infectados com o fungo. Esses resultados sugerem que a adição prévia de IL-6 às culturas de monócitos de indivíduos saudáveis, seguida da infecção com a cepa virulenta por 4h, parece estimular o crescimento do fungo, interferindo com a atividade fungicida. Esse efeito não foi detectado após a infecção das células por 18h. Considerando que a IL-6 foi removida da cultura de monócitos no momento da infecção com o *P. brasiliensis*, é provável que a ausência do efeito inibidor da citocina sobre a atividade fungicida esteja relacionada à diminuição do efeito da IL-6 sobre a célula fagocitária, após 18 h de co-cultivo com o fungo. Segundo Bermudez et al.<sup>25</sup>, o tratamento de macrófagos infectados por *M. avium* com IL-6 recombinante impede a morte intracelular da bactéria, devido ao efeito inibidor desta citocina sobre a expressão de receptores para  $TNF-\alpha$  no monócito. Esse efeito foi observado no tempo de 4 h de cultivo do monócito com IL-6, sendo reversível após esse período.

Outros trabalhos têm discutido o efeito desativador de macrófagos pela IL-6, com conseqüente alteração na atividade microbicida, através de experimentos com microrganismos que induzem síntese e secreção dessa citocina, particularmente os que infectam macrófagos. Assim, a produção de IL-

6 pelo monócito infectado representaria um mecanismo importante de escape da resposta imune do hospedeiro, induzido pelo microrganismo. Em culturas de monócitos tratados com IL-6 recombinante observou-se aumento significativo no crescimento de *M. avium* quando comparadas às culturas não tratadas, sugerindo que a IL-6 possa contribuir significativamente para a patogênese da infecção com *M. avium*, por promover o crescimento micobacteriano<sup>28</sup>. Além disso, TNF- $\alpha$  e IL-6 parecem exercer efeitos antagônicos sobre o crescimento da bactéria em monócitos humanos. Enquanto o TNF- $\alpha$  diminui o crescimento intracelular de *M. avium*, a IL-6 promove o crescimento tanto intra como extracelular da bactéria, podendo ser utilizada pelo *M. avium* como um fator de crescimento<sup>43</sup>. A incubação de amostras virulentas dessa bactéria com IL-6 revelou que o *M. avium* possuía receptores específicos para essa citocina, removendo-a rapidamente do meio de cultivo. Esses dados sugerem que a IL-6 pode desempenhar importante papel nas infecções por cepas virulentas de *M. avium*<sup>44</sup>.

Os resultados obtidos na infecção *in vitro* de monócitos de indivíduos saudáveis com a amostra virulenta de *P. brasiliensis* demonstraram que o fungo é capaz de estimular a síntese de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10. Observamos que nas culturas de monócitos apenas infectados com Pb18, sem tratamento com IL-6, os níveis de TNF- $\alpha$  produzidos ao longo de 18 h de infecção dos monócitos com o fungo foram significativamente mais elevados, em comparação com o tempo de 4h.

Estudos anteriores em nosso laboratório, avaliando a cinética de produção de TNF- $\alpha$  por monócitos humanos<sup>16</sup> e por macrófagos peritoneais de hamsters<sup>17</sup> infectados com a cepa 18 de *P. brasiliensis*, demonstraram que os níveis mais elevados da citocina são obtidos no período de 18h de co-cultivo do fungo com a célula fagocitária. Produção elevada de TNF- $\alpha$  também foi observada por Figueiredo et al.<sup>45</sup>, após desafio de camundongos com fração F1 da parede celular das cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis*. Em vista disso, altos níveis de TNF- $\alpha$ , produzidos após a infecção, podem estar associados à capacidade de monócitos em impedir ou diminuir o crescimento de patógenos tais como *M. avium*<sup>43</sup>, *C. neoformans*<sup>20</sup> e *P. brasiliensis*<sup>17</sup>. Assim, o TNF- $\alpha$

parece ser um componente essencial para a defesa do hospedeiro contra infecções.

