

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO SISTEMA COMPLEMENTO SOBRE A ATIVIDADE
FUNGICIDA E PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL-
ALFA POR MONÓCITOS HUMANOS INFECTADOS COM**

Paracoccidioides brasiliensis

Sérgio Schnoor Fogaça

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada**

BOTUCATU – SP

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DO SISTEMA COMPLEMENTO SOBRE A ATIVIDADE
FUNGICIDA E PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL-
ALFA POR MONÓCITOS HUMANOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

SÉRGIO SCHNOOR FOGAÇA

ORIENTADORA: Profa Dra MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada**

BOTUCATU – SP

2007

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

Fogaça, Sergio Schnoor.

Efeito do sistema complemento sobre a atividade fungicida e produção de fator de necrose tumoral-alfa por monócitos humanos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* / Sergio Schnoor Fogaça. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2007.

Orientadora: Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Assunto CAPES: 21200009

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Fungos

CDD 589.2

Palavras-chave: Atividade fungicida; Monócitos; *Paracoccidioides brasiliensis*; Sistema complemento; TNF-alfa

Sumário

SUMÁRIO

Capítulo I

Importância do sistema complemento na interação entre fagócitos e fungos patogênicos.....	3
Referências Bibliográficas.....	15

Capítulo II

Efeito do sistema complemento sobre a atividade fungicida e produção de fator de necrose tumoral-alfa por monócitos humanos infectados com <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	27
Resumo.....	28
Abstract	29
Introdução	30
Objetivos	33
Casuística e Métodos	33
Resultados	40
Discussão	49
Conclusões	57
Referências Bibliográficas	58

Capítulo 1

IMPORTÂNCIA DO SISTEMA COMPLEMENTO NA INTERAÇÃO ENTRE FAGÓCITOS E FUNGOS PATOGÊNICOS

INTRODUÇÃO

A imunidade inata apresenta grande importância no combate a fungos patogênicos, uma vez que permite uma reação imediata e reconhece uma grande variedade desses microrganismos. Entre os vários mecanismos naturais de defesa, as células fagocitárias desempenham papel central na resistência aos fungos, devido a sua participação na reação inflamatória e na atividade fungicida, ambas dependentes dos mecanismos de ativação dessas células, induzidos pelos fungos e, principalmente por citocinas produzidas pelas células durante a interação com o parasita. Distúrbios da atividade funcional dessas células podem ocasionar o desenvolvimento da doença ou a morte do microrganismo e, ainda influenciar o aparecimento 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 a infecção fúngica.

Monócitos e macrófagos são células do sistema mononuclear fagocitário, importantes na defesa do hospedeiro (ADAMS & HAMILTON, 1997) e considerados fontes importantes de citocinas (VAN FURTH, 1998). Essas células são responsáveis pela ingestão e inativação de leveduras ou partículas fúngicas e interação com linfócitos T e B, promovendo a produção de citocinas, reconhecimento e processamento do antígeno (FROMTLING & SHADOMY 1986; VAN FURTH, 1998).

A maioria dos fungos causadores de micoses sistêmicas apresenta estreita relação com monócitos ou macrófagos nas fases iniciais da infecção ou no decorrer da doença (FROMTLING & SHADOMY, 1986). Segundo DEEPE & BULLOCK (1990), na interação entre o fungo e os fagócitos, é importante considerar o processo de reconhecimento e ligação do fungo à superfície dessas células. A ligação se estabelece devido a inúmeras moléculas presentes na membrana celular do macrófago, que facilitam a ligação entre o hospedeiro e a célula fúngica. Estudos de fagocitose, envolvendo fungos patogênicos, têm demonstrado o envolvimento de vários receptores da superfície dos fagócitos na internalização das partículas fúngicas e na ativação dessas células.

Monócitos e macrófagos são, portanto, células da imunidade inata que expressam receptores de superfície para manose, CD14, componentes do sistema complemento, porção Fc de moléculas de imunoglobulinas e receptores *Toll-like* (TLR) capazes de reconhecer produtos microbianos, levando à estimulação da fagocitose, atividade microbicida e produção de citocinas (ABBAS & LICHTMAN, 2003; UNDERHILL & OZINSKY, 2002).

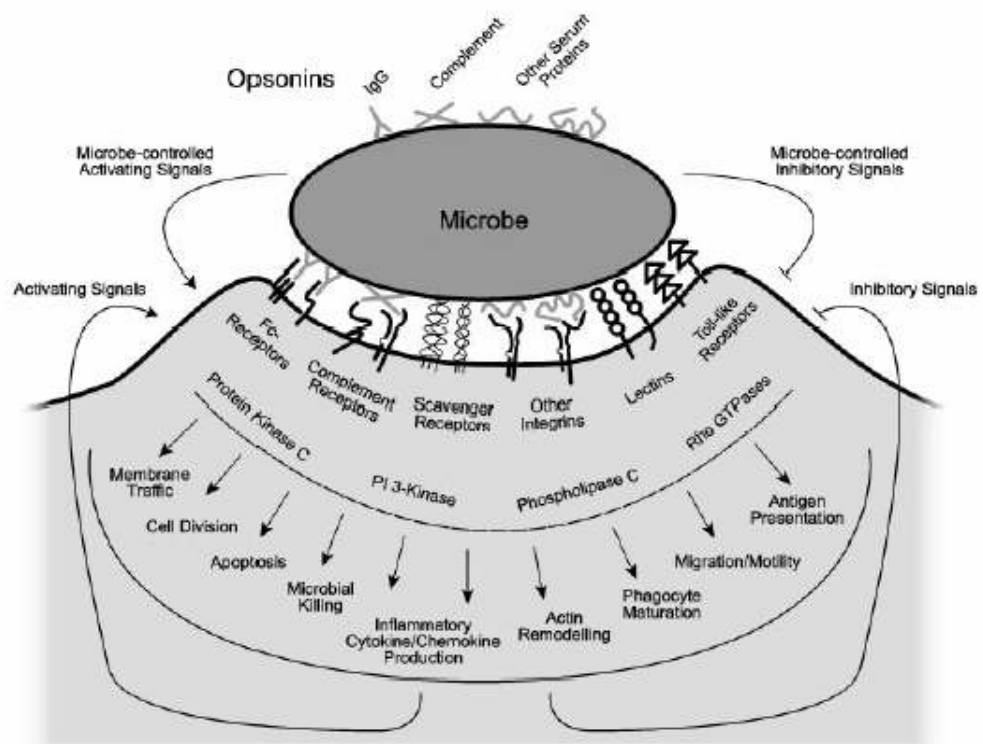


Figura 1. Receptores para diferentes componentes da superfície de microrganismos, presentes na membrana celular de fagócitos. Múltiplos receptores reconhecem, simultaneamente, microrganismos por ligação direta e/ou por ligação a opsoninas na superfície do patógeno. A interação com o receptor induz sinais intracelulares de ativação e desencadeamento de inúmeras funções da célula fagocitária. (Underhill DM & Ozinsky A. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 825-52).

As propriedades fagocítica e microbicida dessas células podem ser moduladas pelos receptores específicos de membrana, envolvidos na interação com os microrganismos (POPI et al., 2002). Os receptores TLR tem sido considerados de

importância no reconhecimento de fungos como *Cryptococcus neoformans* (SHOHAM et al., 2001), *Candida albicans* (JOUAULT et al., 2003; NETEA et al., 2004) e *Aspergillus fumigatus* (MEIER et al., 2003). Camundongos deficientes de TLR4 têm alta carga fúngica em modelos de estudo de candidíase, quando comparados aos camundongos normais (NETEA et al., 2002).

O principal componente da cápsula de *C. neoformans*, a glicuronoxilomanana liga-se a CD14, TLR-2 e TLR-4. Além disso, manoproteínas secretadas pelo fungo são reconhecidas por receptores para manose (LEVITZ, 2002; SHOHAM et al., 2001). CROSS & BANCROFT (1995) demonstraram que a ingestão de formas não-capsuladas de *C. neoformans* é mediada por receptores para manose e β -glucana na superfície do macrófago e, que esse processo induz a produção das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), resultando na ativação das células e fagocitose das formas encapsuladas do fungo.

Entre os receptores de superfície dos macrófagos, os melhor caracterizados são o receptor de manose e o receptor para o componente C3 do sistema complemento, ambos capazes de mediar a fagocitose e a morte intracelular de microrganismos patogênicos (LINEHAN et al., 2000).

O receptor para manose é uma lectina do macrófago que interage com resíduos terminais de manose e fucose de glicoproteínas e glicolípídeos. Esses açúcares são moléculas tipicamente observadas na parede celular de microrganismos, que são assim, reconhecidas pelas células do hospedeiro (ABBAS & LICHTMAN, 2003). Esse receptor é capaz de interagir com uma ampla variedade de microrganismos, como bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, protozoários e micobactérias (GAYNOR et al., 1995, KAHN et al., 1995; LINEHAN et al., 2000; O'RIORDAN et al., 1995, STAHL & EZEKOWITZ, 1998). Macrófagos derivados de monócitos humanos fagocitam leveduras de *C. albicans* não opsonizadas, via receptor para manose (KAGAYA & FUKAZAWA, 1981; KOZEL et al., 1984; SHEPHERD et al., 1982; MARODI et al., 1991; 1993). Além da interação com *C. albicans* esse receptor também está envolvido na ligação de outros microrganismos como *Pseudomonas* (SPEERT et al., 1988), *Pneumocystis carinii* (EZEKOWITZ et al., 1991), *Leishmania donovani* (WILSON & PEARSON, 1986), *Mycobacterium avium* (BERMUDEZ et al., 1991; ROECKLEIN et al., 1991) e *Paracoccidioides brasiliensis* (ALMEIDA et al., 1998).

A propriedade intrínseca de vários fungos patogênicos em ativar o sistema complemento é um importante pré-requisito para uma efetiva resposta imune anti-fúngica.

O espectro de reações imunes associadas ao complemento inclui a produção de moléculas quimiotáticas para células inflamatórias e o auxílio da fagocitose por opsonização do patógeno pelos fagócitos, que auxiliam na organização da defesa do hospedeiro (MORELLI & ROSENBERG, 1971; SPETH et al., 2004; YAMAMURA & VALDIMARSSON, 1977).

O SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é um importante mecanismo de defesa da imunidade inata, constituído por mais de 30 proteínas solúveis no plasma ou expressas na membrana celular, atuando como mediador humoral nos processos inflamatórios.

A complexidade desse sistema, que envolve uma grande variedade de fatores solúveis, proteínas reguladoras e receptores celulares, é de importância especial nas reações anti-fúngicas, porque permite uma reação imediata e reconhece uma ampla variedade de patógenos. Assim, facilita a discriminação entre o próprio e o não-próprio ao organismo, atacando eficientemente as estruturas não-próprias (SPETH et al., 2004).

Após ativação inicial, os diversos componentes do complemento interagem em uma cascata altamente regulada, executando inúmeras funções básicas que incluem: lise osmótica de células e microrganismos, opsonização que promove fagocitose das partículas, ligação a receptores específicos do complemento em células do sistema imune e a depuração imune, que remove complexos antígeno-anticorpo da circulação e os deposita no baço e fígado (ROITT et al., 2003).

As proteínas do sistema complemento agem como cascatas enzimáticas, em que cada etapa produz enzimas que atuam na etapa seguinte da cascata e conduzem à formação final de um complexo de ataque à membrana (MAC), que se insere na membrana do patógeno, formando um poro e levando à lise osmótica (SPETH et al., 1999).

Existem três vias envolvidas na ativação do complemento, todas elas convergindo para a ativação do terceiro componente, ou C3. Estas três vias compreendem a via clássica, iniciada pela ligação do componente C1q ao complexo antígeno-anticorpo; a via da lectina é formada independentemente do anticorpo e é ativada por carboidratos presentes na superfície dos patógenos e, a via alternativa, iniciada a partir do componente C3 que se liga na superfície de vários patógenos microbianos (ROITT et al., 2003).

IMPORTÂNCIA DO SISTEMA COMPLEMENTO NA RESPOSTA ANTI-FÚNGICA

A ativação do sistema complemento por fungos, tanto pela via clássica como alternativa resulta na liberação de fragmentos livres do complemento como anafilatoxinas e moléculas quimiotáticas e, também na deposição de opsoninas sobre a superfície da célula fúngica. As principais opsoninas do complemento são fragmentos peptídicos derivados do componente C3, tais como C3b, iC3b, C3d e C3dg, os quais facilitam o reconhecimento e a morte desses microrganismos pelas células fagocitárias, que possuem receptores para os componentes do complemento (ZHANG & KLEIN, 1997). DRUTZ & FREY (1985) relataram que o complemento promove a ligação de *Blastomyces dermatitidis* a neutrófilos humanos, necessária para a atividade fungicida contra a levedura.

Macrófagos humanos e outros fagócitos possuem, pelo menos, três diferentes receptores que reconhecem produtos de degradação de C3. CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18) têm grande afinidade por partículas recobertas com C3b e iC3b respectivamente e são abundantes em neutrófilos, monócitos/macrófagos, eosinófilos, linfócitos e eritrócitos. Por outro lado, CR4 (CD11c/CD18, p150,95) reconhece preferencialmente estímulos recobertos com iC3b e C3dg (LEVITZ & TABUNI, 1991). Embora CR3 e CR4 compartilhem a cadeia beta (CD18), a atividade de ligação com o complemento está localizada em regiões da cadeia alfa (LAW, 1988; MYONES et al., 1988). A ativação de macrófagos por metabólitos bacterianos, citocinas ou outros estímulos induz um rápido aumento no número total de CR1 na superfície dessas células em até dez vezes (cerca de 50.000), pela mobilização de vesículas secretoras. Aparentemente, esse aumento da concentração de CR1 na superfície celular e, talvez, modificações no próprio receptor, como sua fosforilação são necessários para que a célula seja capaz de fagocitar ativamente por esse receptor (SENGELOV et al., 1994).

