

**BIBLIOTECA DIGITAL DE TESES E DISSERTAÇÕES
UNESP**

RESSALVA

Alertamos para ausência de capa, folha de rosto, Introdução, Objetivos e Delineamento Experimental, não incluídos pela autora no arquivo original.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Rodrigues, Daniela Ramos.

Efeito de citocinas sobre a atividade fungicida e fungistática de neutrófilos humanos contra o *Paracoccidioides brasiliensis* / Daniela Ramos Rodrigues. – 2003.

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

Orientadora: Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Assunto CAPES: 21104000

1. Paracoccidioidomicose - Aspectos imunológicos

CDD 616.015

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*; Neutrófilos humanos; Interferon-gamma (IFN- γ); Fator de necrose tumoral-alpha (TFN- α); Fator estimulador de colônias-granulócitos e macrófagos (GM-CSF)

*Trabalho realizado nos laboratórios do
Departamento de Microbiologia e Imunologia
do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu,
com auxílio da Fundação de Amparo à
Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP).*

*Aos doadores de sangue que por altruísmo se dispuseram a participar
deste trabalho.*

“A sabedoria inspira a vida aos seus filhos; ela toma sob a sua proteção aqueles

que a procuram;

Aquele que a ama, ama a vida;

Aqueles que velam para encontrá-la sentirão sua doçura.

Aqueles que a possuem terão a vida como herança, e Deus abençoará todo lugar

onde ele entrar.

Ela o cumula de alegria, desvenda-lhe seus segredos e enriquece-o com tesouros

de ciência, de inteligência e de justiça”

Eclesiástico, 4: 12-14, 20

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Walter** e **Jacira** que são meus exemplos de caráter, dignidade, força e determinação me apoiando em todos os momentos da minha vida.*

Amo vocês.

*Aos meus irmãos, **Eduardo**, **Fernanda** e **Renato** pelo incentivo durante toda a minha trajetória e pelos momentos que não pude estar presente.*

*Ao meu noivo **Fabiano**, por todo amor e carinho, paciência, compreensão e principalmente pelo apoio no final dessa minha caminhada, dividindo comigo os momentos difíceis ou felizes.*

COM CARINHO ESPECIAL

À minha mais que orientadora,

Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, à quem eu admiro,
por suas nobres atitudes, ensinamentos, amizade, dedicação, incentivo e
confiança que me fez crescer não só cientificamente, mas também contribuindo na
minha formação pessoal.

Obrigado pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À você Ângela minha eterna gratidão.

Agradecimentos Especiais

*À **Maria José de Barros Salgado** e **Sandra de Barros Salgado**, minha eterna gratidão por terem me acolhido no início dessa minha caminhada, me apoiando num momento difícil e principalmente pelo carinho, amizade e pelos momentos agradáveis que passamos juntas.*

*À amiga **Maria Antônia Martinez da Palma**, pelos ensinamentos durante toda essa etapa da minha vida, pelo carinho, amizade, dividindo comigo os momentos de conquistas, angústias e de desânimo sempre me ouvindo e me encorajando com sábias palavras.*

*À **Profa. Dra. Alexandrina Sartori**, minha eterna gratidão por ter me acolhido no final dessa minha jornada, pelo apoio em mais esse momento e pela sua amizade.*

O meu muito obrigado.

Agradeço a todos que estiveram comigo nesta caminhada:

*À **Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli**, pela amizade, disponibilidade e solidariedade científica, contribuindo valiosamente para o enriquecimento deste trabalho.*

*Em especial, às amigas que aqui conquistei, **Luciana da Silva Ruiz, Rosana Aparecida Rodrigues Martins, Sueli Calvi, Ana Cláudia Pelizon, Maria Antônia Martinez da Palma (Tó), Márcia Furlan Tavares, Vanessa Zappa**, pela amizade, carinho, confiança, apoio e pelos bons momentos que passamos juntas.*

*Aos meus familiares, **minha avó Amélia, meus tios Aparecido, Guimarim, Jair, Jeanete, Joceli, Norma, Sueli, Wilson, meus primos Bruno, Gláucia e Leonardo** que contribuíram até este momento da minha vida.*

*Ao amigo **João Gustavo Guizelin Pinto**, pelas caronas (Marília), pela amizade, dividindo o cansaço e os momentos agradáveis durante todo o período de Pós-Graduação.*

*À **Profa. Dra. Maria de Fátima Sugizaki** pela amizade e apoio nos momentos difíceis.*

*Aos docentes da Disciplina de Imunologia, **Dra. Alexandrina Sartori, Dr. José Maurício Sforcin, Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, Dr. Ramon Kaneno e Dr. Silvio Luís de Oliveira**, pelo apoio e amizade.*

Aos colegas do laboratório de Imunologia e de Pós-Graduação pela amizade e convívio agradável.

A todos os docentes da Disciplina de Microbiologia pela amizade e convivência agradável.

*Aos funcionários do Depto. de Microbiologia e Imunologia, **Benedito Corrêa, Luiz Henrique Alquati, Maria de Lourdes Alves, Maria Antônia Martinez da Palma (Tó), Roberto de Oliveira Rocha, Benedito Placideli, Luiz Severino dos Santos (Lula), Pedro Miguel Oyan, Maria José de Barros Salgado (Zezé), Paulo Sérgio Ferreira (Paulinho), Leonice Aparecida Garcia (Nice) e Sônia Maria Faraldo**, pela amizade, auxílio e por não terem medido esforços para me ajudar.*

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais pelo apoio.

*À sessão de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial a **Regina Célia Spadim e Nathanael Pinheiro Salles**, pela amizade e colaboração.*

*Às bibliotecárias **Luciana Pizzani, Rosemary Cristina da Silva, Elza Munata,** pela correção das referências bibliográficas, elaboração da ficha catalográfica e pelo auxílio prestado com dedicação.*

*Ao **Sílvio Lavôr,** da Oficina Artes Gráficas, por ser o responsável pela elaboração da capa desta Dissertação, e por prontamente ter me atendido e ajudado.*

*À **FAPESP,** pelo auxílio e suporte financeiro, que viabilizou a execução deste trabalho.*

Em especial aos meus amigos de longa data,

***Ana Beatriz Cavalcanti, Cláudia Azevedo da Silva, Daniela Paz de Almeida, Fabiana Cavalcanti, Fábio Augusto Alvarez, Lisandra Marques Soffner, Luís Roberto Motta Lopes, Nara Francielle Maldonado, Renata Cristina Belizário, Rennê Martins, Rúbia Martins,** pela grande amizade, apoio, paciência, me dando forças para que eu não desanimasse.*

Lista de Abreviaturas

BHI – infusão cérebro coração

CAT – catalase

EDTA – ethylenediamine tetreacetic acid

EP – erro padrão

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

G-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos

GPY – glicose 1,5%, peptona 1% e extrato de levedura 0,5%

Gp43 – glicoproteína 43

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IFN-γ - interferon gama

IL – interleucina

IL 4- interleucina 4

IL 3 – interleucina 3

IL 8 – interleucina 8

IL 10- interleucina 10

IL 12- interleucina 12

IL 15- interleucina 15

Ig- imunoglobulina

LPS – lipopolissacáride de *Escherichia coli* O₅₅B₅

MCCC – meio de cultura de células completo

MO – monócitos

NO – óxido nítrico

O₂ - oxigênio

O₂⁻ - ânion superóxido

PMNs – leucócitos polimorfonucleares

PBS – salina tamponada com fosfatos

RPMI – meio para cultura de células

SOD – superóxido dismutase

TH – linfócitos T helper (auxiliar)

TNF- α - fator de necrose tumoral

UFC – unidades formadoras de colônias

Lista de Figuras

Figura 1. Efeito do IFN- γ sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em cocultura de curta duração (4h). PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de diferentes concentrações de IFN- γ (50,100,250,500 e 1000 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 4 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....16

Figura 2. Efeito do TNF- α sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em cocultura de curta duração (4h). PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de diferentes concentrações de TNF- α (50,100,250,500 e 1000 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 4 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....17

Figura 3. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs ativados com IFN- γ ou TNF- α . PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de IFN- γ (250 U/ml) ou TNF- α (50 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 4 horas e avaliados quanto atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....23

- Figura 4.** Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs pré-ativados com TNF- α . PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de TNF- α (50 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 24 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....25
- Figura 5.** Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (500U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 4 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....30
- Figura 6.** Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (100 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 24 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....31
-

Figura 7. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (50 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT(20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 48 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....32

Figura 8. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungistática de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (500 U/ml) durante 18h, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 4 horas e avaliados quanto a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....36

Figura 9. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungistática de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (100 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 24 horas e foi avaliada a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....37

Figura 10. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungistática de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (50 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 48 horas e avaliados quanto a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....38

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Efeito de IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de longa duração (24h e 48h).
PMNs foram pré-incubados com IFN- γ e TNF- α durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 24h e 48 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectados a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....19
- Tabela 2. Efeito de IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de longa duração (48h).
PMNs foram pré-incubados com IFN- γ e TNF- α durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 48 horas e avaliados quanto a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EPM (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectados a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....21
- Tabela 3. Efeito de GM-CSF sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).
PMNs foram pré-incubados com GM-CSF durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 4h, 24h e 48 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectados a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....27
-

Tabela 4.	Efeito de GM-CSF sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h). PMNs foram pré-incubados com GM-CSF durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do <i>P.brasiliensis</i> por 4h, 24h e 48 horas e avaliados quanto a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectados a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.....	34
-----------	---	----

Sumário

Resumo

1. Introdução.....	31
2. Objetivos.....	41
3. Delineamento Experimental.....	43
4. Material e Métodos.....	44
4.1. Indivíduos Testados.....	45
4.2. Isolamento e Cultura de Neutrófilos Humanos.....	45
4.3. Cultivo do <i>P. brasiliensis</i>	46
4.4. Obtenção das suspensões de <i>P.brasiliensis</i>	46
4.5. Atividade Fungicida e Fungistática de Neutrófilos Humanos.....	47
4.6. Análise Estatística.....	48
5. Resultados.....	51
5.1. Efeito de IFN- γ sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta duração (4h).....	51
5.2. Efeito de IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de longa duração (24 e 48h).....	54
5.3.Efeito do IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de longa duração (48h).....	56
5.4.Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis pré-ativados com IFN- γ e TNF- α em coculturas de curta duração (4h).....	58

5.5. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis pré-ativados com TNF- α em coculturas de longa duração (24h).....	60
5.6.Efeito do GM-CSF sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).....	62
5.7. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis pré-ativados com GM-CSF em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).....	64
5.8. Efeito do GM-CSF sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).....	69
5.9.Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis pré-ativados com GM-CSF em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).....	71
6. Discussão.....	76
7. Conclusões.....	88
8. Referências Bibliográficas.....	90
9. Abstract.....	115
10. Anexos.....	117

Resumo

O papel de citocinas sobre a atividade antifúngica de polimorfonucleares (PMNs) humanos contra o *Paracoccidioides brasiliensis* não está ainda totalmente esclarecido. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel das citocinas: IFN- γ , TNF- α e GM-CSF sobre a atividade fungicida e fungistática de neutrófilos humanos contra a cepa de alta virulência (cepa 18) do *P. brasiliensis*. Estes efeitos foram testados em coculturas de curta (4h) e longa duração (24 e 48h). PMNs não ativados não apresentaram atividade antifúngica. Porém, células pré-ativadas com IFN- γ apresentaram efeito fungicida em cocultura de curta duração (4h). Entretanto, não foi observada atividade fungicida ou fungistática nas coculturas de longa duração (24 e 48h). Os PMNs ativados com TNF- α exibiram atividade fungicida em coculturas de curta e longa duração (4 e 24h), enquanto GM-CSF estimulou PMNs tanto para atividade fungicida, como fungistática em coculturas de curta e longa duração (4, 24 e 48h). Os efeitos antifúngicos de IFN- γ e TNF- α foram inibidos quando foram adicionadas às coculturas catalase (CAT) ou superóxido dismutase (SOD), demonstrando o papel de H₂O₂ e do ânion superóxido no processo. Para as células ativadas com GM-CSF, o ânion superóxido foi o principal metabólito envolvido. Com base nestes dados, o papel das células polimorfonucleares nos estágios iniciais e tardios de desafio com o *P. brasiliensis* é discutido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Indivíduos Testados

Foram utilizados sangue periférico de doadores saudáveis do Banco de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP - Campus de Botucatu. Os doadores assinaram termo de consentimento autorizado, previsto quando da aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina- UNESP- Botucatu.