Considerando que a IL-10 pode ser produzida tardiamente em culturas de monócitos humanos<sup>46,47</sup>, avaliamos, neste trabalho, a produção dessa citocina por monócitos desafiados com Pb18 nos períodos de 4, 18, 48 e 72h. Os resultados demonstraram que a IL-10 é sintetizada mais tardiamente, em relação à produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, por monócitos infectados com o fungo, uma vez que não detectamos essa citocina após 4h de co-cultivo. Não foram observadas diferenças significativas entre os períodos 18, 48 e 72h com relação à concentração de IL-10 produzida. Esses resultados corroboram os de Shiratsuchi et al.<sup>47</sup> que detectaram, em culturas de monócitos infectados com *M. avium*, níveis máximos de TNF- $\alpha$  entre 6 e 24h e de IL-10 após 24 e 48 H.

Quando os monócitos foram pré-incubados com IL-6 por 24 h e a seguir desafiados com Pb18, as concentrações de TNF- $\alpha$  detectadas no sobrenadante das culturas foram significativamente menores que as obtidas nas culturas controle (MO + Pb18), após ambos os períodos de infecção com Pb18. Assim, a pré-incubação de monócitos com IL-6 induziu efeito inibitório significativo sobre a produção de TNF- $\alpha$ , quando as células foram desafiadas com a amostra virulenta do fungo, sendo esse efeito mais acentuado no período de 18h de co-cultivo monócito-*P. brasiliensis*. Os resultados sugerem o papel da IL-6 na regulação da síntese de TNF- $\alpha$  pelos monócitos infectados com *P. brasiliensis*.

O efeito supressor da IL-6 sobre a síntese de TNF- $\alpha$  tem sido descrito na literatura<sup>24</sup>. Em estudo recente, Paul et al.<sup>48</sup> demonstraram que a IL-6 tem papel anti-inflamatório importante, regulando a produção de TNF- $\alpha$  e a infiltração de leucócitos na meningite pneumocócica.

Na infecção de fagócitos por microrganismos patogênicos, a produção de IL-6 pode ser estimulada por IL-1 e TNF- $\alpha$  e representa um mecanismo de controle da ativação da célula hospedeira<sup>24</sup>. A produção de IL-6 por macrófagos infectados com *M. avium* parece influenciar a resposta imune do hospedeiro, impedindo a ativação dessas células por TNF recombinante<sup>25</sup>. O tratamento de macrófagos com IL-6 pode diminuir, significativamente, tanto a síntese de TNF como a expressão de seus receptores nesses fagócitos,

exercendo efeito antagonista sobre a atividade micobacteriostática e micobactericida mediada por TNF<sup>49</sup>. A suplementação das culturas com TNF restaura a capacidade microbicida dos monócitos<sup>50</sup>.

O tratamento de monócitos humanos com IL-6 exerce efeito inibidor sobre a produção de TNF- $\alpha$ , induzida por estímulos potentes como lipopolissacáride (LPS). O conhecimento da ação inibitória da IL-6 é relevante, tendo-se em vista estudos que demonstraram ser o TNF um potente indutor de IL-6 em culturas de fibroblastos<sup>51</sup> e também em células humanas<sup>52</sup>. A existência de uma interação recíproca estimulatória / inibitória entre TNF e IL-6, sugere uma relação complexa de grande importância na regulação de muitas atividades dessas duas citocinas<sup>53</sup>.

A análise dos resultados de IL-6, detectada no sobrenadante das co-culturas de monócitos infectados com Pb18, tratadas ou não com IL-6 mostram que o *P. brasiliensis* é capaz de induzir a produção de IL-6 por monócitos durante a infecção dessas células *in vitro*. A comparação entre os níveis de IL-6 obtidos nas co-culturas, sem tratamento prévio com IL-6, não mostrou diferença significativa entre os períodos de 4 e 18 h, sugerindo produção precoce de IL-6 pelos monócitos infectados. Por outro lado, como visto na literatura, quando os monócitos foram pré-incubados com IL-6 e desafiados com a cepa Pb18, produziram níveis significativamente mais elevados de IL-6 em comparação com as culturas controle (MO + Pb18), tanto após 4h como 18h de infecção com o fungo. Os resultados sugerem um efeito estimulador da IL-6 sobre a produção dessa citocina, durante a infecção com *P. brasiliensis*. Estudo recente demonstrou que a incubação de monócitos humanos com IL-6 exerce efeito modulador positivo sobre a ativação dessas células, aumentando a expressão de receptores *toll-like* (TLR-4) e a resposta à estimulação com LPS<sup>54</sup>.