Na infecção por fungos do gênero *Cândida*, a ativação do complemento pela via alternativa é desencadeada por galactomanana e beta glucana, presentes na superfície celular (KOZEL, 1996; THONG & FERRANTE, 1978). O fato de que essa via provavelmente desempenha papel principal foi confirmado por estudos experimentais de

candidíase, demonstrando que cobaias deficientes em C4 (via clássica) apresentam o mesmo curso da infecção, comparado a animais normais (SPETH et al., 2004). Segundo KOZEL et al. (1987) a ativação do complemento pela via alternativa é considerada mecanismo primário para ativação e ligação de fragmentos de C3b a *C. albicans*. A fagocitose da levedura é essencialmente dependente da opsonização por componentes do complemento, sendo a capacidade de opsonização do soro fortemente reduzida após inativação a 56°C (FERRANTE & THONG, 1979; SOLOMKIN et al. 1978).

Na patogênese da infecção invasiva por *Aspergillus sp* ocorre ativação inicial e subsequente deposição de C3 na superfície fúngica. Tanto conídios como hifas são capazes de ativar o sistema complemento (KOZEL et al., 1989; STURTEVANT & LATGÉ, 1992). Enquanto a ativação do complemento pelos conídios é mediada pela via alternativa, há um envolvimento progressivo da via clássica quando o conídio inicia sua transformação em hifa. Assim, a via de interação das partículas fúngicas com o sistema complemento muda com a maturação dos conídios para a hifa (KOZEL et al., 1989).

A forma encapsulada de *C. neoformans* é o mais potente ativador da cascata do complemento entre os fungos patogênicos, com a deposição de $10^7 - 10^8$ moléculas de C3 por célula fúngica (YOUNG & KOZEL, 1993; KOZEL et al., 1996). Formas não encapsuladas ligam dez vezes menos C3. A ativação e ligação de C3 ocorrem predominantemente pela via alternativa do complemento (KOZEL, 1998). A opsonização de *C. neoformans* com fragmentos de C3 é um pré-requisito para uma fagocitose eficiente por fagócitos (DAVIES et al., 1982; KELLY et al., 2005). Macrófagos ligam e fagocitam *C. neoformans* via três principais receptores do complemento: CR1, CR3 e CR4, que ligam independentemente o fungo opsonizado (LEVITZ et al., 1997; CROSS et al., 1997). O bloqueio desses receptores, por anticorpo monoclonal específico, inibe a ligação da célula fúngica (LEVITZ & TABUNI, 1991).

A ligação de formas encapsuladas de *C. neoformans* a células dendríticas praticamente não ocorre na ausência de opsoninas. A opsonização com soro humano normal aumenta a ligação, enquanto o mesmo soro inativado não induz interação eficiente com a célula fagocitária, sugerindo, portanto, o papel de componentes termo-lábeis do sistema complemento na interação e indução da atividade fungicida por células dendríticas (KELLY et al., 2005).

Dentre os receptores para complemento, CR3 e CR4 reconhecem preferencialmente iC3b, o fragmento C3 predominante em *C. neoformans* opsonizado por soro humano (KOZEL & PFROMMER, 1986). Macrófagos humanos expressam

tipicamente CR3 e, a ligação e fagocitose do fungo opsonizado com soro é mediada primariamente por esse receptor (LEVITZ & TABUNI, 1991; LEVITZ et al., 1997; ZARAGOZA et al., 2003).

Estudos empregando células de ovário de hamster chinês (CHO) transfectadas com genes para receptores CR1, CR3 ou CR4 e incubadas com células de *C. neoformans* opsonizadas com soro humano normal mostraram que as células fúngicas ligam-se com maior avidéz ao receptor CR3 seguido por CR1 e CR4, nessa ordem decrescente de interação. Esses resultados sugerem que CR1, CR3 e CR4 são receptores independentemente capazes de interagir com *C. neoformans* opsonizadas com fragmento C3 (LEVITZ et al., 1997).

Blastomyces dermatitidis ativa o complemento pelas duas vias clássica e alternativa, com opsonização do fungo por C3b e iC3b (ZHANG & KLEIN, 1997), sendo a beta-glucana o principal componente responsável pela ativação desse sistema e deposição de C3 na parede do fungo (ZHANG & KLEIN, 1997; ZHANG et al., 2001). Um importante fator de virulência de *B. dermatitidis* é o antígeno imunodominante de 120 KDa, BAD-1, anteriormente descrito como WI-1. BAD-1 promove a ligação do fungo às células do hospedeiro pela interação com o receptor CR3 (CD11b/CD18) (NEWMAN et al., 1995).

A cinética de conversão de C3 em outros fragmentos após tratamento de *B. dermatitidis* com soro humano foi estudada por ZHANG & KLEIN (1997). A ligação de C3 à superfície da levedura pode ser posteriormente convertida em iC3b, C3d ou C3dg. Cada uma dessas opsoninas têm preferência de ligação a um receptor específico no fagócito. Conseqüentemente, a ligação desses fragmentos do componente C3 pode influenciar a interação entre a levedura e o fagócito. A análise dos fragmentos de C3 obtidos após tratamento com hidroxilamina por SDS-PAGE e auto-radiografia demonstrou que logo após um minuto de incubação das células leveduriformes de *B. dermatitidis* com soro humano normal, 70% de C3b se transformava em iC3b. Formas moleculares de C3 correspondentes a C3dg não foram observadas.

Outros estudos de cinética de conversão de fragmentos C3 ligados à superfície de células fúngicas demonstraram que 80% das moléculas de C3b se convertem em iC3b na interação com *C. neoformans* (PFROMMER et al., 1993). Portanto, a ligação de C3b e iC3b a seus respectivos receptores na célula fagocitária pode influenciar o destino da interação hospedeiro-patógeno (ZHANG & KLEIN, 1997).

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* ativam o complemento tanto pela via clássica como pela via alternativa *in vitro* (MUNK et al., 1992), resultando na opsonização e fagocitose do fungo por macrófagos (CALICH et al., 1979). Estudos realizados por MUNK & DA SILVA (1992) mostraram que diferentes componentes do sistema complemento e seus produtos de clivagem se depositam sobre a superfície do isolado Pb18 de *P. brasiliensis*. A incubação de células leveduriformes de Pb18 opsonizadas com soro humano normal mostrou que Pb18 ativa o complemento *in vitro* e liga C3, iC3b, C4 e C5b-9 em sua superfície. A análise microscópica mostrou padrão de distribuição uniforme desses componentes em mais de 80% das células de Pb18 pré-incubadas com soro humano normal. Assim, a deposição de produtos de clivagem do sistema complemento pode desempenhar papel importante na fagocitose do fungo (CALICH et al., 1979).

A fração álcali-insolúvel (F1), derivada de polissacarídeos da parede celular de *P. brasiliensis* foi descrita como sendo capaz de ativar o sistema complemento e neutrófilos (CROTT et al., 1993; CROTT et al., 1997). Essa fração induz acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos durante a fase inicial da resposta inflamatória em modelos experimentais da micose (ALVES et al., 1987; FIGUEIREDO et al., 1986). CROTT et al. (1993) investigaram diferenças entre isolados de *P. brasiliensis* com relação à capacidade de ativar o sistema complemento pela fração F1 do fungo. A incubação dessa fração obtida de diferentes isolados com soro humano normal resultou em diferentes graus de inibição das vias clássica e alternativa do complemento. A fração F1 de isolados de baixa virulência foi mais eficiente do que isolados virulentos na capacidade de ativar o sistema complemento, tanto pela via clássica como alternativa. Esses resultados concordam com a literatura relacionada a outros microrganismos como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* e *Aspergillus sp*, cujas cepas menos virulentas são mais eficientes na ativação do sistema complemento (PLUSCHKE & ACHTMAN, 1984; INZANA et al., 1987; (HENWICK et al., 1993).

Na paracoccidiodomicose, assim como na maioria dos processos infecciosos, os fagócitos constituem importante linha de defesa do hospedeiro contra infecções fúngicas. Na resistência natural para o *P. brasiliensis* ficou demonstrada a importância desta atividade fagocitária, em estudos da evolução da infecção experimental em animais com bloqueio do sistema fagocitário-mononuclear (KASHINO et al., 1995). Nesses casos há extensas lesões exudativo-necróticas, com grande número de fungos (FRANCO et al., 1989).

O contato entre as células leveduriformes do fungo e fagócitos é facilitado pela ativação da via alternativa do sistema complemento, que leva à opsonização das leveduras (SHIKANAI-YASUDA et al., 1997). Componentes do próprio fungo, como a glicoproteína de 43 kDa (gp43), considerada o principal antígeno secretado por *P.brasiliensis*, pode promover a adesão inicial e a internalização da levedura por células fagocíticas (ALMEIDA et al., 1998). Assim, a gp43 está envolvida na adesão do *P.brasiliensis* aos macrófagos peritoneais murinos, fenômeno que leva à fagocitose e pode favorecer a morte do fungo. Esse efeito é inibido por anticorpos anti-gp43. Ensaios de inibição indicam o envolvimento de resíduos de fucose e manose, na fagocitose do *P.brasiliensis* (ALMEIDA et al., 1998).

POPI et al. (2002) avaliaram o efeito da gp43 na interação entre macrófagos peritoneais murinos e *P.brasiliensis*. A fagocitose de células leveduriformes do fungo pelas células peritoneais de camundongos das linhagens B10.A e A/SN, considerados, respectivamente, suscetíveis e resistentes à infecção, foi inibida pela adição de diferentes concentrações de gp43 ao meio de cultura. Os autores sugerem que a produção de gp43 pelo fungo, pode ser considerada um mecanismo de evasão do *P.brasiliensis* na instalação da infecção em hospedeiros suscetíveis.

Trabalho recente, desenvolvido por JIMENEZ et al. (2006), avaliou a importância dos receptores para manose e para o componente C3 do sistema complemento na fagocitose de conídios de *P.brasiliensis* por linhagens de macrófagos de medula óssea de camundongos, que apresentam o gene *Nramp1*, que controla a resistência (B10R) ou suscetibilidade (B10S) à infecção por microrganismos intracelulares. Os resultados mostraram que macrófagos B10R e B10S respondem de forma diferente à infecção por conídios de *P.brasiliensis*. A opsonização de conídios com soro murino não inativado aumentou a percentagem de fagocitose pelas duas linhagens de células fagocitárias. Macrófagos B10R apresentaram maior número de conídios associados à membrana celular ou no seu interior do que a linhagem de macrófagos B10S. O tratamento dos conídios com soro inativado ou com EDTA, bem como o tratamento dos macrófagos com anticorpos anti-receptor CR3 diminuíram a fagocitose pelas duas linhagens celulares. A incubação dos macrófagos com alfa metil manosídeo reduziu a fagocitose dos conídios pelos macrófagos B10R, sugerindo também a participação do receptor para manose na fagocitose de *P.brasiliensis*. O estudo da expressão dos receptores para complemento e manose por macrófagos B10R e B10S mostrou que ambas linhagens apresentam números similares de CR3 e que B10R expressa mais receptor para manose, enquanto o receptor

CR1 não foi detectado em ambas linhagens. Esses resultados demonstram que a fagocitose dos conídios do fungo ocorre por mecanismos envolvendo ou não opsonização. A aderência e fagocitose dependentes de opsonização são mediadas pelo complemento e receptor CR3, enquanto a fagocitose independente de opsonização envolve receptor de manose na célula fagocitária.

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 interferon-gamma (IFN- γ) e outras citocinas de perfil Th1, destacando-se o papel do TNF- α . O efeito sinérgico entre essas duas citocinas é essencial para a resistência do hospedeiro contra infecções por microrganismos intracelulares (MARTIN-OROZCO et al., 2001) e para uma eficiente atividade fungicida contra o *P. brasiliensis* (CALVI et al., 2003; SOARES et al., 2001).

Estudos *in vitro* revelaram que conídios e leveduras de *P. brasiliensis* são eficientemente fagocitados por macrófagos de camundongos (CANO et al., 1992) e de humanos (MOSCARDI-BACCHI et al., 1993) e, quando ingeridos por macrófagos não ativados, ocorre transformação e replicação fúngica em seu interior. Porém, quando essas células são ativadas por citocinas, a transição de conídios para levedura é inibida (CANO et al., 1992; MOSCARDI-BACCHI et al., 1993).

Conídios ou células leveduriformes de *P. brasiliensis* multiplicam-se facilmente no interior de macrófagos alveolares e peritoneais murinos, depois de ingeridos. Entretanto, quando essas células são ativadas por IFN- γ , a multiplicação é limitada e os conídios e células fúngicas podem ser destruídos (BRUMMER et al., 1988, 1989, 1990). Em relação às células murinas os resultados mostraram que a ativação com IFN- γ promove a eliminação do fungo por meio da via L-arginina/óxido nítrico (NO) (GONZALEZ et al., 2000). No entanto, CALVI et al. (2003) demonstraram que a ativação com IFN- γ não é suficiente para a atividade fungicida de células humanas contra cepa virulenta (Pb18) do *P. brasiliensis*. Este processo é efetivo após a preativação dos monócitos com TNF- α ou IFN- γ associado ao TNF- α .