4.2 Isolamento e Cultura de Neutrófilos Humanos

As diferentes frações celulares do sangue periférico foram inicialmente obtidas em gradiente de Ficoll-Hypaque⁽⁷⁷⁾. Os PMNs foram coletados a partir da fração celular contida no fundo do tubo, através da suspensão das células em tampão Tris com cloreto de amônia (0,85%) para lise das hemácias. Após, a isotonicidade da suspensão foi restaurada com 5ml de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y.) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemical Co. USA), 40 ug/ml de gentamicina. A suspensão celular final foi ressuspensa em meio de cultura especificado acima, acrescido de 10% de soro AB humano inativado (Meio de Cultura de Células Completo: MCCC) sendo a concentração final ajustada para 2×10^6 células viáveis/ml, utilizando coloração por azul tripan. A viabilidade das suspensões utilizadas variou de 90 a 95%. A seguir, a

suspensão celular foi distribuída em placas de cultura de 96 orifícios (100 µl por orifício) e incubadas por 18 h a 37° C em tensão de

5% de CO₂, em presença ou não de IFN-γ recombinante (50,100,250,500 e 1000 U/ml), TNF-α recombinante (50,100,250,500e1000 U/ml) e GM-CSF (50,100,250,500 e 1000 U/ml).

4.3 Cultivo do *P. brasiliensis*

Foi utilizada a cepa 18 de *P. brasiliensis* (Pb 18) mantida em nosso laboratório através de cultivo em meio GPY a 37°C, em tubos de 20 x 20 mm. As culturas foram repicadas semanalmente e utilizadas após 5 ou 6 dias de cultivo.

4.4 Obtenção das suspensões de *P. brasiliensis*

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* foram cultivadas (conforme descrito no item 4.3). Após o crescimento, as células leveduriformes foram removidas da superfície de cultivo através da adição de aproximadamente 10 ml de meio RPMI, transferidas para tubos estéreis contendo pérolas de vidro de 4mm de diâmetro e homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vortex por 30 segundos. Em seguida, as suspensões celulares foram mantidas a 37° C durante 5 minutos para sedimentação de grumos não desfeitos durante a agitação. Após este período, o sobrenadante dessa suspensão foi coletado, sendo uma alíquota da mesma utilizada para contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer utilizando microscópio com contraste de fase. Foram consideradas como células viáveis as que se apresentaram

com aspecto brilhante, uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração escura. A viabilidade das suspensões utilizadas foi maior ou igual a 90%.

4.5 Atividade Fungicida e Fungistática de neutrófilos humanos

Após o período de incubação de 18 h com as citocinas (conforme descrito no item 4.2) as culturas de neutrófilos foram desafiadas com 0.1ml da suspensão de *P. brasiliensis* (4×10^5 leveduras/ml: relação fungo/ neutrófilo 1:200 diluídas em MCCC ou MCCC acrescido de 10% de soro humano AB fresco, como fonte de complemento para o processo de opsonização em presença ou ausência de catalase (CAT:20000 U/ml ou superóxido dismutase (SOD:450 U/ml) Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas as suspensões controles do fungo em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com os neutrófilos. Após um período de 4, 24 e 48 horas as coculturas foram tratadas com água destilada. Este processo permite que os neutrófilos sejam lisados, com conseqüente liberação dos fungos que foram fagocitados. As suspensões obtidas através desse processo foram consideradas como culturas experimentais. O mesmo procedimento foi realizado com as suspensões controles, contendo apenas o fungo (culturas controles).

Ao final do processo, o material obtido, a partir da lavagem com água destilada, das culturas controles e das experimentais resultaram em um volume de aproximadamente 1ml. Esse material, contendo fungos viáveis ou não, foi centrifugado e ressuspenso em volume de água destilada que permitisse o crescimento de, no máximo, 200 colônias de fungos por placa, tornando a leitura das mesmas mais sensíveis. Em seguida, 0,1 ml das suspensões em água destilada foi semeada em três placas contendo meio de cultura BHI, mais 4% de soro de cavalo e 5% de fator de crescimento, preparado a

partir de filtrado de cultura de células leveduriformes do fungo (cepa 192), cultivadas em meio de Casals a 37°C e com agitação (120 rpm) durante 7 dias.

A recuperação dos fungos viáveis foi detectada através da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) após 10 a 14 dias de semeadura e calculada através da seguinte fórmula:

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

Essa fórmula foi utilizada tanto para a detecção de atividade fungicida como para atividade fungistática, nos diferentes períodos de cocultura. No entanto para a atividade fungicida, foram utilizadas as médias das UFC das culturas experimentais obtidas após cada um dos períodos de cocultura testados, em relação à média das UFC das culturas controles obtidas à 0 hora. Para a atividade fungistática foram utilizadas as médias das UFC das culturas experimentais obtidas após cada um dos períodos de coculturas testados, em relação a média das UFC das culturas controles obtidas em cada período.

4.6. Análise Estatística

Os procedimentos estatísticos foram desenvolvidos empregando-se o programa Graph Pad Software, San Diego, CA, USA, 1993 ⁽⁷⁸⁾. Os resultados entre os grupos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) para amostras dependentes

seguida de comparação pelo método de Tukey. O nível de significância adotado para todos os testes foi de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Efeito de IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta duração (4h).

Os resultados relativos ao IFN- γ são mostrados na Figura 1. Observamos que os PMNs não ativados não apresentaram atividade fungicida significativa contra o *P.brasiliensis*, em ensaios de curta duração (4h), uma vez que a porcentagem de recuperação fúngica foi bastante alta (125 %).

No entanto, após a pré-ativação com IFN- γ as células adquiriram atividade fungicida contra o fungo, de modo dose dependente, uma vez que resultados estatisticamente significativos foram obtidos com a concentração de 250 U/ml.

Na Figura 2 podem ser analisados os resultados relativos a pré-ativação com TNF- α . Podemos observar que, de forma semelhante ao detectado para o IFN- γ , essa citocina induziu as células a uma eficiente atividade fungicida, com resultados significativos, obtidos com a concentração de 50 U/ml. Assim, em experimentos posteriores com as duas citocinas utilizamos as doses de 250 U/ml e 50 U/ml para o IFN- γ e TNF- α , respectivamente.

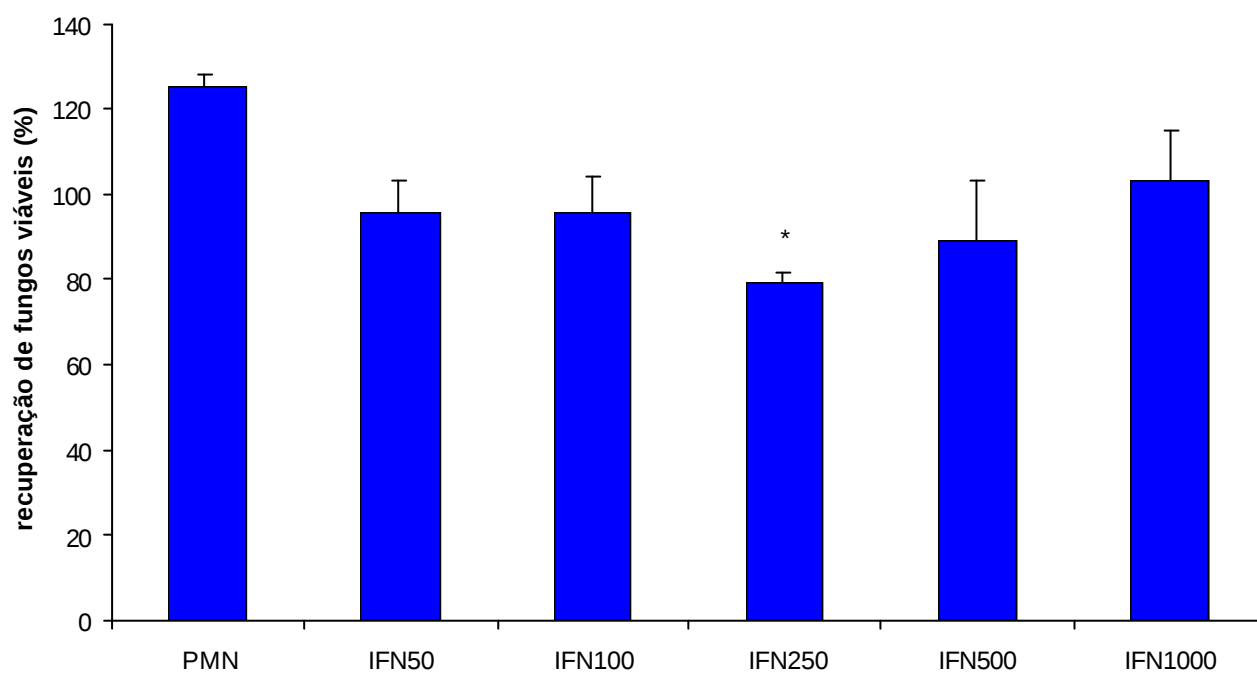


Figura 1 Efeito do IFN- γ sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em cocultura de curta duração (4h). PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de diferentes concentrações de IFN- γ (50,100,250,500 e 1000 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 4 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN.

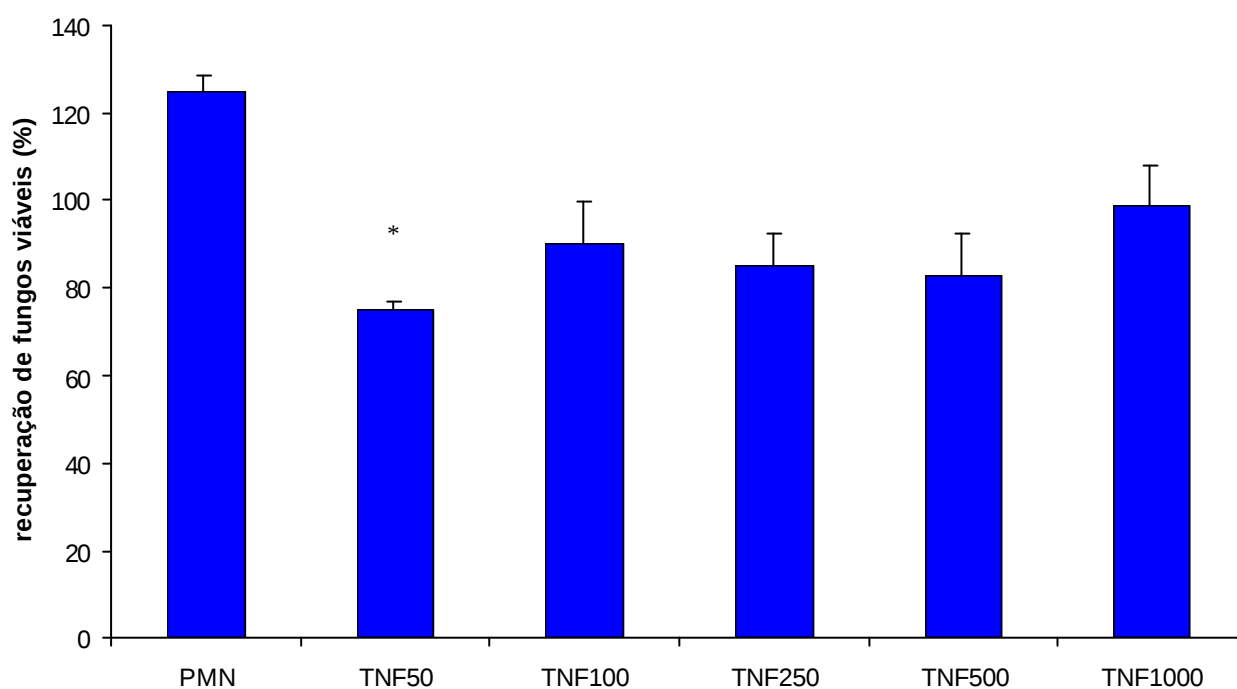


Figura 2. Efeito do TNF- α sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em cocultura de curta duração (4h). PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de diferentes concentrações de TNF- α (50,100,250,500 e 1000 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 4 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

5.2. Efeito de IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de longa duração (24h e 48h).

Os resultados são mostrados na Tabela 1. Observamos que os PMNs, não ativados, de forma semelhante ao detectado para o ensaio de 4 horas, não apresentaram atividade fungicida eficiente contra o fungo. Quando as células foram ativadas com IFN- γ ou TNF- α , uma atividade significativa foi detectada apenas com TNF- α nos ensaios de cocultura de 24 horas (% de recuperação de fungos viáveis = 70%). Nos ensaios, utilizando coculturas de 48 horas ambas as citocinas, não induziram as células à destruição do fungo.