A capacidade de *M. avium* em induzir produção de IL-6 por células mononucleares do sangue periférico, foi avaliada por Blanchard et al.<sup>55</sup>, que detectaram níveis elevados dessa citocina no sobrenadante das culturas celulares, principalmente após 8 horas de estímulo. A produção de IL-6 por monócitos humanos estimulados com componentes de *C. neoformans* pode ser independente de TNF- $\alpha$  e os monócitos são os principais responsáveis por essa liberação<sup>19</sup>. Assim, a síntese de IL-6 pode ser induzida tanto por TNF- $\alpha$ <sup>56</sup>,

como também por ação direta de produtos microbianos, por via independente de TNF<sup>57,58</sup>. Aumento nos níveis séricos de IL-6 foi observado após infecções bacterianas agudas<sup>59</sup>, em choque séptico<sup>60</sup> e outras infecções bacterianas<sup>61</sup>. Além disso, a IL-6 também se apresenta elevada em camundongos infectados por *Chlamydia trachomatis*<sup>62</sup> e por *C. neoformans*<sup>19</sup>, bem como em estudos *in vitro*, com tratamento de macrófagos com IL-6 e desafio com *M. avium*<sup>25</sup> ou *Listeria monocytogenes*<sup>63</sup>. Assim, os resultados da literatura sugerem que a IL-6 estimula sua própria produção<sup>64</sup>, mas também regula a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 num mecanismo de *feedback* negativo<sup>65</sup>.

A pré-incubação dos monócitos com IL-6 levou à menor produção de IL-10 pelas células, observada no período de 18h de infecção com Pb18. De maneira semelhante aos resultados da produção de TNF- $\alpha$ , a pré-incubação com IL-6 induziu inibição dos níveis de IL-10 pelos monócitos. Esses resultados são surpreendentes, uma vez que é descrito na literatura o efeito supressor da IL-10 sobre a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos sadios estimuladas com *C. neoformans*, *C. albicans* e LPS<sup>66</sup>. Em estudo sobre a regulação da síntese de citocinas e prostaglandinas por IL-10, Niho et al.<sup>67</sup> verificaram que TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub> são moléculas chave na indução de IL-10 por monócitos estimulados com LPS. O TNF- $\alpha$  pode também estimular diretamente a produção de mRNA para IL-10, por mecanismo independente de PGE<sub>2</sub>. Níveis elevados de IL-10 produzidos inibem eficientemente a síntese de TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, bem como da própria IL-10, regulando, portanto, a resposta inflamatória *in vivo*. Em vista desses resultados, podemos sugerir que a menor concentração de IL-10, obtida nas culturas de monócitos tratados com IL-6 e infectados com Pb18, poderia ser decorrente do efeito supressor da IL-6 sobre a produção de TNF- $\alpha$  observado no presente trabalho.

Nossos resultados de maior produção de IL-6 associada à menor síntese de TNF- $\alpha$ , IL-10 e menor atividade fungicida após tratamento dos monócitos com IL-6 recombinante, sugerem um efeito autócrino dessa citocina sobre os monócitos, no sentido de modular negativamente a função dessas células. Na paracoccidiodomicose, é provável que a produção de IL-6, induzida por cepas virulentas de *P. brasiliensis*<sup>16</sup>, possa impedir a ativação de monócitos

e macrófagos adjacentes ao local infectado, interferindo com a síntese de TNF- $\alpha$ , diminuindo a atividade fungicida dessas células e talvez, propiciando a sobrevivência do patógeno.

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a IL-6 tem efeito modulador negativo sobre a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 por monócitos humanos, infectados com cepa virulenta do *P. brasiliensis*. Essa citocina parece exercer influência negativa na interação fungo-monócito, aumentando a capacidade do *P. brasiliensis* de sobreviver nessa célula, provavelmente por diminuição na produção de TNF- $\alpha$ . Esses resultados confirmam os achados da literatura com *M. avium*<sup>43</sup> e *C. neoformans*<sup>19</sup>, indicando que a IL-6 pode ser considerada um potente fator de crescimento utilizado por diversos patógenos, como mecanismo de virulência. Assim, a produção dessa citocina pode ser prejudicial para o hospedeiro, exercendo importante papel na patogênese de doenças infecciosas devido sua influência negativa sobre a resposta imune frente aos microrganismos. Estudos sobre o mecanismo envolvido na promoção do crescimento de *P. brasiliensis* em culturas de monócitos humanos pela IL-6 poderão contribuir para melhor compreensão do papel dessa citocina na patogênese da paracoccidiodomicose.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*