Em modelos experimentais murinos de paracoccidiodomicose, a atividade fungicida de macrófagos contra o *P. brasiliensis*, decorrente da ativação com IFN- γ foi atribuída à produção de óxido nítrico (NO), induzida pela enzima NO sintase. A indução dessa enzima depende do sinergismo de ação de citocinas de perfil Th1, como TNF- α e IFN- γ e, de produtos liberados pelo próprio agente patogênico (BOCCA et al., 1998). No

decorrer da infecção experimental por *P.brasiliensis*, há intensa produção de TNF- α , IFN- γ e NO, que se correlaciona com a capacidade fungicida dos macrófagos (NASCIMENTO et al., 2002). Portanto, a atividade fungicida da célula fagocitária parece depender do balanço entre citocinas estimuladoras e supressoras produzidas pela célula, durante a interação com fungo.

Embora os mecanismos envolvidos na destruição do fungo por monócitos e macrófagos ativados não estejam ainda totalmente esclarecidos, CARMO et al. (2006) demonstraram que a atividade fungicida de monócitos humanos contra o *P.brasiliensis* parece ser dependente da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por essas células, após ativação com IFN- γ e TNF- α .

Os resultados da literatura mostram que o receptor CR3 pode participar tanto na fagocitose dependente de opsonização como na independente desse fenômeno (OFEK et al., 1995). Existem evidências de que esse receptor pode se ligar a 1-3 β glucana e mediar a fagocitose de microrganismos que possuam esse componente na parede celular (THORNTON et al., 1996; XIA et al., 1999), como *P.brasiliensis* (KANETSUNA et al., 1969; CARBONELL et al., 1970; AZUMA et al., 1974). Além disso, estudos recentes realizados por JIMENEZ et al. (2006) documentam, pela primeira vez, a importância dos receptores CR3 e para manose na fagocitose de *P.brasiliensis* por macrófagos murinos e, contribuem significativamente para a compreensão de mecanismos de suscetibilidade ao fungo.

Entretanto, até o momento, não se conhece o papel da opsonização do fungo por componentes do complemento sobre a atividade fungicida de monócitos contra o *P.brasiliensis*. Assim, o estudo *in vitro* da atividade fungicida de monócitos humanos desafiados com células leveduriformes do fungo, opsonizadas com soro humano normal permitirá o conhecimento da importância do sistema complemento na ativação dessas células para induzir a morte do fungo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH. Innate Immunity. In:----- Editors. Cellular and Molecular Immunology 5thed, 2003; cap 12, 275-97.

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.

ALMEIDA SR, UNTERKIRCHER CS, CAMARGO ZP. Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. Med Mycol 1998; 36: 405-11.

ALVES LMC, FIGUEIREDO F, BRANDÃO FILHO SL, TINCANI I, SILVA CL. The role of fractions from *Paracoccidioides brasiliensis* in the genesis of inflammatory response. Mycopathologia 1987; 97:3-7.

AZUMA I, KANETSUNA F, TANAKA Y, YAMAMURA Y, CARBONELL LM. Chemical and immunological properties of galactomannans obtained from *Histoplasma duboisii*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatitidis*. Mycopathol Mycol Appl 1974; 54: 111–25.

BERMUDEZ L.E, YOUNG LS, ENKEL H. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. Infect Immun 1991; 59:1697-1702.

BHAKDI S, TRANUM-JENSEN J. Membrane damage by complement. Biochim Biophys Acta 1983; 737: 343-72.

BOCCA AL, HAYASHI EE, PINHEIRO AG, FURLANETTO AB, CAMPANELLI AP, CUNHA FQ, et al. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* – infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. J Immunol. 1998; 161: 3056-3063.

CALICH VL, KIPNIS TL, MARIANO M, NETO CF, DA SILVA WD. 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 Immunopathol 1979; 12: 21–30.

CALVI SA, PERAÇOLI MT, MENDES RP, MARCONDES-MACHADO J, FECCHIO D, MARQUES AS, et al. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. Microbes Infect. 2003; 5:107-113.

CANO LE, BRUMMER E, STEVENS DA, RESTREPO A. Fate of conidia of *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokines-treated macrophages. Infect Immun 1992; 60: 2096–2100.

CARBONELL LM, KANETSUNA F, GIL F. Chemical morphology of glucan and chitin in the cell wall of the yeast phase of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Bacteriol 1970; 101: 636–642.

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

CROSS CE, COLLINS HL, BANCROFT GJ. CR3-dependent phagocytosis by murine macrophages: different cytokines regulate ingestion of a defined CR3 ligand and complement-opsonized *Cryptococcus neoformans*. Immunology 1997; 91: 289-96.

CROTT LSP, LUCISANO-VALIM YM, SILVA CL, BARBOSA JE. Interactions of F1 fractions from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis* with human complement and with human neutrophils. Mycopathologia 1997; 140:19–27.

CROTT LSP, VALIM YM, 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 Vet Mycol 1993; 31: 17–27.

DAVIES SF, CLIFFORD DP, HOIDAL JR, REPINE JE. Opsonic requirements for the uptake of *Cryptococcus neoformans* by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J Infect Dis 1982; 145: 870–4.

DEEPE GS, BULLOCK WE. Immunological aspects of fungal pathogenesis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1990; 9: 567-79.

DRUTZ DJ, FREY CL. Intracellular and extracellular defenses of human phagocytes against *Blastomyces dermatitidis* conidia and yeasts. J Lab Clin Med 1985; 105:737–750.

EZEKOWITZ RAB, WILLIAMS DJ, KOZIEL H, ARMSTRONG MYK, WARNER A, RICHARDS FF, ROSE RM. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. Nature (Lond.) 1991; 351: 155-8.

FERRANTE A, THONG YH. Requirement of heat-labile opsonins for maximal phagocytosis of *Candida albicans*. Sabouraudia 1979; 17:293-7.

FRANCO M, MENDES RP, MOSCARDI-BACCHI M, REZKALLAH-IWASSO MT, MONTENEGRO MR. Paracoccidioidomycosis. Bailliere's Clin Trop Med Comm Dis 1989, 4: 185-220.

FIGUEIREDO F, SILVA CL, ALVES LMC, ROSSI MA. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. Brazilian J Med Biol Res 1986; 19:651A.

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

GAYNOR CD, MCCORMACK FX, VOELKER DR, MCGOWAN SE, SCHLESINGER LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. J Immunol. 1995; 155: 5343-51.

GONZALEZ A, GREGORI W, VELEZ D, RESTREPO A, CANO LE. Nitric Oxide participation in the fungicidal mechanism of Gamma Interferon-Activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. Infec Immun. 2000; 68: 2546-2552.

HENWICK S, HETHERINGTON SV, PATRICK CC. Complement binding to *Aspergillus* conidia correlates with pathogenicity. J Lab Clin Med 1993; 122: 27-35.

INZANA TJ, TOSI MF, KAPLAN SL, ANDERSON DC, MASON JR EO, WILLIAMS RP. Effect of *Haemophilus influenzae* type b lipopolysaccharide on complement activation and polymorphonuclear leukocyte function. Pediatric Res 1987; 22: 659-66.

JIMENEZ MP, RESTREPO A, RADZIOCH D, CANO LE, GARCIA LF. Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 47: 56-66.

JOUAULT T, IBATA-OMBETTA S, TAKEUCHI O, TRINEL PA, SACCHETTI P, LEFEBVRE P, AKIRA S, POULAIN D. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. J Infect Dis 2003; 188: 165-72.

KAGAYA, K., FUKAZAWA Y. Murine defense mechanism against *Candida albicans* infection. II. Opsonization, phagocytosis, and intracellular killing of *C. albicans*. Microbiol Immunol 1981; 25:807-18.

KAHN S, WLEKLINSKI M, ARUFFO A, FARR A, CODER D, KAHN M. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. J Exp. Med 1995; 182: 1243-58.

KANETSUNA F, CARBONELL LM, MORENO RE, RODRIGUEZ J. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Bacteriol 1969; 97: 1036–41.

KASHINO SS, FAZIOLI RDOS A, MOSCARDI-BACCHI M, FRANCO M, SINGER-VERMES LM, BURGER E, CALICH VL. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia. 1995 Jun;130(3):131-40.

KELLY RM, CHEN J, YAUCH LE, LEVITZ SM. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 2005; 73: 592-8.

KOZEL TR. Activation of the complement system by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 34–46.

KOZEL TR, BROWN RR, PFROMMER GST. Activation and binding of C3 by *Candida albicans*. Infect Immun 1987; 55:1890-4.

KOZEL TR, HIGHISON B, STRATTON CJ. Localization on encapsulated *Cryptococcus neoformans* of serum components opsonic for phagocytosis by macrophages and neutrophils. Infect. Immun 1984. 43:574-579.

KOZEL TR, PFROMMER GS. Activation of the complement system by *Cryptococcus neoformans* leads to binding of iC3b to the yeast. Infect Immun 1986 52: 1–5.

KOZEL TR, TABUNI A, YOUNG BJ, LEVITZ SM. Influence of opsonization conditions on C3 deposition and phagocyte binding of large- and small-capsule *Cryptococcus neoformans* cells. Infect Immun 1996; 64: 2336–8.

KOZEL TR, WILSON MA, FARRELL TP, LEVITZ SM. Activation of C3 and binding to *Aspergillus fumigatus* conidia and hyphae. Infect Immun 1989; 57: 3412–7.

KOZEL TR. Complement activation by pathogenic fungi. Res Immunol 1998; 149: 309–20.

LEVITZ SM, TABUNI A, KOZEL TR, MACGILL RS, INGALLS RR, GOLENBOCK DT. Binding of *Cryptococcus neoformans* to heterologously expressed human complement receptors. *Infect Immun* 1997; 65: 931–5.

LEVITZ SM, TABUNI A. Binding of *Cryptococcus neoformans* by human cultured macrophages. Requirements for multiple complement receptors and actin. *J Clin Invest* 1991; 87(2): 528-35.

LEVITZ SM. Receptor-mediated recognition of *Cryptococcus neoformans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2002; 43: 133-6.

LINEHAN SA, MARTÍNEZ-POMARES I, GORDON S. Macrophage lectins in host defence. *Microbes Infect* 2000; 2: 279-88.

MARÓDI L, SCHREIBER S, ANDERSON D, MACDERMOTT R P, KORCHAK H M, JOHNSTON R B JR. Enhancement of macrophage candidacidal activity by IFN- γ : increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest* 1993; 91: 2596–2601.

MARÓDI L., KORCHAK HM, JOHNSTON Jr RB. Mechanisms of host defense against *Candida* species . I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 1991; 146: 2783-9.

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.

MEIER A, KIRSCHNING CJ, NIKOLAUS T, WAGNER H, HEESEMANN J, EBEL F. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for *Aspergillus*-induced activation of murine macrophages. *Cell Microbiol.* 2003; 5: 561-70.

MORELLI R, ROSENBERG LT. The role of complement in the phagocytosis of *Candida albicans* by mouse peripheral blood leukocytes. J Immunol 1971; 107: 476–80.

MOSCARDI-BACHI M, BRUMMER E, STEVENS D. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. J Med Microbiol 1993; 40: 159–64.

MUNK ME, KAJDACSY-BALLA A, DEL NEGRO G, CUCE LC, DA SILVA WD. Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol 1992; 30: 317–21.

MUNK ME, DIAS DA SILVA WD. Activation of human complement system *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. J Med Vet Mycol 1992; 30: 481-4.

MYONES, B L., DAIZELL JG, HOGG N, ROSS GD. Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR-4) activity resembling CR-3. J Clin Invest 1988; 82: 640-51.

NASCIMENTO FRF, CALICH VLG, RODRIGUEZ D, RUSSO M. DUAL role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. J Immunol. 2002; 168:4593-4600.

NETEA MG, SUTMULLER R, HERMANN C, VAN DER GRAAF CA, VAN DER MEER JW, VAN KRIEKEN JH, HARTUNG T, ADEMA G, KULLBERG BJ. Toll-like receptor 2 suppress immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. J Immunol 2004; 172: 3712-8.

NETEA MG, VAN DER GRAAF CA, VONK AG, VERSCHUEREN I, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ. The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. J Infect Dis 2002; 185: 1483-9.

NEWMAN SL, CHATURVEDI S, KLEIN BS. The WI-1 antigen of *Blastomyces dermatitidis* yeasts mediates binding to human macrophage CD11b/CD18 (CR3) and CD14. *J Immunol* 1995; 154: 753–61.

O'RIORDAN DM, STANDING JE, LIMPER AH. *Pneumocystis carinii* glycoprotein A binds macrophage mannose receptors. *Infect Immun* 1995; 63: 779-84.

PFROMMER, GS, DICKENS SM, WILSON MA, YOUNG BJ, KOZEL TR. Accelerated decay of C3b to iC3b when C3b is bound to the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Infect Immun* 1993; 61: 4360–6.

PLUSCHKE G, ACHTMAN M. Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1 *Escherichia coli* differs with O antigen type and correlates with virulence of meningitis in newborns. *Infect Immun* 1984; 43: 684-92.

POPI AF, LOPES JD, MARIANO M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol* 2002; 218: 87-94.

ROECKLEIN JA, SWARTZ RP, YEAGER H Jr. Nonopsonic uptake of *Mycobacterium avium* complex by human monocytes and alveolar macrophages. *J Lab Clin. Med* 1991; 119: 772-81.

ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. Migração celular e inflamação. In:----- Editores. *Imunologia*, 6a. ed., 2003, Editora Manole, Barueri, SP., cap 3, 47-64.