Tabela 1. Efeito de IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de longa duração (24h e 48h).

PMN Pré-ativação	(%) Recuperação de fungos viáveis	
	24 h	48 h
PMN	90,0 $\pm$ 9.3	110 $\pm$ 27
PMN +IFN- γ (250 U/ml)	92,2 $\pm$ 13.2	100 $\pm$ 26
PMN +TNF- α (50 U/ml)	70,3 $\pm$ 6.4 *	110 $\pm$ 23

PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de IFN- γ ou TNF- α durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P.brasiliensis* por 24 horas e 48 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* p < 0,05 vs PMN.

5.3. Efeito do IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de longa duração (48h).

Em função dos resultados negativos ao papel do IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungicida em coculturas de longa duração, interessou-nos avaliar se as citocinas, pelo menos, induziriam as células a uma atividade fungistática contra o fungo após o desafio de 48 horas.

Como pode ser observado na Tabela 2, PMNs estimulados tanto com IFN- γ como por TNF- α , não apresentaram atividade fungistática contra o fungo, uma vez que foram detectadas altas porcentagens de recuperação de fungos viáveis.

Tabela 2. Efeito de IFN- γ e TNF- α sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de longa duração (48h).

PMN Pré-ativação	(%)Recuperação de fungos viáveis
	48 h
PMN	100,1 $\pm$ 15.3
PMN + IFN- γ (250 U/ml)	100,1 $\pm$ 7.3
PMN + TNF- α (250 U/ml)	120,1 $\pm$ 27.3

PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de IFN- γ ou TNF- α durante 18 horas e desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 48 horas e avaliados quanto a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

5.4. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis pré-ativados com IFN- γ e TNF- α em coculturas de curta duração (4h).

Como tanto o IFN- γ como o TNF- α ativaram os PMNs para a aquisição de atividade fungicida em ensaio de (4h), conduzimos experimentos com o objetivo de determinar o envolvimento de H₂O₂ e O₂⁻ nesta atividade, incubando as células, durante o desafio com o fungo, com CAT e SOD. Os resultados podem ser analisados na Figura 3.

Como detectado previamente; neutrófilos ativados com IFN- γ ou TNF- α exibiram uma atividade fungicida significativa em ensaio de 4h.

Entretanto a atividade induzida pelas duas citocinas foi interrompida por CAT e SOD demonstrando tanto o envolvimento de H₂O₂ como de O₂⁻ na destruição do *P.brasiliensis* por PMNs ativados por essas citocinas.

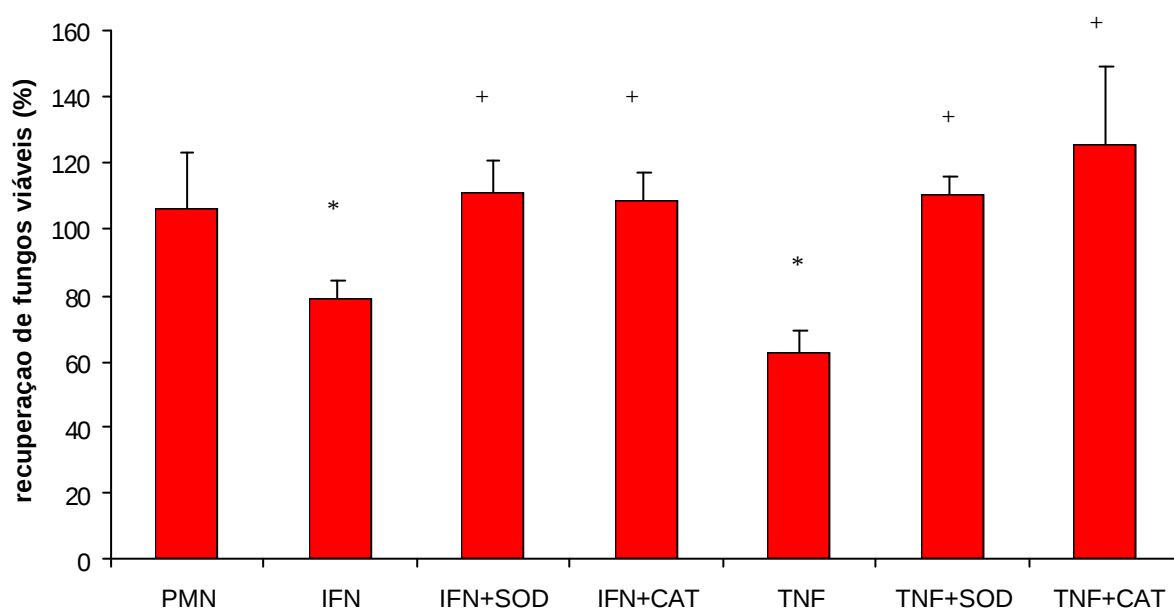


Figura 3. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs ativados com IFN- γ ou TNF- α . PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de IFN- γ (250 U/ml) ou TNF- α (50 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 4 horas e avaliados quanto atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

+ $p < 0,05$ vs IFN- γ ou TNF- α

5.5. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis pré-ativados com TNF- α em coculturas de longa duração (24h).

De forma semelhante aos experimentos anteriores, avaliamos o papel da H_2O_2 e do O_2^- sobre a atividade fungicida induzida pelo TNF- α em cocultura de longa duração (24h).

Os resultados foram semelhantes aos observados para os ensaios de 4h, uma vez que a atividade fungicida apresentada pelas células pré-ativadas com TNF- α foi abolida quando as mesmas foram desafiadas com o *P.brasiliensis* na presença de CAT ou SOD.

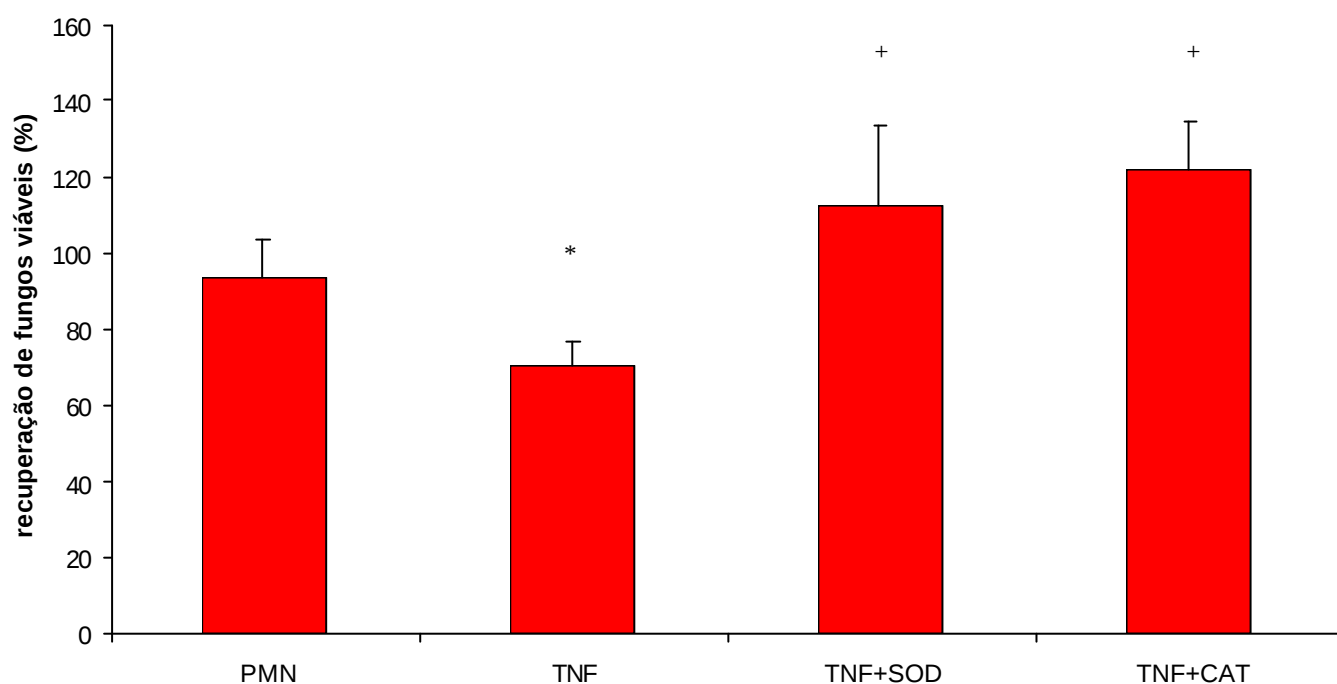


Figura 4. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs pré-ativados com TNF- α . PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de TNF- α (50 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 24 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

+ $p < 0,05$ vs TNF- α

5.6 Efeito do GM-CSF sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).

Os resultados utilizando a citocina em diversas concentrações são mostrados na Tabela 3.

Como esperado, não foram detectadas atividades fungicidas significativas com as culturas não ativadas. No entanto a pré-ativação com GM-CSF induziu-as a atividade fungicida significativa nos três períodos de avaliação.

No entanto, as concentrações da citocina necessárias para essa atividade, foram diferentes para cada período, sendo de 500,100 e 50 U/ml para os ensaios de 4, 24 e 48 horas respectivamente.

Tabela 3 . Efeito do GM-CSF sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).

PMN Pré-ativação	PMN (%) Recuperação de fungos viáveis		
	4 h	24 h	48 h
PMN	89 ± 5	114 ± 6	253 ± 34
PMN + GM-CSF (50 U/ml)	77 ± 9	95 ± 8	159 ± 16 *
PMN +GM-CSF(100 U/ml)	74 ± 8	86 ± 11 *	210 ± 18
PMN +GM-CSF(250 U/ml)	84 ± 14	98 ± 12	208 ± 45
PMN +GM-CSF(500 U/ml)	61 ± 9 *	100 ± 10	170 ± 23
PMN+GM-CSF(1000 U/ml)	89± 14	96± 12	179± 27

PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de diferentes concentrações de GM-CSF durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* por 4h, 24h ou 48 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média ± EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* p < 0,05 comparados ao PMN nos respectivos períodos de cocultura.

5.7. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis pré-ativados com GM-CSF em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).

Uma vez estabelecida a participação do GM-CSF sobre a atividade fungicida de PMNs humanos em coculturas de curta e longa duração, realizamos ensaios semelhantes aos já descritos para IFN- γ e TNF- α com o objetivo de estabelecer o envolvimento dos metabólitos do O₂, sobre esse processo. Os experimentos foram realizados, em cada um dos períodos de cocultura. (Figuras 5,6 e 7).

As concentrações de GM-CSF utilizadas foram as estabelecidas a partir dos resultados apresentados na Tabela 3.

Os experimentos realizados com as coculturas de 4 horas são apresentados na Figura 5. Observamos que a incubação com SOD aumentou levemente a % de recuperação de fungos viáveis, em relação a detectada com a pré-incubação com TNF α e desafio com o fungo na ausência da droga. No entanto, os resultados não foram significativos. De forma semelhante, a CAT não exerceu nenhum efeito.

Na Figura 6 são apresentados os resultados relativos ao período de cocultura de 24 horas.

Observamos que de forma diferente ao período de 4 horas, o desafio das células pré-ativadas na presença de SOD aboliram de forma

significativa a atividade fungicida. Em relação à CAT, observamos um aumento na porcentagem de recuperação de fungos viáveis, quando comparada à detectada com as células pré-ativadas e desafiadas na ausência da droga; no entanto os resultados não foram estatisticamente significativos.

Os resultados detectados no período de cocultura de 48 horas são mostrados na Figura 7.

Observamos de uma forma bastante clara que tanto a SOD quanto a CAT inibiram a atividade fungicida apresentada pelas células ativadas, comprovando a participação do O_2^- e da H_2O_2 no processo de destruição do *P.brasiliensis* por células pré-ativadas por GM-CSF.