- 1 - FROMTLING RA, SHADOMY HJ. An overview of macrophage-fungal interactions. *Mycopathologia* 1986; 93:77-93.
- 2 - GORDON S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* 1998; 149: 685-8.
- 3 - TRINCHIERI G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ). *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 17-23.
- 4 - SADEGHI HM, SCHNELLE JF, THOMAS JK, NISHANIAN P, FAHEY JL. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp Gerontology* 1999; 34: 959-70.
- 5 - HAMBLIN AS. Cytokines and cytokine receptors. Oxford: University Press, 1993, 90p.
- 6 - VAN FURTH R. Human monocytes and cytokines. *Res Immunol* 1998; 149: 719-20.
- 7 - TSUNAWAKI S, SPORN M, DING A, NATHAN C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 1988; 334: 260-2.
- 8 - LOHMANN-MATTHES ML, STEINMULLER C, FRANKE-ULLMANN G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7: 1678-89.
- 9 - DOOLEY DP, COX RA, HESTILOW KL, DOLAN MJ, MAGEE DM. Cytokine induction in human coccidioidomycosis. *Infect Immun* 1994; 62: 3980-3.
- 10 - CROSS CE, BANCROFT GJ. Ingestion of acapsular *Cryptococcus neoformans* occurs via mannose and beta-glucan receptors, resulting in cytokine production and increased phagocytosis of the encapsulated form. *Infect Immun* 1995; 63: 2604-11.
- 11 - VECCHIARELLI A, RETINI C, PIETRELLA D, MONARI C, TASCINI C, BECCARI T et al. Downregulation by cryptococcal polysaccharide of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta secretion from human monocytes. *Infect Immun* 1995; 63: 2919-23.
- 12 - JOUALT T, BERNIGAUD A, LEPAGE G, TRINEL PA, POULAIN D. The *Candida albicans* phospholipomannan induces *in vitro* production of tumor necrosis factor-alpha from human and murine macrophages. *Immunology* 1994; 83: 268-73.
- 13 - XIONG J, KANG K, LIU L, YOSHIDA Y, COOPER KD, GHANNOUM MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell Interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun* 2000; 68: 2464-9.
- 14 - KESAVAN S, WALTERS CE, HOLLAND KT, INGHAM E. The effects of *Malassezia* on pro-inflammatory cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Med Mycol* 1998; 36: 97-106.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. *Annu Inter Med* 1997; 126: 36-47.

- 15 - SUZUKI T, TSUZUKI A, OHNO N, OHSHIMA Y, YADOMAE T. Enhancement of IL-8 production from human monocytic and granulocytic cell lines, THP-1 and HL-60, stimulated with *Malassezia furfur*. FEMS Immunol Med Microbiol 2000; 28: 157-62.
- 16 - KUROKAWA CS. Produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em pacientes com paracoccidiodomicose e após infecção *in vitro* de monócitos com amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2001.
- 17 - PARISE-FORTES MR, DA SILVA MF, SUGIZAKI MF, DEFAVERI J, MONTENEGRO MR, SOARES AM et al. Experimental paracoccidiodomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. Med Mycol 2000; 38: 51-60.
- 18 - DELFINO D, CIANCI L, MIGLIARDO M, MANCUSO G, CUSUMANO V, CORRADINI C et al. Tumor necrosis factor-inducing activities of *Cryptococcus neoformans* components. Infect Immun 1996; 64: 5199-204.
- 19 - DELFINO D, CIANCI L, LUPIS E, CELESTE A, PETRELLI ML, CURRO F et al. Interleukin-6 production by human monocytes stimulated with *Cryptococcus neoformans* components. Infect Immun 1997; 65: 2454-6.
- 20 - LEVITZ SM, TABUNI A, KORNFELD H, REARDON CC, GOLENBOCK DT. Production of tumor necrosis factor alpha in human leukocytes stimulated by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1994; 62: 1975-81.
- 21 - RAPONI G, GHEZZI MC, MANCINI C, FILADORO F. Preincubation of *Candida albicans* strains with amphotericin B reduces tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 release by human monocytes. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 1958-61.
- 22 - COX RA, MAGEE DM. Production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, and interleukin 6 during murine coccidiodomycosis. Infect Immun 1995; 63: 4178-80.
- 23 - SILVA CL, SILVA MF, FACCIOLI LH, PIETRO RC, CORTEZ SA, FOSS NT. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidiodomycosis. Clin Exp Immunol 1995; 101: 314-20.
- 24 - AKIRA S, TAGA T, KISHIMOTO T. Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol 1993; 54, 1-78.
- 25 - BERMUDEZ LE, WU M, PETROFSKY M, YOUNG LS. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. Infect Immun 1992; 60: 4245-52.
- 26 - BREEN EC, REZAI AR, NAKAJIMA K, BEALL GN, MITSUYASU RT, HIRANO T et al. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. J Immunol 1990; 144: 480-4.
- 27 - DENIS M, GREGG EO, GHANDIRIAN E. Cytokine modulation of *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. Int J Immunopharmacol 1990; 12: 721-7.