SENGELOV H, KJELDSSEN L, KROEZE W, BERGER M, BORREGAARD N. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J Immunol* 1994; 153: 804-10.

SHEPHERD VL., CAMPBELL EJ, SENIOR RM, STAHL PD. Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes. *J Reticuloendothel Soc* 1982; 32: 423-31.

SHIKANAI-YASUDA MA, ASSIS CM, TAKEDA KM, TAMASHIRO N, BUENO JP. Monocyte adherence to *Paracoccidioides brasiliensis*, zymosan-C3b and erythrocyte-hemolysin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1997; 138: 65-69.

SHOHAM S, HUANG C, CHEN JM, GOLENBOCK DT, LEVITZ SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* 2001; 166: 4620-6.

SOARES AMVC, CALVI SA, PERAÇOLI MTS, FERNADEZ 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; 102:480-485.

SOLOMKIN JS, MILLS EL, GIEBINK GS, NELSON RD, SIMMONS RL, QUIE PG. Phagocytosis of *Candida albicans* by human leukocytes opsonic requirements. *J Infect. Dis* 1978; 137: 30-7.

SPEERT DP, WRIGHT SD, SILVERSTEIN SC, MAH B. Functional characterization of macrophage receptors for in vitro phagocytosis of unopsonized *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Invest* 1988; 82: 872-9

SPETH C, RAMBACH G, LASS-FLORL C, DIERICH MP, WURZNER R. The role of complement in invasive fungal infections. *Mycoses* 2004; 47: 93-103.

SPETH C, WURZNER R, STOIBER H, DIERICH MP. The complement system: pathophysiology and clinical relevance. *Wien Klin Wochenschr* 1999; 111: 378-91.

STAHL PD; EZEKOWITZ RAB. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 50-5.

STURTEVANT JE, LATGÉ JP. Interactions between conidia of *Aspergillus fumigatus* and human complement component C3. *Infect Immun* 1992; 60: 1913-8.

THONG YH, FERRANTE A. Alternative pathway of complement activation by *Candida albicans*. Aust N Z J Med 1978; 8: 620–2.

THORNTON BP, VETVICKA V, PITMAN M, GOLDMAN RC, ROSS GD. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the b-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). J Immunol 1996; 156: 1235–46.

UNDERHILL DM; OZINSKY A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annu Rev Immunol 2002; 20: 825-52.

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

WILSON ME, PEARSON RD. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. J Immunol 1986; 136: 4681-8.

XIA Y, VETVICKA V, YAN J, HANIKYROVA M, MAYADAS T, ROSS GD. The α -glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. J Immunol 1999; 162: 2281–90.

YAMAMURA M, VALDIMARSSON H. Participation of C3 in intracellular killing of *Candida albicans*. Scand J Immunol 1977; 6: 591–4.

YOUNG BJ, KOZEL TR. Effects of strain variation, serotype and structural modification on the kinetics for activation and binding of C3 to *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 1993; 61: 2966–72.

ZARAGOZA O, TABORDA CP, CASADEVALL A. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. Eur. J Immunol 2003; 33: 1957–67.

ZHANG MX, BRANDHORST TT, KOZEL TR, KLEIN BS. Role of glucan and surface protein BAD1 in complement activation by *Blastomyces dermatitidis* yeast. *Infect Immun* 2001; 69: 7559–64.

ZHANG MX, KLEIN B. Activation, binding and processing of complement component 3 (C3) by *Blastomyces dermatitidis*. *Infect Immun* 1997; 65: 1849–55.

Capítulo 2

**EFEITO DO SISTEMA COMPLEMENTO SOBRE A ATIVIDADE
FUNGICIDA E PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL-
ALFA POR MONÓCITOS HUMANOS INFECTADOS COM
*Paracoccidioides brasiliensis***

Sérgio S. Fogaça¹, Érika T. Nakaira¹, Ana Paula Bordon¹, Ângela Maria V. C. Soares¹,
Maria Terezinha S. Peraçoli^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, 18618-000 Botucatu, São Paulo, Brasil.

* Endereço para correspondência:

Dra Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP,

Distrito de Rubião Junior s/n

CEP 18618-000 Botucatu, São Paulo, Brasil.

e-mail: peracoli@ibb.unesp.br

Padronizado de acordo com as normas para publicação na Revista FEMS Immunology & Mycobiology, Blackwell Publishing, Ltd.

RESUMO

Monócitos e macrófagos são células da imunidade inata que desempenham importante papel na defesa contra infecções fúngicas, através do reconhecimento dos fungos, ativação e desenvolvimento de atividade fungicida. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da opsonização de células leveduriformes de *P. brasiliensis* com soro humano sobre a atividade fungicida de monócitos humanos e sobre a produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por essas células. Monócitos de sangue periférico, obtidos de indivíduos saudáveis, foram cultivados na ausência ou presença de 500 UI de IFN- γ por 24h a 37°C. A seguir essas células foram desafiadas com a amostra Pb18 de *P. brasiliensis* durante 4h nas proporções monócito-fungo de 10:1 e de 50:1. A suspensão fúngica foi previamente incubada por 30 min a 36°C com meio de cultura RPMI, RPMI suplementado com 10% de soro humano normal, não inativado ou com meio RPMI suplementado com 10% de soro humano submetido à inativação por aquecimento a 56°C por 30 min. A atividade fungicida dos monócitos contra Pb18 foi avaliada por plaqueamento dessas co-culturas em meio de cultivo BHI-ágar e determinação da recuperação de fungos viáveis após 14 dias de incubação a 36°C. A produção de TNF- α foi determinada, por ensaio imunoenzimático (ELISA), no sobrenadante das co-culturas após 18h de incubação a 37°C. Os resultados mostraram que o desafio de monócitos com Pb18 opsonizado com soro não inativado induz aumento significativo da atividade fungicida e níveis elevados de TNF- α em comparação às co-culturas desafiadas com o fungo não opsonizado ou opsonizado com soro inativado. A pré-incubação dessas células com IFN- γ antes do desafio com Pb18 levou ao aumento da atividade dessas células, demonstrado por liberação de níveis mais elevados de TNF- α e da atividade fungicida, em comparação às células não estimuladas com IFN- γ . O desafio de monócitos com células fúngicas, não opsonizadas ou tratadas com soro inativado induziu baixa produção de TNF- α e não estimulou a atividade fungicida dessas células. Em conjunto, os resultados sugerem a participação de componentes do sistema complemento na ativação de monócitos para uma atividade fungicida eficiente contra o *P. brasiliensis*.

ABSTRACT

Monocytes and macrophages are cells of the innate immune response that play an important role against fungal infections by fungal recognition, and activation to achieve an efficient fungicidal activity. This study evaluated the effect of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells opsonized with human serum on the fungicidal activity and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) production by human monocytes. Peripheral blood monocytes obtained from healthy individuals were pre-incubated for 24h with or without 500 UI of human recombinant interferon-gamma (IFN- γ) and then challenged with the *P.brasiliensis* strain (Pb18) for 4h at ratios of monocytes to fungi 1:1 and 50:1. The fungal suspension was previously incubated for 30 min at 37°C in RPMI culture medium without serum, or with 10% non-inactivated normal human serum, or 10% heat-inactivated normal human serum. Fungicidal activity of monocytes against Pb18 was assessed by viable fungi recovery after plating in BHI-agar and counting of colony-forming-units after 14 days of culture at 36°C. TNF- α production was determined in supernatant cultures by enzyme immunoassay (ELISA). The results showed that the monocyte challenge with Pb18 opsonized with non-inactivated serum induced a significant increase in fungicidal activity and high levels of TNF- α in comparison with co-cultures challenged with non-opsonized or heat-inactivated opsonized fungus. The monocyte pre-incubation with IFN- γ before the fungus challenge led to cell activation demonstrated by higher production of TNF- α levels and fungicidal activity in relation to the cells non-stimulated with IFN- γ . Fungal cells non-opsonized or opsonized with heat-inactivated serum induced lower production of TNF- α and did not stimulate fungicidal activity after monocyte challenge. These results suggest the involvement of complement system in monocyte activation for an efficient fungicidal activity against *P.brasiliensis*.

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica de maior incidência nos países da América Latina, sendo o Brasil o país que concentra o maior número de casos (WANKE & LONDERO, 1994). O agente etiológico da doença é o fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que se apresenta na forma de micélio ou conídios à temperatura ambiente, com variação de 4 a 28°C. Na temperatura de 37°C, tanto *in vivo*, nos tecidos do hospedeiro, quanto *in vitro*, em meios de cultura apropriados apresenta-se sob a forma de levedura (RESTREPO, 1985). A infecção ocorre, provavelmente, pela inalação de propágulos do fungo, que se depositam nos pulmões, causando lesões locais. Considera-se que as manifestações clínicas da PCM sejam decorrentes da progressão de lesões primárias, pela reativação de focos quiescentes após um período de latência (reativação endógena) ou pela re-infecção exógena após exposição ao fungo (MONTENEGRO & FRANCO, 1994).

Pacientes com a forma ativa da micose apresentam uma gama de sinais e sintomas agrupados em dois padrões principais que definem as formas aguda e crônica (FRANCO et al., 1987). No adulto, a forma clínica predominante é a crônica, mas quando acomete crianças ou adolescentes apresenta-se na forma aguda ou subaguda. Quando a micose não é diagnosticada e tratada oportunamente pode levar a formas disseminadas graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento dos pulmões, tegumento, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides do tubo digestivo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

O estabelecimento da doença, sua disseminação e gravidade dependem de fatores ligados ao fungo, como virulência e composição antigênica, das condições ambientais e principalmente de fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro, durante a interação com o fungo. *P.brasiliensis* induz resposta imunológica altamente complexa e multifatorial, cujos componentes celulares são ativados, no sentido de desempenharem

papel efetor direto contra o parasita ou de participar dos mecanismos imunoregulatórios presentes no organismo infectado (PERAÇOLI & SOARES, 1992). Assim, a imunidade celular, mediada por linfócitos T e macrófagos desempenha papel central na resistência aos fungos.

Muitos indivíduos são expostos ao *P.brasiliensis*, mas poucos desenvolvem a doença, sugerindo que mecanismos de imunidade inata e adaptativa podem ser importantes na eliminação do fungo (MUSATTI et al., 1994). Monócitos e macrófagos atuam como primeira linha de defesa do organismo contra infecções fúngicas. A função das células fagocitárias depende do seu estado de ativação, induzido principalmente pelo ambiente de citocinas presentes durante a interação com o microrganismo.

Conídios ou células leveduriformes de *P. brasiliensis* multiplicam-se facilmente no interior de macrófagos alveolares e peritoneais murinos, depois de ingeridos. Entretanto, quando essas células são ativadas por IFN- γ , a multiplicação é limitada e os conídios e células fúngicas podem ser destruídos (BRUMMER et al., 1988, 1989, 1990). Em relação às células murinas os resultados mostraram que a ativação com IFN- γ promove a eliminação do fungo por meio da via L-arginina/óxido nítrico (NO) (GONZALEZ et al., 2000). Embora os mecanismos envolvidos na destruição do fungo por monócitos e macrófagos ativados não estejam ainda totalmente esclarecidos, CARMO et al. (2006) demonstraram que monócitos humanos ativados com fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ou associação de TNF- α e IFN- γ exercem atividade fungicida contra cepa virulenta de *P.brasiliensis* por mecanismos envolvendo a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por essas células, não ocorrendo participação de NO. Por outro lado, o tratamento prévio de neutrófilos humanos com IL-10 inibe atividade fungicida dessas células ativadas com TNF- α (COSTA et al., 2007).

A ativação do sistema complemento por fungos, tanto pela via clássica como pela alternativa, resulta na deposição de opsoninas sobre a superfície da célula fúngica, facilitando a fagocitose e a atividade fungicida das células fagocitárias. Vários trabalhos têm mostrado que a fagocitose de microrganismos como *Cryptococcus neoformans* (KOZEL et al., 1996, KELLY et al., 2005), *Cândida albicans* (GRUBER et al., 1998; TRIEBEL et al., 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (HIRSCH et al., 1994) e *Listeria monocytogenes* (DREVETS et al., 1996) na presença de soro humano fresco é mais eficiente do que com soro inativado, enfatizando a importância dos receptores para complemento nas células fagocitárias. O contato entre as células leveduriformes de *P.brasiliensis* e fagócitos é facilitado pela ativação da via alternativa do sistema complemento, que leva à opsonização das leveduras (SHIKANAI-YASUDA et al., 1997). Componentes do próprio fungo, como a glicoproteína de 43 kDa (gp43), considerada o principal antígeno secretado por *P.brasiliensis*, pode promover a adesão inicial e a internalização da levedura por células fagocíticas (ALMEIDA et al., 1998).

Células leveduriformes de *P.brasiliensis* ativam o complemento pela via alternativa in vitro (MUNK et al., 1992), resultando na opsonização e fagocitose do fungo por macrófagos (CALICH et al., 1979). JIMENEZ et al. (2006) demonstraram que a fagocitose de conídios de *P.brasiliensis* por macrófagos de medula óssea de camundongos ocorre por mecanismos envolvendo ou não opsonização. A aderência e fagocitose dependentes de opsonização são mediadas pelo complemento e receptores CR, enquanto a fagocitose independente de opsonização envolve receptores de manose na célula fagocitária. Entretanto, até o momento, não se conhece o papel da opsonização do fungo por componentes do complemento sobre a atividade fungicida de monócitos contra o *P.brasiliensis*.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito do sistema complemento sobre a atividade fungicida e produção de fator de necrose tumoral- α por monócitos humanos previamente ativados com IFN- γ e infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram utilizadas amostras do sangue periférico de 10 indivíduos saudáveis, doadores do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP – Câmpus de Botucatu. Todos os indivíduos selecionados apresentavam reação negativa ao teste cutâneo com paracoccidioidina. 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.