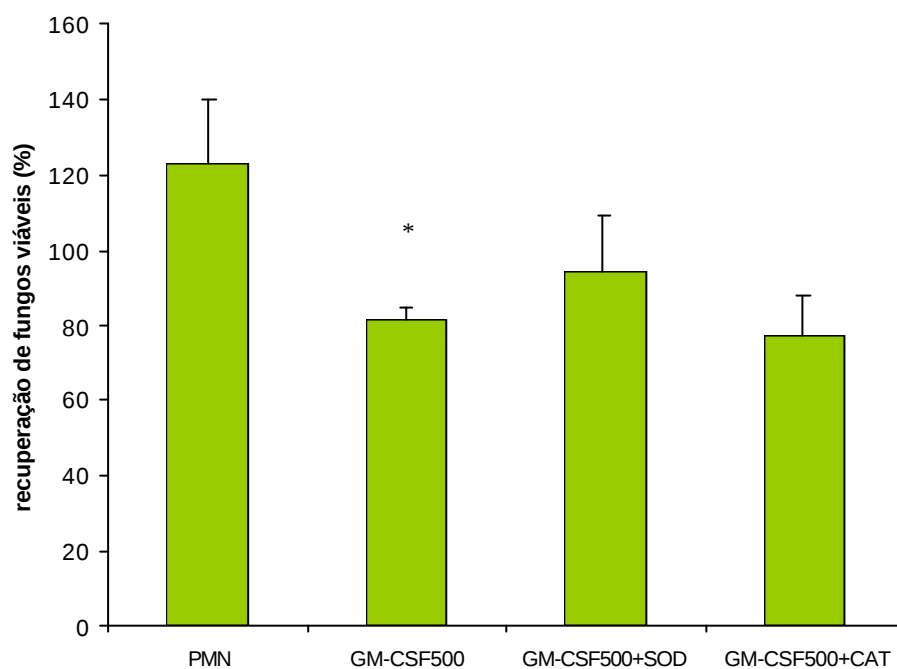


Figura 5. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (500U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 4 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

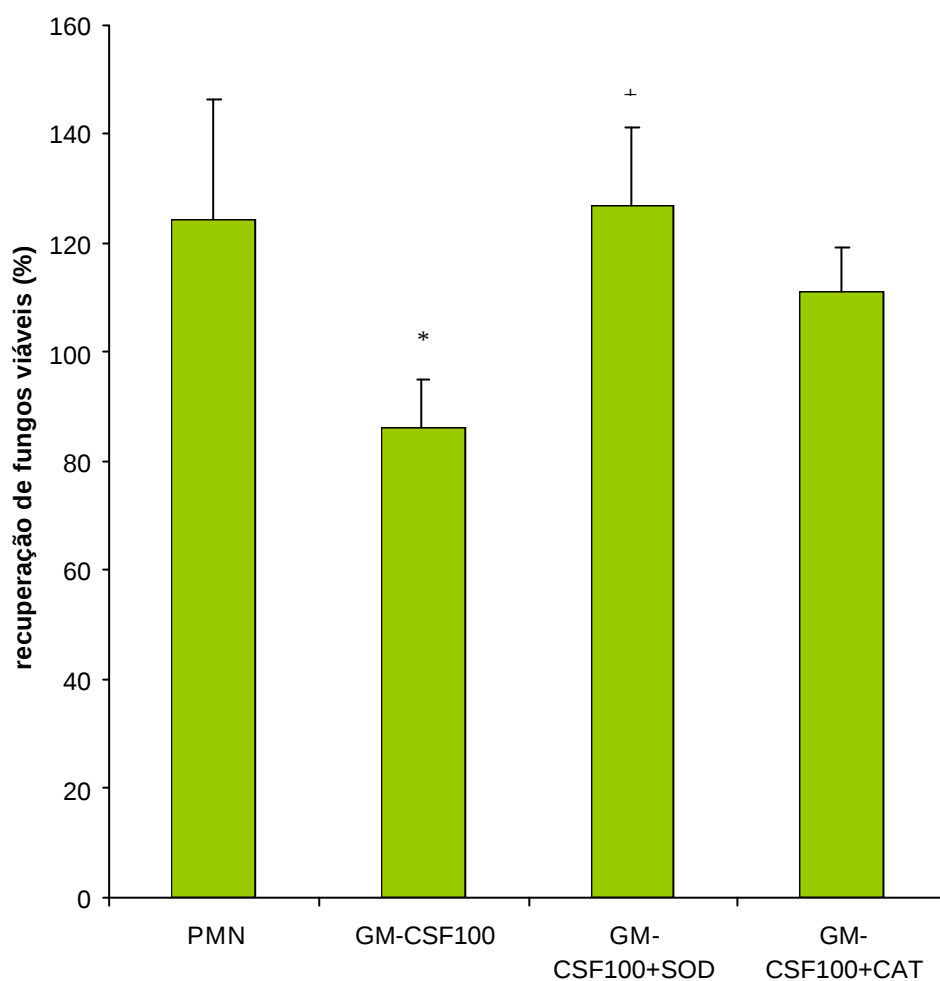


Figura 6. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (100 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 24 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

+ $p < 0,05$ vs GM-CSF 100

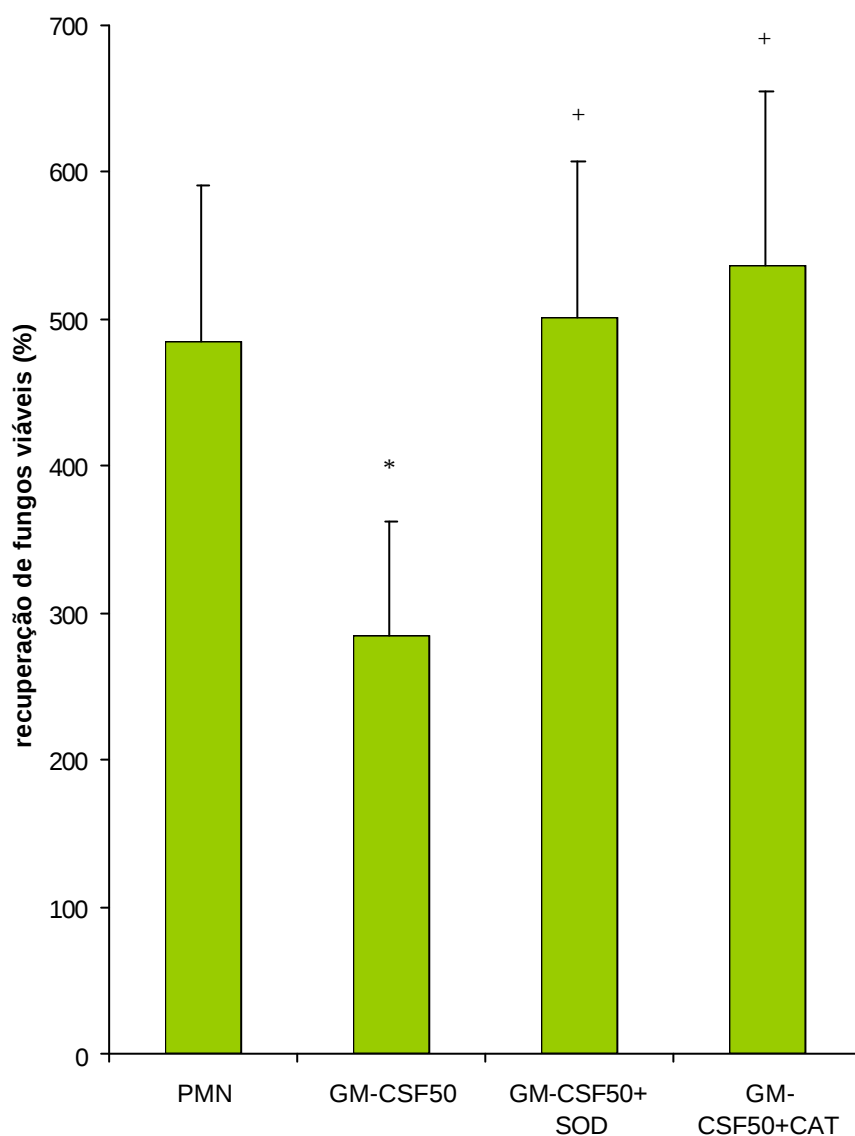


Figura 7. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungicida de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (50 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P.brasiliensis* na presença ou ausência de CAT(20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 48 horas e avaliados quanto a atividade fungicida. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

+ $p < 0,05$ vs GM-CSF 50

5.8. Efeito do GM-CSF sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).

De forma semelhante aos ensaios de atividade fungicida, os PMNs pré-ativados com GM-CSF apresentaram atividade fungistática contra o fungo nos 3 períodos de cocultura avaliados. As concentrações que apresentaram resultados significativos foram as mesmas detectadas nos ensaios de atividade fungicida (500,100 e 50 u/ml) para os períodos de 4, 24 e 48 horas de cocultura, respectivamente.

Tabela 4. Efeito de GM-CSF sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).

PMN Pré-ativação	PMN (%) Recuperação de fungos viáveis		
	4 h	24 h	48 h
PMN	97 ± 4	98 ± 8	109 ± 24
PMN + GM-CSF (50 U/ml)	104 ± 27	78 ± 10	65 ± 9 *
PMN +GM-CSF(100 U/ml)	94 ± 18	67 ± 7 *	85 ± 13
PMN+GM-CSF (250 U/ml)	107 ± 15	85 ± 13	99 ± 29
PMN+GM-CSF (500 U/ml)	67 ± 11 *	87 ± 12	67 ± 11
PMN+GM-CSF(1000 /ml)	96 ± 15	82 ± 10	75 ± 16

PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P.brasiliensis* por 4h, 24h e 48 horas e avaliados quanto a atividade fungistática. Os resultados representam a média + EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* p < 0,05 comparados ao PMN nos respectivos períodos de cocultura.

5.9. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungistática de PMNs obtidos de indivíduos saudáveis pré-ativados com GM-CSF em coculturas de curta (4h) e longa duração (24h e 48h).

A Figura 8 mostra que quando PMNs ativados com GM-CSF foram desafiados com *P.brasiliensis* por 4 horas na presença de SOD, a atividade fungistática foi quase que totalmente abolida, demonstrando o papel do ânion superóxido nesse processo. A catalase também apresentou efeito inibitório sobre a fungistase, mas os resultados não foram estatisticamente significativos. Resultados semelhantes podem ser discutidos para os ensaios de 24 horas (Figura 9).

Nos ensaios de 48 horas, tanto a SOD quanto a CAT mostraram efeitos inibitórios significativos sobre a atividade fungistática.

O conjunto dos resultados relativos a pré-incubação de PMNs com GM-CSF permite-nos concluir que esta citocina ativa essas células para o desenvolvimento tanto de atividade fungistática como fungicida em coculturas de curta e longa duração. No entanto, o mecanismo efetor envolvido na primeira parece envolver principalmente o ânion superóxido, enquanto que a atividade fungicida é mediada tanto por ânion superóxido, como pela H_2O_2 .