- 28 - DENIS M, GREGG EO. Recombinant interleukin-6 increases the intracellular and extracellular growth of *Mycobacterium avium*. *Can J Microbiol* 1991; 37: 479-83.
- 29 - PERAÇOLI MT, KUOKAWA CS, CALVI SA, MENDES RP, PEREIRA PC, MARQUES SA et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, 2003; 5: 413-8.
- 30 - SANO A, TANABA R, NISHIMURA K, KUOKAWA CS, COELHO KIR, FRANCO M et al. Characteristics of 17 *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycoscience* 1997; 38: 117-22.
- 31 - SOARES AM, CALVI SA, PERACOLI MT, FERNANDEZ AC, DIAS LA, DOS ANJOS AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102: 480-5.
- 32 - BOYUM A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Introduction. Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97: 7.
- 33 - SINGER-VERMES LM, CIAVAGLIA MC, KASHINO SS, BURGER E, CALICH VL. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 261-4.
- 34 - CALVI SA, PERAÇOLI MT, MENDES RP, MARCONDES-MACHADO J, FECCHIO D, MARQUES SA et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect* 2003; 5: 107-13.
- 35 - LANGERMANS JA, VAN DER HULST MEB, NIBBERING PH, VAN FURTH R. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. *Infect Immun* 1992; 60: 5107-12.
- 36 - GREEN SJ, CRAWFORD RM, HOCKMEYER JT, MELTZER MS, NACY CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1990; 145: 4290-7.
- 37 - WU-HSIEH BA, LEE GS, FRANCO M, HOFMAN FM. Early activation of splenic macrophages by tumor necrosis factor alpha is important in determining the outcome of experimental histoplasmosis in mice. *Infect Immun* 1992; 60: 4230-8.
- 38 - MATSIOTA-BERNARD P, LEFEBRE C, SEDQUI M, CORNILLET P, GUENOUNOU M. Involvement of tumor necrosis factor alpha in intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. *Infect Immun* 1993; 61: 4980-3.
- 39 - REINER NE, NG W, WILSON CB, McMASTER WR, BURCHETT SK. Modulation of *in vitro* monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*, interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition to interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest* 1990; 85: 1914-24.