3.2. Cultivo e preparo da suspensão de *P. brasiliensis*

Utilizou-se a amostra de *P. brasiliensis* Pb18, proveniente da Micoteca do departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. A cepa foi mantida a 37°C com subcultivos semanais em meio de cultura GPY, contendo 2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 2% de ágar. As células leveduriformes foram empregadas após 6 dias de cultivo, para a infecção das culturas de monócitos. Após o crescimento, as células foram removidas da superfície de cultivo, com alça de platina e transferidas para tubos estéreis contendo 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) e pérolas de vidro de 4mm de

diâmetro, sendo 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, uma alíquota dessa suspensão foi obtida para contagem das células leveduriformes em câmara hemocitométrica tipo Neubauer, utilizando microscópio com contraste de fase, segundo método descrito por SOARES et al. (2001). Foram consideradas como viáveis as células que se apresentaram com aspecto brilhante, uma vez que as células mortas apresentam-se com coloração opaca e escura. Nos ensaios, foram empregadas suspensões fúngicas que apresentavam, no mínimo, 90% de viabilidade.

3.3. Preparo do extrato-aquoso de células fúngicas

A amostra Pb192 de *P. brasiliensis* foi cultivada em meio de cultura GPY, contendo 2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 2% de ágar por incubação a 36°C. As culturas foram utilizadas após 5 dias de cultivo para o preparo do extrato aquoso segundo o método de KURITA et al. (1993). O crescimento de um tubo de cultura de Pb192 foi retirado com alça de platina e colocado em frasco contendo 250 mL de GPY, sendo incubado a 36°C com agitação constante de 140 rpm por 7 dias. Após o período, o meio foi distribuído em frascos plásticos que foram centrifugados a 2500 rpm por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado fúngico pesado, sendo adicionado volume de água destilada estéril suficiente para obtenção de suspensão fúngica a 10%. A seguir, a suspensão foi autoclavada a 127°C por 15 min e deixada em repouso por 3 dias à temperatura ambiente. Após esse período, os frascos contendo essa suspensão foram centrifugados a 2500 rpm por 15 min, o sobrenadante retirado com esterilidade e denominado extrato aquoso. As alíquotas desse extrato foram armazenadas a – 20°C até o momento de uso.

3.4. 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 obtidas por meio da separação em gradiente de Ficoll-Hypaque (BOYUM et al., 1968) e lavadas inicialmente com solução gelada de EDTA-PBS, por centrifugação a 200 g por 10 minutos e, em seguida, com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) por mais 10 minutos a 200 g. Após esses procedimentos as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma), 40 µg/mL de gentamicina e 10% de soro bovino fetal (Gibco) inativado por aquecimento a 36°C por 30 min (meio RPMI completo), sendo a identificação e viabilidade dos monócitos realizada através da incorporação de vermelho neutro. Aliquotas de 50 µL da suspensão celular foram incubadas a 37°C, durante 10 minutos com 450 µL da solução do corante a 0,02%. Os monócitos foram diferenciados dos linfócitos por apresentarem citoplasma de coloração vermelha. A seguir, a suspensão celular foi ajustada para 2×10^6 monócitos/mL e 100 µL dessa suspensão foram distribuídos em placas de cultura de 96 orifícios. Após uma hora de incubação a 37°C em tensão de 5% de CO₂, as células não aderentes foram eliminadas através de lavagem das placas com meio de cultura RPMI.

3.5. Atividade fungicida

Monócitos, obtidos conforme descrito no item 3.4, foram cultivados na presença ou ausência de 500 UI/mL de Interferon-gama (R & D Systems) por 24h a 37°C em placas de 96 orifícios e fundo plano (Linbro, Flow Lab, USA). A seguir, os orifícios da placa foram lavados com meio RPMI completo e os monócitos desafiados com células leveduriformes de *P. brasiliensis*, previamente incubadas com meio RPMI, RPMI suplementado com 10% de soro humano autólogo não inativado (soro fresco), ou com 10% de soro humano

autólogo inativado a 56°C por 30 min, nas proporções monócitos:fungo de 50:1 e 1:1 (culturas experimentais). Alguns orifícios da placa de cultura receberam apenas as suspensões de células fúngicas, tratadas ou não com soro fresco ou inativado, diluídas em RPMI em concentrações equivalentes às utilizadas na incubação com os monócitos (culturas controles). Após o período de 4h, os sobrenadantes das culturas foram coletados e as células submetidas a diversas lavagens com água destilada estéril. Este processo permite que os monócitos sejam 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, contendo fungos viáveis ou não, foi centrifugado e ressuspenso em volume de água destilada que permita 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 extrato aquoso preparado segundo KURITA et al. (1993), conforme descrito no item 1.4. 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 foram incubadas em estufa a 36°C por 14 dias, quando então as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. A atividade fungicida (AF) dos monócitos foi determinada pela seguinte fórmula:

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

3.6. Obtenção de sobrenadantes de cultura de monócitos de indivíduos saudáveis

Os monócitos obtidos, conforme descrito no item 3.4. foram cultivados na presença ou ausência de 500 UI/mL de Interferon-gama (R & D Systems) por 24h a 37°C em placas de 96 orifícios e fundo plano (Linbro, Flow Lab, USA). A seguir, os orifícios da placa foram lavados com meio RPMI completo e os monócitos incubados a 37°C, em tensão de 5% de CO₂, na ausência ou na presença de 20 ug/mL de lipopolissacáride (LPS) de *Escherichia coli* 055B5 ou de células leveduriformes viáveis de *P.brasiliensis*, células leveduriformes de *P. brasiliensis*, previamente incubadas com meio RPMI, RPMI suplementado com 10% de soro humano autólogo não inativado (soro fresco), ou com 10% de soro humano autólogo inativado a 56°C por 30 min, na proporção monócitos:fungo de 50:1. Após 18h de co-cultivo, o sobrenadante foi aspirado, submetido à centrifugação para eliminação de células fúngicas e armazenado a - 70°C para dosagem de TNF- α pela técnica de ELISA.

3.7. Determinação de fator de necrose tumoral-alfa

A pesquisa de TNF- α foi realizada pela técnica de ELISA, utilizando-se placas de 96 orifícios e fundo plano (Maxsorb-Nunc, Life Tech. Inc., MD, USA) e anticorpos monoclonais e policlonais anti-citocina específica. As concentrações dos anticorpos, utilizadas nas reações, foram as recomendadas pelo fabricante.

As placas de 96 orifícios e fundo plano (Maxsorb-Nunc) foram sensibilizadas por 18 h a 37°C com anticorpo monoclonal de camundongo anti-TNF- α humano (R & D Systems), diluído em tampão fosfato pH 7,2 (PBS), na concentração de 2 μ g/mL. Após esse período os orifícios foram lavados 4 vezes com 300 μ L de PBS, contendo Tween 20 a 0,05% (PBST). O bloqueio da placa foi realizado colocando-se em cada orifício 300 μ L de PBS contendo 5% de sacarose, 1% de soro albumina bovina (BSA) e 0,05% de NaN₃

(azida sódica), à temperatura ambiente, por 2 h. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito acima e 100 µL dos sobrenadantes gerados e do TNF- α recombinante humano (R & D Systems), em diferentes concentrações, foram adicionados à placa. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente seguiu-se nova lavagem da placa, sendo adicionado o anticorpo revelador policlonal de coelho anti-TNF- α humano conjugado com biotina (R & D Systems) na concentração de 100 ng/mL em PBS contendo 0,1% BSA, seguindo-se incubação por 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 2 µg/mL por 60 min a 37°C. Lavou-se novamente a placa com PBST e adicionou-se 100 µL do substrato enzimático, constituído por 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo 1mg/mL do revelador ortofenilenodiamina (Sigma) e 10 µL de H₂O₂ a 30% (Sigma). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min, a reação foi bloqueada pela adição de 50µL de ácido sulfúrico 2M e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA (Multiskan) com comprimento de onda de 492 nm. Os níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura de monócitos foram calculados, utilizando-se curva padrão, obtida com TNF- α recombinante humano (R & D Systems), em concentrações variando de 15 pg/mL a 2000 pg/mL.

3.8. Análise Estatística

Os resultados referentes ao efeito do IFN- γ e do sistema complemento sobre a atividade fungicida de monócitos desafiados com *P. brasiliensis*, bem como a produção de TNF- α por essas células foram analisados empregando-se o teste de análise de variância (ANOVA) para amostras dependentes, através do programa estatístico INSTAT, 3.05

(Graph-Pad, San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado para os testes empregados foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da concentração de IFN-gama para estudo da atividade fungicida de monócitos contra *P.brasiliensis*

Inicialmente as culturas de monócitos humanos foram tratadas com concentrações de IFN- γ variando de 50 a 1000 UI/mL, para escolha da melhor dose capaz de induzir a atividade fungicida. As células foram incubadas na presença ou ausência de IFN- γ por 24h, conforme descrito no item 3.5 de material e métodos e desafiadas com células leveduriformes viáveis de *P.brasiliensis*, opsonizadas com 10% de soro autólogo fresco, na proporção monócito:fungo de 1:1 e 50:1 (Figura 1). Os resultados mostram que a atividade fungicida de monócitos incubados com 500 UI/mL de IFN- γ foram significativamente maiores em comparação com as culturas controle, não estimuladas e as estimuladas com IFN- γ nas concentrações de 50, 100 e 300 UI/mL. Os valores obtidos pela estimulação com 500 UI/mL de IFN- γ não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à dose de 1000 UI/mL da citocina. Esses resultados sugerem um efeito dose-dependente do IFN- γ sobre a atividade fungicida dos monócitos humanos. Em vista desses resultados escolhemos a dose de 500 UI/mL de IFN- γ para o estudo da atividade fungicida de monócitos contra *P.brasiliensis* opsonizados com sistema complemento.

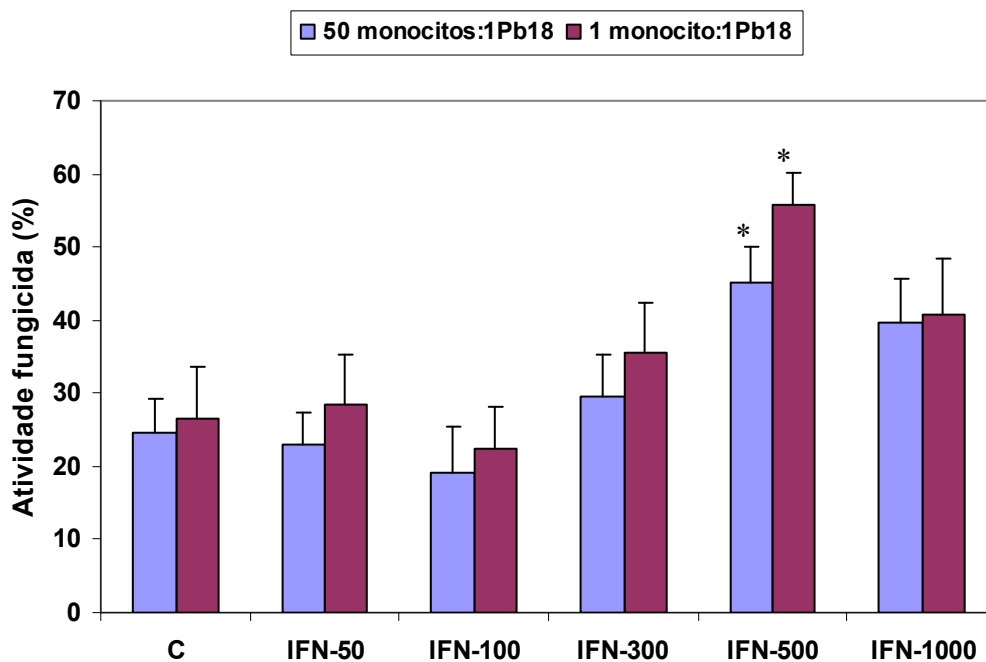


Figura 1. Atividade fungicida de monócitos humanos estimulados ou não com diferentes concentrações de Interferon-gama (IFN) e desafiados com células leveduriformes de *P.brasiliensis* (Pb18) tratadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro humano fresco, não inativado na proporção monócito:fungo de 1:1 e 50:1. Os valores representam a média \pm erro padrão dos resultados obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* ($p < 0,05$) vs C, 50 UI/mL, 100 UI/mL e 300 UI/mL (Anova)

4.1. Avaliação da recuperação de fungos viáveis

Nas figuras 2 e 3 são apresentados os resultados da média \pm erro padrão de recuperação das unidades formadoras de colônia (UFC) de fungos viáveis a partir de culturas de monócitos ativados ou não com interferon-gama e desafiados com a amostra Pb18, nas proporções monócito:fungo de 1:1 e 50:1 respectivamente.

Os resultados mostram que, em ambos os tratamentos monócitos:fungo, a recuperação de fungos viáveis foi significativamente menor nas co-culturas de monócitos ativados por IFN- γ e desafiados com Pb18 opsonizados com soro humano fresco (SF-IFN) quando comparada às demais culturas contendo apenas Pb18 (SI-Pb, SS-Pb, SF-Pb) ou às

culturas de monócitos pré-tratadas ou não com IFN- γ e infectadas com Pb18 não opsonizado (SS-IFN, SS-Mo) ou tratado com soro inativado (SI-IFN; SI-Mo). A incubação do fungo com meio RPMI sem soro ou com meio RPMI adicionado de soro humano inativado, não apresentou efeito sobre a capacidade dos monócitos em matar o fungo.