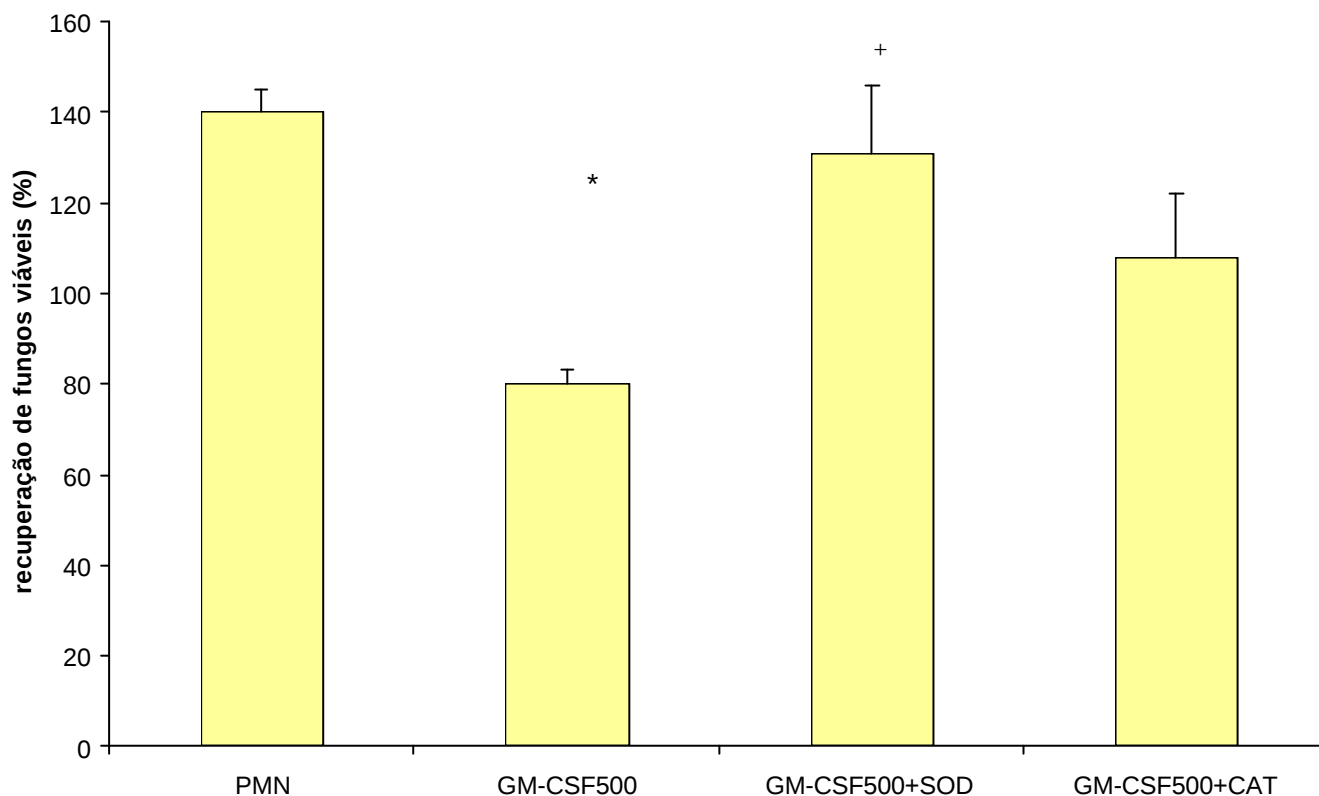


Figura 8. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungistática de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (500 U/ml) durante 18h, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 4 horas e avaliados quanto a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

+ $p < 0,05$ vs GM-CSF 500

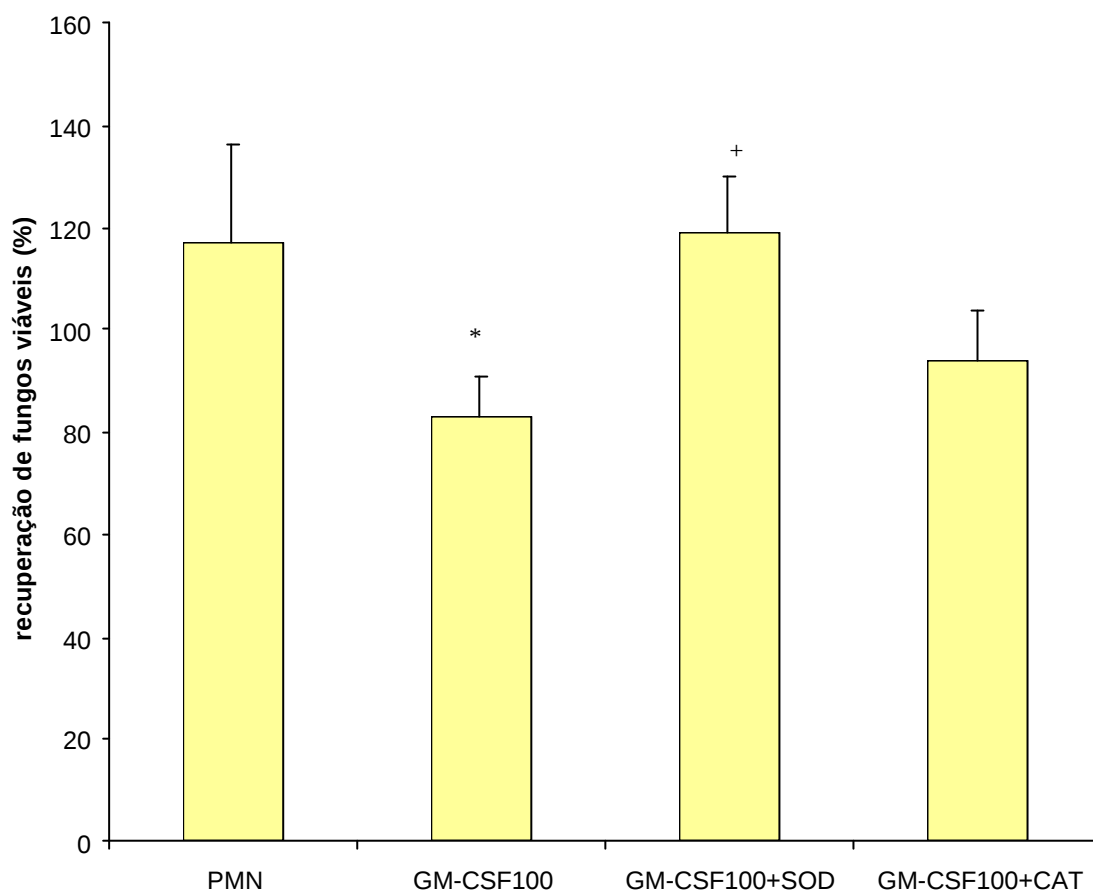


Figura 9. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungistática de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (100 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 24 horas e foi avaliada a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

+ $p < 0,05$ vs GM-CSF 100

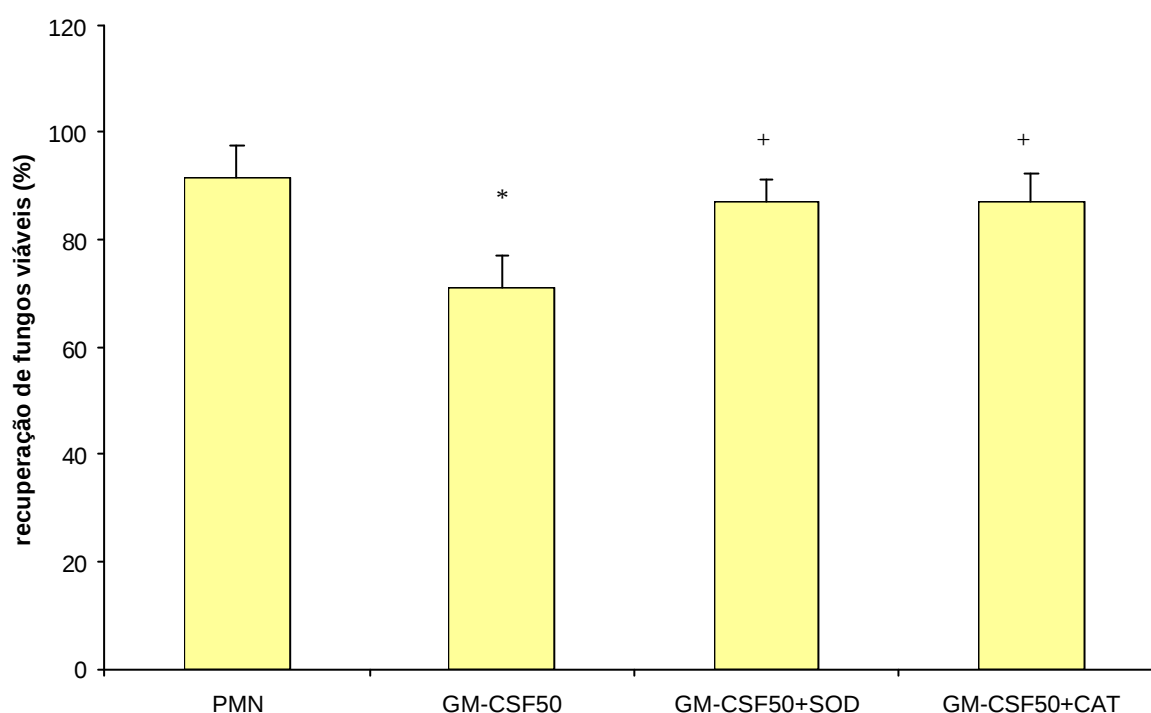


Figura 10. Efeito da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) sobre a atividade fungistática de PMNs pré-ativados com GM-CSF. PMNs foram pré-incubados na ausência (PMNs) ou presença de GM-CSF (50 U/ml) durante 18 horas, desafiados com a cepa 18 do *P. brasiliensis* na presença ou ausência de CAT (20000 U/ml) ou SOD (450 U/ml) por 48 horas e avaliados quanto a atividade fungistática. Os resultados representam a média $\pm$ EP (erro padrão) da porcentagem de recuperação de fungos viáveis detectadas a partir de PMNs obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* $p < 0,05$ vs PMN

+ $p < 0,05$ vs GM-CSF 50

6. Discussão

Nos últimos anos, vários trabalhos, têm estabelecido definitivamente que os PMNs, de forma semelhante aos macrófagos, podem ter as suas funções altamente reguladas por citocinas liberadas por outras células como mastócitos, queratinócitos, macrófagos, linfócitos CD₄⁺ e os próprios PMNs ^(76,79,80,81,82).

Essas citocinas podem aumentar a quimiotaxia de neutrófilos aos sítios inflamatórios, a atividade fagocítica, a produção de radicais livres do O₂ e a liberação de enzimas lisossomais que resultam em um aumento da atividade citotóxica, bactericida e mesmo fungicida dessas células. Esses achados fizeram com que o papel dos PMNs nas várias infecções fosse reavaliado no sentido de considerar uma participação mais dinâmica e efetora dessas células, tanto em uma fase precoce, em que representaria um dos componentes da resposta imune inata, como em fases posteriores, participando da resposta imune específica.

No entanto, na paracoccidioidomicose, são raros os trabalhos com o objetivo de estabelecer o real papel dessas células nos mecanismos de defesa contra o fungo, com destaque tanto para os fatores de ativação como os liberados pelas mesmas na resposta ao fungo ^(75,76). Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de citocinas como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF sobre as atividades fungicida e fungistática de PMNs humanos desafiados *in vitro* com cepa de alta virulência do fungo. Além disso, os mecanismos antifúngicos efetores destas células foram avaliados, sendo, este o primeiro trabalho na literatura com esse objetivo.

Nossos resultados indicam que PMNs não ativados não desenvolvem atividade antifúngica. Estes resultados diferem dos obtidos por Kurita et al.⁽⁷⁶⁾ uma vez que estes autores detectaram que PMNs humanos, não ativados apresentam efeito fungistático contra *P.brasiliensis* em cocultura de longa duração. Esta discrepância pode ser explicada por diferenças na virulência das cepas usadas nos dois estudos.

Nossos resultados revelaram que PMNs ativados com IFN- γ apresentam um efeito fungicida sobre *P.brasiliensis*, em coculturas de curta duração (4h). Resultados diferentes no entanto, foram detectados, em coculturas de longa duração (24h e 48h), uma vez que essa citocina não estimulou as células a apresentar atividade fungicida, nem tão pouco fungistática, em ensaios de 48h.

Esses resultados estão parcialmente de acordo com os de Kurita et al.⁽⁷⁶⁾. Estes autores detectaram que PMNs ativados com IFN- γ apresentam atividade fungicida contra um determinado isolado de *P.brasiliensis* em coculturas de 4h e 24h. No entanto, sobre outro isolado, esta citocina induziu apenas um efeito fungistático. A atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* também foi apresentada por neutrófilos murinos ativados com essa citocina⁽⁷⁵⁾ Outros trabalhos têm demonstrado que PMNs humanos apresentam atividade microbicida após a ativação com IFN- γ e desafio com *Staphylococcus aureus*⁽⁸³⁾ e *Entamoeba histolytica*⁽⁸⁴⁾. Adicionalmente, essa citocina ativa PMNs murinos *in vitro*, para que essas células apresentem atividade fungicida contra *Blastomyces dermatitides*⁽⁸⁵⁾.

Pacientes com doença granulomatosa crônica (CGD), uma síndrome rara em que os fagócitos apresentam defeitos no processo de geração dos produtos do “burst” oxidativo, são suscetíveis a desenvolverem aspergilose e candidíase invasivas. No entanto, o tratamento de neutrófilos de pacientes com IFN- γ restaurou parcialmente o defeito, assim como a capacidade dessas células de destruir hifas de *Aspergillus fumigatus in vitro* ^(86,87). Adicionalmente o IFN- γ induz PMNs de indivíduos normais a apresentarem atividade contra hifas de *C. albicans* e *A. fumigatus in vitro* ^(88,89) assim como a destruição intracelular de blastóporos de *C. albicans* ⁽⁹⁰⁾.