- 40 - BEAMAN L. Effects of recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor on *in vitro* interactions of human mononuclear phagocytes with *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 1991; 59: 4227-9.
- 41 - CARMO JPM, PERAÇOLI MTS, CALVI SA, DIAS LA, TAVIAN EG, SOARES AMVC. Killing of high-virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* by human monocytes: the role of oxygen intermediates. *Ann Rev Biol Med* 2002; special issue, p. 93.
- 42 - SOARES AMVC. Paracoccidioidomycose: estudo de monócitos humanos: atividade fungicida e produção de citocinas. [livre-docência]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2003.
- 43 - DENIS M, GREGG EO. Recombinant tumour necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunology* 1990; 71: 139-41.
- 44 - DENIS M. Interleukin-6 is used as a growth factor by virulent *Mycobacterium avium*: presence of specific receptors. *Cell Immunol* 1992; 141: 182-8.
- 45 - FIGUEIREDO F, ALVES LM, SILVA CL. Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol* 1993; 93:189-94.
- 46 - DE WAAL MALEFYT R, ABRAMS J, BENNETT B, FIGDOR CG, de VRIES JE. Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209-20.
- 47 - SHIRATSUCHI H, HAMILTON B, TOOSI Z, ELLNER JJ. Evidence against a role for interleukin-10 in the regulation of growth of *Mycobacterium avium* in human monocytes. *J Infect Dis* 1996; 173: 410-7.
- 48 - PAUL R, KOEDEL U, WINKLER F, KIESEIER BC, FONTANA A, KOPF M et al. Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis. *Brain* 2003; 126: 1873-82.
- 49 - SCHINDLER R, MANCILLA J, ENDRES S, GHORBANI R, CLARK SC, DINARELLO CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990; 75: 40-7.
- 50 - OSWALD IP, GAZZINELLI RT, SHER A, JAMES SL. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* 1992; 148: 3578-82.
- 51 - KOHASE M, HENRIKSEN-DESTEFANO D, MAY LT, VILCEK J, SEHGAL PB. Induction of beta 2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation. *Cell* 1986; 45: 659-66.
- 52 - JABLONS DM, MULE JJ, MCINTOSH JK, SEHGAL PB, MAY LT, HUANG CM et al. IL-6/IFN-beta-2 as a circulating hormone. Induction by cytokine administration in humans. *J Immunol* 1989; 142: 1542-7.

- 53 - ADERKA D, LE J, VILCEK J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 1989; 143: 3517-23.
- 54 - TAMANDL D, BAHRAMI M, WESSNER B, WEIGEL G, PLODER M, FURST W et al. Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. *Shock* 2003; 20: 224-9.
- 55 - BLANCHARD DK, MICHELINI-NORRIS MB, PEARSON CA, FREITAG CS, DJEU JY. *Mycobacterium avium*-intracellulare induces interleukin-6 from human monocytes and large granular lymphocytes. *Blood* 1991; 77: 2218-24.
- 56 - VAN SNICK J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 253-78.
- 57 - HAVELL EA, SEHGAL PB. Tumor necrosis factor-independent IL-6 production during murine listeriosis. *J Immunol* 1991; 146: 756-61.
- 58 - KONTNY E, ZIOLKOWSKA M, MASLINSKI W. Production of pro-inflammatory cytokines in human monocytes: not a cascade but the dependence on protein kinase C pathway. *Immunol Lett* 1999; 67: 263-7.
- 59 - HELFGOTT DC, TATTER SB, SANTHANAM U, CLARICK RH, BHARDWAJ N, MAY LT et al. Multiple forms of IFN-beta2/IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. *J Immunol* 1989; 142: 948-53.
- 60 - WAAGE A, BRANDTZAEG P, HALSTENSEN A, KIERULF P, ESPEVIKT. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med* 1989; 169: 333-8.
- 61 - VAN DAMME J, SCHAAFSMA MR, FIBBE WE, FALKENBURG JH, OPDENAKKER G, BILLIAU A. Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *Eur J Immunol* 1989; 19: 163-8.
- 62 - MAGEE DM, SMITH JG, BLEICKER CA, CARTER CJ, BONEWALD LF, SCHACHTER J et al. *Chlamydia trachomatis* pneumonia induces in vivo production of interleukin-1 and -6. *Infect Immun* 1992; 60: 1217-20.
- 63 - DENIS M. Growth of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages and its modulation by cytokines; activation of bactericidal activity by interleukin-4 and interleukin-6. *Can J Microbiol* 1991; 37: 253-7.
- 64 - DINARELLO CA. Role of interleukin-1 in infectious diseases. *Immunol Rev* 1992; 127: 119-46.
- 65 - DINARELLO CA, MARNOY SO, ROSENWASSER LJ. Role of arachidonate metabolism in the immunoregulatory function of human leukocytic pyrogen/lymphocyte-activating factor/interleukin 1. *J Immunol* 1983; 130: 890-5.
- 66 - LEVITZ SM, TABUNI A, NONG SH, GOLENBOCK DT. Effects of interleukin-10 on human peripheral blood mononuclear cell responses to *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1996; 64: 945-51.

- 67 - NIHO Y, NIRO H, TANAKA Y, NAKASHIMA H, OTSUKA T. Role of IL-10 in the crossregulation of prostaglandins and cytokines in monocytes. *Acta Haematol* 1998; 99: 165-70.

## **ANEXOS**