Não foram observadas diferenças significativas entre os resultados da recuperação de fungos viáveis nas culturas de monócitos pré-tratados ou não com IFN- γ e desafiados com células leveduriformes de *P.brasiliensis* opsonizadas com soro fresco (SF-Mo e SF-IFN). A baixa recuperação de fungos nessas culturas sugere o papel do sistema complemento na atividade fungicida de monócitos contra o *P.brasiliensis*.

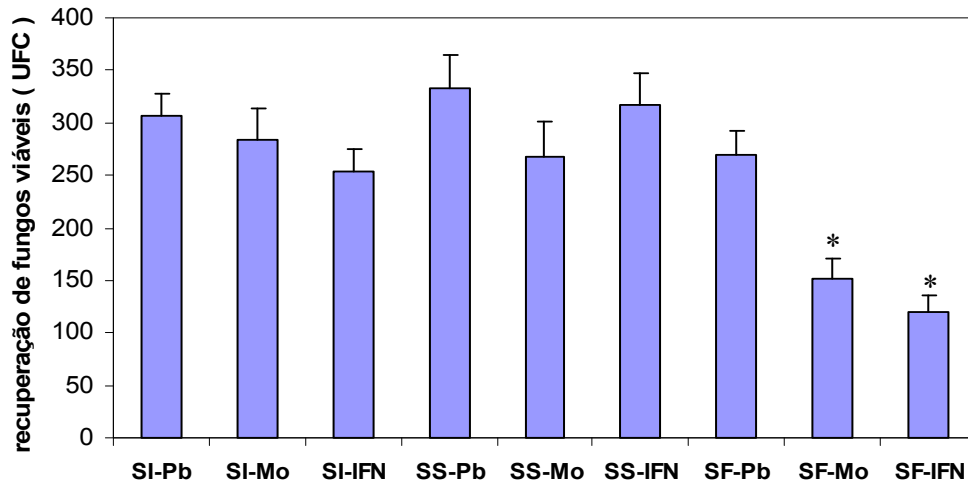


Figura 2. Recuperação de fungos viáveis a partir de monócitos humanos estimulados ou não com 500 UI/mL de Interferon-gama (IFN) e desafiados com células leveduriformes de *P.brasiliensis* (Pb) tratadas com meio RPMI sem soro (SS), RPMI com 10% de soro humano fresco (SF) ou RPMI com 10% de soro humano inativado (SI), na proporção monócito:fungo de 1:1. Os valores representam a média \pm erro padrão dos resultados obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* ($p < 0,01$) vs (Pb, Mo, IFN) SI; (Pb, Mo, IFN) SS; (Pb) SF

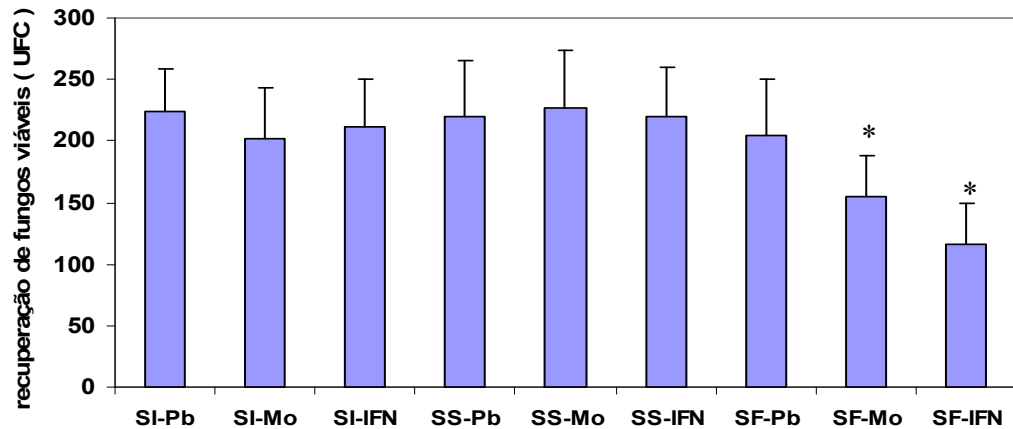


Figura 3. Recuperação de fungos viáveis a partir de monócitos humanos estimulados ou não com 500 UI/mL de Interferon-gama (IFN) e desafiados com células leveduriformes de *P.brasiliensis* (Pb) tratadas com meio RPMI sem soro (SS), RPMI com 10% de soro humano fresco (SF) ou RPMI com 10% de soro humano inativado (SI), na proporção monócito:fungo de 50:1. Os valores representam a média \pm erro padrão dos resultados obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* ($p < 0,01$) vs (Pb, Mo, IFN) SI; (Pb, Mo, IFN) SS; (Pb) SF

4.2. Avaliação da atividade fungicida

Os resultados da atividade fungicida de monócitos humanos contra *P.brasiliensis* na proporção monócito:fungo de 1:1 e de 50:1 estão representados na Figura 4. Os valores da atividade fungicida de monócitos contra *P.brasiliensis* foram semelhantes nas duas proporções monócito-fungo empregadas. Os valores da atividade fungicida mostram que apenas monócitos tratados com IFN- γ e desafiados com Pb18 opsonizado com soro fresco (SF-IFN) apresentam capacidade fungicida significativamente mais elevada do que células desafiadas com o fungo não opsonizado (SS) ou tratado com soro inativado (SI). Mesmo o tratamento prévio dos monócitos com IFN- γ não estimulou a atividade fungicida contra o Pb18 não opsonizado (SS-IFN) ou tratado com soro humano inativado (SI-IFN). Os

valores da atividade fungicida de monócitos contra *P.brasiliensis* foram semelhantes nas diferentes proporções monócito-fungo empregadas.

O cultivo de monócitos na presença da citocina, seguido do desafio com as células leveduriformes opsonizadas com soro fresco (SF-IFN) levou à maior atividade fungicida em comparação com as células não tratadas com IFN- γ (SF-Mo). Esses resultados sugerem que a ativação de monócitos com IFN- γ aumenta a capacidade fungicida dessas células contra o fungo. Embora a atividade fungicida de monócitos não estimulados com IFN- γ e desafiados com Pb18 opsonizado com soro fresco (SF-Mo) seja significativamente menor do que as células pré-tratadas com IFN- γ , nessas mesmas condições, essa atividade foi mais elevada em comparação com as células tratadas ou não com IFN- γ e desafiadas com células leveduriformes não opsonizadas (SS-IFN) ou opsonizadas com soro inativado (SI-IFN). Esses resultados indicam o importante papel do sistema complemento na capacidade lítica de monócitos contra o *P.brasiliensis*.

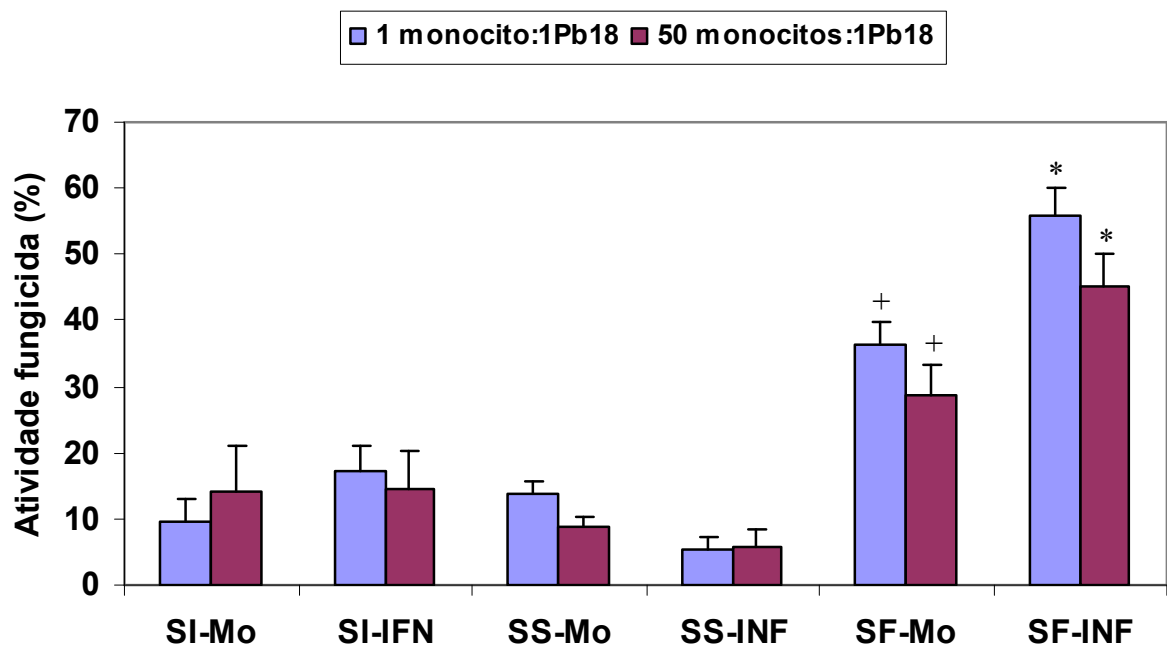


Figura 4. Atividade fungicida de monócitos humanos estimulados ou não com 500 UI/mL de Interferon-gama (IFN) e desafiados com células leveduriformes de *P.brasiliensis* tratadas com meio RPMI sem soro (SS), RPMI com 10% de soro humano fresco (SF) ou RPMI com 10% de soro humano inativado (SI), na proporção monócito:fungo de 1:1 e 50:1. Os valores representam a média \pm erro padrão dos resultados obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

+ ($p < 0,05$) vs (Mo, IFN) SI; (Mo, IFN) SS

* ($p < 0,01$) vs (Mo, IFN) SI; (Mo, IFN) SS; (Mo) SF

4.3. Determinação de TNF-alfa no sobrenadantes de cultura de monócitos desafiados com *P.brasiliensis*

Na Figura 5 observa-se que o desafio das culturas de monócitos com células leveduriformes de *P.brasiliensis* opsonizadas com soro fresco levou à produção de níveis de TNF- α significativamente mais elevados do que os obtidos nas culturas controle não infectadas com o fungo, tratadas ou não com IFN- γ (Cs/IFN; Cc/IFN) e em relação aos níveis detectados após desafio com Pb18 não opsonizado (SS) ou opsonizado com soro inativado (SI). O pré-tratamento dos monócitos com IFN- γ seguido do desafio com Pb18 opsonizado com soro fresco induziu a liberação de níveis significativamente mais altos da citocina, em relação a todos os demais tratamentos. A estimulação prévia com IFN- γ de monócitos desafiados com Pb18 não opsonizado (SS) ou opsonizado com soro inativado (SI) levou à produção de baixos níveis de TNF- α , cujos valores foram estatisticamente diferentes apenas em relação aos detectados nas culturas controle. Quando as culturas foram estimuladas com LPS, utilizado como estímulo controle positivo, a concentração de TNF- α foi significativamente maior do que nas culturas previamente tratadas com IFN- γ , sugerindo um efeito modulador positivo do IFN- γ sobre a capacidade de produção de TNF- α pelos monócitos.

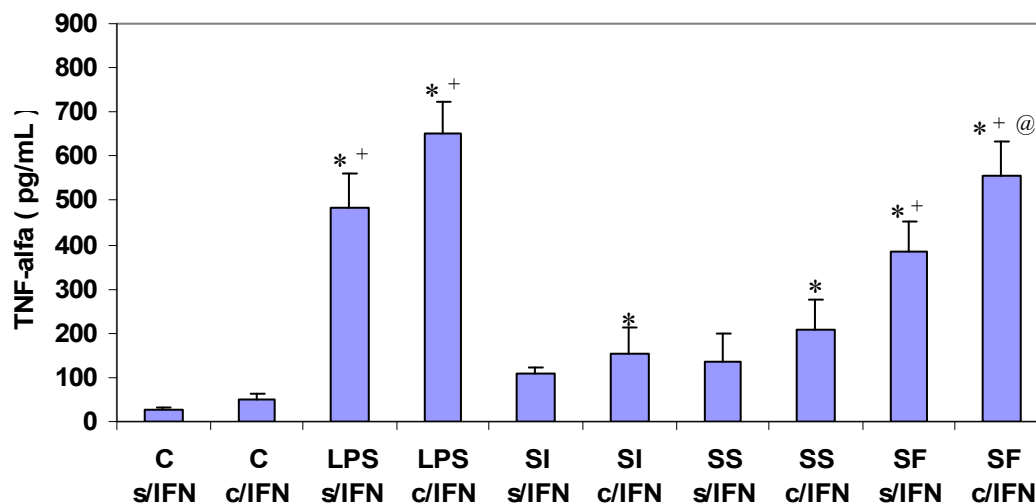


Figura 7. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) produzido por monócitos humanos estimulados ou não com 500 UI de Interferon-gama (IFN) e desafiados com células leveduriformes de *P.brasiliensis* tratadas com meio RPMI sem soro (SS), RPMI com 10% de soro humano fresco (SF) ou RPMI com 10% de soro humano inativado (SI), na proporção monócito:fungo de 50:1. Os valores representam a média \pm erro padrão dos resultados obtidos de 10 indivíduos saudáveis.