Estudos têm demonstrado o efeito protetor do IFN- γ na candidíase experimental murina, mesmo após o estabelecimento da infecção por alguns dias. Em camundongos imunossuprimidos pelo pré-tratamento com hidrocortisona, o IFN- γ também reduziu o crescimento do fungo nos órgãos. No entanto, o efeito benéfico do IFN- γ na candidíase disseminada foi abolido pelo pré-tratamento dos animais com ciclofosfamida sugerindo que o efeito dessa citocina foi mediado por ativação de PMNs. Esses resultados foram reforçados pela detecção de atividade fungicida aumentada contra *C. albicans* de neutrófilos peritoneais e do sangue periférico de camundongos tratados com IFN- γ ⁽⁹¹⁾.

O envolvimento do IFN- γ no processo de ativação de PMNs para a destruição do *P. brasiliensis* reforça o papel dessa citocina nos mecanismos de resistência na paracoccidioidomicose, demonstrado tanto em estudos com células de pacientes ^(92,93,94) como em modelos experimentais ^(29,95,96).

Em modelo murino experimental de suscetibilidade e resistência ao fungo, a infecção intraperitoneal em animais resistentes esteve associada a uma

produção sustentada de IFN- γ . No caso da infecção intratraqueal, no pulmão de animais suscetíveis foram detectados altos níveis de IFN- γ , mas também de IL-4, IL-5 e IL-10 quando comparados as resistentes. No entanto, em ambas as linhagens, a neutralização de IFN- γ endógeno induziu uma exacerbação da infecção pulmonar, disseminação precoce da doença para o fígado e baço, diminuição da resposta de hipersensibilidade tardia, e dos níveis de anticorpos específicos IgG₁ e IgG_{2b}, aumento substancial da carga fúngica e alteração do padrão granulomatoso das lesões que passaram do tipo compacto, para um infiltrado inflamatório difuso, rico em fungos⁽⁹⁶⁾.

A necessidade de ativação dos PMNs com IFN- γ , para apresentação de atividade antifúngica, sugere que essas células seriam eficazes somente a partir da interação com fatores da resposta imune específica, representada principalmente por células TCD₄⁺ TH₁. No entanto, esse mecanismo poderia ser garantido já na resposta imune inata, quando a fonte de IFN- γ seria as células “Natural Killer” (NK), embora não existam trabalhos demonstrando que o *P. brasiliensis* induz a produção de IFN- γ por essas células, em uma fase precoce da infecção.

No entanto, as células NK secretam IFN- γ em resposta a *Listeria monocytogenes* 6 horas após a infecção de camundongos com níveis máximos detectados às 24 horas⁽⁹⁷⁾. Outros trabalhos têm demonstrado que *C. albicans* e *C. neoformans* podem diretamente ligarem-se às células T e NK e estimular a expressão do gene e liberação de IFN- γ ⁽⁹⁸⁾.

O TNF- α foi outra citocina testada em nosso sistema. Os efeitos antifúngicos foram muito semelhantes aos exibidos pelas células ativadas com

IFN- γ , exceto pelo efeito fungicida apresentado por TNF- α em 24h, não detectado com IFN- γ . Estes resultados em relação ao TNF- α não estão de acordo com aqueles apresentados por Kurita et al.^(75,76) uma vez que estes autores demonstraram que TNF- α não tem efeito sobre a atividade fungicida de PMNs humanos e murinos.

No entanto, o TNF- α tem uma ação importante sobre PMNs aumentando a migração, aderência, degranulação e o “burst” respiratório dessas células^(72,73). A incubação de PMNs com TNF- α aumenta a destruição intracelular de *C. albicans*⁽⁹⁹⁾ enquanto que essa citocina diminui substancialmente a destruição extracelular de hifas desse microrganismo⁽¹⁰⁰⁾.

O tratamento com anticorpo monoclonal anti TNF- α ou inibidores farmacológicos dessa citocina aumentou a taxa de mortalidade e o crescimento de *C. albicans* durante a evolução de candidíase disseminada em camundongos^(101,102,103). Esse efeito do anti- TNF- α não foi observado em animais neutropênicos, reforçando as observações *in vitro* indicando que o TNF- α é importante no processo de ativação de PMNs para a destruição de *C. albicans* e que a neutralização dessa citocina inibe essa atividade sobre as leveduras.

De forma semelhante ao discutido para o IFN- γ , a capacidade do TNF- α em ativar PMNs para a aquisição de atividade fungicida contra o *P. brasiliensis*, reforça o seu papel nos mecanismos de resistência ao fungo. Trabalhos têm demonstrado que monócitos humanos desafiados com cepa virulenta do fungo adquirem atividade fungicida somente após a ativação com IFN- γ em concentrações adequadas de TNF- α ^(45,104).

Além da ativação sobre células fagocitárias, o papel protetor do TNF- α pode se estender no sentido de estimular a resposta de outras citocinas inflamatórias, aumentar a permeabilidade celular do endotélio vascular e posterior recrutamento de outras células efectoras, representando um fator determinante no processo inflamatório da micose^(105,106,107).

Assim essa citocina produzida por macrófagos, em resposta a componentes da parede celular do *P. brasiliensis*⁽¹⁰⁸⁾ pode ser importante para o processo de acúmulo de macrófagos e diferenciação de células epitelióides e persistência dos granulomas formados⁽¹⁰⁹⁾.

Souto et al⁽¹¹⁰⁾, demonstraram que camundongos geneticamente deficientes de IFN- γ ou do receptor de TNF- α , foram incapazes de controlar a infecção por *P. brasiliensis*. Animais deficientes de IFN- γ apresentaram lesões constituídas por infiltrado inflamatório composto de poucos neutrófilos, células mononucleares, epitelióides e gigantes, compondo um granuloma bastante incipiente. Animais deficientes do receptor de TNF- α , não desenvolveram resposta granulomatosa. Assim, os autores discutem o papel das duas citocinas na formação do granuloma e no controle da disseminação fúngica.

De forma semelhante ao IFN- γ , a ativação de PMNs por TNF- α , pode ocorrer em uma fase precoce da resposta imune. Essa citocina pode ser liberada pelo macrófago ou mesmo pelo PMN ativado pelo fungo, processo em que atuaria de uma forma autócrina. Em relação ao macrófago trabalhos em nosso laboratório têm demonstrado que monócitos e macrófagos de pacientes encontram-se em

estado ativado determinado pela elevada capacidade de produzir citocinas, incluindo TNF- α ⁽¹¹¹⁾.

Assim, a fonte de TNF- α para a ativação de PMNs nos estágios iniciais de infecção pode ser o macrófago alveolar ativado pelos antígenos do fungo.

Uma terceira citocina testada neste trabalho foi o GM-CSF. Esta citocina demonstrou alta capacidade em ativar PMNs humanos para atividades antifúngicas, uma vez que induziu estas células ao desenvolvimento de atividade fungicida e fungistática em coculturas de curta e longa duração (4h, 24h e 48h).

Trabalhos têm demonstrado que tanto o GM-CSF como o G-CSF aumentam a ativação de neutrófilos, entretanto o GM-CSF é considerado como sendo mais potente que o G-CSF no sentido de ativar os PMNs para aumento do “burst” respiratório com produção principalmente de ânion superóxido ^(71,74,112). No entanto, a capacidade do GM-CSF em aumentar o “burst” respiratório, depende de um segundo sinal fornecido por N-formyl peptídeos, C₅a e o leucotrieno B₄ ⁽¹¹³⁾, tendo portanto essa citocina o papel de primar PMNs para essa função.

Takahashi et al ⁽¹¹⁴⁾, demonstrou que o GM-CSF induz tanto monócitos como neutrófilos a produzir IL-8. Os autores sugerem que a função ativadora dessa citocina sobre os neutrófilos seria mediada por IL-8.

Os trabalhos citados acima permite-nos discutir que no presente trabalho, a atividade fungicida adquirida por PMNs humanos pré-ativados com GM-CSF foi possível devido principalmente a liberação do ânion superóxido, ocorrido após “priming” fornecido via GM-CSF e um segundo sinal dado pelo próprio fungo.

Não podemos também descartar a possibilidade de que o efeito observado seja devido a IL-8, liberada nos sobrenadantes das coculturas. No entanto, Kurita et al ⁽⁷⁶⁾, demonstraram que a IL-8 não induz neutrófilos humanos a apresentarem atividade anti *P. brasiliensis*.

Djeu et al ⁽¹¹⁵⁾, demonstrou que a atividade de PMNs contra *C. albicans* pode ser regulada por linfócitos grandes granulares (LGL) via liberação de fatores ativadores de PMNs, como o TNF- α e o IFN- γ . No entanto, anticorpo contra essas citocinas não neutralizou completamente a atividade ativadora dos PMNs, indicando que um outro fator poderia estar envolvido. Em trabalho posterior Blanchard et al ⁽¹¹⁶⁾, demonstraram que linfócitos grandes granulares estimulados com *C. albicans* produzem GM-CSF que estimulam a capacidade dos neutrófilos inibir o crescimento desse fungo.

A possibilidade de células LGL representadas provavelmente por células NK, de liberarem GM-CSF em resposta a fungos, reforça a nossa idéia de que o processo de ativação de PMNs, para a aquisição de atividade antifúngica contra o *P. brasiliensis* possa ocorrer em uma fase precoce da resposta imune a esse fungo.

No presente trabalho, os estudos relativos aos mecanismos efetores envolvidos nas atividades antifúngicas de PMNs humanos mostraram que a atividade fungicida apresentada por IFN- γ e TNF- α foi revertida por SOD e CAT, demonstrando o papel do ânion superóxido e H₂O₂. Para as células ativadas com GM-CSF, o papel destes metabólitos variou, dependendo do tempo das coculturas e o efeito testado, se

fungistático ou fungicida. A atividade fungicida em 4h não foi significativamente revertida por SOD ou CAT. No entanto, esses inibidores

apresentam efeito sobre a atividade fungicida em ensaios de 24h e 48h. Sobre a atividade fungistática, SOD teve um efeito inibitório sobre ensaios de 4h e 24h. Em 48h ambas, SOD e CAT, foram capazes de reverter o efeito. Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que para PMNs ativados com IFN- γ e TNF- α , os mecanismos antifúngicos são mediados por H₂O₂ e ânion superóxido. Para células ativadas com GM-CSF, o ânion superóxido parece ser o principal metabólito de O₂ envolvido.

Em relação ao envolvimento de H₂O₂, os resultados estão de acordo com os obtidos em nosso laboratório para monócitos humanos ativados com IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF ^(117,118), uma vez que a atividade fungicida destas células foi inibida por CAT, mas não por SOD ou pelo inibidor de óxido nítrico. O papel do metabolismo oxidativo sobre as funções efectoras de PMNs contra *P.brasiliensis* já foi sugerido também em sistema murino. PMNs de camundongos sensibilizados com *P.brasiliensis* exibiram atividade fungicida eficiente associada a um aumento no metabolismo oxidativo destas células ⁽⁶⁴⁾.

Em modelo experimental murino de suscetibilidade e resistência ao *P. brasiliensis*, a produção de H₂O₂ por PMNs de camundongos resistentes aumentou durante a infecção, enquanto a dos suscetíveis permaneceu em níveis baixos. A produção de ânion superóxido permaneceu inalterada nos animais resistentes e

diminuída nos suscetíveis indicando que os PMNs desses animais perderam a capacidade de produzir esse metabólito com a evolução da infecção⁽⁶⁷⁾.

Os metabólitos do oxigênio também são importantes na destruição por neutrófilos, de hifas de *A. fumigatus*, *C. albicans*, *Blastomyces dermatitides* e *Histoplasma capsulatum*^(100,119,120,121,122,123,124).