* ($p < 0,05$) vs C (s/IFN, c/IFN);

+ ($p < 0,05$) vs SI, SS (s/IFN; c/IFN)

@ ($p < 0.01$) vs SF(s/IFN)

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos o efeito do sistema complemento sobre a atividade fungicida e a produção de TNF- α por monócitos humanos previamente ativados ou não com IFN- γ e desafiados com a cepa virulenta de *P.brasiliensis* opsonizada com soro humano.

Inicialmente as células fúngicas foram incubadas a 37 °C por 30 min com meio RPMI suplementado com 10% de soro humano fresco, não inativado, ou com meio RPMI contendo 10% de soro humano inativado por aquecimento ou ainda com meio RPMI sem soro. A seguir essas suspensões fúngicas foram utilizadas para desafiar monócitos humanos obtidos de indivíduos saudáveis na proporção monócito-fungo de 50:1. A análise dos resultados revelou que esse procedimento permitiu a recuperação de número elevado de células leveduriformes viáveis. Apenas monócitos previamente tratados ou não com IFN- γ e desafiados com Pb18 opsonizado com soro fresco, não inativado, apresentaram capacidade fungicida significativamente mais elevada em relação às células desafiadas com o fungo não opsonizado ou tratado com soro inativado.

Esses resultados sugerem que a ativação de monócitos com IFN- γ aumenta a capacidade fungicida dessas células contra o fungo, quando as células fúngicas são opsonizadas pelo sistema complemento e confirmam estudos anteriores, que relatam ausência de atividade fungicida de monócitos humanos contra a cepa virulenta Pb18 de *P.brasiliensis*. Atividade fungicida eficiente só é obtida após ativação de monócitos com IFN- γ ou após ação sinérgica de IFN- γ e TNF- α (CALVI et al., 2003; CARMO et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2005). A atividade fungicida de macrófagos derivados de monócitos contra *Histoplasma capsulatum* mostrou ser dependente da concentração de IFN- γ para ativação dessas células (BRUMMER et al., 1991). VECCHIARELLI et al.

(1989) demonstraram que macrófagos alveolares humanos e monócitos do sangue periférico são capazes de matar *C.albicans* após ativação com IFN- γ , IL-1 ou LPS.

Já está bem estabelecido na literatura, que uma eficiente atividade fungicida de monócitos e macrófagos está relacionada com a produção de níveis elevados de TNF- α , detectados após pré-ativação com IFN- γ , resultando na morte de microrganismos tais como *Listeria monocytogenes* (LANGERHANS et al., 1992), *Leishmania major* (GREEN et al., 1990) e *H. capsulatum* (WU-HSIEH et al., 1992). Além disso, um efeito sinérgico de ambas citocinas é necessário para ativar monócitos do sangue periférico para *killing* de *Legionella pneumophila* (MATSIOTA-BERNARD et al., 1993), *Leishmania donovani* (REINER et al., 1990) e *Coccidioides immitis* (BEAMAN, 1991).

Estudos sobre os mecanismos envolvidos na atividade fungicida de monócitos humanos contra *P.brasiliensis* demonstraram a participação de H₂O₂ no mecanismo efetor dessas células após ativação com IFN- γ e TNF- α . Segundo CALVI et al. (2003) H₂O₂ parece ser um metabólito importante para a atividade fungicida de monócitos estimulados por IFN- γ e TNF- α e CARMO et al. (2006), atribuíram a atividade fungicida de monócitos humanos, estimulados por TNF- α ou TNF- α associado a IFN- γ sobre Pb18 à produção de H₂O₂, uma vez que esse processo foi inibido significativamente na presença de catalase. Porém, o mesmo não ocorreu na presença de inibidores de O₂⁻ ou de NO, sugerindo que H₂O₂ participa da atividade fungicida, enquanto NO não parece estar diretamente envolvido na morte de *P.brasiliensis* por monócitos humanos. Em trabalho recente RODRIGUES et al. (2007) demonstraram o envolvimento de H₂O₂ na atividade fungicida de neutrófilos humanos contra *P.brasiliensis*, quando essas células foram ativadas *in vitro* por IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF. A inibição dessa atividade na presença de catalase e de superóxido dismutase mostra que H₂O₂ e O₂⁻ participam como moléculas efetoras nesse processo. Monócitos humanos não estimulados com citocinas e desafiados com cepas de

alta e baixa virulência de *P.brasiliensis*, produzem níveis significativamente menores de H₂O₂ durante a infecção com a cepa virulenta, em comparação com a cepa pouco virulenta, podendo esse efeito ser considerado mecanismo de escape do *P.brasiliensis* contra os mecanismos efetores dos monócitos. A recuperação da capacidade de produção de H₂O₂ quando os monócitos foram pré-tratados com indometacina sugere que a baixa atividade fungicida contra cepa virulenta poderia ser resultante da produção de prostaglandina induzida pelo fungo, com conseqüente inibição da produção de H₂O₂ pela célula (BORDON et al., 2007).

Por outro lado, trabalhos realizados com macrófagos alveolares e peritoneais murinos, mostram que essas células matam *P.brasiliensis* por mecanismo independente do metabolismo oxidativo (BRUMMER et al., (1988; 1988a). Além disso, a produção de NO tem sido descrita como eficiente na inibição da replicação e na morte de *P.brasiliensis* (BOCCA et al., 1998; GONZALEZ et al. 2000; JIMENEZ et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2002) e de outros fungos como *C.albicans* (VAZQUEZ-TORRES et al. 1996) e *C.neoformans* (ALSPAUGH & GRANGER, 1991) por fagócitos mononucleares murinos. Por outro lado o papel do NO na atividade antifúngica de células humanas não está ainda bem definido. A secreção de NO e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), envolvida na conversão de L-arginina em NO por monócitos humanos, tem apresentado resultados controversos na literatura (DENIS, 1994; ALBINA 1995; MacMICKING et al., 1997; SCHNEEMANN et al., 1993). Esse metabólito não parece estar envolvido na morte de *C.neoformans* (CAMERON et al., 1990), *A.fumigatus* (MICHALISZYN et al., 1995), *H.capsulatum* (DESAI et al., 1995) e de *P.brasiliensis* (CARMO et al., 2006). Entretanto, a expressão de iNOS foi descrita por macrófagos e células gigantes presentes em granulomas de linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM (NEWORAL et al., 2003). Assim, o envolvimento de NO na morte de *P.brasiliensis*

não está ainda claramente definido e merece maiores estudos. Além disso, macrófagos podem destruir microrganismos por mecanismos não oxidativos, tais como acidificação dos fagossomas, lisozima, proteínas catiônicas e componentes do sistema complemento (KAGAYA et al., 1992; MOONIS et al., 1992).

Ao contrário da literatura, nossos resultados mostram que monócitos não estimulados com IFN- γ e desafiados com Pb18 tratado com soro fresco apresentam atividade fungicida significativamente mais elevada em comparação com células estimuladas ou não com IFN- γ e desafiadas com o fungo tratado com soro inativado ou sem soro. Essa atividade, embora significativamente menor do que a obtida após tratamento com IFN- γ indica o importante papel do sistema complemento na atividade fungicida contra o *P.brasiliensis*.

O sistema complemento participa na defesa contra infecções fúngicas, promovendo quimiotaxia, opsonização das leveduras e fagocitose por células inflamatórias (GRUBER et al., 1998; LEVITZ, 2002; TRIEBEL et al., 2003; YAMAMURA & VALDIMARSSON, 1977). A fagocitose de *C.albicans* e de *C.neoformans* é dependente da opsonização do fungo por componentes do complemento e, é acentuadamente reduzida após inativação do soro por aquecimento a 56°C (BOLANOS & MITCHELL, 1989; FERRANTE & THONG, 1979; KOZEL et al., 1988).

A opsonização é um pré-requisito para a fagocitose por monócitos, macrófagos e células polimorfonucleares (STURTEVANT & LATGÉ, 1992). Portanto, a deposição do componente C3 e sua degradação na parede celular de fungos patogênicos se constitui no evento central da interação entre o fungo e o hospedeiro humano (SPETH et al., 2004). Vários trabalhos têm mostrado que macrófagos humanos expressam o receptor para complemento CR3, que reconhece iC3b, o fragmento de C3 predominante em fungos opsonizados com soro humano como *C.neoformans* (KELLY et al., 2005; ZARAGOZA et

al., 2003) e *Blastomyces dermatitidis* (ZHANG & KLEIN, 1977; ZHANG et al., 2001). Em relação ao *P.brasiliensis* tem sido descrito que células fúngicas têm a capacidade de ativação do sistema complemento tanto pela via clássica como alternativa *in vitro* (MUNK et al., 1992), resultando na opsonização e fagocitose do fungo por macrófagos (CALICH et al., 1979). A incubação de células leveduriformes da amostra Pb18 opsonizadas com soro humano normal leva à ativação do complemento *in vitro* e ligação de C3b, iC3b, C4 e C5b-C9 na superfície do fungo (MUNK & DA SILVA, 1992). JIMENEZ et al. (2006), estudando a importância dos receptores para manose e C3 do sistema complemento na fagocitose de conídios de *P.brasiliensis* por linhagens de macrófagos murinos, mostraram que a opsonização com soro de camundongos não inativado aumentou a capacidade fagocítica dessas células.

Entretanto, até o momento não se conhece o papel da opsonização do *P.brasiliensis* por componentes do complemento sobre a atividade fungicida de monócitos contra o fungo. Os resultados do presente trabalho mostram que a atividade fungicida de monócitos ativadas por IFN- γ só é efetiva contra células fúngicas opsonizadas com soro humano não inativado, não ocorrendo após tratamento do fungo com soro inativado e na ausência de complemento. Segundo DREVETS et al. (1996) o estímulo com TNF- α e IFN- γ aumenta a expressão do receptor CR3 para complemento em macrófagos peritoneais, levando ao aumento intenso na fagocitose e atividade microbicida contra *L.monocytogenes* opsonizada com soro não inativado. Essas atividades são inibidas quando a bactéria é opsonizada por soro depletado de complemento ou por incubação com anticorpo monoclonal anti-CR3. O aumento da expressão de CR3 e da fagocitose mediada por esse receptor são mecanismos pelos quais TNF- α e IFN- γ estimulam macrófagos a matar patógenos intracelulares. Estudos futuros sobre o mecanismo envolvido na atividade

fungicida de monócitos contra células fúngicas de *P.brasiliensis*, opsonizadas por complemento, serão importantes para compreensão desse processo.

A associação entre atividade fungicida e produção de TNF- α por monócitos ativados por IFN- γ e desafiados com *P.brasiliensis* opsonizados com soro fresco, demonstrada no presente trabalho, corrobora resultados prévios descritos na literatura. Os resultados demonstram que uma atividade fungicida eficiente é obtida após ativação com IFN- γ ou por ativação sinérgica de monócitos com IFN- γ e TNF- α (CALVI et al., 2003). Esse efeito é dependente da produção de TNF- α pelas células previamente ativadas pelas citocinas (CALVI et al., 2003; CARMO et al., 2006).

Nossos 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 diretamente a síntese de TNF- α . Estudos anteriores em nosso laboratório, avaliando a cinética de produção de TNF- α por monócitos humanos (KUROKAWA et al., 2007) e por macrófagos peritoneais de hamsters (PARISE-FORTES et al., 2000) infectados com Pb18, 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- α também foi observada por FIGUEIREDO et al. (1993), após desafio de camundongos com fração F1 da parede celular das cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis*. Assim, pode-se considerar que a parede celular do *P. brasiliensis* estaria estimulando a produção de TNF- α e a resposta imunológica do hospedeiro.

No presente trabalho, níveis mais elevados de TNF- α foram obtidos quando do desafio com o fungo opsonizado com soro não inativado, em comparação ao tratamento com soro inativado ou na ausência de soro. Mesmo sem o estímulo prévio com IFN- γ os monócitos desafiados com Pb18 opsonizado com soro fresco produziram níveis mais elevados de TNF, sugerindo participação do sistema complemento na ativação dos

monócitos para produção da citocina. Esses resultados concordam com trabalhos da literatura, que demonstraram ser a produção de TNF- α por monócitos do sangue periférico estimulados com *C.neoformans* ou componentes da cápsula polissacarídica do fungo, dependente da presença do sistema complemento nos ensaios realizados. Amostras clínicas de *C.neoformans* foram incubadas sob diferentes condições de opsonização e empregadas para estimular células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis. Na ausência de soro, os níveis de TNF- α induzidos pelas células fúngicas eram baixos e semelhantes aos obtidos a partir de células não estimuladas. O soro humano normal, não inativado, aumentava a produção da citocina, enquanto a inativação do soro por aquecimento praticamente eliminava a capacidade do fungo induzir a produção de TNF- α (CHAKA et al., 1997). A síntese de TNF- α por macrófagos e monócitos estimulados com outros microrganismos como *Penicillium marneffe* (RONGRUNGRUANG & LEVITZ, 1999) e estreptococos do Grupo B (LEVY et al., 2003) só ocorre quando os microrganismos são opsonizados com soro não inativado, sugerindo que fatores presentes no soro são necessários para estimular a liberação da citocina por essas células. A produção de TNF- α pelos monócitos, induzida por estreptococos opsonizado com soro fresco era inibida pela incubação dessas células com anticorpo monoclonal anti-CR3 ou CR4, sugerindo ativação da via alternativa do complemento. Segundo LEVY et al. (2003) a capacidade do soro ou plasma em amplificar a produção de TNF- α por monócitos murinos depende da ativação do complemento pela via alternativa pelo microrganismo e da ligação de C3 ao receptor CR3 e CR4, que levam à ativação dessas células.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho mostram que o desafio de monócitos humanos, obtidos de indivíduos saudáveis, com células leveduriformes de *P.brasiliensis* opsonizadas com soro humano normal, não inativado, leva à produção de

níveis elevados de TNF- α e à atividade fungicida, sugerindo a participação de componentes do sistema complemento, na ativação de monócitos para uma eficiente atividade fungicida. Essa capacidade é aumentada quando as células são pré-ativadas com IFN- γ antes do desafio com o fungo. Considerando que o *P.brasiliensis* ativa o complemento pela via alternativa, sendo observado depósito de componentes de C3 na sua parede celular (MUNK & DA SILVA, 1992), estudos envolvendo componentes dessa via de ativação e seus receptores na superfície de monócitos permitirão melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação de monócitos pelo *P.brasiliensis* e sua importância na relação patógeno-hospedeiro.

6. CONCLUSÕES

1. Monócitos humanos desafiados com células leveduriformes de *P.brasiliensis* opsonizadas com soro humano normal, não inativado, produzem níveis elevados de TNF- α e apresentam atividade fungicida eficiente contra o fungo.
2. A pré-ativação de monócitos com IFN- γ induz aumento da atividade dessas células, demonstrada por maior produção de TNF- α e da atividade fungicida em comparação com células não estimuladas com IFN- γ .
3. O desafio de monócitos com células leveduriformes de *P.brasiliensis* não opsonizadas ou tratadas com soro humano normal inativado induz baixa produção de TNF- α e não estimula a atividade fungicida dessas células, sugerindo a participação de componentes do sistema complemento na ativação de monócitos para uma atividade fungicida eficiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albina JE (1995) On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J Leukoc Biol* **58**: 643-649.
- Almeida SR, Unterkircher CS, Camargo ZP (1998) Involvement of the major glycoprotein (gp43) of *Paracoccidioides brasiliensis* in attachment to macrophages. *Med Mycol* **36**: 405-411.
- Alspaugh JA, Granger DL (1991) Inhibition of *Cryptococcus neoformans* replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect Immun* **59**: 2291-2296.
- Beaman L (1991) Effects of recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor on in vitro interactions of human mononuclear phagocytes with *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* **59**: 4227-4229
- Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, et al (1998) Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* – infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol* **161**: 3056-3063.
- Bolanos B, Mitchell TG (1989) Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by rat alveolar macrophages. *J Med Vet Mycol* **27**: 203-217.
- Bordon AP, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC (2007) Prostaglandin E₂ inhibits human monocytes *Paracoccidioides brasiliensis* killing by decreasing H₂O₂ and TNF-alpha production. *Microbes Infect (in press)*.
- Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* **97**: 77-89.

- Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA (1988) *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ for enhance killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol* **140**: 2786-2789.
- Brummer E, Hanson LH, Stevens DA (1988) Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int J Immunopharmacol* **10**: 945-952.
- Brummer E, Hanson LH, Restrepo A (1989) Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun* **57**: 2289-2294.
- Brummer E, Sun SH, Harrison JL, Perlman AM, Philpott DE, Stevens DA (1990) Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. *Infect Immun* **58**: 2628-36.
- Brummer E, Kurita N, Yoshida S, Nishimura K, Miyaji M (1991) Killing of *Histoplasma capsulatum* by gamma-interferon-activated human monocyte-derived macrophages: evidence for a superoxide anion-dependent mechanism. *J Med Microbiol* **35**: 29-34.
- Calderone RA, Linehan L, Wadsworth E, Sandberg AL (1988) Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect Immun* **56**: 252-258.
- Calich VL, Kipnis TL, Mariano M, Neto CF, DA Silva WD (1979) 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 Immunopathol* **12**: 21-30.
- Calich VLG, Singer-Vermes LM, Russo M, Vaz CAC, Burger E (1994) Immunogenetics in Paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. (Eds). Paracoccidioidomycosis. Flórida, USA: *CRC Boca Raton* p. 151-173.

- Calvi SA, Peraçoli MT, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Fecchio D, Marques AS, et al (2003) Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect* **5**:107-113.
- Cameron ML, Granger DL, Weinberg JB, Kozumbo WJ, Koren HS (1990) Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation to nitrite or nitrate. *Am Rev Respir Dis* **142**: 1313-1319.
- Carmo JP, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC (2006) TNF- α activates human monocytes for *Paracoccidioides brasiliensis* killing by an H₂O₂ – dependent mechanism. *Med Mycol* **44**: 363-368.
- Chaka W, Verheul AF, Vaishnav VV, Cherniak R, Scharringa J, Verhoef J, Snippe H, Hoepelman IM (1997) Cryptococcus neoformans and cryptococcal glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein induce different levels of tumor necrosis factor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* **65**:272-278.
- Costa DL, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Bordon AP, Tavian EG, Peracoli MT, Soares AM (2007) Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol* **51**: 73-80.
- Denis M (1994) Human monocytes/macrophages: NO or not NO? *J Leukoc Biol* **55**: 682-684.
- Desai G, Nassar F, Brummer E, Stevens DA (1995) Killing of *Histoplasma capsulatum* by macrophage colony stimulating factor-treated human monocyte-derived macrophages: role for reactive oxygen intermediates. *J Med Microbiol* **43**: 224-229.
- Drevets DA, Leenen PJ, Campbell PA (1996) Complement receptor type 3 mediates phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by a TNF-alpha- and IFN-gamma-stimulated macrophage precursor hybrid. *Cell Immunol* **169**: 1-6.

- Ferrante A, Thong YH (1979) Requirement of heat-labile opsonins for maximal phagocytosis of *Candida albicans*. *Sabouraudia* **17**:293-297.
- Figueiredo F, Alves LMC, Silva CL (1993) Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol* **93**: 189-94.
- Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS (1987) Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its forms. *Rev Soc Bras Med Trop* **20**: 129-132.
- Gonzalez A, Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE (2000) Nitric Oxide participation in the fungicidal mechanism of Gamma Interferon-Activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* **68**: 2546-2552.
- Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA (1990) Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **15**; 145: 4290-4297.
- Gruber A, Lukasser-Vogl E, Von Zepelin MB, Dierich MP, Wurzner R (1998) Human immunodeficiency virus type1 gp160/gp41 binding to *Candida albicans* selectively enhances candidal virulence in vitro. *J Infect Dis* **177**: 1057–1063.
- Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA (1994) Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha-mediated growth inhibition of Mycobacterium tuberculosis by human alveolar macrophages. *J Immunol* **152**: 743-753.
- Jimenez M del P, Restrepo A, Radzioch D, Cano LE, Garcia LF (2006) Importance of complement 3 and mannose receptors in phagocytosis of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by Nramp1 congenic macrophages lines. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:56-66.

- Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y, Suzuki S, Kobayashi M, Okawa Y, et al (1992) Biochemical mechanisms of intracellular killing of fungi. *J Med Vet Mycol.* **30**:179-187.
- Kelly RM, Chen J, Yauch LE, Levitz SM (2005) Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* **73**: 592-598.
- Kozel TR, Pfrommer GS, Guerlain AS, Highison BA, Highison GJ (1988) Strain variation in phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*: dissociation of susceptibility to phagocytosis from activation and binding of opsonic fragments of C3. *Infect Immun* **56**: 2794-2800.
- Kozel TR, Tabuni A, Young BJ, Levitz SM (1996) Influence of opsonization conditions on C3 deposition and phagocyte binding of large- and small-capsule *Cryptococcus neoformans* cells. *Infect Immun* **64**: 2336–8.
- Kurita N, Terao K, Brummer E, Ito E, Nishimura K, Miyaji M (1991) Resistance of *Histoplasma capsulatum* to killing by human neutrophils. Evasion of oxidative burst and lysosomal-fusion products. *Mycopathologia* **115**:207-213.
- Kurokawa CS, Soares AMVC, Araujo JR JP, Sugizaki MF, Peraçoli MTS (2007) Pro and anti-inflammatory cytokine produced by human monocytes infected *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol Immunol* **51** (4), *in press*
- Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Van Furth R (1992) 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* **60**: 5107-5112.
- Levitz SM (2002) Receptor-mediated recognition of *Cryptococcus neoformans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **43**: 133-136.

- Levy O, Jean-Jacques RM, Cywes C, Sisson RB, Zarembek KA, Godowski PJ, Christianson JL, Guttormsen HK, Carroll MC, Nicholson-Weller A, Wessels MR (2003) Critical role of the complement system in group B streptococcus-induced tumor necrosis factor alpha release. *Infect Immun* **71**: 6344-6353.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**:323-350.
- Matsiota-Bernard P, Lefebvre C, Sedqui M, Cornillet P, Guenounou M (1993) Involvement of tumor necrosis factor alpha in intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. *Infect Immun* **61**: 4980-4983.
- Michaliszyn E, Senechal S, Martel P, de Repentigny L (1995) Lack of involvement of nitric oxide in killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by pulmonary alveolar macrophages. *Infect Immun* **63**: 2075-2078.
- Montenegro MR, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo AM, Del Negro G, editors (1994) *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida: CRC Press. p. 131-150.
- Moonis M, Ahmad I, Bachhawat BK (1992) Macrophages in host defence: an overview. *Indian J Biochem Biophys* **29**: 115-122.
- Munk ME, Kajdacsy-Balla A, Del Negro G, Cuce LC, Da Silva WD (1992) Activation of human complement system in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* **30**: 317-321.
- Munk ME, Da Silva WD (1992) Activation of human complement system *Paracoccidioides brasiliensis* and its deposition on the yeast form cell surface. *J Med Vet Mycol* **30**:481-484.
- Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallatt-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz AS,

- Restrepo-moreno A, Del Negro G, (Eds) (1994). Paracoccidioidomycosis. *Flórida CRC Press Boca Raton* p:345-363.
- Nascimento FRF, Calich VLG, Rodriguez D, Russo M (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* **168**:4593-4600.
- Nascimento MPP, Soares AMVC, Parise-Fortes MR, Martins RAR, Nakaira ET, Peraçoli MTS (2005) Monocyte-derived multinucleated giant cells induced in vitro by interferon-gamma and *Paracoccidioides brasiliensis* antigen display fungicidal activity. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **47** (suppl14): p21.
- Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH (2003) Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine* **21**:234-41.
- Parise-Fortes MR, Da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, Soares AM, et al (2000) Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol* **38**: 51-60.
- Peraçoli MTS, Soares AMVC (1992) Imunologia da paracoccidioidomicose. In: TOSTA CE. *Imunologia das infecções. Uberaba: FUNEPU* p: 15-36.
- Reiner NE, Ng W, Wilson CB, McMaster WR, Burchett SK (1995) Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest* **85**: 1914-1924.

- Restrepo A (1985) The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* : a puzzle still unsolved. *J Med Vet Mycol* **23**: 323-334.
- Rodrigues DR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Peraçoli MTS, Soares AMVC (2007) *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- γ , TNF- α and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol* **45**: 27-33.
- Rongrungruang Y, Levitz SM (1999) Interactions of *Penicillium marneffe* with human leukocytes in vitro. *Infect Immun* **67**:4732-4736.
- Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A (1993) Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* **167**: 1358-1363.
- Shikanai-Yasuda MA, Assis CM, Takeda KM, Tamashiro N, Bueno JP (1997) Monocyte adherence to *Paracoccidioides brasiliensis*, zymosan-C3b and erythrocyte-hemolysin in patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* **138**: 65-69.
- Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML (2006) Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* **39**: 297-310.
- Soares AMVC, Calvi SA, Peraçoli MTS, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR (2001) Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* **102**:480-485.
- Speth C, Rambach G, Lass-Flörl C, Dierich MP, Würzner R (2004) The role of complement in invasive fungal infections. *Mycoses* **47**: 93-103.
- Sturtevant JE, Latgé JP (1992) Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J Infect Dis* **166**: 580-586.

- Triebel T, Grillhosl B, Kacani L, Lell CP, Fuchs A, Speth C, Lass-Florl C, Steinmann J, Dierich MP, Wurzner R (2003) Importance of the terminal complement components for immune defence against *Candida*. *Int J Med Microbiol* **292**: 527-536.
- Vecchiarelli A, Todisco T, Puliti M, Dottorini M, Bistoni F (1989) Modulation of anti-*Candida* activity of human alveolar macrophages by interferon-gamma or interleukin-1-alpha. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1989;1: 49-55. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1**: 49-55.
- Wanke B, Londero AT (1994) Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G editors. *Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Florida: CRC Press* p.109-120.
- Wu-Hsieh BA, Howard DH (1992) Intracellular growth inhibition of *Histoplasma capsulatum* induced in murine macrophages by recombinant gamma interferon is not due to a limitation of the supply of methionine or cysteine to the fungus. *Infect Immun* **60**: 698-700.
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E (1996) Peroxynitrite contributes to the candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect Immun* **64**: 3127-3133.
- Yamamura M, Valdimarsson H (1977) Participation of C3 in intracellular killing of *Candida albicans*. *Scand J Immunol* **6**: 591-4.
- Zaragoza O, Taborda CP, Casadevall A (2003) The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. *Eur. J Immunol* **33**: 1957-1967.

Zhang MX, Brandhorst TT, Kozel TR, Klein BS (2001) Role of glucan and surface protein BAD1 in complement activation by *Blastomyces dermatitidis* yeast. *Infect Immun* **69**: 7559–64.

Zhang MX, Klein B (1997) Activation, binding and processing of complement component 3 (C3) by *Blastomyces dermatitidis*. *Infect Immun* **65**: 1849–55.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)