Os nossos resultados mostrando que somente PMNs humanos ativado desenvolvem atividade antifúngica contra o *P. brasiliensis* e que esse processo pode ser assegurado durante uma resposta imune inata, reforçam os estudos que demonstram o papel desempenhado por essa resposta no controle inicial da infecção. Camundongos atímicos infectados com cepa virulenta do *P. brasiliensis* apresentaram tempo de sobrevivência menor e doença mais grave quando comparados aos animais eutímicos. No entanto, na 1ª semana de infecção, nos dois grupos de animais, observou-se capacidade de destruição fúngica e controle de sua disseminação, sugerindo que os mecanismos de imunidade inata foram eficientes tanto para animais suscetíveis, como para resistentes⁽¹²⁵⁾. Adicionalmente camundongos atímicos não desenvolveram doença progressiva, quando infectados com cepa menos virulenta do fungo.⁽¹²⁶⁾

Em conclusão, os resultados do presente trabalho reforçam a idéia de que os PMNs possuem um envolvimento dinâmico na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*. A atividade destas células pode ser regulada por elementos da resposta imune específica e inata.

No entanto, trabalhos em paracoccidiodomicose devem ser direcionados no sentido de avaliar além dos seus efeitos antifúngicos direto, o papel dessas células no direcionamento dos processos imunes a serem desenvolvidos pelo

hospedeiro infectado, através da capacidade dessas células em sintetizar e liberar citocinas imunorreguladoras.⁽¹²⁷⁾

Esse papel regulador dos PMNs tem sido principalmente atribuído ao fato dessas células representarem uma importante fonte de IL-12 e IL-10 em fases

precoces de infecções orientando dessa forma, uma resposta imune específica mediada por células TCD₄ TH₁ ou TH₂.^(128,129)

Amostras de *C. albicans* estimulam neutrófilos a produzirem IL-12, sendo esse processo necessário ao controle da infecção, entretanto a administração de IL-12 exógena não aumentou a resistência de camundongos suscetíveis a infecção sistêmica ou gastrointestinal por esse fungo, devido à sua capacidade de induzir a produção de IL-10 por neutrófilos^(129,130,131). Resultados semelhantes foram observados na aspergilose murina⁽¹³²⁾.

Estudos têm demonstrado que a infecção intraperitoneal de camundongos com *Toxoplasma gondii* leva a um rápido acúmulo de neutrófilos capazes de produzir IL-12 destacando a participação destas células nos eventos precoces que levam a uma imunidade específica dependente dessa citocina⁽¹³³⁾.

Em modelo experimental murino de suscetibilidade e resistência ao *P. brasiliensis* a administração exógena de IL-12 recombinante em camundongos suscetíveis inibiu a disseminação das leveduras a partir do pulmão, para fígado e baço. Adicionalmente, essa citocina induziu um aumento significativo do infiltrado mononuclear pulmonar. Esses resultados reforçam o papel dessa citocina na indução de imunidade protetora a infecção pelo *P. brasiliensis*⁽¹³⁴⁾.

Assim, trabalhos em paracoccidioidomicose devem ser desenvolvidos no sentido de demonstrar o possível papel dos PMNs na indução desse tipo de resposta.

7. Conclusões

- Polimorfonucleares (PMNs) humanos não ativados, não apresentaram atividade fungicida, nem fungistática contra a cepa de alta virulência (cepa 18) do *P. brasiliensis*;
 - PMNs ativados com IFN- γ apresentaram atividade fungicida contra a cepa 18 do *P. brasiliensis* em coculturas de curta duração (4h), sendo essa mediada por H₂O₂ e ânion superóxido;
 - PMNs ativados com TNF- α apresentaram atividade fungicida contra a cepa 18 do *P. brasiliensis* em coculturas de curta e longa duração (4,24,48h), sendo essa mediada por H₂O₂ e ânion superóxido;
 - PMNs ativados com GM-CSF apresentaram tanto atividade fungicida como fungistática em coculturas de curta e longa duração (4h,24 e 48h), sendo essas mediadas, principalmente por ânion superóxido.
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso MT, Montenegro, M.R. Paracoccidioidomycosis: a recente proposed classification of its forms. Rev Soc Med Trop 1987; 20: 129-32.
2. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS Paracoccidioidomycosis. Baill's Clin Trop Med Commun Dis 1989; 4: 185-220.
3. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. J Med Vet Mycol 1985; 23: 323-34.
4. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Bras Med 1908; 22: 121-4, 141-4.
5. Splendore A. Un'affezione micotica com localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribù degli exoascei (*Zymonema brasiliensi* n. sp.). In: Bertero, G., editors Volume in onore del Prof. Celli nel 25^o ano di insegnamento. Roma, 1912. p.412.

6. Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos do Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. Ann Fac Med São Paulo 1930; 5: 125.
 7. Lacaz CS South American Blastomycosis. Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo 1956; 7-120.
 8. San-Blás F, San-Blás G, Inlow D. Dimorphism in *Paracoccidioides brasiliensis*. Zentralbl Bakteriol 1980, 8: 23-8.
 9. Paris S, Duran-González D, Mariat F. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorphism. J Med Vet Mycol 1985; 23: 85-92.
 10. Albonoz MB Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. Sabouraudia 1971; 9: 248-53.
 11. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. Med Mycol 1998; 36: 37-42.
-

-
12. Naiff RD, Ferreira LCL, Barret TV. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. Rev Inst Med Trop 1986; 28:19-29.
 13. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in na endemic area of paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg 1998; 58: 505-12.
 14. Yarzabal LA. Anticuerpos especificos de la blastomicosis sudamericana revelados por inmunoelectroforesis. Rev Inst Med Trop 1971; 13: 320-7.
 15. Yarzabal LA, Bout D, Naquira F, Fruit J, Andieu S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. Sabouraudia 1977; 15: 79-85.
 16. Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F Patogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. Mycopathologia 1976; 58: 63-70.
 17. González Ochoa A. Theories regarding the portal of entry of *Paracoccidioides brasiliensis*: a brief review. Sci Publ Paho 1972; 254: 278-80.
-

-
18. Mackinnon, J.E. Pathogenesis of South American blastomycosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1959; 53: 487-94.
19. Restrepo A. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Curr Top Med Mycol 1988; 2: 239-77,
20. Wanke B, Londero AT Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Florida: CRC Press, 1994: 109-20.
21. Carbonell LM, Rodriguez J. Transformation of mycelial and yeast forms of *Paracoccidioides brasiliensis* in cultures and experimental inoculations. J Bacteriol 1965; 90: 504-10.
22. San-Blás F, San-Blás G. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Szaniszlo PJ. Fungal Dimorphism. New York: Plenum, 1985: 93-120.
23. Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Montenegro MR, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Curr Top Med Mycol 1993; 5: 115-49.
-

-
24. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Florida: CRC Press, 1994: 233-58.
25. Martinez R. Etioepidemiologia e ecologia. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de Infectologia. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997: 1803.
26. Castro RM, Del Negro G. Particularidades clínicas da paracoccidioidomicose na criança. Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo 1976; 31:194-8.
27. Mendes RP. Quadro clínico. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de infectologia. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997: 1803.
28. Peraçoli MTS, Soares AMVC. Imunologia da paracoccidioidomicose. In: TOSTA, C.E. Imunologia das infecções. Uberaba: FUNEPU, 1992: 15-36.
29. Calich VLG, Russo M, Vaz CAC, Burger E, Singer-Vermes LM. Resistance mechanism to experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Ciên Cult 1994; 46: 455-61.
30. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC., Rezkallah-Iwasso, M.T. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press 1994: 175-86.
-

-
31. Peraçoli MTS, Parise-Fortes MR, Pereira da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995; 37: 129-36.
 32. Arango M, Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1982; 79: 115-123.
 33. Biagioni L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques AS; Mota NGS, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. II Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 78: 617-21.
 34. Chequer-Bou-Habib D, Daniel-Ribeiro, Banic DM, Francisconi do Valle AC, Galvão-Castro B. Policlonal B-cell activation in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1989; 108: 89-93.
 35. Mendes RP, Scheinberg MA, Rezkallah-Iwasso MT, Marcondes-Machado J, Milano SIM, Pereira PCM, Meira DA, Barravieira B, Curi PR. Evaluation of IgE in sera of patients with paracoccidioidomycosis. In: *Resumenes del IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis*, Caracas, p. 124, 1989.
-

-
36. Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, Marques AS, Dillon NL, Franco MF. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 765-72.
 37. Mok PWY, Greer DL. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol* 1977; 28: 89-98.
 38. Musatti CC, Rezkallah-Iwasso MT, Mendes E, Mendes NF. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol* 1976; 24:365-78.
 39. Peraçoli MTS, Soares AMVC, Mendes RP, Marques SA, Guastale HA, Meira DA, Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with the chronic form of paracoccidioidomycosis. Early and late evaluation after treatment. *Rev Ib Micol* 1988; 5: 69.
 40. Yarzabal LA, Dessaint JP, Arango M, Albornoz MCB, Campins H. Demonstration and quantification of IgE antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in paracoccidioidomycosis. *Int Arch All* 1980; 62: 346-51.
-

41. Restrepo A, Restrepo M, Restrepo F, Aristizábal LH, Moncada LH, Vélez H. Immune responses in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia* 1978; 16: 151-63.

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

 43. Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:161-8.

 44. Moscardi-Bacchi M, Brummer E, Stevens DA. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: Inhibition by activated phagocytes. *J Med Microbiol* 1994; 40: 159-64.

 45. Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Machado JM, Fecchio D, Marques SA, Soares AMVC. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infection* 2002. (Submetido)

 46. Franco M, Montenegro MRG. Anatomia Patológica. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. Paracoccidioidomicose. Sarvier-EDUSP 1982; 97-117.
-

-
47. Figueiredo F, Silva CL, Alves LCM, Rossi MA. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. Braz J Med Biol Res 1986; 19: 615 A.
 48. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira A M, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol 1985a; 66:585-94.
 49. Iabuki K , Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of the lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. Mycopathologia 1979; 67: 131-41.
 50. Kerr IB, Araripe PCO, Lenzi HL. Paracoccidioidomycosis in experimentally-infected rats. Ver Inst Med Trop São Paulo 1988; 30: 336-50.
 51. Fernandez HN, henson PM, Otani A, Hugli TE. Chemotatic response to human C3a and C5a anaphylatoxins. I. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis *in vitro* and under stimulated *in vivo* conditions. J Immunol 1978; 120: 109-15.
 52. Ford Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shpley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature (Lond.) 1980; 286: 264-65.
-

-
53. Lee TC, Snyder F. Function, metabolism and regulation of platelet activating factor and related ether lipids. *In* Phospholipids and cellular regulation. J F kuo, editor. CRC Press, Inc Boca Raton 1985; 1-39.
 54. Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc natl Acad Sci USA* 1975; 72: 1059-62.
 55. Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J* 1995; 9: 200-9.
 56. Henson PM, Henson JE, Fittschen C, Kimani G, Bratton DL and Riches DW. Phagocytic cells: degranulation and secretion. *In* Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. JI Gallin IM, Goldstein and R Snderman. Editors Raven Press New York 1988; 363-390.
 57. Spitznagel JK. Antibiotic proteins of human neutrophils. *J Clin Invest* 1990; 86: 1381-86.
 58. Calich VLG, Kipnis TL, Mariano M, Fava-Netto C, Silva WS. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*. Its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. *Clin Immunol Immunopath* 1979;12:20-30
-

-
59. Crott LSP, Valim YML, Silva CL, Barbosa JE. The role of the complement system in the neutrophil functions stimulated in vitro by an alkali-insoluble cell wall fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med and Vet Mycology 1993; 31: 17-27.
60. Calich VLG, Vaz CAP, Burger E. PMN chemotactic factor produced by glass adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Path 1985b; 66: 57-65.
61. Restrepo A, Vélez H. Efectos De La Fagocitosis In Vitro Sobre El *P.brasiliensis*. Sabouradia 1975; 13: 10-21.
62. Goihman-Yahr M, Essensfeld E, Albornoz MC, Yarzabal L. Defects on in vitro digestive ability of polymorphonuclear neutrophils in paracoccidioidomycosis. Infect Immun 1980; 28: 557-566.
63. Goihman-Yahr M, Rothemberg A, Bretanha A, Iosturiz G, Roquete R, Avila-Millan E, Loria Van, Soavedro DE Borges N, Pereira J Molina T. Digestion of killed *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. Mycopathologia 1989; 106:53-8.
64. McEwen JG, Brummer E, Stevens DA., Restrepo A. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. Am J Trop Med Hyg 1987; 36: 603-8.
-

-
65. McEwen JG, Sugar A, Brummer E, Restrepo A, Stevens DA. Toxic effect of products of oxidative metabolism on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Microbiol 1984; 118: 423-428.
66. Lenzi HL, Calich VLG, Miyaji M, Sano A, Nishimura K, Burger E. Fibrosis patterns of lesions developed by athymic and euthymic mice infected with *P. brasiliensis*. Braz J Med Biol Res 1994; 27:2301-2308.
67. Meloni -Bruneri LH, Campa A, Abdalla DS, Calich VL, Lenzi HL, Burger E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistance mice. J Leukoc Biol 1996; 59:526-33.
68. Baggiolini M, Walz A and Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide1 / interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. J Clin Invest 1985; 84:1045-1049.
69. Balazovich KJ, Almeida HI, and Boxer LA. Recombinant human G-CSF and GM-CSF prime human neutrophils for superoxide production through different signal transduction mechanisms. J Lab Clin Med 1991; 118:576-584.
70. Musso T, Calosso L, Zucca M. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. Infect Immun 1998; 66: 2640-47.
-

71. Nathan CF. Respiratory burst in adherent human neutrophils: Triggered by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood* 1989; 73:301-306.
 72. Shalaby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E, Svedersky LP, Finkle BS, Palladino Jr MA. Activation of human polymorphonuclear neutrophil function by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1985; 135: 2069-73.
 73. Steinbeck MJ and Roth JA. Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev Infect Dis* 1989; 11: 549-568.
 74. Weisbart RH, Golde DW, Clark SC, Wong GG, Gasson JC. Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature (Lond)* 1985; 314: 361-363.
 75. Kurita N, Biswas SK, Oarada M, Sano A, Nishimura K, Miyaji M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 1999a; 37(1): 19-24.
 76. Kurita N, Oarada M, Ito E, Miyaji M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 1999b ; 37: 261-267.
-

-
77. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest suppl 1968; 97: 77-89.
 78. Godfrey KAM, Statistic in practice. Comparing the means of several groups. N. Engl J Med 1985; 313: 450-6.
 79. Sullivan GW, Carper HT, Mandell GL. The effect of three human recombinant hematopoietic growth factors (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-3) on phagocyte oxidative activity. Blood 1993; 81: 1863-1970.
 80. Ribeiro RA, Flores LA, Cunha FQ, Ferreira SH. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell dependent mechanism. Immunology 1991; 73: 472-77.
 81. Djeu JY. Cytokines and anti-fungal immunity. Adv Exp Med Biol 1992; 319: 217-23.
 82. Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. Immunol today 1993; 14: 75-8.
 83. Edwards SW, Say JE, Hughes V. Gamma interferon enhances the killing of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils. J Gen Microbiol 1988; 134:37-42.
-

-
84. Denis M, Chadee K. Human neutrophils activated by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha kill *Entamoeba histolytica* trophozoites *in vitro*. J leuk Biol 1989; 46:270-274.

 85. Morrison CJ, Brummer E, Isenberg RA, Stevens DA. Activation of murine polymorphonuclear neutrophils for fungicidal activity by recombinant gamma interferon. J leuk Biol 1987; 41: 434-40.

 86. Ezekowitz RAB, Sieff CA, Dinauer MC, Nathan DG, Orkin SH, Newburger PE. Restoration of phagocyte function by interferon-gamma in X-linked chronic granulomatous disease occurs at the level of a progenitor cell. Blood 1990; 76: 2443-48.

 87. Rex JH, Bennet JE, Gallin JI, Malech HL, De Carlo ES, Melnick DA. *In vivo* interferon-gamma therapy augments the *in vitro* ability of chronic granulomatous disease neutrophils to damage *Aspergillus* hyphae. J Infect Dis 1991; 163: 849-52.

 88. Djeu JY, Blanchard DK, Halkias D, Friedman H. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. J Immunol 1986;137: 2980-84.
-

-
89. Roilides E, Holmes A, Blake C, Pizzo PA, Walsh TJ. Impairment of neutrophil antifungal activity against hyphae of *Aspergillus fumigatus* in children infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1993a; 167: 905-11.
 90. Kullberg BJ, Van't Wout JW. Cytokines in the treatment of fungal infections. *Biotherapy* 1994; 7: 195-210.
 91. Kullberg BJ, Van't Wout JW, Hoogstraten C, Van Furth R. Recombinant interferon- γ enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. *J Infect Dis* 1993;168: 436-443.
 92. Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF, Estevez ME, Tiraboschi NI, Negróni R, Diez RA. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol Immunol* 1991; 35: 164-74.
 93. Bernard G, Durandy A, Assis CM, Hong MA, Orie NM, Sato NM, Mendes-Giannini MJS, Lacaz CS, Duarte AJS. Responses of T and B lymphocytes to *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall extract in healthy sensitized and non-sensitized subjects. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 189-194.
 94. Peraçoli MTS, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PCM, Marques SA, Soares AMVC. Detection of cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Ann Rev Biomed Sciences* 2002; p. 85.
-

-
95. Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Russo M, Calich VLG. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relation-ship among progression of the infection, broncho-alveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. *Infect Immun* 1995; 63:1777-1183.

 96. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Burger E, Calich VLG. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1998; 66: 800-06.

 97. Dunn PL, North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun* 1991; 59: 2892-2900.

 98. Levitz SM, North EA. Gamma interferon gene expression and release in human lymphocytes directly activated by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun* 1996; 64: 1595-99.

 99. Djeu JY, Blanchard DK, Halkias D, Friedman H. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986; 137: 2980-4.
-

100. Diamond RD, Lyman CA, Wysong DR. Disparate effects of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to *Candida albicans* hyphae in vitro. J Clin Invest 1991; 87: 711-20.
 101. Louie A, Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Ritz WJ, Singh JK, Gordon MA. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. Infect Immun 1994; 62:2761-72.
 102. Netea MG, Blok WL, Kulbrg BJ, Bemelmans M, Vogels MTE, Buurman WA, Van der Meer JWM. Pharmacological inhibitors of tumor necrosis factor production exert differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice. J Infect Dis 1995; 171: 393-99.
 103. Steinshamn S, Waage A. Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice. Infect Immun 1992; 60: 4003-08.
 104. Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS, 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*. Immunol 2001; 102: 480-85.
-

-
105. Jaattela M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- α /cachectin. *Lab Invest* 1991; 64: 724-42.

 106. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987; 56: 234-48.

 107. Losa Garcia JE, Rodriguez FM, Martin de Cabo MR, Garcia Salgado MJ, Losada JP, Villaron LG et al. Evaluation of inflammatory cytokine secretion by human alveolar macrophages. *Mediators Inflamm* 1999; 8: 43-51.

 108. 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.

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

 110. Souto JT, Figueiredo F, Furlaneto 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: 1881-20.
-

-
111. Calvi SA, Peraçoli MTS, Mendes RP, Ruiz RL, Marcondes-Machado J, Soares AMVC. Cytokines in bronchoalveolar lavage (BAL) of paracoccidioidomycosis patients. *Ann Rev Biomed Sciences* 2002; p. 107.
 112. You A, Kitagawa S, Ohsaka A, Saito M, Takaku F. Stimulation and priming of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Qualitative and quantitative differences. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171: 491.
 113. Weisbart RH, Kwan L, Golde DW, Gasson JC. Human GM-CSF primes neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to the major physiologic chemoattractants. *Blood* 1987; 69:18.
 114. Takahashi GW, Andrews III DF, Lilly MB, Singer JW, Alderson MR. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes. *Blood* 1993; 81(2): 357-64.
 115. Djeu JY, Blanchard DK. Regulation of human polymorphonuclear neutrophil (PMN) activity against *Candida albicans* by large granular lymphocytes via release of a PMN-activating factor. *J Immunol* 1987; 139: 2761.
 116. Blanchard DK, Michelini-Norris MB, Djeu JY. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by large granular lymphocytes
-

stimulated with *Candida albicans*: Role in activation of human neutrophil function. Blood 1991; 77(10): 2259-65.

117. 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 Biomed Sciences 2002; p. 93.
118. Carmo JPM, Peraçoli MTS, Calvi SA, Dias LA, Tavian EG, Soares AMVC. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on human monocytes activation in vitro for high-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* killing. Ann Rev Biomed Sciences 2002; p. 94.
119. Brummer E, Sugar AM, Stevens DA. Enhanced oxidative burst in immunologically activated but not elicited polymorphonuclear leukocytes correlates with fungicidal activity. Infect Immun 1985; 49: 396-401.
120. Brummer E, Kurita N, Yoshida S, Nishimura K, Miyaji M. A basis for resistance of *Blastomyces dermatitidis* killing by human neutrophils: inefficient generation of myeloperoxidase system products. J Med Vet Mycol 1992; 30: 233-43.
-

121. Kurita N, Terao K, Brummer E, Ito E, Nishimura K, Miyaji M. resistance of *Histoplasma capsulatum* to killing by human neutrophils evasion of oxidative burst and fusion products. *Mycopathologia* 1991; 115: 207-13.
 122. Morgenstern DE, Dinanuer MC, Doerschuk CM, Li LL, Gifford MA. Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatosis disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J Exp Med* 1997; 185: 207-18.
 123. Rex JH, Bennett JE, Gallin JI, Malech HL, Melnick DA. Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Infect Dis* 1990; 162: 523-28.
 124. Roilides E, Uhlig K, Venzon D, Pizzo PA, Strieter RM, Walsh TJ. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocytes colony-stimulating factor and gamma interferon. *Infect Immun* 1993; 61: 1185-93.
 125. Burger E, Miyaji M, Sano A, Calich VLG, Nishimura K, Lenzi HL. Histopatology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: A sequential study. *Am J Trop Med Hyg* 1996a; 55(2): 235-242.
-

-
126. Burger E, Vaz CCA, Sano A, Calich VLG, Singer-Vermes LM, Xidieh CF, kashino SS, Nishimura K, Miyaji M. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: Studies with isolates differing in virulent and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. Am Trop Med 1996b; 55(4): 391-98.
 127. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Immunology Today 1995; 16(1): 21-26.
 128. Denkers E, Marshall AJ. Neutrophils as a source of immunoregulatory cytokines during microbial infection. Immunologist 1998; 6:116.
 129. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Puccetti P, Bistoni F. Neutrophils and the adaptive immune response to *Candida albicans*. Res Immunol 1997c; 14:512-18.
 130. Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Initiation of T helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. Chem Immunol 1997a; 68:110-135.
 131. Romani L, Mencacci E, Cenci E, Del Sero G, Bistoni F, Puccetti P. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4⁺ T helper subset election in mice with candidiasis. J Immunol 1997b; 158: 2356-62.
-

-
132. Cenci E, Mencacci A, D' Ostiani C, Fè, Montagnoli A, Bacci A, Del Sero G, Perito S, Bistoni F, Romani L. Cytokine-and T helper-dependent immunity in murine aspergillosis. *Res Immunol* 1998; 149: 445-54.
133. Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol* 2000; 165: 4515-21.
134. Calich VLG, Vaz CAC, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol* 1998; 9:407-16.
-

9. Abstract

Fungicidal and fungistatic activity of human polymorphonuclear leukocytes (PMNs) against high virulent strain of *Paracoccidioides brasiliensis* were studied. These effects were tested in short term (4h) and long term cocultures (24h and 48h). Nonactivated PMNs failed to exhibit antifungal activities in all studied periods. However if these cells were IFN- γ activated they presented fungicidal effect at 4h of cocultures. However no activity, fungistatic or fungicidal, were detected in further times. TNF- α activated PMNs exhibit fungicidal activity at 4h and 24 h, while GM-CSF stimulated PMN to fungicidal and fungistatic activities in short and long terms cocultures. The antifungal effects of IFN- γ and TNF- α were inhibited or abrogated when *P. brasiliensis* challenge occurred in presence of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) showing the role of H_2O_2 and superoxide anion in antifungal activities . For GM-CSF activated cells superoxide anion was the main metabolite involved. Based on these data the role of PMNs cells in early and later stages of *P. brasiliensis* is discussed.

Consentimento livre e esclarecido

Eu, _____, fui convidado a participar de um estudo que irá avaliar a função do “Efeito de citocinas sobre a atividade fungicida e fungistática de neutrófilos humanos contra o *Paracoccidioides brasiliensis*”.

Estou ciente que serão colhidos 20 ml de sangue, por meio de seringa e agulhas descartáveis, uma única vez.

Todas as informações conseguidas no estudo serão utilizadas apenas pelo pesquisador e, meus dados serão identificados somente por número, sendo que meu nome não aparecerá quando os resultados do estudo forem apresentados.

Botucatu, _____, de _____ de 2000.

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador