

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**GRANULOMA PARACOCCIDIOIDOMICÓTICO: IMUNIDADE
PROTETORA DEPENDE DA INTERAÇÃO ENTRE RESPOSTAS
CELULAR E HUMORAL NA INFEÇÃO POR *Paracoccidioides
brasilensis***

LUCIANO APARECIDO PANAGIO

**Ribeirão Preto-SP
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Panagio, Luciano Aparecido

Granuloma Paracoccidiomicótico: Imunidade Protetora depende da interação
Entre Respostas Celular e Humoral na Infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

Luciano Aparecido Panagio

Ribeirão Preto, 2006

Xxxp.; 29cm

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia
Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo, Ribeirão Preto – SP.

Orientador: Silva, João Santana

1. *Paracoccidioides brasiliensis* – 2. Granulomas – 3. Resposta Imune – 4. Apoptose
– 5. Neutrófilo – 6. Carga Fúngica

LUCIANO APARECIDO PANAGIO

**GRANULOMA PARACOCCIDIOIDOMICÓTICO: IMUNIDADE PROTETORA
DEPENDE DA INTERAÇÃO ENTRE RESPOSTAS CELULAR E HUMORAL NA
INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis***

Proforma da Tese de doutorado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia
Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em
Ciências Médicas. Área de Concentração:

Orientação: Prof. Dr. João Santana da Silva

Ribeirão Preto

2006

AGRADECIMENTOS

Professores

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pela sua lúcida orientação e por ter aceitado-me em seu laboratório, permitindo um real ganho técnico e intelectual e amadurecimento crítico.

À Prof. Dra. Halha Saridakis, querida amiga, que sempre aconselhou-me e estimulou-me a seguir carreira científica.

À Prof. Dra. Ionice Felipe, que sempre acreditou em minha capacidade.

À Prof. Dra Cláudia M. L. Maffei, cuja ajuda durante o processo de seleção foi determinante para minha entrada nesse departamento e pelo suporte no primeiro ano de doutorado.

Ao Prof. Dr. Marcos Rossi, que cedeu seu laboratório e reagentes para os procedimentos gerais de histologia.

Ao Prof. Dr. Fernando Cunha, que gentilmente permitiu o uso de reagentes e equipamentos de seu laboratório para a realização de dosagens e leitura de resultados.

Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, de cujo laboratório utilizamos reagentes e equipamentos.

A todos os professores da Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, que direta ou indiretamente, durante as disciplinas ou conversas científicas em palestras e seminários, fomentaram meus conhecimentos e aguçaram minha curiosidade.

Aos professores de minha banca examinadora: Fulano, Sicrano e Beltrano, que através de suas sugestões permitiram um aumento de qualidade na redação e entendimento desse trabalho.

Funcionários

À minha querida e sempre solícita Ana Cristine, minha mãesona em Ribeirão Preto, que desde o primeiro momento me acolheu com carinho e respeito, atenta sempre a tornar meus dias menos penosos.

À Marli, pela sua disposição a ajudar sempre e pelo carinho com que trata a todos.

Ao Júlio, que cuida com extrema competência do nosso biotério e sempre foi atencioso com nossos pedidos. Ao Edi e Sávio, pela manutenção de nosso biotério e cuidado com nossos animais.

Aos técnicos Cristiane Milanezi, Wander e Lúcia, pela paciência especialmente nos primeiros momentos e pelo apoio técnico durante esse trabalho.

Ao recém-chegado Walter, que auxiliou muito nos experimentos de citometria de fluxo, com competência e paciência invejáveis.

À Maria Helena, pelo auxílio e pela calma com que me ensinou técnicas de histologia.

Aos amigos

Ao meu amigo irmão Ita, companheiro desde a graduação (em um tempo remoto no século passado). Valeu pela amizade ímpar e sempre sincera, que espero cultivar por muitos anos.

À Clau, Cris e Flávia, amigas dentro do laboratório e fora dele. Pela amizade fraterna de vocês e pela suas qualidades de caráter e ajuda incondicional. Com vocês ficou mais fácil minha estada por aqui.

Ao amigo Gustavo, pela auxílio contínuo durante esse doutorado, pelas conversas científicas, comentários sarcásticos impagáveis e troca de impressões futebolísticas.

À Karen, pelo seu imenso coração e infundável disposição para ajudar. Seu auxílio nos experimentos foi fundamental.

À Anika e ao Marcelão, que colaboraram muito nesse trabalho. Pelas nossas divertidas conversas nesse tempo de convivência.

À Vanessa, com sua alegria contagiante e seu memorável "The coffee is ready".

À Ana Paula Campanelli, pela sua ajuda valiosa quando da minha chegada ao laboratório e pela sua amizade verdadeira.

Aos amigos do laboratório Alessandra, Xoru, Bia, Isabel, Fredy, Wander, Wanessa, Lucinda, Elen, Antônio, Sandra, Ana Lúcia, Pauline, Jaque e Carlo.

À Dani, Kelen Janaína e Lucinha, pela nossa amizade sincera durante esses anos.

A todo pessoal do laboratório do professor Célio Silva, nossos vizinhos com quem sempre trocamos informações e auxílio, além dos momentos de descontração vividos sempre que oportunamente.

A todo pessoal do nosso futebol de Segundas-Feiras: Ita, Gustavo, Ademilson, Daniel, Humberto, Doidinho, Imbi, Antônio, Wander, Zé, Monstro, Alexandre, Horse, Serjão e todos os outros pernas-de-pau que por lá passaram. Obrigado, a ruindade e falta de estilo de vocês fez com que eu me sobressaísse algumas vezes.

Às músicas que elevam meu espírito e permitem recolocar minhas idéias no lugar.

À Universidade de São Paulo, por proporcionar todos os meios para a realização desse trabalho.

À CAPES, pelo suporte financeiro durante meu doutorado.

Aos anônimos e humildes trabalhadores brasileiros que com seu suor pagam e pagarão, quase sempre sem saber, os investimentos feitos em prol de nosso desenvolvimento científico.

DEDICATÓRIA

À minha família, sem dúvida o sustentáculo que me dá força para superar os obstáculos desse mundo louco.

A meus pais, Luiz e Isaura, que me deram todas as condições seguir caminho por esse mundo. A retidão nas atitudes e firmeza de caráter que sempre imprimiram em suas vidas são minha referência mais valiosa.

À Silvana, minha outra metade, cuja dedicação e amor me deram forças para construir essa parte de minha carreira.

À minha irmã Paula e meu irmão Lui. Essa vitória é nossa.

Aos meus sobrinhos-filhos Ana Carolina, Mariana e Gabriel.

À toda minha família: tios, tias, primos e primas, que formam uma unidade indissolúvel.

Aos animais.

Muitos animais são sacrificados em prol da ciência. Apesar de todo o cuidado que procuramos exercer sempre, alguns deles sofrem muito. São vítimas inocentes, usadas em prol de nosso desenvolvimento científico e intelectual. Por isso, devemos sempre procurar com muito respeito utilizar seus corpos e órgãos. Obrigado, meus pequenos.

ABREVIACOES

IL: Interleucina

KO: Animal deficiente (Knockout)

APC: Célula apresentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell)

Fas: receptor Fas

FasL: ligante do receptor Fas

Lpr: Animais com receptor Fas defectivo (Lymphoproliferative Disease)

NO: xido nítrico (Nitric Oxide)

NO₃⁻: Nitrato

NO₂⁻: Nitrito

MPO: Mieloperoxidase

Th: Linfócito T auxiliar (T Helper)

WT: Animais selvagens (Wild Type)

IL-18KO: Animais deficientes de IL-18

BKO: Animais deficientes de linfócitos B

BHI: gar Infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion)

IFN- γ : Interferon gama

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alfa)

MIP-1 α : Proteína inflamatória de macrófago-1 alfa (Macrophage Inflammatory Protein-1 alfa)

KC: Quimiocina derivada de queratinócito (Keratinocyte Derived-Chemokine)

FACS: "Fluorescence-Activated Cell Sorting"

Pb 18: *Paracoccidioides brasiliensis* cepa 18

PCM: Paracoccidioidomicose

NØ: Neutrófilo

MØ: Macrófago

LØ: Linfócito

DTH: Reação de hipersensibilidade tipo tardia (Delayed Type Hipersensibility)

ELISA: Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay)

ABREVIACOES

IL: Interleucina

KO: Animal deficiente (Knockout)

APC: Célula apresentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell)

Fas: receptor Fas

FasL: ligante do receptor Fas

Lpr: Animais com receptor Fas defectivo (Lymphoproliferative Disease)

NO: xido nítrico (Nitric Oxide)

NO₃⁻: Nitrato

NO₂⁻: Nitrito

MPO: Mieloperoxidase

Th: Linfócito T auxiliar (T Helper)

WT: Animais selvagens (Wild Type)

IL-18KO: Animais deficientes de IL-18

BKO: Animais deficientes de linfócitos B

BHI: gar Infusão de cérebro e corao (Brain Heart Infusion)

IFN- γ : Interferon gama

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alfa)

MIP-1 α : Proteína inflamatória de macrófago-1 alfa (Macrophage Inflammatory Protein-1 alfa)

KC: Quimiocina derivada de queratinócito (Keratinocyte Derived-Chemokine)

FACS: "Fluorescence-Activated Cell Sorting"

Pb 18: *Paracoccidioides brasiliensis* cepa 18

PCM: Paracoccidioidomicose

N \emptyset : Neutrófilo

M \emptyset : Macrófago

L \emptyset : Linfócito

DTH: Reao de hipersensibilidade tipo tardia (Delayed Type Hipersensibility)

ELISA: Ensaio de imunoabsoro por ligao enzimática (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay)

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
1. Cultivo de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>.....	28
2. Animais de Experimentação.....	28
3. Viabilidade dos Fungos.....	29
4. Preparo do inóculo.....	29
5. Infecção dos camundongos.....	30
6. Reagentes e Soluções.....	30
7. Curva de Mortalidade.....	33
8. Determinação de Unidades formadoras de colônia (UFCs) no baço, fígado e pulmões.....	33
9. Obtenção de sobrenadantes de triturados de pulmões para dosagem de quimiocinas e citocinas.....	34
10. Processamento histopatológico dos órgãos.....	34
11. Dosagem de Óxido Nítrico no soro pelo método de Griess.....	35
12. Determinação de citocinas e quimiocinas pelo Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA).....	36

13. Preparação das células pulmonares para citometria de fluxo.....	38
14. Microscopia Intravital.....	39
15. Ensaio de determinação da atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão..	41
16. Reação de hipersensibilidade tardia	42
17. Dosagem de Anticorpos.....	42
18. Imunização Passiva.....	43
19. Análise Estatística.....	43
RESULTADOS.....	45
DETERMINAÇÃO DO PAPEL DA IL-18 NA PCM MURINA.....	45
1. Susceptibilidade de camundongos WT e IL-18 KO ao <i>P. brasiliensis</i>	45
2. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	45
3. Observação do infiltrado inflamatório- Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E).....	48
4. Observação da carga parasitária- Coloração de Grocott.....	51
5. Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH).....	51
6. Dosagem de Óxido Nítrico (NO) no soro de camundongos WT e IL-18KO infectados por <i>P. brasiliensis</i>	51
7. Quantificação de citocinas em lisado pulmonar de camundongos WT e IL-18KO infectados por <i>P. brasiliensis</i>	54

8. Análise da Expressão de Fas/FasL em leucócitos pulmonares de camundongos WT e IL-18KO.....	59
---	----

DETERMINAÇÃO DO PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO FAS/FASL NA PCM MURINA.....	45
--	-----------

1. Susceptibilidade de camundongos WT e lpr ao <i>P. brasiliensis</i>	61
2. Verificação histopatológica de infiltrado inflamatório em animais lpr.....	61
3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	62
4. Observação do infiltrado inflamatório- Coloração de Hematoxilina & Eosina.....	65
5. Observação da carga parasitária- Coloração de Grocott..	66
6. Observação da deposição de colágeno- Coloração de Tricromo Masson.....	73
7. Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH)...	73
8. Análise do infiltrado inflamatório pulmonar de camundongos WT ou lpr infectados por <i>P. brasiliensis</i> por citometria de fluxo.....	76
9. Migração de leucócitos peritoneais de camundongos WT ou lpr após estímulo por Tioglicolato de Sódio.....	79
10. Quantificação de quimiocinas em lisado pulmonar de camundongos WT e lpr infectados por <i>P. brasiliensis</i>	79
11. Atividade de mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos pulmonares de camundongos WT e lpr infectados por <i>P. brasiliensis</i>	84

12. Quantificação de citocinas em lisado pulmonar de camundongos WT e lpr infectados por <i>P. brasiliensis</i>	86
13. Dosagem de Óxido Nítrico (NO) no soro de camundongos WT e lpr infectados por <i>P. brasiliensis</i> ...	86
14. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> induz apoptose de leucócitos pulmonares de camundongos WT e lpr.....	89
15. Expressão de Fas/FasL em leucócitos pulmonares de camundongos WT e lpr infectados por <i>P. brasiliensis</i>	91
16. Dosagem de anticorpos no soro de camundongos WT e lpr infectados por <i>P. brasiliensis</i>	93

DETERMINAÇÃO DO PAPEL DE LINFÓCITOS DE ANTICORPOS NA PCM

MURINA.....95

1. Susceptibilidade de camundongos WT e BKO ao <i>P. brasiliensis</i>	95
2. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	95
3. Observação do infiltrado inflamatório- Coloração de Hematoxilina & Eosina.....	98
4. Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH).....	102
5. Quantificação de citocinas em lisado pulmonar de camundongos WT e BKO infectados por <i>P. brasiliensis</i>	102
6. Transferência de soro imune para camundongos BKO promove melhora no quadro histopatológico.....	105

DISCUSSÃO.....	110
CONCLUSÕES.....	123
RESUMO.....	124
ABSTRACT.....	126
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

1. INTRODUÇÃO

1. Paracoccidioidomicose: o agente e a doença

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico, causador de doença pulmonar e sistêmica em humanos, conhecida como paracoccidioidomicose (PCM). A infecção geralmente ocorre por inalação de propágulos uninucleados, denominados conídios. Os conídios são formas de resistência às condições adversas ambientais, que transitam para forma leveduriforme (parasitária) nos alvéolos pulmonares do hospedeiro susceptível (BRUMMER et al, 1993; BORGES-WALMSLEY et al, 2002). Há relatos de que os conídios podem ocorrer em solo (ALBORNOZ, 1971) e água (RESTREPO, 1985) de regiões endêmicas. *P. brasiliensis* cresce na forma de leveduras a 37°C em cultura e nos tecidos do hospedeiro, mas em baixas temperaturas desenvolve-se na forma de micélio com hifas septadas. A forma leveduriforme do *P. brasiliensis* é metabolicamente ativa, produzindo enzimas como fosfatases, esterases e desidrogenases durante o desenvolvimento do fungo.

As características ecológicas das áreas endêmicas e dados laboratoriais sugerem que o micronicho do fungo seja estabelecido o solo, em lugares onde as temperaturas variam de 17 a 24°C e com índices pluviométricos de 900 a 1800 mm/ano (BRUMMER et al, 1993). Em região

de alta incidência de PCM, *P. brasiliensis* foi isolado de solo úmido e sombreado, encontrado nas habitações de *Dasypus novemcinctus*, popularmente conhecido como tatu (BAGAGLI et al, 2003). *P. brasiliensis* também foi encontrado em tecidos e excrementos de diversos animais, como morcegos, esquilos e pingüins (RESTREPO et al, 2001). Mais recentemente foi mostrado que animais domésticos possuem anticorpos que reconhecem antígenos de *P. brasiliensis*, sendo potenciais reservatórios do fungo (ONO et al, 2001). Geograficamente, a PCM é distribuída por toda a América Latina, compreendendo uma região que se estende da Argentina até o México, com prevalência significativa no Brasil, que possui a maior a maior quantidade de casos reportados, cerca de 80% (RESTREPO et al, 1973).

Uma característica comum a diversos fungos, patogênicos ou não, é a presença de α e β -glucanas na composição da parede celular. Cepas mais virulentas de *P. brasiliensis* apresentam uma maior percentagem de α -glucanas (HOGAN et al, 1996). No entanto, o principal antígeno de superfície do fungo e fator de virulência é a gp43, glicoproteína também componente da parede celular do *P. brasiliensis*. Na PCM, assim como em outras micoses, há uma correlação direta entre virulência e capacidade de adesão às membranas das células do hospedeiro ou à matriz extracelular. Juntamente com uma proteína de 30 kDa recentemente identificada (ANDREOTTI et al, 2005), gp43 colabora para ligação às proteínas da matriz extracelular. A presença de soro anti-gp43 reduziu a aderência de *P. brasiliensis*, o que confirma a função de adesão exercida pela gp43 (MENDES-GIANNINI et al, 2000).

A gp43 é também secretada extracelularmente pela forma leveduriforme, sendo detectada no soro de pacientes com PCM (TABORDA et al, 1998). Exerce também propriedades regulatórias sobre a diferenciação de linfócitos T *in vivo* (FERREIRA et al, 2003) e também sobre funções dos MØs *in vitro*, como inibição da produção de H₂O₂ e NO (POPI et al, 2002). Análise do

transcriptoma de *P. brasiliensis* revelou a presença de seqüências codificadoras de fatores de virulência comuns a outros fungos, como enzimas do ciclo do glioxilato, superóxido dismutase, tiolperoxidase, fosfolipase e catalase, entre outros.

Devido às lesões freqüentemente encontradas na mucosa buco-faríngea de pacientes com PCM, a penetração traumática do fungo (devido a hábitos peculiares de mastigação de vegetais e limpeza dental com gravetos) foi aventada por alguns autores como uma das vias de infecção por *P. brasiliensis* (LACAZ et al, 1991). Posteriormente, através de estudos experimentais e observações clínicas, percebeu-se que as lesões originavam-se por disseminação hematogênica (inclusive para mucosas nasal e retal) do fungo após infecção primária pulmonar (NEGRONI et al, 1979).

A PCM é observada geralmente em homens adultos, trabalhadores de zonas rurais ou indivíduos que exercem profissões na lida com plantas e jardins (BRUMMER et al, 1993). As lesões causadas pelo *P. brasiliensis* geram fibrose nos órgãos atingidos, afetando sua função normal (TUDER et al, 1985). Nas mucosas nasal e oral as lesões são destrutivas, acarretam em incapacidade de respiração plena e de alimentação, além de legar deformidades estéticas. Além do mais, as lesões paracoccidioidomicóticas são sítios de infecções secundárias por outros fungos e por bactérias. O impacto sócio-econômico da PCM é importante, pois além de incapacitante, a doença exige tratamento com antifúngicos de custo elevado e por tempo prolongado, levando muitos pacientes ao abandono da medicação, elevando o risco de reativação da infecção.

As formas da PCM são divididas em duas categorias: a juvenil e a adulta (FAVA-NETO, 1961; Brummer et al, 1993). Em ambas há comprometimento das funções imunológicas mediadas por células, mas a imunidade humoral é preservada, com marcada ativação policlonal

(CHEQUER-BOU-HABIB et al, 1989). A forma juvenil da PCM (aguda, 3-5% dos casos) caracteriza-se por um curso rápido e de grande severidade, compreendendo doença sistêmica causadora de hipertrofia do sistema reticuloendotelial e disfunção profunda da medula óssea. As lesões apresentam número elevado de leveduras, geralmente com ausência de formações granulomatosas organizadas (FRANCO et al, 1987). Sem tratamento rápido essa condição clínica usualmente é fatal. Pacientes desse grupo são pertencentes ao grupo denominado anérgico, nos quais são encontrados altos títulos de anticorpos de diversos isotipos, com supressão da resposta imune celular (LACAZ et al, 1982; BRUMMER et al, 1993).

A forma adulta (crônica, perfazendo cerca de 90% dos casos relatados) da PCM é predominantemente unifocal e pulmonar. Dependendo da condição geral do paciente, pode ser leve, moderada ou severa. Os sintomas (como tosse freqüente, febre, perda de peso e dificuldades de respiração) aparecem gradualmente, podendo ser confundidos inicialmente com outras enfermidades pulmonares. A formação de infiltrado inflamatório é evidente, com presença de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e geração de granulomas epitelióides, com macrófagos englobando um número sempre variável de fungos. Lamentavelmente, os pacientes procuram tratamento quando há sinais de debilitação física e respiratória e os sintomas são intensos. Muitas vezes, nesta fase, há disseminação a partir do foco pulmonar inicial, ocorrendo formação de lesões extrapulmonares. A médio e longo prazo a mortalidade por PCM crônica. Portanto, a instituição da terapia antifúngica deve ser iniciada o mais urgente possível. Pacientes enquadrados nessas condições situam-se no pólo hiperérgico da doença (LACAZ et al, 1982).

Apesar da terapia correta e no tempo estipulado, alguns focos quiescentes (contendo fungos viáveis) podem permanecer, podendo ocorrer relapsos (reinfecção endógena) em média 4 anos após a infecção inicial. A reinfecção exógena também é possível, porém infreqüente. A fibrose

tecidual forma uma barreira à entrada de agentes terapêuticos, permitindo a perpetuação do fungo em focos quiescentes (RESTREPO et al, 1980; TUDER et al, 1985).

A baixa incidência de PCM em mulheres levou a investigações sobre um fator adicional à exposição ocupacional: um possível efeito protetor inerente ao estrógeno, fato que veio a ser confirmado posteriormente. RESTREPO et al (1984) mostraram que o 17- β -estradiol inibiu a transição da forma miceliana para leveduriforme *in vitro*. A presença de estrógeno também inibiu transição de conídio para formas leveduriformes (SALAZAR et al, 1988).

A susceptibilidade humana à PCM pode estar também intrinsecamente ligada a fatores genéticos. Pacientes que apresentam antígenos HLA-B40/Cw1 e A2/B40 têm maior incidência da doença comparativamente aos indivíduos saudáveis (LACERDA et al, 1988; GOLDANI et al, 1991). O padrão de susceptibilidade e resistência contra *P. brasiliensis* foi determinado experimentalmente, entre diferentes linhagens de camundongos, mostrando a relação de MHC e susceptibilidade à PCM. Animais de linhagem B10.A e C57BL/10 foram mais susceptíveis, enquanto A/Sn e DBA/2 foram classificados com resistentes ao fungo (SINGER-VERMES et al, 1995). Contudo, não é correto relacionar susceptibilidade somente a um determinado MHC, pois animais resistentes (B10.A) e susceptíveis (A/Sn) apresentam o mesmo haplótipo, H-2 (CALICH et al, 1985).

2. Inflamação granulomatosa

A inflamação granulomatosa é imperativa para resolução de diversas doenças. Granulomas podem ser formados em resposta a agentes indutores de resposta Th1 (*P. brasiliensis* e *Mycobacterium tuberculosis*) e Th2, como os encontrados em infecções por *Schistosoma mansoni* (CHENSUE et al, 1995; CHIU et al, 2004). Segundo MARIANO (1995), "O

granuloma típico induzido por *M. tuberculosis*, tanto em humanos e animais de laboratório quanto em condições laboratoriais em animais, é uma coleção focal de células mononucleares circundada por tecido conectivo que inclui fibroblastos, fibras de colágeno e vasos neoformados". Granulomas em doenças infecciosas, em geral, apresentam grandes MØs usualmente ocupando o centro da lesão, circundando o agente infeccioso e impedindo sua disseminação. Com o desenvolvimento do granuloma, os MØs exibem um citoplasma eosinofílico e núcleo com cromatina dispersa. Nesse estágio, as células são denominadas epitelióides (organizadas em camadas ou agregados) que podem fundir-se, formando coleções de células multinucleadas ("polykaryons") encontrados nas áreas centrais e em torno de áreas necróticas.

As células multinucleadas são divididas em duas categorias: células de Langhans, as quais apresentam núcleos dispersos periféricamente; e células gigantes, que possuem núcleos dispersos pelo citoplasma (MARIANO, 1995). É importante salientar a presença de granulócitos na área central dos granulomas, principalmente nos períodos iniciais de sua formação. A tendência é que a presença de NØs diminua com o desenvolvimento da lesão. Eosinófilos também podem ser encontrados no granuloma, distribuídos através do foco infeccioso, sendo, porém, observados com maior frequência em respostas tipo Th2, como durante a resposta granulomatosa contra *S. mansoni* (FREEMAN et al, 2005)

Em geral, infecção experimental murina com *P. brasiliensis* resulta em formação de granuloma (FRANCO, 1986). Granulomas paracoccidiodomicóticos são estruturalmente arranjados em duas zonas, a central e a periférica. A zona central é subdividida em outras duas: afibrilar, abrigo macrófagos, células epitelióides, células gigantes e fungos; e outra mais externa, a fibrilar, composta por fibras delgadas de colágeno tipos I e III randomicamente

dispersas. Já a área periférica do granuloma é rica em fibroblastos e matriz extracelular, principalmente, constituída por colágeno tipo I arranjado em feixes compactos, entrelaçados com finas fibras de colágeno tipo III (KERR et al, 1988; COCK et al, 2000).

Há uma evidente correlação entre a resposta imune humoral ou celular gerada contra *P. brasiliensis* e a morfologia dos granulomas em hamsters. Quando predomina a resposta imune celular, há formação de granulomas organizados típicos. Contrariamente, quando prevalecem altos níveis de anticorpos e baixa imunidade celular, os granulomas são frouxos e mal organizados (PERAÇOLI et al, 1982). Foi demonstrada correlação entre nível elevado de IgG2b e susceptibilidade (B10.A). Ao contrário, altos níveis de IgG2a correlacionam-se com resistência e menor taxa de mortalidade na infecção experimental (CANO et al, 1995).

O tipo de resposta granulomatosa frente ao *P. brasiliensis* é também fator determinante. Animais resistentes (A/Sn) apresentam nódulos encapsulados bem definidos, com predomínio de colágeno tipo I, maciça presença de neutrófilos (NØs) e poucos fungos viáveis. Já em animais susceptíveis (B10.A), o tipo de lesão predominante mostrava menor tendência à encapsulação, com múltiplos e pequenos focos granulomatosos, presença de plasmócitos e fibras reticulares de colágeno III. Essas análises histopatológicas demonstraram a influência de fator genético para o tipo de lesão desenvolvida na PCM (XIDIEH et al, 1999).

3. Imunidade Inata

A imunidade inata é filogeneticamente conservada entre organismos multicelulares. Em mamíferos a presença de células “gamma-delta” e produção de substâncias mantidas evolucionariamente, como defensinas e colectinas, são parte importante no sistema de defesa inata (LEHRER, 2004; ROMANI, 2004; SELSTED & OUELLETTE, 2005). A resposta inata é

responsável pelo reconhecimento de microrganismos por receptores altamente conservados, que detectam moléculas de agentes patogênicos em primeira instância, agindo como “sensores de risco” (AKIRA et al, 2001; SELSTED & OULLETTE, 2005). A produção de citocinas por células participantes da imunidade inata afeta criticamente e modula profundamente células componentes da imunidade adaptativa (LIEW, 2003).

As linhas de defesa contra fungos são numerosas, compreendendo desde mecanismos protetores encontrados também em seres multicelulares menos evoluídos (imunidade inata) até a sofisticada resposta adaptativa, prontamente exibida durante infecção (ROMANI, 2004). A participação de mecanismos naturais de defesa é essencial na PCM. A fagocitose, sistema complemento e células "Natural killer" (NK) compõem um sistema de defesa eficaz na contenção do crescimento fúngico (CALICH et al, 1979; JIMENEZ et al, 1984; BRUMMER et al, 1989).

A eficácia da defesa antimicrobiana é atribuída à habilidade do sistema imune em integrar imunidade inata e imunidade adaptativa. Células dendríticas e MØs, por exemplo, são fundamentais na apresentação de antígenos (essencialmente via MHC classe II) para linfócitos T. Recentemente foi demonstrado que os TLR (receptores evolucionariamente conservados) localizados na superfície dessas células são determinantes no controle da infecção por fungos (MEIER et al, 2003; ROEDER et al, 2004). Moléculas de superfície de fungos podem ligar-se TLR, ativando vias de sinalização que culminam na produção de citocinas relevantes para o processo inflamatório e resolução da infecção (STRIETER et al, 2002). A produção de TNF- α e IL-1 durante a candidíase disseminada é dependente de TLR2 (NETEA et al, 2002). TLR4, por sua vez, medeia sinalização intracelular que culmina na produção das quimiocinas MIP-2 e KC, importantes na elicitação de NØs para o sítio inflamatório.

Uma instalação rápida de ambiente inflamatório é salutar para eliminação do *P. brasiliensis* (GONZALEZ et al, 2003). Células fagocíticas possuem atividade antifúngica intrínseca, eliminando o patógeno através de mecanismo oxidativo ("burst" respiratório) ou não oxidativo (desgranulação e liberação de moléculas efetoras, como defensinas e proteínas catiônicas) e seqüestro de íons ferro (ROMANI, 2004). NØs apresentam atividade antifúngica direta contra *C. albicans*, mas também produzem IL-10 e IL-12, promovendo ativação e controle da resposta imune (ROMANI et al, 1997 b). NØs murinos ativados ou não por citocinas exercem ação fungicida e fungistática contra *P. brasiliensis* nos estágios iniciais infecção, respectivamente, ação essencial para posterior contenção da disseminação do patógeno (KURITA et al, 1999 a).

Polimorfonucleares (PMN) de sangue periférico humano foram examinados *in vitro* para verificação de ação antifúngica contra *P. brasiliensis*. As leveduras do fungo foram resistentes à morte, porém houve efeito fungistático quando o ensaio foi efetuado com incubação prolongada com PMN; lisados celulares de PMN, contudo, não exerceram efeito fungistático (KURITA et al, 1999 b). NØs de pacientes com PCM apresentam falha na capacidade digestiva *in vitro* (GOIHMAN et al, 1980). Da mesma maneira, NØs de animais sensíveis, ao contrário daqueles de animais resistentes, apresentam falha na produção de espécies reativas de oxigênio (MELONI-BRUNERI et al, 1996). Os leucócitos mais importantes na defesa contra *P. brasiliensis* são os MØs, que aportam logo após os NØs no sítio de inflamação. MØ ativado por INF- γ exercem efeito fungicida sobre conídios de *P. brasiliensis* devido em grande parte à produção de óxido nítrico (GONZALEZ et al, 2000). Além do mais, são fundamentais na composição de granulomas epitelióides durante a PCM.

4. Imunidade Adaptativa: Citocinas

A imunidade adaptativa desempenha papel fundamental na defesa contra diversos patógenos e está centrada em linfócitos B e T, que após reconhecimento de antígenos estranhos através de receptores específicos, interagem e amplificam a resposta imune pela liberação de anticorpos e citocinas tipo Th1 e Th2. As citocinas INF- γ , IL-12 e TNF- α são as principais ativadoras da resposta imune tipo Th1 e imprescindíveis para o início e efetivação da resposta inflamatória. (MURPHY et al, 1994). Uma vez iniciada a eliminação dos microrganismos patogênicos, há formação de mecanismos agressores (que muitas vezes danificam tecidos saudáveis, adjacentes ao foco infeccioso), além de resposta de reparo e remodelagem tecidual. As citocinas, tanto de tipo Th1 como Th2, exercem papel ativo e imprescindível também na recomposição funcional do órgão danificado (STRIETER et al, 2002).

Todo processo inflamatório é coordenado, através de estímulos positivos ou negativos, pela inter-relação de todo o sistema imune celular, onde integram-se os linfócitos CD4 e CD8. O papel de linfócitos T na proteção contra infecções fúngicas é essencial, pois são as principais células produtoras de INF- γ , o principal ativador dos MØ (CANO et al, 1995; CANO et al, 2000; ROMANI, 1997 a; SCHNIZLEIN-BICK et al, 2003).

A ativação de MØs por citocinas (principalmente INF- γ) liberadas por células T é fundamental para eliminação de diversos parasitas animais, como *S. mansoni*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptococcus neoformans*. A participação do sistema imune específico na resistência contra *P. brasiliensis* está bem descrita, sendo parte essencial na estratégia de defesa contra o fungo. (RESTREPO et al, 1982; MOSCARDI-BACCHI et al, 1989; CANO et al, 1995; ALMEIDA & LOPES, 2001).

Na PCM a geração de resposta Th1 por INF- γ determina resistência à PCM, enquanto resposta Th2 está associada à susceptibilidade (MURPHY et al, 1998; KASHINO et al, 2000; PINA et al, 2004). Também experimentalmente foi demonstrado que INF- γ exerce papel protetor na PCM (CANO et al, 1998; SOUTO et al, 2000). A administração de IL-12 conferiu proteção em infecção sistêmica por *P. brasiliensis* e aumentou o processo inflamatório através da elevação de INF- γ (ARRUDA et al, 2002). O desequilíbrio entre produção de IL-12, INF- γ e IL-10 (com predominância dessa última) promove susceptibilidade à PCM (BENARD et al, 2001). TNF- α e IFN- γ medeiam resistência ao *P. brasiliensis* e induzem produção de NO principalmente por MØs (SOUTO et al, 2000). Os MØs ativados apresentam níveis aumentados da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de reativos intermediários de nitrogênio (RIN) como nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e óxidos como o NO.

A participação do NO na formação e manutenção de resposta tipo Th1 é conhecida (NIEDBALA et al, 1999). No entanto, o excesso de produção de NO durante a PCM promove susceptibilidade ao *P. brasiliensis*, devido à diminuição dos níveis de TNF- α (NASCIMENTO et al, 2002). Além do mais, a despeito da importância para a eliminação do *P. brasiliensis*, a ativação da produção do NO na PCM contribui para a ocorrência de imunossupressão observada durante o curso da infecção. Prova disso é que o tratamento com de inibidor de NO (N ω -nitro-L-arginina) previne falha na defesa celular contra *P. brasiliensis* em modelo experimental (BOCCA et al, 1998).

5. Imunidade adaptativa: Interleucina-18 (IL-18)

OKAMURA et al (1995) descreveram uma nova citocina potente indutora de INF- γ , posteriormente denominada com o IL-18. Estudos demonstraram que a estrutura de IL-18

assemelha-se a IL-12 e aos membros da família IL-1 (DINARELLO, 1999) mas possui maior espectro de ações no sistema imune (KOHNO & KURIMOTO, 1998). Em geral, o receptor de IL-18 (IL-18R) é expresso somente em células Th1. O aumento da expressão desse receptor em linfócitos T e células NK advém de estímulos propiciados por IL-12 e INF- γ (YOSHIMOTO et al, 1998; XU et al, 1998; SMELTZ et al, 2002).

IL-18 é armazenada na forma de precursor inativo e sua forma ativa surge após clivagem pela caspase-1, mesma enzima requerida para o processamento da IL-1 β , citocina com a qual IL-18 similaridade estrutural (FANTUZZI et al, 1999).

A ausência de IL-18 foi prejudicial à atividade de células NK e desfavorece uma resposta Th1 (TAKEDA et al, 1998). Estudos em diferentes modelos experimentais, porém, mostraram que IL-18 é uma citocina que, dependendo do ambiente onde se desenvolve a resposta imune, pode amplificar tanto uma resposta Th1 como Th2 (NAKANISHI et al, 2001). Em animais deficientes de INF- γ a IL-18 induz células NK a produzirem IL-13, uma citocina tipo Th2 (HOSHINO et al, 1999). A ausência de IL-12 também predispõe a uma resposta do tipo Th2 via IL-18 (YOSHIMOTO et al, 1999).

Em geral, IL-18 isoladamente não induz produção de INF- γ , mas amplifica a indução promovida pela IL-12 (DINARELLO & FANTUZZI, 2003). IL-18 sinergiza também com outras citocinas, como IL-15 e IL-21, promovendo produção de INF- γ por células NK (ZHANG et al, 1997; STRENGELL et al, 2003). Contudo, demonstrou-se que animais "knockout" (KO) para IL-18 (IL-18KO) infectados por *Propionibacterium acnes* apresentam um quinto da quantidade de INF- γ encontrada em animais "wild type" (WT) infectados pelo mesmo patógeno. Isso demonstra que IL-18 (ao menos em alguns modelos experimentais) é fundamental para manutenção de níveis protetores de citocinas Th1 (TAKEDA et al, 1998).

A IL-18 é uma citocina com atividade pleiotrópica, exercendo papel e um amplo espectro de patologias agudas ou crônicas e como ativadora de funções importantes na resposta imune (MCINESS et al, 2000). IL-18 pode também promover efeitos deletérios em miocárdio, fígado e cérebro pelo acúmulo de INF- γ , TNF- α e formação de infiltrado inflamatório, além de desempenhar papel patológico na inflamação intestinal (DINARELLO & FANTUZZI, 2003).

Dentre outras funções da IL-18, podemos destacar: atração de células dendríticas plasmocitóides e promoção de resposta Th1 (KASER et al, 2004); regulação de ICAM-1 em monócitos humanos (STUYT et al, 2003); defesa contra agentes infecciosos (KAWAKAMI, 2002; WEIJER et al, 2003); angiogênese *in vivo* e *in vitro* (PARK et al, 2001); ativação de NØs (LEUNG et al, 2001); participação no mecanismo de asma fúngica (BLEASE et al, 2001); indução da expressão de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α por MØs (NETEA et al, 2000). Juntamente com IL-2, porém IL-18 promove resposta do tipo Th2 essencial, no combate ao *Strongyloides venezuelensis* (SASAKI et al, 2005).

A adição de INF- γ em cultura de esplenócitos de camundongos deficientes de INF- γ infectados por *T. cruzi* modula apoptose por dois mecanismos distintos: aumentando os níveis de NO e expressão de Fas/FasL (MARTINS et al, 1999). Ainda não foi estudado, porém, se na PCM a IL-18 induziria, direta ou indiretamente, níveis de INF- γ que pudessem influenciar a produção de NO ou a expressão de Fas/FasL em leucócitos pulmonares.

A importância de IL-18 tem sido estudada também em infecções por protozoários e fungos. Na infecção por *L. major* IL-18 determina uma resposta Th1 indiretamente, estimulando células Th1 a produzirem INF- γ (OHKUSU et al, 2000). Contudo, outro estudo demonstrou que animais deficientes de IL-18 infectados por *L. major* produziram níveis similares de IFN- γ àqueles apresentados por animais normais durante o período de infecção (MONTEFORTE et al,

2000). IL-18 isoladamente, porém, não direcionou desenvolvimento de resposta Th1 em camundongos BALB/c ou C57BL/6 (ROBINSON et al, 1997). A administração de IL-18 a animais C3H/HeN promoveu efeito exacerbante da leishmaniose. Contrariamente, WEI et al (1999) demonstraram que animais deficientes de IL-18 são mais susceptíveis a *L. major*. As diferenças encontradas entre esses estudos podem ser devidas: ao tempo de observação mais longo (MONTEFORTE et al, 2000); ou ao “background” genético dos animais utilizados, que são diferentes. Esses resultados demonstraram que IL-18, diferentemente da IL-12, nem sempre é necessária para o desenvolvimento de resposta Th1 (WEI et al, 2004).

Animais deficientes de IL-18, mas não de IL-12, são susceptíveis à forma sistêmica da candidíase (NETEA et al, 2003). A administração de IL-18 em animais infectados por *C. neoformans* resultou na eliminação de microrganismos dos pulmões, além de impedir disseminação para o cérebro e aumentar a sobrevivência dos animais (KAWAKAMI et al, 1997). O sinergismo entre IL-12 e IL-18 é importante também na indução INF- γ por células NK e MØs peritoneais em resposta ao *C. neoformans* (ZHANG et al, 1997; QURESHI et al, 1999). A participação da IL-18 na resistência ou na susceptibilidade ao *P. brasiliensis* não foi ainda determinada, seja clinicamente ou experimentalmente.

6. Imunidade adaptativa: quimiocinas

Quimiocinas são fatores protéicos importantes na resposta imune contra patógenos, que regulam não apenas a composição do infiltrado inflamatório, mas também a ativação celular. São divididas em quatro grupos, de acordo com a posição de duas das quatro cisteínas conservadas entre os membros dessa família: CXC (α); CC (β); C (γ); e CX₃C.

As α e β quimiocinas são mais relevantes no recrutamento de leucócitos em infecções pulmonares agudas e crônicas (HUFFNAGLE et al, 1995). Em quimiocinas CXC a presença da seqüência glutamato-leucina-arginina (ELR) próxima à região N-terminal determina uma maior especificidade quimiotática sobre NØ. Na ausência de ELR há seletividade para células mononucleares. As principais quimiocinas ELR são IL-8 (KC) e MIP-2, e as CXC sem ELR mais representativas são PF-4, IP-10 e MIG (ROLLINS, 1997). As β quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 e RANTES) induzem principalmente o recrutamento de linfócitos, monócitos e eosinófilos (OPPENHEIM et al, 1991), mas NØs também migram em resposta a essas quimiocinas (ROSSI & ZLOTNIK, 2000).

Algumas quimiocinas contribuem para formação de granulomas em diferentes processos, infecciosos ou não. A formação granulomatosa é regulada tanto por fatores do patógeno quanto inerentes ao hospedeiro. A intensidade de ativação desses elementos, dentre os quais quimiocinas e citocinas, determina a formação de granuloma epitelióide e posterior progressão a um processo cicatricial fibrótico (FRANCO et al, 1998). A infusão intravenosa de glucanas de *Saccharomyces cerevisiae* induz a formação de granulomas pulmonares (FLORY et al, 1995), em um processo dependente de TNF- α , IL-1 e MCP-1. *C. neoformans* induz liberação das quimiocinas MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES de monócitos humanos isolados do sangue periférico (HUANG & LEVITZ, 2000) e em pulmões de animais infectados (OLSZEWSKI et al, 2001). Células dos pulmões produzem diferentes quimiocinas durante infecção por *P. brasiliensis*, que modulam a resposta imune para padrão Th1 (SOUTO et al, 2003).

7. Apoptose

Morte celular é uma parte importante no ciclo de vida de organismos multicelulares, tomando parte no desenvolvimento, defesa e homeostasia. Durante a geração e execução da resposta imune a eliminação de linfócitos potencialmente autorreativos ou prevenção de resposta exacerbada por leucócitos precisam ser elaboradas de maneira coordenada. Reconhecem-se hoje duas formas principais e completamente distintas de eliminação de células "indesejadas": a necrose e a apoptose.

A necrose é uma forma de morte passiva, acidental, que ocorre normalmente em eventos onde há agressão celular (MAJNO & JORIS, 1995). Após lesões severas na membrana plasmática, mitocôndria e lisossomos, há perda da homeostasia e entrada de água e íons, aumentando a turgidez citoplasmática e dilatação das organelas. Em seguida ocorre rompimento dessas estruturas e liberação de enzimas degradativas, causadoras de danos ao núcleo, organelas, membrana plasmática e ribossomos (KANDUC et al, 2002; FINK & COOKSON, 2005). As enzimas lisossomais liberadas nas imediações completam a lise dos componentes estruturais, mas também danificam membranas celulares dos tecidos adjacentes, desencadeando uma resposta inflamatória.

A apoptose (morte celular programada) é essencial para o desenvolvimento e envolve um processo ativo e controlado, que ocorre tanto em situações patológicas como fisiológicas. A morte celular programada envolve mecanismos de autodestruição celular, porém sem a liberação de macromoléculas potencialmente patogênicas ou destrutivas que possam desencadear uma resposta inflamatória (MILLS et al, 1999).

Os estudos iniciais onde se verificaram evidências da morte celular programada foram realizados por GLUCKSMANN (1951), em estudos na embriogênese de vertebrados. Evidências da ocorrência da apoptose foram inicialmente mostradas por KERR et al (1972), em

estudos morfológicos em isquemia hepática. Condensações citoplasmáticas e nucleares e fragmentação celular foram as mudanças observadas nas células apoptóticas. Observou-se também o "blebbing" da membrana plasmática (projeções citoplasmáticas) e fragmentação celular em vesículas envoltas por membrana plasmática (e às vezes também por membrana nuclear), os chamados corpos apoptóticos.

O termo apoptose foi proposto para definir este diferenciado mecanismo de controle da morte celular (KEER et al, 1972). A morte celular programada é uma propriedade comum e evolucionariamente conservada entre todos os metazoários, e sua indução é promovida por sinais intra ou extracelulares (HUNOT & FLAVELL, 2001). Dentre as causas mais freqüentes de apoptose estão os danos na membrana mitocondrial causados por fatores de estresse oxidativo ou por agentes químicos provocam uma cascata de eventos que, via caspases ou AIF ("apoptosis inducing factor"), acionam eventos bioquímicos que culminam na apoptose (PENNINGER et al, 1998; JOZA et al, 2001).

A descoberta de que síntese de mRNA, proteínas e enzimas era requerida para o prosseguimento da apoptose ratificou a idéia de que esse processo não é somente uma variante da necrose, mas sim um mecanismo marcadamente distinto (WYLLIE, 1980). O primeiro marcador bioquímico de apoptose surgiu a partir de investigações que relacionaram a apoptose com ativação de endonucleases (WYLLIE, 1980). Estas enzimas clivam o DNA na região internucleossomal, inicialmente gerando grandes fragmentos (50 a 300 kb) e posteriormente oligonucleossomos múltiplos de 180 a 200 pares de base, que em eletroforese apresentam um padrão característico "em escada" (ladder). Células apoptóticas apresentam perda da assimetria da membrana precocemente, evidenciada pela exposição de fosfatidilserina (FS), um fosfolípido carregado negativamente. Normalmente localizado na monocamada interna da

membrana plasmática às custas de um processo ativo para manutenção da homeostase, FS é um marcador extremamente útil na detecção da apoptose (FINK & COOKSON, 2005).

O mecanismo pelo qual a apoptose é regulada começou a ser compreendido durante estudos com o nematodo *Caenorhabditis elegans*. Três genes estão envolvidos na morte celular programada de *C. elegans*: ced-3 e ced-4 (proapoptóticos) e ced-9 (antiapoptótico). Estes genes codificam proteínas com similaridade estrutural e fisiológica às caspases humanas, fundamentais na condução da apoptose (YUAN et al, 1993). Caspases são enzimas pertencentes à família das cisteína proteases e existem sob a forma de precursores inativos (procaspases), ativados por clivagem em ligações peptídicas específicas (LAURENZI & MELINO, 2000; KAUFMANN & HENGARTNER, 2001).

Vários estímulos conduzem à ativação das caspases com conseqüente indução de apoptose: geração de reativos intermediários de oxigênio, influxo de cálcio, perda do potencial de membrana mitocondrial (HEIDEN et al, 1997); deprivação de soro, radiações ionizantes, tratamento com granzima B, agentes farmacológicos (LIU et al, 1997). Foram descritas até o momento cerca de 14 caspases diferentes em seres humanos. Contudo, nem todas fazem parte efetivamente de vias de indução de apoptose, participando em alguns processos de regulação e promoção de inflamação.

A apoptose constitui-se também em um importante mecanismo de eliminação de linfócitos autorreativos e de controle de resposta imune periférica (VAN PARIJS & ABBAS, 1998), além da eliminação de tumores e células infectadas por vírus e bactérias. Alguns trabalhos mostraram que algumas bactérias, tais como *Shigella flexneri* (ZYCHLINSKY et al, 1992), *Pseudomonas spp* (KOCHI & COLLIEN, 1993), *Salmonella spp* (CHEN et al, 1996), dentre outras, são capazes de induzir apoptose de fagócitos, constituindo importante fator de virulência. Existem,

porém, poucas evidências experimentais implicando *P. brasiliensis* ou outros fungos na indução de apoptose.

Foi demonstrado que proteinases de *C. albicans* têm atividade semelhante à caspase-1, induzindo apoptose de macrófagos peritoneais murinos (BEAUSÉJOUR et al, 1998). A inibição dessas proteinases fúngicas por pepstatina, contudo, impediu a apoptose de macrófagos peritoneais (PANAGIO et al, 2002). Alguns metabólitos como a gliotoxina, produzida por alguns tipos de fungos, são indutores de apoptose (KROLL et al, 1999). *P. brasiliensis* foi capaz de induzir apoptose de timócitos em infecção murina (SOUTO et al, 2003).

8. Sistema Fas/FasL

Moléculas presentes na superfície celular de diversos tipos celulares, denominadas receptores de morte, são capazes de transmitir sinais apoptóticos quando associados a seus respectivos ligantes, principalmente através da ativação de caspases (ASHKENAZI & DIXIT, 1998; ASHKENAZI & VISHVA, 1999). Os receptores de morte são membros da superfamília do receptor de TNF (TNFR) e dividem-se em cinco grupos: TNFR1 (p55 ou CD120a), DR3 (Apo-3/Tramp), DR4, DR5 (Apo-2R/TRAIL-R2) e CD95 (Fas/Apo-1). Todos apresentam domínios extracelulares ricos em cisteína, com porções intracelulares homólogas adicionais denominadas domínios de morte (ASHKENAZI & DIXIT, 1998). Os ligantes responsáveis pela ativação desses receptores são trímeros (pertencentes à superfamília do TNF) e ligam-se especificamente da seguinte maneira: CD95 ligante (CD95L/FasL) ao Fas; TNF- α ao TNFR1; APO3 ligante (APO3L) ao DR3; APO2 ligante (APO2L) ao DR4 e DR5 (PAN et al, 1997; SHERIDAN et al, 1997).

A apoptose mediada pelo sistema Fas/FasL (CD95/CD95L) é um dos mecanismos responsáveis pela homeostasia do sistema imune (JU et al, 1995; GREEN et al, 2003). Fas é um receptor do tipo 1 de 45 kD, expresso em diversos tecidos, particularmente abundante em timócitos e linfócitos T. FasL é uma glicoproteína de superfície do tipo II de 40 kD, pertencente à família TNF. Contrariamente ao Fas, FasL tem expressão restrita, presente em linfócitos ativados, células NK e células residentes de sítios imunoprivilegiados, como os olhos e os testículos (LI-WEBER & KRAMMER, 2003).

A ligação Fas/FasL é fundamental no desenvolvimento da tolerância periférica e participa da deleção clonal de linfócitos autorreativos, abreviando a resposta imune. A falha nesse sistema pode conduzir ao aparecimento de doenças linfoproliferativas com variados graus de severidade (CHEN et al, 1998; GREEN, 2003; LI-WEBER & KRAMER, 2003).

A via de ativação iniciada por Fas/FasL induz, além mecanismos promotores de morte celular, sinalização para angiogênese, regulação do desenvolvimento e maturação de linfócitos T e B e de funções fisiológicas de muitas células e tecidos, como o controle da eritropoiese (DE MARIA et al, 1999). A ligação de Fas em monócitos e macrófagos tratados com anticorpos para o receptor Fas pode induzir citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-8) via NF κ B, instalando quadro de inflamação aguda e injúria tissular (PARK et al, 2003). A participação efetiva da via Fas/FasL também foi demonstrada em doenças inflamatórias pulmonares (DOS REIS et al, 2004).

A apoptose mediada por Fas é o principal mecanismo pelo qual linfócitos citotóxicos eliminam células apresentadoras de antígenos estranhos (CURTIN & COTTER, 2003). A apoptose no sistema imune, contudo, ocorre também por meio de outros mecanismos. Dois receptores glicoprotéicos, TNFRI/p55 e TNFRII/p75 (estruturalmente relacionados com Fas)

ligam-se ao TNF- α e transduzem sinais de morte celular em vários tipos celulares, via cascata de sinalização mediada por caspases (CLEMENT & STAMENKOVIC, 1994).

Durante infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* há uma grande produção de NO, potente indutor de apoptose de M ϕ (MARTINS et al, 1998). Em camundongos infectados por *T. cruzi*, o impedimento da interação Fas/FasL resultou na diminuição da indução de apoptose e da produção de NO, como consequência da produção de citocinas tipo Th2 (MARTINS et al 2001).

Após a formação da coleção celular e início da eliminação do patógeno, o granuloma entra em processo de desarticulação estrutural, onde as células componentes entram em processo de desativação e morte celular programada. Na esquistossomose murina, a eliminação de linfócitos do granuloma é mediada via Fas (RUMBLEY et al, 2001). A apoptose induzida por antígenos de ovos de *S. mansoni* também é mediada via Fas/FasL (LUNDY et al, 2001). Até o momento não existem estudos avaliando participação de Fas ou FasL na formação ou desarticulação de granulomas na PCM.

Foi demonstrado que gp43 de *P. brasiliensis* causa apoptose de leucócitos humanos, gerando hiporresponsividade ao fungo (CACERE et al, 2002). Em monócitos de sangue periférico humano a hiporresponsividade ao *P. brasiliensis* está relacionada com indução de apoptose por gp43 via Fas/FasL (CAMPANELLI et al, 2003). *P. brasiliensis* causou apoptose de timócitos em modelo experimental murino, mas um possível envolvimento de mecanismo imunológico via Fas nesse processo apoptótico não foi avaliado (SOUTO et al, 2003). Após invasão de *P. brasiliensis* ocorreu rearranjo de citoesqueleto e apoptose de células epiteliais Vero e pneumócitos tipo II. Esses dados foram confirmados por testes de fragmentação do DNA e superexpressão de Bak (proteína pró-apoptótica) e TUNEL. Esses dados permitiram sugerir que

P. brasiliensis induz apoptose para favorecer sua disseminação (MENDES-GIANNINI et al, 2004).

Muitos estudos mostram que a imunidade contra fungos é mediada por citocinas e quimiocinas do tipo Th1. A presença de IFN- γ e IL-12 (potente indutora da produção de INF- γ) é imprescindível para resolução de micoses, impedindo multiplicação de parasitas através da ativação de células fagocíticas (LIVONESI, 2001). Diversos trabalhos têm demonstrado a importância da IL-18 diretamente na produção de IFN- γ , ou indiretamente, através da potencialização da produção de IL-12.

A despeito da relevância de IL-18 na regulação da apoptose via Fas/FasL e dos recentes estudos que associaram apoptose com hiporresponsividade e susceptibilidade à PCM, ainda não foi avaliado em modelo experimental *in vivo* uma possível participação da IL-18 e Fas/FasL na regulação dos processos apoptótico e inflamatório contra *P. brasiliensis*. Também não foi avaliada se a ausência de sinalização Fas/FasL influiria na apoptose de linfócitos, modulando a resposta inflamatória negativamente.

Estudos demonstram que a sinalização via Fas/FasL também influi na migração e atividade enzimática dos NØs (GRESHAM et al, 1991). Considerando-se que a presença de NØs especialmente nas fases iniciais de infecção é determinante na contenção da infecção pelo *P. brasiliensis*, seria interessante a verificação de atividade migratória desses leucócitos durante a PCM, assim como sua atividade microbicida.

Durante a paracoccidiodomicose ocorre aumento dos níveis de anticorpos de isotipos encontrados em resposta do tipo Th2. Contudo, apesar da descrição em modelos animais caracterizados por predominância de IgG2a (resposta Th1) e IgG2b (Th2), não está esclarecido se os anticorpos são apenas marcadores de resistência ou susceptibilidade ou participam

ativamente da elaboração da resposta protetora, favorecendo a formação de granulomas compactos.

9. Anticorpos

A imunidade celular tanto específica como não específica proporciona a principal linha de defesa contra infecções fúngicas. Essa observação deriva principalmente da observação clínica associada com dados experimentais. Reconhecidamente, indivíduos com imunidade celular comprometida são mais susceptíveis a micoses (LEVITZ et al, 1992). O papel dos anticorpos em doenças infecciosas, porém, é muito variável. A imunidade humoral é comprovadamente protetora contra a maioria dos vírus conhecidos e essencial na neutralização de toxinas. Em infecções causadas por bactérias há estudos suportando tanto a importância (HALL et al, 2003) quanto irrelevância (ELKINS et al, 1999) dos anticorpos na proteção contra o patógeno. A controvérsia sobre o papel da imunidade por anticorpos permanece também em relação a infecções fúngicas. Existem muitos estudos suportando que anticorpos possam participação essencial, parcial, irrelevante ou até mesmo prejudicial durante o processo infeccioso e geração de resposta de memória.

MONGA et al (1979) sugeriram que anticorpos não têm influência no curso da infecção por *C. neoformans*. Outros estudos mostraram a possibilidade de resposta humoral mista, onde ocorre produção de anticorpos protetores e não protetores na criptococose experimental (MUKHERJEE et al, 1995; ZARAGOZA & CASADEVALL, 2004). A eficácia dos anticorpos contra *C. neoformans* pode ser maior devido ao efeito aditivo de NO, corroborando a interdependência entre imunidade celular e humoral (RIVERA et al 2002). Contudo, a soroterapia passiva com anticorpo monoclonal foi protetora contra criptococose experimental,

apesar do caráter transitório dessa proteção em animais inoculados com alta carga fúngica (DROMMER et al 1991). Em MØs humanos e murinos a atividade antifúngica máxima contra *C. neoformans* ocorreu por um processo dependente de opsonização (KELLY et al, 2005).

Numerosos estudos fornecem evidências contra ou a favor da imunidade protetora conferida por anticorpos contra *C. albicans*. Animais deficientes de linfócitos B apresentaram maior susceptibilidade e carga fúngica mais elevada em relação a animais selvagens durante candidíase cutânea (KAGAYA et al, 1981). A administração passiva de anticorpos promoveu significativo grau de proteção contra candidíase murina profunda, diminuindo efetivamente a carga fúngica em diversos órgãos (PEARSALL et al, 1978). Igualmente a presença de IgG3 gerou consistente estado de proteção na candidíase sistêmica (HAN et al, 2000). Contudo, demonstrou-se que a administração de soro hiperimune não conferiu proteção, pois a fagocitose não-imune e imunidade celular mediada por células T eram necessárias para eficiente eliminação do patógeno (MIYAKE et al, 1977).

Apesar da extensa controvérsia sobre efetividade e viabilidade de tratamento terapêutico com anticorpos, há uma grande consideração sobre a aplicação em condições clínicas (MATTHEWS & BURNIE, 1992; MATTHEWS & BURNIE, 1996). Embora existam muitos anticorpos contra antígenos de *A. fumigatus* para uso diagnóstico, não foi avaliada uma possível atividade terapêutica protetora, com exceção de anticorpos contra fosfatase alcalina (CASADEVALL et al, 2002). Animais deficientes de células B infectados por *Histoplasma capsulatum* não exibiram diferenças nas taxas de sobrevivência quando comparados aos controles. Assim, a produção de anticorpos foi dispensável para imunidade protetora na histoplasmose (ALLENDÖRFER et al, 1999).

A participação de imunoglobulinas na PCM vem sendo investigada há muitos anos, com grande relevância no prognóstico da doença, visto que após tratamento há uma diminuição na quantidade de anticorpos (CRUZ et al, 1990). Frequentemente, porém, a resposta imune humoral tem sido associada à doença disseminada e manifestações clínicas severas, (ARANGO et al, 1982). Mas segundo BIAGIONI et al (1987), "IgG e C3 parecem exercer papel precoce e importante na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*, contribuindo possivelmente para a destruição dos fungos e bloqueando a difusão de antígenos para fora dos granulomas".

A detecção dos anticorpos presentes no soro de pacientes infectados com *P. brasiliensis* tem sido utilizada como ferramenta diagnóstica da PCM. *P. brasiliensis* expressa diversas moléculas antigênicas como as glicoproteínas gp43 e gp 70, reconhecidas por anticorpos produzidos no curso da PCM, tanto em humanos quanto em animais de laboratório (DE MATOS GROSSO et al, 2003). O tipo de resposta humoral evocada na PCM policlonal, onde diferentes isotipos de imunoglobulinas são produzidos em grande quantidade. De uma forma geral, altos índices de anticorpos remetem à susceptibilidade. Em todas as formas clínicas da PCM há presença de anticorpos antiidiotipos detectados no soro dos pacientes, correlacionando-se com as distintas formas clínicas da doença (SOUZA et al, 2000).

A produção de determinados isotipos das imunoglobulinas na PCM reflete normalmente o estado de ativação do sistema imune. Na infecção humana a presença de IgG4 e IgE associa-se com a forma mais severa da doença (BISELLI et al, 2001). Em modelo experimental, animais susceptíveis (B.10A) apresentam um perfil de isotipos específico, com predomínio policlonal (IgG1, IgG2a e IgG2b, igualmente distribuídas), sendo que IgG1 e IgG2b, característicos de resposta Th2, são produzidos em estágio precoce da infecção. Animais resistentes (A/Sn)

produzem quantidades significativamente maiores de IgG3 e IgG2a, características de resposta Th1 (CANO et al, 1995).

No contexto das doenças infecciosas os anticorpos podem potencializar a imunidade através de diversos mecanismos, como: neutralização de toxinas, opsonização, ativação de complemento, liberação de citocinas, citotoxicidade celular e apresentação antigênica. Anticorpos específicos contra *M. tuberculosis* foram capazes de aumentar resposta imune inata e celular em modelo experimental (VALLÉRE et al, 2005).

Embora na PCM os anticorpos sejam associados normalmente à quadros mais severos da doença, não é claro se anticorpos contribuem essencialmente para geração ou manutenção susceptibilidade, ou ainda se são apenas marcadores do estágio da doença. Anticorpos anti-gp70 foram capazes de promover a formação de granulomas compactos e abreviar o curso da PCM (DE MATTOS GROSSO et al, 2003), contribuindo para a idéia de que imunoglobulinas possuem uma participação positiva na proteção contra *P. brasiliensis*. Até o momento não existe estudo relatando a evolução da PCM sistêmica na ausência de células B ou anticorpos.

O papel das citocinas características de resposta Th1 durante a PCM foi determinado em recentes estudos, tanto por nosso laboratório quanto por autores de outros grupos. Assim, nessa tese de doutorado nossa proposta foi entender o papel da IL-18, cujo emprego tem sido proposto na terapêutica de infecções fúngicas. Objetivamos analisar a função da IL-18 na modulação da resposta imune durante a PCM sistêmica. Além disso, procuramos determinar se a ausência da via Fas/FasL afeta o curso da PCM. Com o decorrer do trabalho e nossas observações novas questões e respostas surgiram, e concluímos ser importante inserí-las nesse trabalho, na esperança de que sejam contribuições importantes no estudo da PCM. Dessa forma, os objetivos dessa tese foram:

1. Determinar a importância da IL-18 na PCM
2. Verificar se IL-18 é necessária para indução de Fas/FasL após infecção por *P. brasiliensis*
3. Verificar como diminuição da sinalização Fas-FasL afeta o curso da PCM
4. Verificar se após PCM sistêmica ocorre apoptose de linfócitos presentes em granulomas pulmonares
5. Paralelamente, verificar se linfócitos B e anticorpos são importantes para manutenção da resposta imune e formação de granuloma na infecção por Pb

OBJETIVOS

O papel das citocinas características de resposta Th1 durante a PCM foi determinado em recentes estudos, tanto por nosso laboratório quanto por autores de outros grupos. Assim, nessa tese de doutorado nossa proposta foi entender o papel da IL-18, cujo emprego tem sido proposto na terapêutica de infecções fúngicas. Objetivamos analisar a função da IL-18

na modulação da resposta imune durante a PCM sistêmica. Além disso, procuramos determinar se a ausência da via Fas/FasL afeta o curso da PCM. Com o decorrer do trabalho e nossas observações novas questões e respostas surgiram, e concluímos ser importante inserí-las nesse trabalho, na esperança de que sejam contribuições importantes no estudo da PCM. Dessa forma, os objetivos dessa tese foram:

6. Determinar a importância da IL-18 na PCM
7. Verificar se IL-18 é necessária para indução de Fas/FasL após infecção por *P. brasiliensis*
8. Verificar como diminuição da sinalização Fas-FasL afeta o curso da PCM
9. Verificar se após PCM sistêmica ocorre apoptose de linfócitos presentes em granulomas pulmonares
10. Paralelamente, verificar se linfócitos B e anticorpos são importantes para manutenção da resposta imune e formação de granuloma na infecção por Pb

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo de leveduras de *P. brasiliensis*

A cepa de *P. brasiliensis* 18, altamente virulenta (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Roberto Martinez, Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-SP) foi utilizada nesse trabalho. A cepa de Pb18 foi mantida na fase leveduriforme à temperatura de 37°C em meio de Fava-Neto. Para preservação da virulência o fungo foi alternadamente mantido por subculturas em meio BHI e

passagens em animais (Brummer et al, 1990). As leveduras utilizadas para inoculação em animais foram obtidas de subculturas de colônias retiradas de Agar BHI após recuperação de fungos de lisados de órgãos.

2.2. Animais de Experimentação

Foram utilizados camundongos isogênicos adultos (6-8 semanas), machos, da linhagem BALB/c e C57BL/6, mantidos segundo as recomendações da CETEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Os animais foram criados e mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os camundongos normais foram mantidos em caixas com no máximo 8 animais e tiveram livre acesso à água e ração. Foram utilizados também nesse trabalho animais deficientes (KO) de:

- IL-18, da linhagem BALB/c
- Fas (Fas truncado), da linhagem C57BL/6
- linfócitos B, da linhagem C57BL/6.

Os animais KO foram mantidos em microisoladores, com no máximo 6 animais por caixa, tendo livre acesso a ração e água, ambas autoclavadas. Todos os animais (KO e normais) foram mantidos em sala com aeração e temperatura controladas automaticamente. Semanalmente 5 gotas do complexo vitamínico Vitagold (Tortuga, Mairinque, SP, Brasil) /100 mL de água) foram adicionadas à água dos animais normais e KO. Após o término dos experimentos, os animais sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical, colocados em sacos plásticos e incinerados dentro das normas de segurança por profissionais habilitados.

2.3. Viabilidade dos Fungos

Executada pela técnica de marcação por diacetato de fluoresceína (FIT-C) e brometo de etídio, desenvolvida por Calich et al (1978). A 100 µl de suspensão com fungos foram adicionados 100 µl de diacetato de fluoresceína (2µg/mL) e 100 µl de brometo de etídio (50 mg/mL). A mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C e a viabilidade foi determinada utilizando-se microscópio de fluorescência. A viabilidade foi considerada satisfatória quando acima de 90% das leveduras marcaram-se pelo FIT-C.

2.4. Preparo do inóculo

Após teste de viabilidade, quantidades arbitrárias de *P. brasiliensis* foram colocadas em tubos de vidro contendo 2 mL de PBS e pérolas de vidro estéreis. As leveduras foram colocadas em tubo de vidro contendo pérolas de vidro e PBS estéril, agitadas por 10 segundos em vórtex e lavadas duas vezes com PBS estéril, em centrifugação a 1000 rpm/4°C/10 minutos. Em seguida as leveduras foram ressuspendidas em 5mL de PBS estéril, aspiradas em seringa descartável de 10mL e passadas através de agulha 25x8, para completa separação de grumos. Em seguida foi efetuada nova centrifugação (nas condições mencionadas acima) e as leveduras foram contadas em câmara de Neubauer. A concentração de células fúngicas foi ajustada para $1,0 \times 10^7$ leveduras/mL em PBS estéril, sendo que 100 µl dessa solução foram inoculados em cada animal.

2.5. Infecção

Os animais foram anestesiados por 2,2,2 tribromoetanol (250 μ g/g) e inoculados intravenosamente (i.v.) pelo plexo orbital com $1,0 \times 10^6$ leveduras de *P. brasiliensis* em 0,1mL de PBS estéril.

2.6. Reagentes e Soluções

2.6.1. Meio de Fava-Neto: Para o preparo do meio adicionamos a 1 litro de água destilada: 18g de Agar (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England); 10g de Peptona (BD Difco, USA); 3g de Proteose Peptona (BD Difco, USA); 5g de Extrato de Carne (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England); 5g de NaCl (Merck, Germany); 5g de Extrato de Levedura (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England); 40g de Dextrose (Merck, Germany). Em seguida ajustamos o pH para 7,2-7,4. O meio foi autoclavado por 15 minutos/121°C. Após resfriamento até cerca de 50°C adicionamos ao meio penicilina (100 μ g/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL). O meio foi em seguida distribuído em placas estéreis descartáveis.

2.6.2. RPMI 1640: Na preparação do meio incompleto (RPMI-I) foram adicionados a um litro de água destilada: 10,4 g de RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA); 2,6 g de N-2-hidroxipiperazina N-2 ácido etanossulfônico (HEPES, Sigma, St Louis, MO, USA); 2 g de bicarbonato de sódio. O pH foi corrigido para 7,2. Na preparação do meio completo (RPMI-C) foram adicionados 5% de soro bovino fetal (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.), L-glutamina (2mM) , penicilina (100 μ g/mL), estreptomicina (100 μ g/mL), 2- β -mercaptoetanol (5×10^5 M), aminoácidos essenciais e piruvato de sódio (1mM), todos da Sigma (St Louis, MO, USA). O meio foi filtrado e estocado a 4°C.

2.6.3. BHI (Brain Heart Infusion): Para preparação de meio para subcultura foram adicionados em um litro de água destilada 35g de BHI Agar (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England). O meio foi autoclavado por 15 minutos/121°C . Após esfriamento até aproximadamente 50°C foram adicionados penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100µg/mL) e 50 mL de soro bovino fetal (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.). Quando o objetivo foi a recuperação fúngica e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) a partir de lisados de órgãos suplementamos o meio com 25ml de caldo filtrado de cultura da cepa 265 de *P. brasiliensis* (cepa não virulenta). O meio foi em seguida distribuído em placas estéreis descartáveis.

2.6.4. Solução de Turk: Adicionamos 2ml de violeta de genciana e 10 mL de ácido acético a 488mL de água destilada. A solução foi estocada em temperatura ambiente.

2.6.5. Tampão de lise: Solução de Tris 0,17M foi diluída na proporção de 1:10 em solução de cloreto de amônio (NH₄Cl) 0,16M. A solução final foi filtrada com membrana 0,22µm e mantida a 4°C.

2.6.6. Reagente de Griess:

Solução 1: Naphthalene-ethylene diamine dihydrochloride (NEDD) 0,01% em água destilada

Solução 2: Sulfanilamida 1% em Ac. Fosfórico (H₃PO₄) 5% (em água destilada).

No momento do uso misturamos Solução 1 e 2 em partes iguais.

2.6.7. Tampão Carbonato-bicarbonato:

Solução 1: A 200 mL de água destilada foram adicionados 1,06 g de Carbonato de ódio.

Solução 2: A 600 mL de água destilada foram adicionados 2,52 g de Bicarbonato de Sódio.

A solução 2 foi adicionada à solução 1 até que o pH atingisse o valor de 9,6. A solução final foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.6.8. Tampão Fosfato pH 6,5 : A um litro de água destilada foram adicionados 11,8g Na_2HPO_4 e 16,1g de NaH_2PO_4 . A solução final foi autoclavada e guardada em geladeira.

2.6.9. Tampão Fosfato pH 9: Foi preparada solução de Na_2HPO_4 0,1M. Em seguida adicionou-se solução de NaH_2PO_4 0,1M até que pH 9 fosse alcançado. A solução final foi autoclavada e mantida a 4°C.

2.6.10. Solução Salina Balanceada de Hank's: A um litro de água destilada foi adicionado um frasco de solução de Hank's (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.). O pH foi ajustado para 7,2 com solução de bicarbonato de sódio a 7%. A solução final foi filtrada com membrana de poro 0,22 μM e mantida a 4°C.

2.6.11. Exoantígeno: Quantidade arbitrária de massa celular fúngica foi colocada em tubo de vidro contendo pérolas de vidro e 2mL de PBS. A suspensão foi agitada em vórtex por 1 minuto e centrifugada por 10 minutos/1000 x g/4°C. O sobrenadante contendo exoantígeno foi coletado e a concentração protéica determinada pelo método do Ácido Bicinonínico (Sigma, St Louis, MO, USA).

7. Curva de Mortalidade:

Foi estabelecido um tempo máximo de observação de 120 dias para animais de linhagem BALB/c e C57BL/6. Após o final dos experimentos os animais foram sacrificados.

8. Determinação de Unidades formadoras de colônia (UFCs) no baço, fígado e pulmões

Os animais infectados foram anestesiados intraperitonealmente com 2,2,2 tribromoetanol (250 µg/g) e em seguida sacrificados por deslocamento cervical. O baço, fígado e pulmões direitos foram retirados e submetidos a pesagem em vials criogênicos contendo 1mL de PBS estéril. Lisados celulares de baço, fígado e pulmões foram obtidos após homogeneização com triturador mecânico (Ika-Werke, GMB4 & Co. KG, Germany) e diluídos 1:10. Aliquotas de 100 ul dessa diluição foram semeadas em placas contendo Agar BHI (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England) suplementado com caldo filtrado de cultura da cepa 265 de *P. brasiliensis* e soro fetal bovino. Após 15 dias de cultivo a 37°C, UFC foram contadas e corrigidas por grama de órgão.

9. Obtenção de sobrenadantes de triturados de pulmões para dosagem de quimiocinas e citocinas

Após períodos pré-estabelecidos de infecção por *P. brasiliensis* os animais foram anestesiados intraperitonealmente com 2,2,2 tribromoetanol (250µg/g) e sacrificados por deslocamento cervical. Foi feita perfusão injetando-se 10 mL de PBS estéril no ventrículo esquerdo para retirada de células da circulação sanguínea pulmonar. Os pulmões foram colocados em vials criogênicos contendo 1mL de PBS estéril com inibidor de proteases (Phenylmethylsulfonil fluoride, Sigma, St Louis, MO, USA). Lisados dos pulmões esquerdos foram obtidos após homogeneização com triturador mecânico e centrifugados a 1000

rpm/4°C/10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados a -70°C , até o momento da dosagem de citocinas e quimiocinas por ELISA.

10. Processamento histopatológico dos órgãos

Animais foram sacrificados 7, 15, 30, 60, 120, 150 e 180 dias após a infecção. Fragmentos de baço, fígado e pulmões desses foram retirados e imediatamente colocados em solução de PBS pH 7,2/formol 10% e deixados por 24 horas. Em seguida os órgãos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (iniciando-se com álcool 80 %, até o absoluto), clarificados em xilol e incluídos em parafina. Cortes histológicos de $5\mu\text{m}$ de espessura foram obtidos, dispostos em lâminas e deixados por 12 horas/ 60°C para fixação e retirada de excesso de parafina. Antes dos procedimentos de coloração as lâminas foram lavadas em xilol para retirada de excesso de parafina e reidratadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (iniciando-se com álcool absoluto, até 80%). Os cortes foram corados por:

Hematoxilina e Eosina (Método de H&E), para tipificação de infiltrado inflamatório.

Prata-metenamina (Método de Grocott), para caracterização dos fungos nos granulomas

Ácido crômico (Método de Tricromo-Masson), para observação de fibras de colágeno.

Após coloração, as lâminas foram desidratadas novamente em concentrações crescentes de álcool etílico, lavadas com xilol, preparadas com meio de montagem (Bálsamo do Canadá) e cobertas com lamínulas.

11. Dosagem de NO no soro pelo método de Griess

A produção de NO foi indiretamente avaliada pela mensuração da produção de nitrato (NO_3^-) no soro dos animais, visto que o NO é muito instável e decompõe-se espontaneamente em

nitritos (NO_2^-) e nitratos. Após anestesia com 2,2,2 tribromoetanol ($250\mu\text{g/g}$) os animais tiveram o sangue retirado pela via retro-obital. O material recolhido foi centrifugado $1000 \times \text{g}/10$ minutos e o soro foi separado e congelado a -70°C até o momento da dosagem de NO. A concentração de NO no soro foi determinada após redução enzimática de nitrito para nitrato com a enzima nitrato redutase ($10\text{U}/500\mu\text{L}$) e βNADPH (5 mg/mL), diluídos em KH_2PO_4 $0,5\text{M}$ pH 7,5 como descrito previamente (Bocca et al, 1998). Foi preparado um coquetel contendo $500\mu\text{L}$ NADPH + $1000\mu\text{L}$ KH_2PO_4 + $950\mu\text{L}$ de H_2O + $50\mu\text{L}$ da solução de nitrato redutase. Em seguida, $40\mu\text{L}$ desse coquetel foram adicionados em poços de placa de 96 wells juntamente com $40\mu\text{L}$ de cada amostra ou diluição de curva padrão foram adicionados. A placa foi incubada por uma noite a 37°C e em seguida $80\mu\text{L}$ de solução de Griess foram adicionados em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 540nm . A concentração total (indireta) de NO foi então determinada usando-se o método de Griess, determinado por referência a uma curva padrão de NaNO_2 (1 a $200 \mu\text{M}$). Os resultados foram reportados como μM de NO_3^- .

12. Determinação de citocinas e quimiocinas pelo Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)

A partir dos sobrenadantes de triturados de pulmões de animais infectados e não infectados, obtidos conforme descrito no item 9, foram quantificadas as seguintes citocinas e quimiocinas com uso de reagentes e kits comerciais, em conformidade com as recomendações de cada fabricante:

INF- γ e IL-12: Anticorpos purificados e biotinizados da Pharmingen (San Diego, CA, USA).

IL-4 e TNF- α : Kit da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

IL-10: Kit BD Optéia - BD Biosciences, Pharmingen (San Diego, CA, USA).

MCP-1 e MIP-1 α : Kit Quantikine - R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Recombinantes:

IFN- γ : Pharmingen (San Diego, CA, USA).

IL-12: Pharmingen (San Diego, CA, USA).

Protocolo geral para ELISA:

a) SENSIBILIZAÇÃO

Placas de poliestireno de 96 poços foram recobertas com tampão de ligação contendo o anticorpo de captura (diluído conforme recomendações dos fabricantes). Os kits para dosagem de KC e MIP-1 α foram fornecidos com placas pré-sensibilizadas com anticorpo de captura. As placas foram incubadas "overnight" a 4°C e lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20.

b) BLOQUEIO

Os sítios não específicos foram bloqueados com 100 μ l/ poço de tampão de bloqueio específico a temperatura ambiente. Posteriormente foi feita lavagem das placas como descrito anteriormente.

c) AMOSTRAS

Os padrões de citocinas foram diluídos em tampão de bloqueio e os de quimiocinas diluídos em soluções fornecidas pelo fabricante dos kits. Diluições dos padrões (curva padrão) e das amostras foram adicionadas aos poços, seguindo-se incubação a temperatura ambiente.

d) DETECÇÃO

As placas foram lavadas novamente e então foram adicionados anticorpos de detecção biotinilados, diluídos segundo orientações dos fabricantes nos respectivos tampões de bloqueio ou diluentes fornecidos.

IL-4, IL-10, TNF- α e quimiocinas: os anticorpos biotinilados e peroxidase-estreptavidina foram diluídos nas soluções recomendadas pelos fabricantes. As placas foram incubadas em temperatura ambiente.

IFN- γ e IL-12: partes iguais de solução A e solução B (complexo avidina-biotina-peroxidase, ABC-Vector Lab. UK) foram diluídas em PBS e adicionadas aos poços. As placas foram incubadas à temperatura ambiente.

Após lavagem foram adicionados em cada poço solução contendo substrato e cromógeno da peroxidase, Tetra-methyl-benzidine (TMB, KPL, Gaithersburg, MA, USA). Foi esperado o desenvolvimento de cor por 15 minutos, quando a reação foi finalizada pela adição de H₂SO₄ 1N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA eMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), medindo-se a densidade óptica por poço, em 450 nm. A detecção e quantificação foram avaliadas segundo a curva padrão obtida.

13. Preparação das células pulmonares para citometria de fluxo

Animais sacrificados 7, 15 e 30 dias após infecção por *P. brasiliensis* tiveram seus pulmões retirados, retalhados em pequenas partes e digeridos enzimaticamente com liberase (Roche, Basel, Switzerland) em meio RPMI-1 por uma hora. Em seguida os órgãos foram triturados com auxílio de Medimachine (BD Biosciences, San Jose, CA) por 4 minutos. A suspensão foi então filtrada com auxílio de uma seringa de 10 mL acoplada a um filtro. Em seguida adicionou-se

2mL de tampão de lise a cada tubo, com incubação a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida 10mL de PBS foram adicionados e as suspensões foram centrifugadas e ressuspendidas em RPMI-C 5%. Alíquotas celulares foram marcadas com líquido de Turk e a contagem de leucócitos efetuada em câmara de Neubauer. Foram distribuídas $1,0 \times 10^5$ células por tubo de análise.

13.1. Marcação de moléculas de superfície celular

Leucócitos obtidos por digestão enzimática e trituração foram incubados por 20 minutos a 4°C na presença de 50 µl de "Fc block" (sobrenadante de cultura de células 2.4G2, contendo anticorpos para bloqueio de receptor para porção Fc). Em seguida, anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) foram adicionados, seguindo-se incubação por 40 minutos/ 4°C ao abrigo da luz. As células foram então lavadas com 1 mL de PBS pH 7,2 e ressuspendidas em formaldeído 1% em PBS pH7,2. A aquisição dos dados foi feita em FACSorter (BD Biosciences, San Jose, CA). Todos os anticorpos foram adquiridos da Pharmingen (San Diego, CA, USA). As análises foram realizadas utilizando-se o programa "Cell Quest" (Becton and Dickson, San Jose, CA, USA), que permite analisar todas as células adquiridas (10000/ amostra) ou determinadas populações, individualizadas por janelas ("Gates") estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

13.2. Detecção da exposição de fosfatidilserina e células apoptóticas

A detecção de apoptose foi realizada com utilização do Kit comercial Annexin V-FITC Apoptosis (Abcam, Cambridge, MA, USA). A Anexina V liga-se à fosfatidilserina expressa na

membrana de células apoptóticas. Leucócitos obtidos por digestão enzimática e trituração foram incubados por 10 minutos com solução de AnexinaV-FITC e mantidos ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas em solução tampão de alta disponibilidade de Ca^{++} fornecida pelo fabricante, centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos/4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspensionado com 200 μL da solução tampão. Imediatamente as amostras foram adquiridas em FACSorter (BD Biosciences, San Jose, CA). As análises foram realizadas utilizando-se o programa “Cell Quest” (Becton and Dickson, San Jose, CA, USA), que permite analisar todas as células adquiridas (10000/ amostra) ou determinadas populações, individualizadas por janelas (“Gates”) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

14. Microscopia Intravital

Para avaliação da interação do leucócito com o endotélio (rolamento e adesão) foi empregada a técnica de microscopia intravital (FORTES *et al.*, 1991). Duas horas após inoculação intraperitoneal de Tioglicolato de Sódio 3% os animais foram anestesiados por injeção i.p. de Hidrato de Cloral (400 $\mu\text{g/g}$ de peso) e através de incisão na parede abdominal, exteriorizou-se o mesentério para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37 °C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução de Ringer à 37 °C. A placa aquecida foi mantida sobre o “charriot” de um microscópio óptico tri-ocular ao qual estavam acoplados um foto-tubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, com aumento final de 3400 vezes, além de uma câmera e um monitor de vídeo, que permitiram a projeção e gravação das imagens. Através do editor de vídeo XP Codec Pack 1.3.0. selecionamos imagens

representativas dos leucócitos durante rolamento e adesão. Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando entre 10 e 16 μm . Duas horas após a administração do estímulo inflamatório, avaliou-se o rolamento de leucócitos aos vasos do mesentério, sendo analisados três vasos por animal, durante 5 minutos cada vaso, estimando-se o resultado como média de todos. Os resultados do rolamento foram expressos como número de leucócitos que rolaram por 5 minutos por vaso. Além disso, avaliou-se também o número de leucócitos aderidos ao endotélio ao longo de uma extensão de 100 μm^2 de vênula. Esta foi definida na tela do monitor: 10 μm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela. Uma dada seção do leito vascular foi testada somente uma vez para a determinação do número de leucócitos aderidos ao endotélio. Três determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média de todos. O número de células aderidas foi avaliado utilizando-se imagens gravadas em vídeo.

15. Ensaio de determinação da atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão

A intensidade do acúmulo de neutrófilos no pulmão dos animais infectados por *P. brasiliensis* foi aferida pelo ensaio da mieloperoxidase. Após perfusão com salina, o pulmão direito de cada animal foi colocado em tampão (NaCl 0,1M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M) gelado e em pH 4,7 e homogeneizados em Pollytron. O material homogeneizado foi em seguida centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado então um choque hipotônico no “*pellet*” de células com 600 μl de NaCl 0,2%, seguido por 600 μl de uma solução de NaCl 1,6% e glicose 5%. Depois de nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4 °C, o “*pellet*” foi ressuspenso em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de

brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir esse homogeneizado foi novamente centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 3µL do sobrenadante das amostras de pulmões foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram adicionadas 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine – 1,6 mM final na placa) e a placa foi incubada por 5 min à 37°C. Logo após, 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM final na placa) foram adicionados nos poços e a placa foi incubada por mais 5 min à 37 °C. A seguir a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (obtidos da cavidade peritoneal 6h após camundongos serem injetados com carragenina e diluídos seriadamente em NaPO₄ 0,08 M (1 x 10⁵ neutrófilos/ poço/ 50 µL). Foi determinada a absorvância em leitor de ELISA (Spectra Max 250; Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm.

16. Reação de hipersensibilidade tardia (DTH, Delayed-type hypersensitivity). As reações de DTH foram avaliadas pelo teste de edema na pata. Vinte e quatro horas antes do sacrifício dos animais, os camundongos infectados por *P. brasiliensis* foram desafiados pela injeção de 25µl de antígeno de exoantígeno (EXO) derivados de Pb18 (2 µg/ ml⁻¹) na pata traseira. Na outra pata foram injetados 25µL de PBS. Vinte e quatro horas após o desafio o edema na pata foi aferido com paquímetro (Mitutoyo Corporation, Tokyo, Japan). A formação de edema foi reportada em milímetros. Animais não infectados submetidos ao mesmo protocolo foram usados como controles.

17. Dosagem de Anticorpos

Anticorpos específicos para os antígenos produzidos por *P. brasiliensis* foram medidos no soro de animais infectados por Pb 18 pelo método de ELISA. Placas de poliestireno foram recobertas com 5µg/mL de exoantígeno de Pb 18, diluído em tampão carbonato de sódio pH 9,5. As placas foram incubadas "overnight" a 4°C e em seguida lavadas com uso de lavador automático (Immunowash 1575, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) por 3 vezes com PBS pH 7,2 contendo 0,05% de TWEEN 20. A etapa seguinte foi a de bloqueio, onde 100 µL de tampão PBS pH 7,2 com 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil) foram adicionados em cada poço. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, a etapa de lavagem foi repetida. Em seguida as amostras foram adicionadas em duplicata, em diluições de 1:100 até 1:800 em tampão de bloqueio. As placas foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente e em seguida lavadas. Para dosagem de IgG total utilizamos anticorpo de cabra conjugado com peroxidase (Zymed-Invitrogen, CA, USA) Para dosagem de IgG2a e IgG1 utilizamos anticorpos de coelho e em seguida anticorpos de cabra anti-coelho marcado com peroxidase (Zymed-Invitrogen, CA, USA). Após lavagem foram adicionados em cada poço solução contendo substrato e cromógeno da peroxidase, TMB (KPL, Gaithersburg, MA, USA). Esperou-se o desenvolvimento de cor por no máximo 15 minutos, quando a reação foi finalizada pela adição de H₂SO₄ 1N. A leitura foi feita em leitor de ELISA eMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), medindo-se a densidade óptica por poço, a 450 nm. A densidade óptica de cada diluição do soro foi comparada e subtraída da leitura do branco e a leitura expressa em DO.

18. Imunização Passiva

Pouco antes da eutanásia para retirada de órgãos o sangue dos animais C57BL/6 foi retirado. Foram feitos três "pools": com soro de animais BKO infectados; com soro não imune, retirado de animais WT não infectados; outro com soro imune, retirado de animais WT infectados por Pb18 após diversos períodos de infecção (15, 30 e 60 dias). Os soros foram congelados a -20°C até o momento do tratamento. Um dia antes da infecção (dia -1) por 10^6 leveduras de Pb18 os animais BKO receberam injeção intraperitoneal de 500 μL de soro de BKO, soro imune ou não imune. O tratamento com soro foi repetido nos dias 4 e 12 após infecção e grupos foram sacrificados 15 ou 30 dias após infecção. Um outro grupo de animais recebeu soro nos dias -1, 5, 15 e 25 de infecção e foram sacrificados no 30 $^{\circ}$ dia.

29. Análise Estatística

A análise de variância (ANOVA) e o método de Tukey foram utilizados para determinar as diferenças existentes entre o grupo experimental de camundongos normais (BALB/c e C57BL/6) e aqueles deficientes de IL-18, Fas ou animais deficientes linfócitos B. O mesmo método foi utilizado para determinar diferenças existentes dentro de cada grupo experimental entre animais infectados e não infectados. Para realização desta análise utilizamos o programa estatístico GraphPad Prism versão 3.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

3. RESULTADOS

A) DETERMINAÇÃO DO PAPEL DA IL-18 NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE SISTÊMICA MURINA

1. Susceptibilidade de camundongos WT e IL-18 KO ao *P. brasiliensis*

É notório que citocinas do tipo Th1 são essenciais para proteção contra *P. brasiliensis*. Existem dados consistentes evidenciando a participação de INF- γ , TNF- α e IL-12 em animais infectados intravenosamente pelo fungo. Nossa primeira medida foi investigar a relevância da IL-18 na proteção de animais da linhagem intermediariamente resistente BALB/c contra PCM. Infectamos animais deficientes de IL-18 (IL-18KO) e normais (WT) intravenosamente com 10^7 formas leveduriformes de *P. brasiliensis* 18 (Pb18), uma cepa altamente virulenta. Verificamos que após 120 dias infecção cerca de 80% dos animais IL-18KO haviam morrido, contra um percentual de 70% de mortalidade do grupo WT (Figura 1).

2. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Nosso próximo passo foi determinar o grau de parasitismo nos órgãos de animais infectados pelo Pb18 (pulmões, fígado e baço). Os animais foram infectados com 10^6 formas leveduriformes do fungo e sacrificados 7, 15, 30, 60 e 120 dias após infecção. Verificamos que nas duas primeiras semanas após infecção a carga fúngica foi semelhante entre animais KO e WT em todos os órgãos analisados. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) aos 30 dias de infecção, onde encontramos maior carga fúngica nos pulmões de animais WT. Não houve

diferença na contagem de UFC nesse período tanto no baço como no fígado. Aos 60 pós-infecção não houve diferença marcante na contagem de UFC em nenhum dos órgãos. Aos 120 dias de infecção não foi observado parasitismo no baço e fígado, somente nos pulmões, mas a diferença não foi significativa entre os grupos (Figura 2).

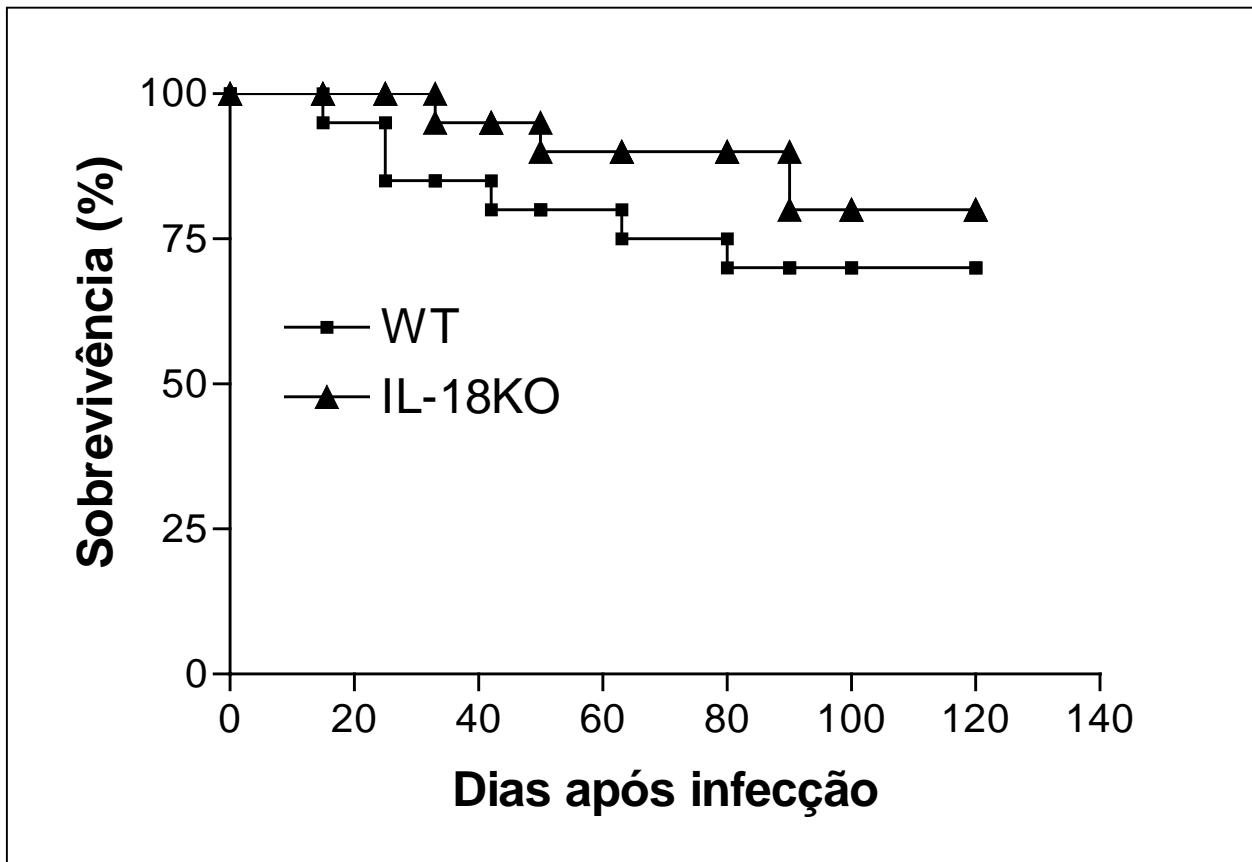


Figura 1. Sobrevivência de camundongos selvagens (WT) e geneticamente deficientes de IL-18 (IL-18KO) após infecção com *P. brasiliensis*. Camundongos C57BL/6 e IL-18KO foram infectados intravenosamente com 1×10^7 formas leveduriformes de Pb18. O tempo de vida dos animais foi avaliado por 100 dias. Vinte animais foram utilizados em cada grupo, sendo os dados representativos de dois experimentos independentes.

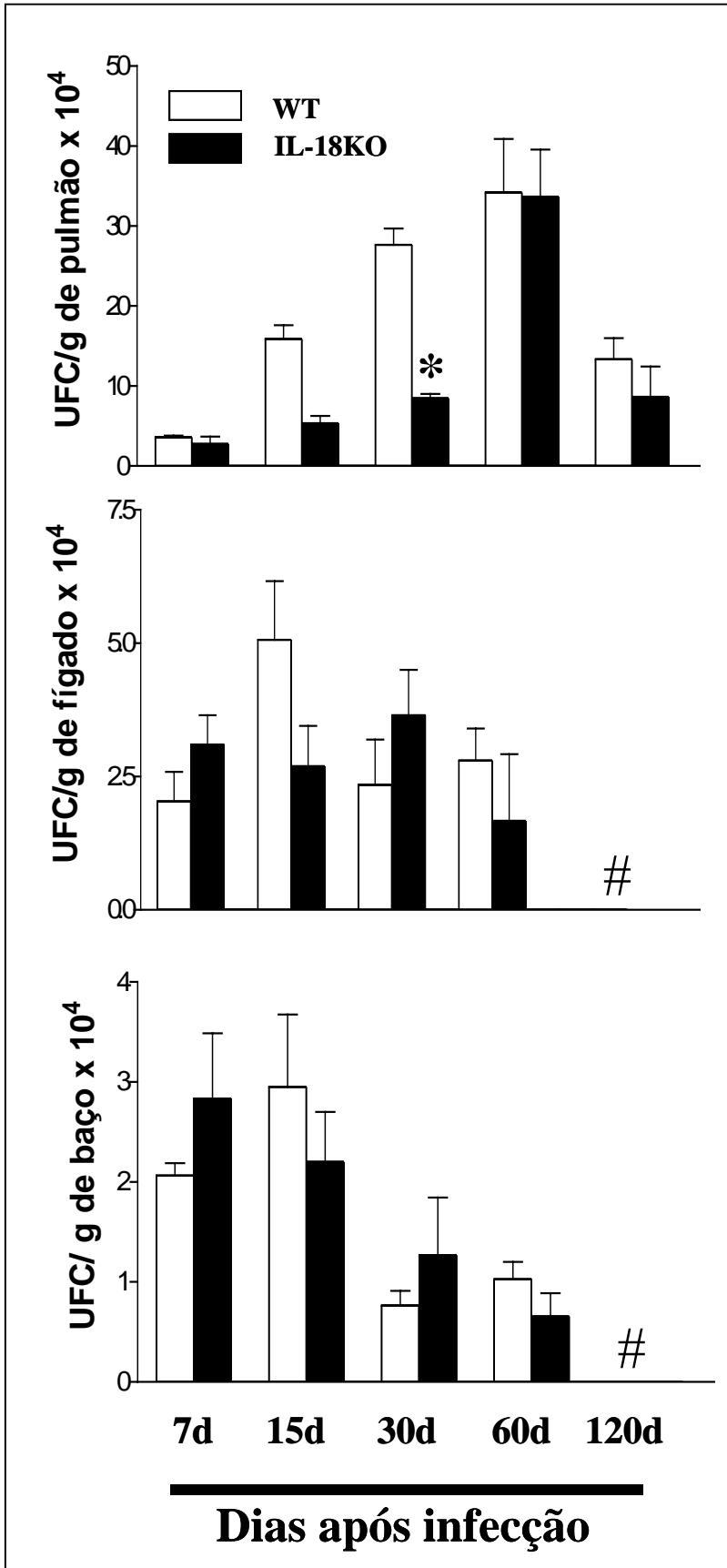


Figura 2.
Quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) nos órgãos de animais WT e IL-18KO infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos C57BL/6 e IL-18KO foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30, 60 e 120 dias de infecção os animais foram sacrificados e tiveram seus órgãos retirados, pesados, homogeneizados e plaqueados em Agar BHI. Após 14 dias foram determinados os valores de UFC no baço, fígado e pulmão. Cada ponto corresponde a 3 animais, sendo os dados representativos de 3 experimentos independentes. As barras representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$ WT vs IL-18KO. # ausência de fungos viáveis.

3. Análise Histopatológica de secções pulmonares de animais WT ou IL-18KO infectados por *P. brasiliensis*

3.1 Observação do infiltrado inflamatório- Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E)

Animais IL-18KO e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30, 60 e 120 dias os animais foram sacrificados e seus órgãos (pulmão, fígado e baço) retirados, fixados e processados em álcool/xilol, incluídos em parafina e corados por H&E (Figura 3). Notamos aos 7 dias pós-infecção um infiltrado inflamatório focal difuso, composto por neutrófilos e células mononucleares, com elementos fúngicos dispersos, quadro esperado nesse período de infecção. Aos 14 dias já havia algum grau de organização, com formação de granulomas epitelióides, com presença de histiócitos, células epitelióides, linfócitos e neutrófilos, com leveduras localizadas centralmente, em ambos grupos de animais. Aos 30 dias de infecção houve formação de granulomas bem definidos, composto por histiócitos, células epitelióides, células gigantes agregadas ao redor das leveduras, menor número de neutrófilos e um cinturão externo composto por células mononucleares e fibroblastos. Aos 60 dias após infecção notamos granulomas bem consolidados e muitas células epitelióides ao redor dos fungos (Figura 3 e Figura 4). Aos 120 dias há pequena quantidade de granulomas, com confluência dos granulomas restantes.

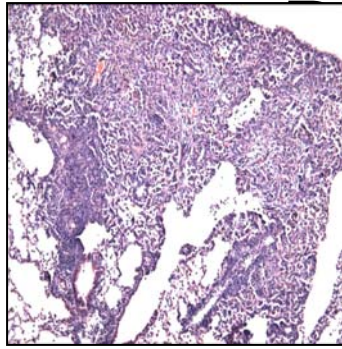
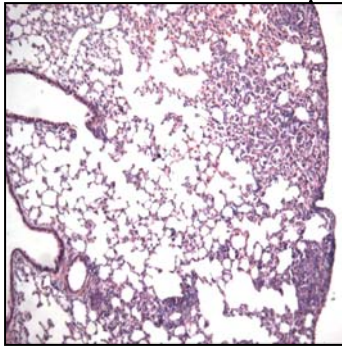
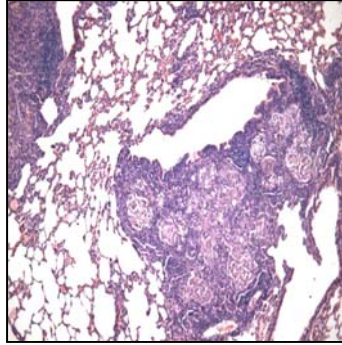
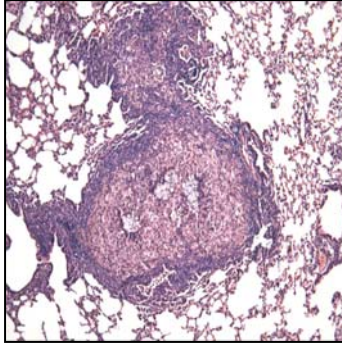
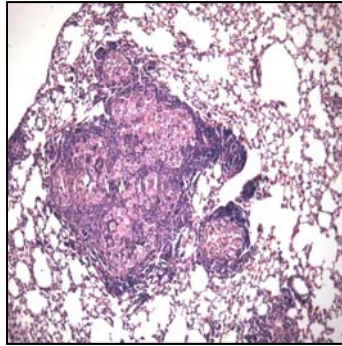
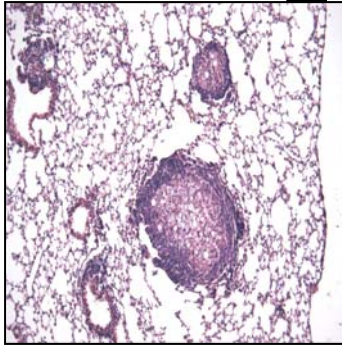
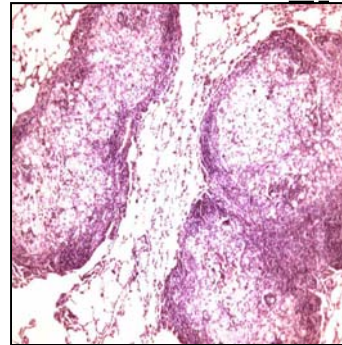
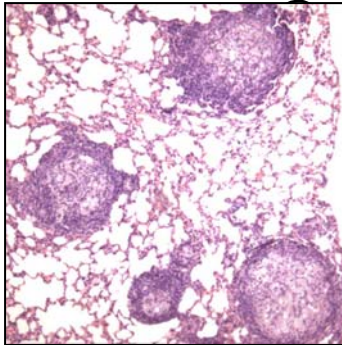
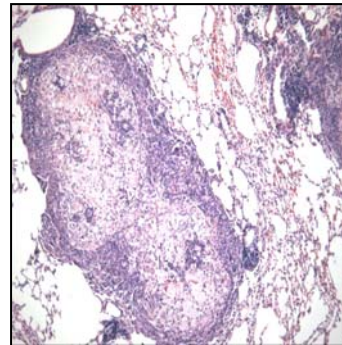
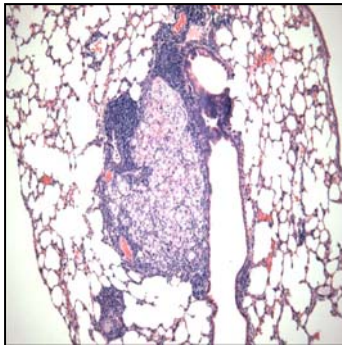
WT**IL-18KO****7d****15d****30d****60d****120d**

Figura 3. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos WT e IL-18KO. Fotomicrografias foram tiradas 7, 15, 30, 60 e 120 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, C, E, G, I: Animais WT; B, D, F, H e J: Animais IL-18KO. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento de 1000x.

3.2 Observação da carga parasitária- Coloração de Grocott

Animais IL-18KO e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30 e 60 dias de infecção os animais foram sacrificados e seus pulmões foram retirados, fixados e processados em álcool/xilol e incluídos em parafina. A análise histopatológica foi realizada após coloração de Grocott (Figura 5), A análise histopatológica foi realizada após coloração de Grocott (Figura 18), que cora os fungos em negro. A marcação dos fungos observada corrobora os dados observados pela contagem de UFC. Aos 15 dias de infecção observamos carga fúngica semelhante entre animais IL-18KO e WT. Nos cortes histológicos de 30 e 60 dias após infecção observamos marcação maior dos fungos em animais WT, comparativamente aos animais IL-18KO.

4. Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH)

A DTH foi realizada através da injeção de 2 μ g de exoantígeno (EXO) nas patas traseiras de animais infectados e não infectados por Pb18 (Figura 6). Vinte e quatro horas após a injeção de EXO a variação de edema nas patas foi medida nos animais 15, 30 e 60 dias após infecção com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Não houve diferença estatística na variação de edema entre os animais KO e WT no mesmo período de infecção.

5. Dosagem de Óxido Nítrico (NO) no soro de camundongos WT e IL-18KO infectados por *P. brasiliensis*

A produção de NO foi avaliada nos soro de animais infectados com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Os períodos analisados foram 15, 30 e 60 dias após infecção. Os resultados apresentados mostraram que não houve diferença significativa na produção de NO

entre os animais KO e WT no mesmo período de infecção (Figura7). Os resultados foram expressos como μM de nitrato (NO_3^-).

6. Quantificação de citocinas em lisado pulmonar de camundongos WT e IL-18KO infectados por *P. brasiliensis*

6.1 Dosagem de IFN- γ

Animais IL-18KO e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30 e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. A infecção dos animais resultou na elevação de 3 vezes nos níveis de IFN- γ aos 7 dias após infecção em animais KO e WT (Figura 8A), relativamente aos animais não infectados. Houve queda na produção de INF- γ aos 60 dias de infecção em ambos grupos de animais. Contudo, não houve diferença significativa entre animais infectados KO e WT avaliados no mesmo período de infecção.

6.2 Dosagem de IL-12

Animais IL-18KO e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30 e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. A infecção dos animais resultou em elevação nos níveis de IL-12 aos 15 dias após infecção em animais KO e WT (Figura 8B), relativamente aos animais não infectados. Contudo, não houve diferença significativa entre animais infectados KO e WT avaliados no mesmo período de infecção.

WT

IL-18

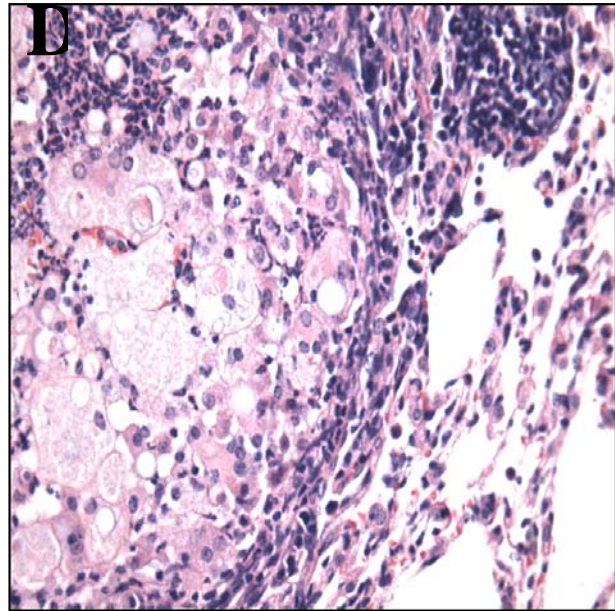
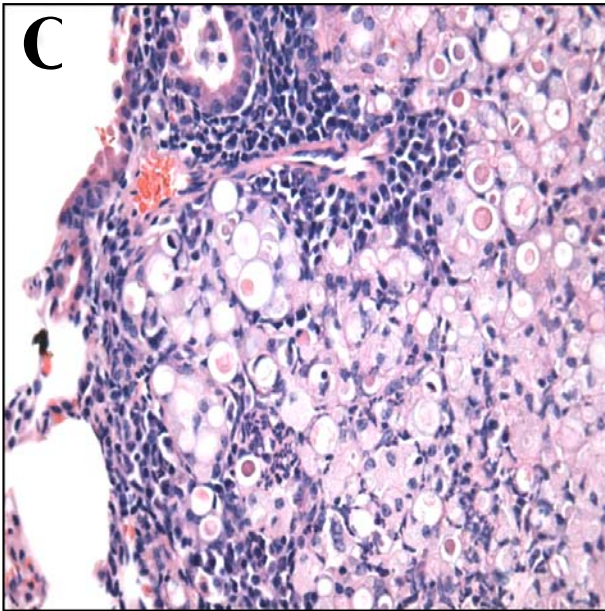
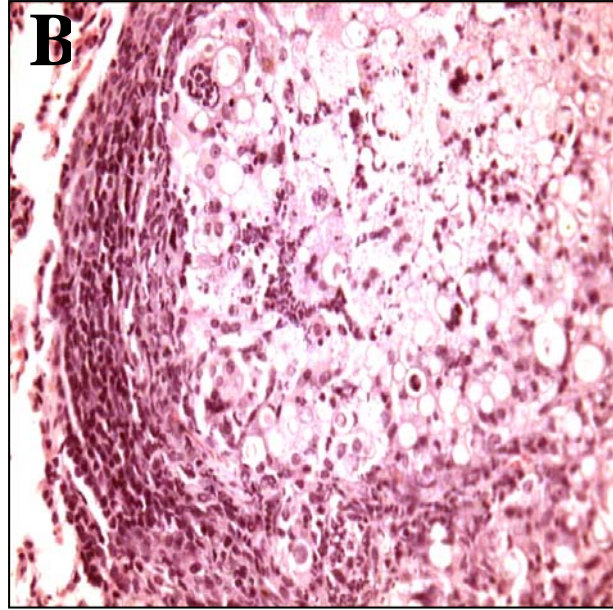
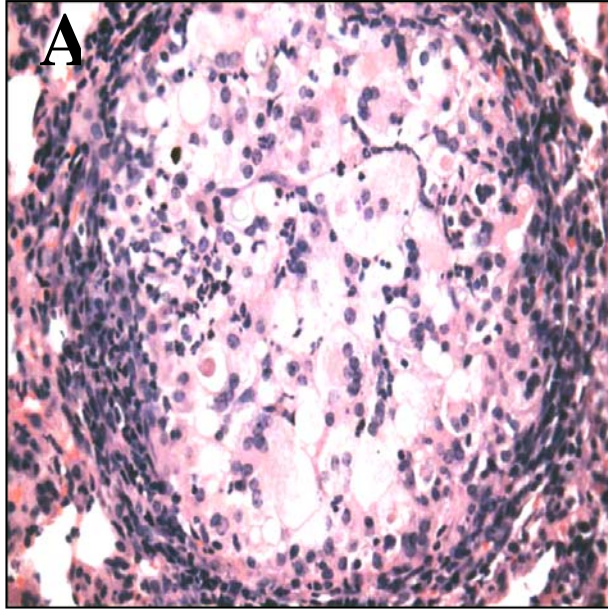


Figura 4. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos WT e IL-18KO. Fotomicrografias foram tiradas 60 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A e C: Animais WT; B e D: Animais IL-18KO. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento de 4000x.

WT

IL-18KO

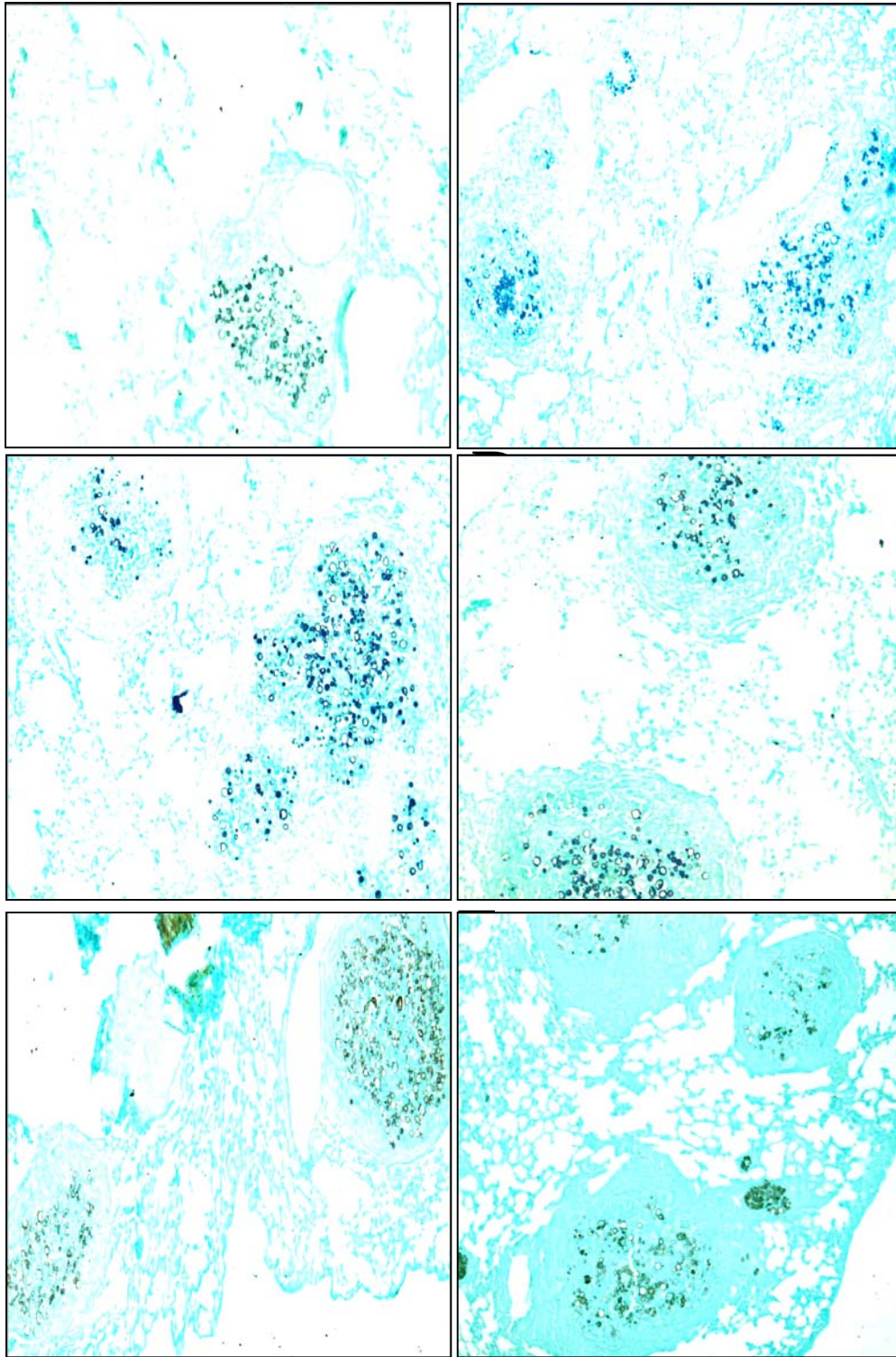


Figura 5 . Análise histológica de secções pulmonares de camundongos WT e IL-18KO. Fotomicrografias foram tiradas 15, 30 e 60 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, C e E: Animais WT; B, D e F: Animais IL-18KO. Coloração de Grocott, aumento de 1000x.

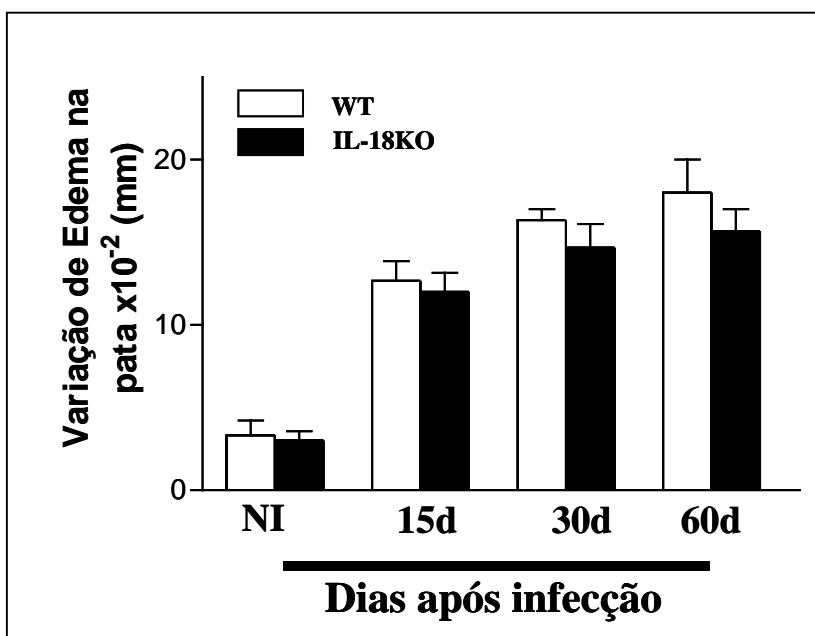


Figura 6. Reação de hipersensibilidade tardia (DTH).

Camundongos C57BL/6 e IL-18KO foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Nos dias 15, 30 e 60 após infecção foram desafiados pela injeção de 25 μ l de exoantígeno (EXO) derivados de Pb18 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) na pata traseira, enquanto na outra pata foram injetados 25 μ L de PBS. Vinte e quatro horas após o desafio o aumento de edema na pata foi aferido com paquímetro. Animais não infectados (NI) submetidos ao mesmo protocolo foram usados como controles. Cada ponto corresponde a 3 animais. O resultado apresentado é representativo de dois experimentos independentes.

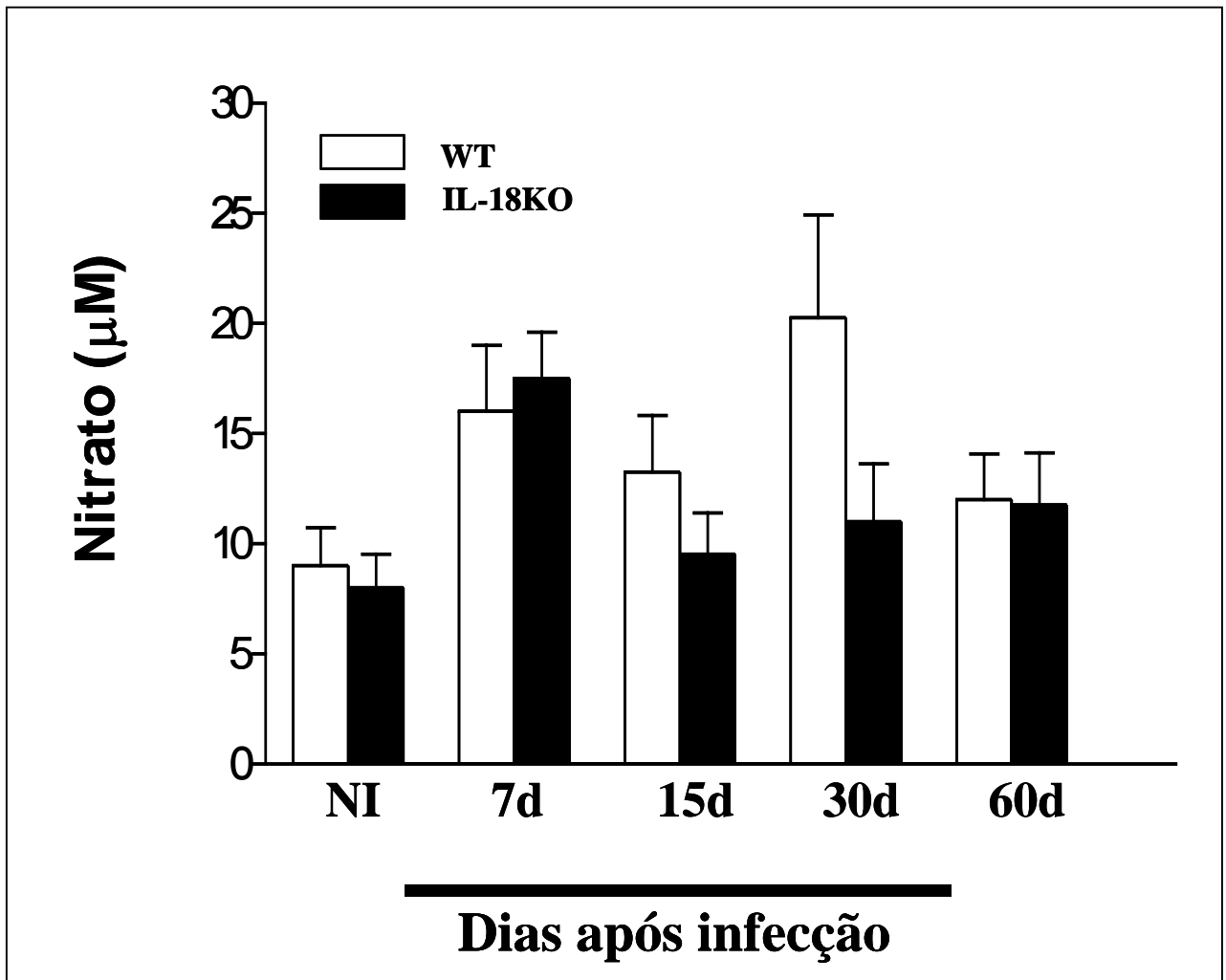


Figura 7. Dosagem de Óxido Nítrico no soro. Camundongos WT e IL-18KO foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção o sangue foi colhido e o soro separado. A produção de NO foi indiretamente avaliada pela mensuração da produção de nitrato (NO_3^-), realizada pelo método de Griess. Soros de animais não infectados (NI) foram utilizados como controle. Cada ponto representa a média \pm SD de órgãos de 3 camundongos. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

6.3 Dosagem de TNF- α

Animais IL-18KO e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30 e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. Houve diferença significativa ($p < 0,005$) nos níveis dessa citocina apenas no período de 60 dias após infecção, quando os níveis de TNF- α foram aproximadamente duas vezes maior em animais WT, comparativamente aos KO (Figura 8C). Importante lembrar que nesse período de infecção ocorreu uma diminuição de UFC nos pulmões de animais WT, comparativamente aos 30 dias de infecção.

6.4 Dosagem de IL-4

Animais IL-18KO e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30 e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. Os níveis de IL-4 foram semelhantes entre os animais KO e WT em todos os períodos de infecção analisados (Figura 9A).

6.5 Dosagem de IL-10

Animais IL-18KO e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30 e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. Aos 30 dias de infecção ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) de IL-10 nos pulmões de animais WT, com níveis cerca de cinco vezes maior que aquele encontrado em animais KO (Figura 9B). Nesse período de infecção a contagem de UFC é maior em animais WT. Aos 60 dias de infecção ocorre aumento de IL-10 em animais KO, alcançando níveis semelhantes àqueles de encontrados em WT. Aos 60 dias de infecção houve uma diminuição nos níveis da citocina em ambos os grupos.

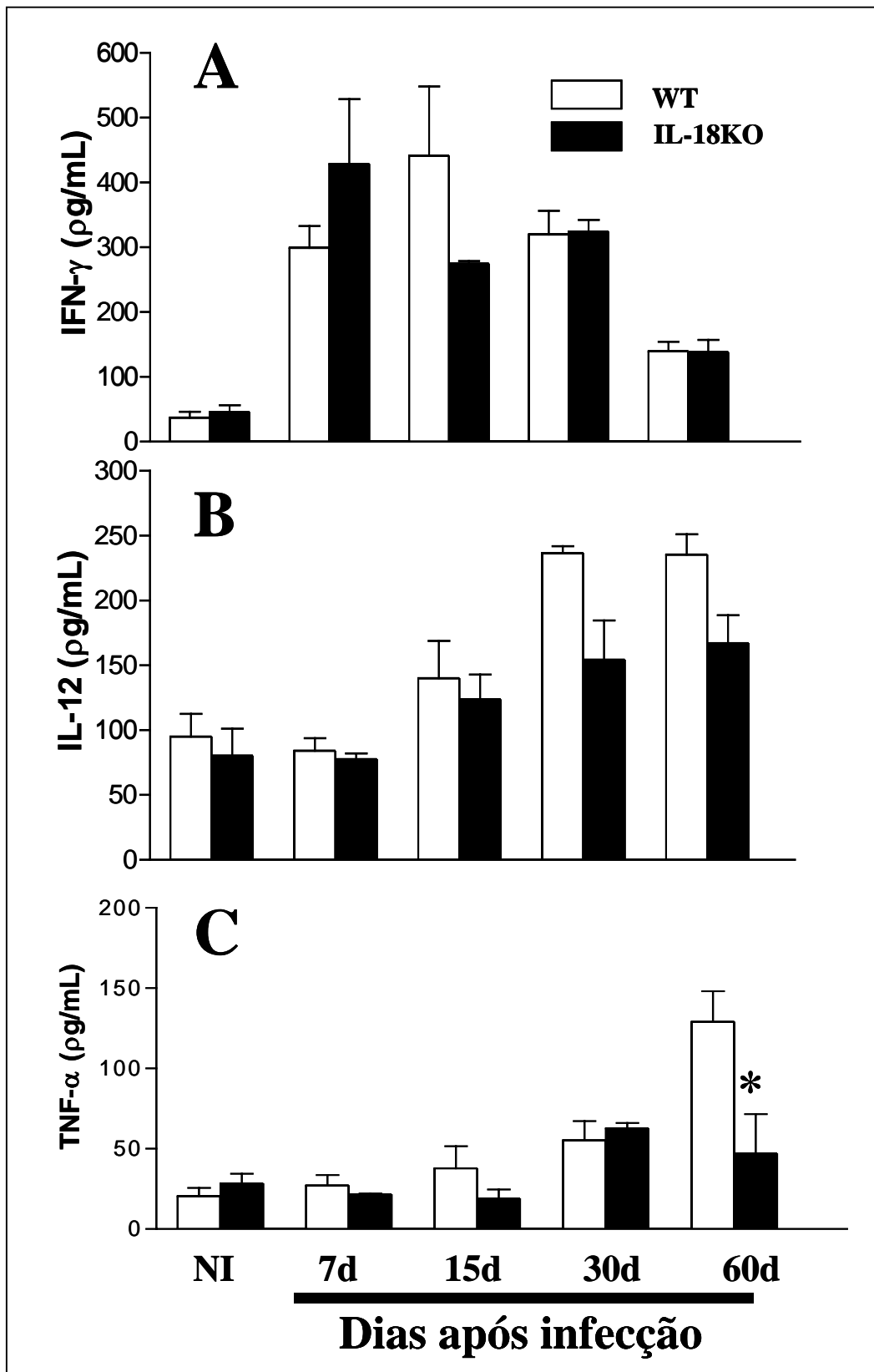


Figura 8. Detecção de citocinas Th1 nos pulmões de camundongos WT e IL-18KO infectados com *P. brasiliensis*. Os animais foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e homogeneizados. O sobrenadante foi colhido e a dosagem de IFN- γ (A), IL-12 (B) e TNF- α (C) realizada por ELISA. Pulmões de animais não infectados (NI) foram utilizados como controle. Cada ponto

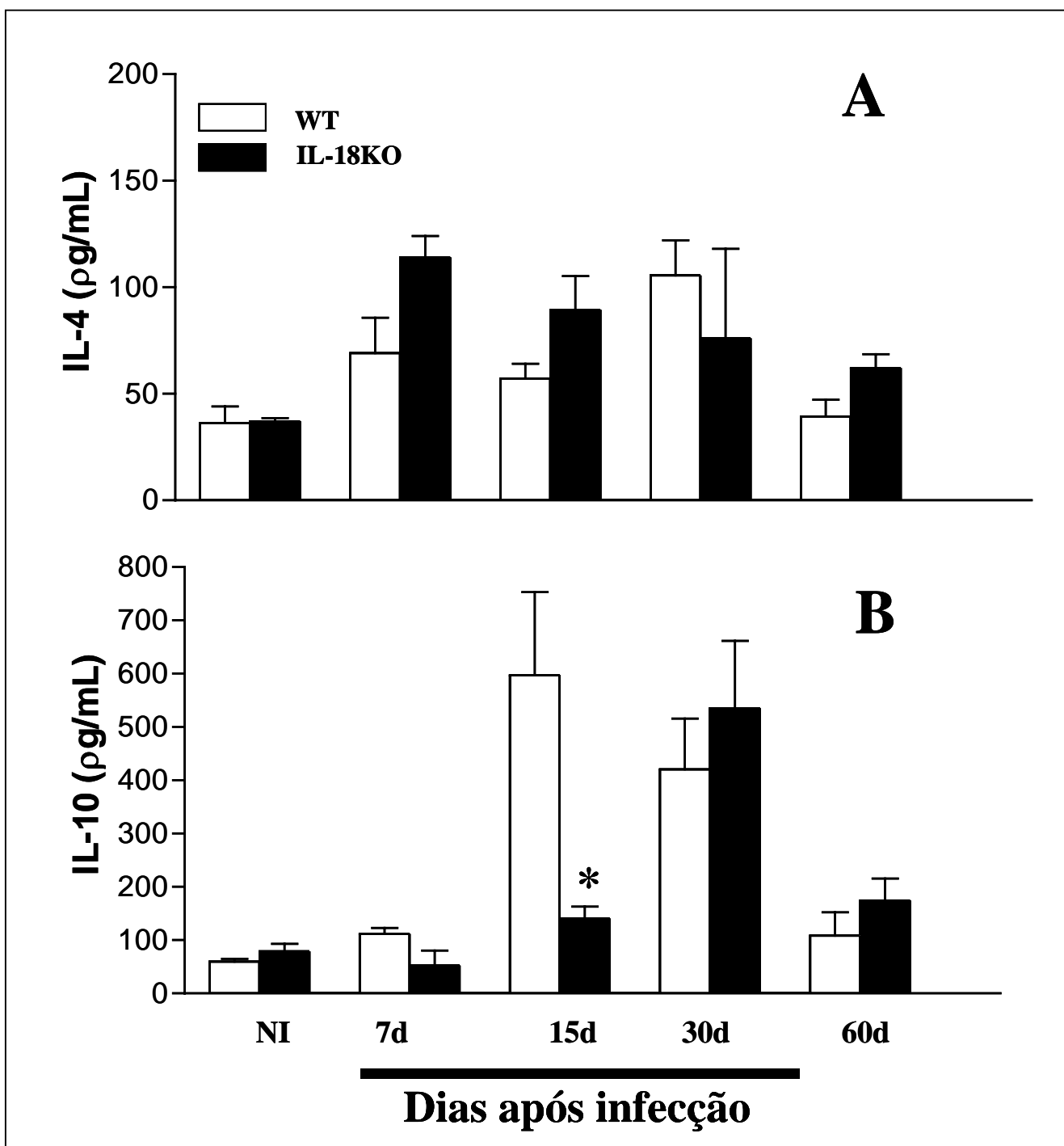


Figura 9. Detecção de citocinas Th2 nos pulmões de camundongos WT e IL-18KO infectados com *P. brasiliensis*. Os animais foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e homogeneizados. O sobrenadante foi colhido e a dosagem de IL-4 (A) e IL-10 (B) realizada por ELISA. Pulmões de animais não infectados (NI) foram utilizados como controle. Cada ponto representa a média \pm SD de órgãos de 3 camundongos. Resultados representativos de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$, WT vs KO no mesmo período de infecção.

7. Análise da Expressão de Fas/FasL em leucócitos pulmonares de camundongos WT e IL-18KO

A indução da expressão de Fas e FasL em monócitos de pacientes por *P. brasiliensis* foi demonstrada. Citocinas Th1 induzem aumento da expressão de Fas e FasL em linfócitos ativadas, promovendo aumento de apoptose. Procuramos verificar experimentalmente em nosso modelo de PCM se ausência de IL-18 influiria de alguma maneira na expressão de Fas/FasL. Infectamos animais WT e IL-18KO com 10^6 leveduras de Pb 18 e coletamos todos os lobos pulmonares após 7, 15 e 30 dias de infecção. Coletamos também pulmões de animais não infectados. Em camundongos WT e IL-18KO houve aumento significativo da expressão de Fas em células $CD4^+$ e $CD8^+$ aos 15 dias de infecção (Figura 10), comparativamente aos camundongos não infectados ($p < 0,05$). Houve aumento significativo da expressão de FasL em células $CD4^+$ de animais WT e IL-18KO aos 7 e 15 dias de infecção, comparativamente aos animais não infectados ($p < 0,05$). Em células $CD8^+$ de animais WT e IL-18KO houve elevação significativa da expressão de FasL aos 15 dias de infecção, comparativamente aos animais não infectados ($p < 0,05$). Quando comparamos animais WT e IL-18 KO, infectados ou não, não encontramos diferenças significativas na expressão de Fas e FasL nas células analisadas.

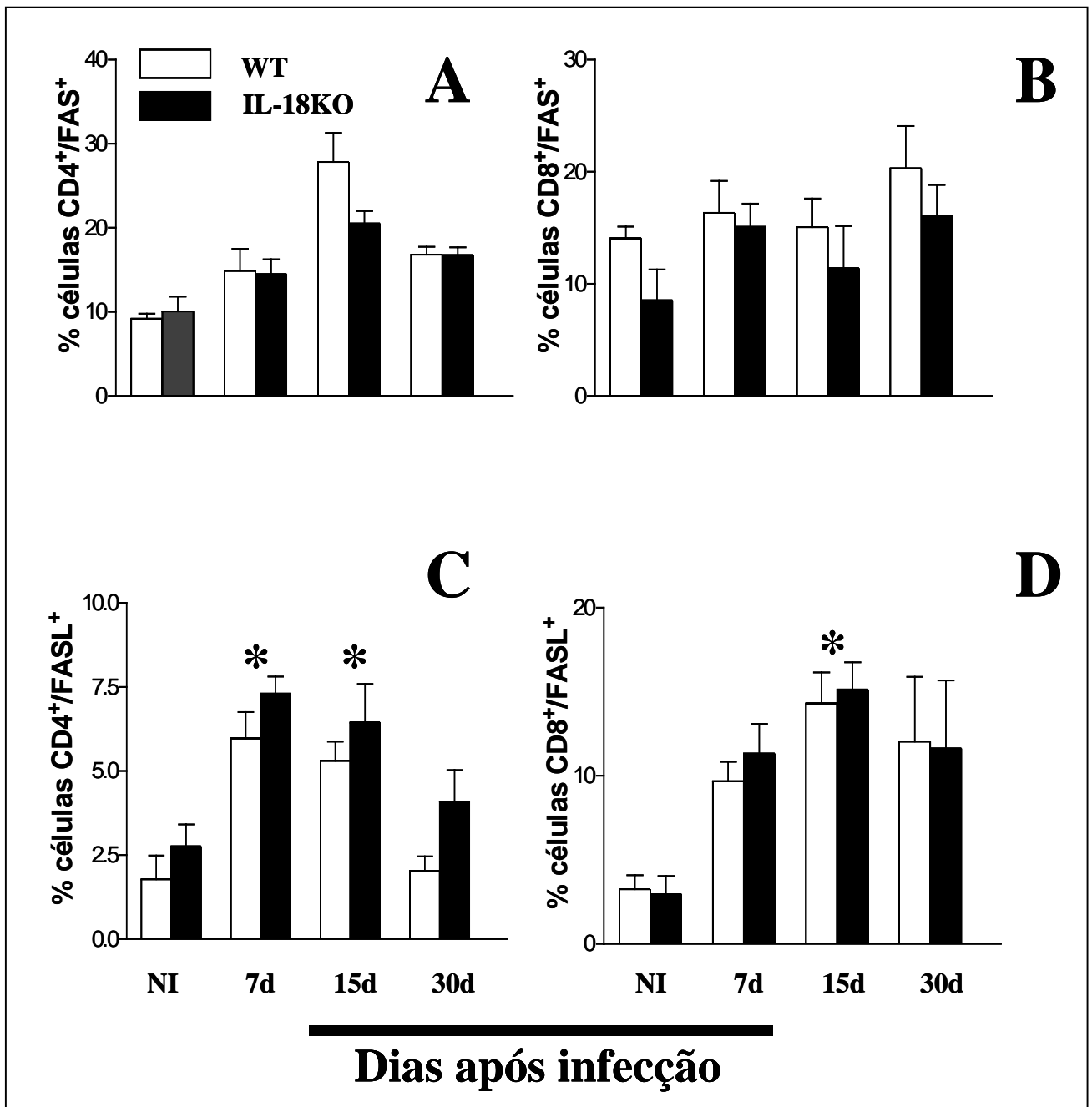


Figura 10. Expressão de moléculas de superfície. Camundongos BALB/c e IL-18KO foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15 e 30 dias de infecção os pulmões foram retirados, tratados com liberase e triturados em Medimachine®. Células pulmonares foram marcadas com anticorpos específicos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). As células foram selecionadas quanto ao tamanho e granulosidade e analisadas por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média \pm SD de amostras em triplicatas e são representativos de dois experimentos independentes. NI: não infectados. * $p < 0,05$, NI vs infectados.

B) DETERMINAÇÃO DO PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO FAS/FASL NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE SISTÊMICA MURINA

1. Susceptibilidade de camundongos WT e lpr ao *P. brasiliensis*

Muitos estudos têm demonstrado que *P. brasiliensis* induz a expressão de Fas e FasL em leucócitos humanos. A via de sinalização Fas/FasL é conhecida por induzir vias de ativação que levam à apoptose. Contudo, diversos autores têm reportado que essa via de sinalização pode desencadear eventos inflamatórios. Pensamos que em um modelo experimental de PCM onde a via Fas/FasL normal fosse interrompida poderíamos obter resultados importantes sobre o papel dessa via na resistência contra *P. brasiliensis*. Para nossa investigação utilizamos animais lpr (que expressam Fas truncado) e WT de linhagem C57BL/6. Nossa primeira medida foi investigar a sobrevivência de animais lpr infectados intravenosamente com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Verificamos que após 120 dias infecção todos os animais sobreviveram (Figura 11).

2. Verificação histopatológica de infiltrado inflamatório em animais lpr

Animais lpr são notadamente propensos a desenvolver doença autoimune espontânea. Dados da literatura mostram, porém, que animais lpr de linhagem C57BL/6, como os utilizados em nosso trabalho, desenvolvem sinais mínimos de autoimunidade e linfoproliferação, comparativamente a outras linhagens. Receávamos porém que mesmo uma doença linfoproliferativa branda ocasionada por infecção com Pb18 poderia interferir no curso natural da PCM e confundir nossas análises. Retiramos mensalmente fígado e pulmões (órgão normalmente mais afetados por doença linfoproliferativa) de animais lpr e WT (n=2) não

infectados por um período de seis meses, quando ocorrem manifestações de doença linfoproliferativa em animais lpr de linhagens diferentes de C57BL/6. Fizemos fotomicrografias de secções de órgãos de camundongos com 180 dias de vida (Figura 12) e verificamos que não houve infiltração de leucócitos no fígado e pulmão dos animais estudados no período analisado. Um outro grupo de animais lpr e WT foram sacrificados seis meses após infecção por Pb18. Verificamos que em ambos animais a infecção havia desaparecido e o tecido pulmonar encontrava-se remodelado, sem áreas de fibrose e sem infiltração leucocitária (dados não mostrados).

3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Nosso próximo passo foi determinar o grau de parasitismo nos órgãos de animais infectados pelo Pb18 (pulmões, fígado e baço). Os animais foram infectados com 10^6 formas leveduriformes do fungo e sacrificados 7, 15, 30, 60 e 120 dias após infecção (Figura 13). Verificamos que a contagem de UFC no baço foi semelhante nas duas primeiras semanas após infecção. Porém, após 30 dias de infecção encontramos maior carga fúngica em lpr ($p < 0,05$). Após 60 dias o parasitismo foi similar, e aos 120 dias após infecção não encontramos fungos no baço. No fígado, aos 15 dias de infecção, encontramos maior quantidade de fungos em animais lpr ($p < 0,05$). Nos dias 30 e 60 a quantidade de fungos foi similar em ambos animais. Aos 120 dias de infecção não encontramos fungos viáveis no fígado em nenhum grupo. O parasitismo foi maior também nos pulmões de animais lpr. Aos 30 e 60 dias após infecção encontramos grande contagem de fungos nos pulmões de animais lpr ($p < 0,05$). Aos 120 dias de infecção não houve presença de fungos viáveis nos pulmões de animais WT, ao passo que animais lpr ainda apresentavam pequena carga fúngica.

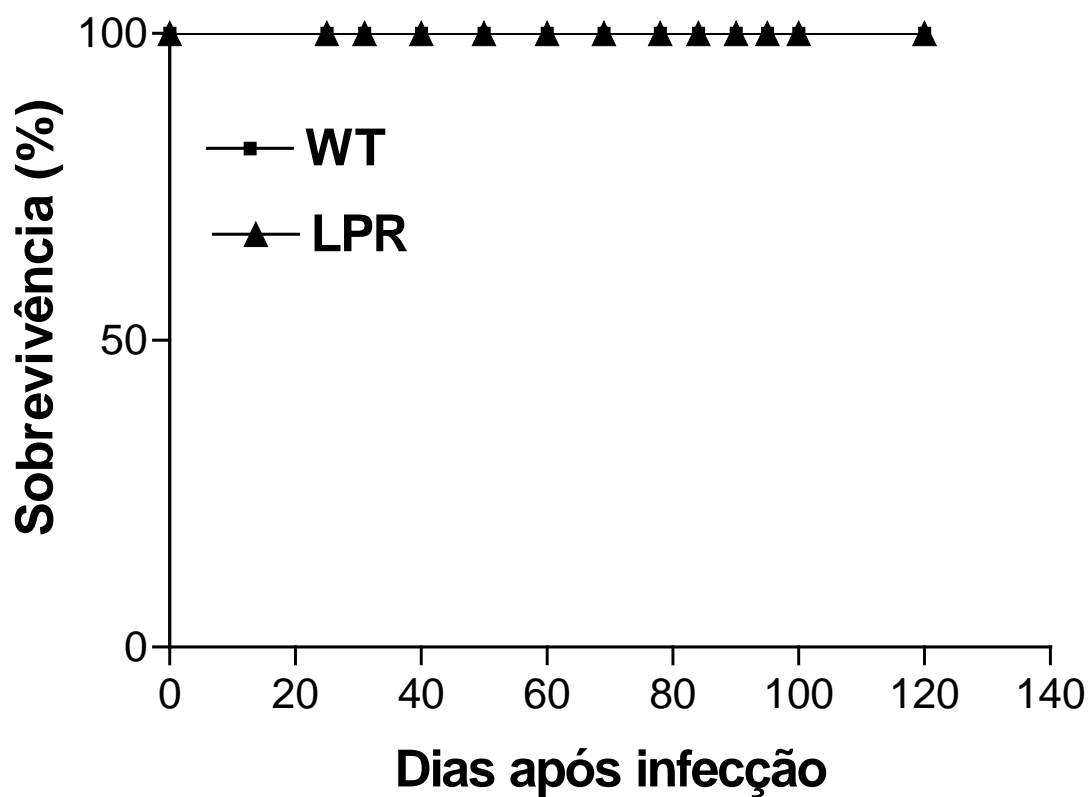


Figura 11: Sobrevivência de camundongos normais (WT) e portadores de Fas truncado (lpr) após infecção com *P. brasiliensis*. Camundongos C57BL/6 e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^7 formas leveduriformes de Pb18. O tempo de vida dos animais foi avaliado por 120 dias. 15 animais foram utilizados em cada grupo, sendo os dados representativos de dois experimentos independentes.

WT

lpr

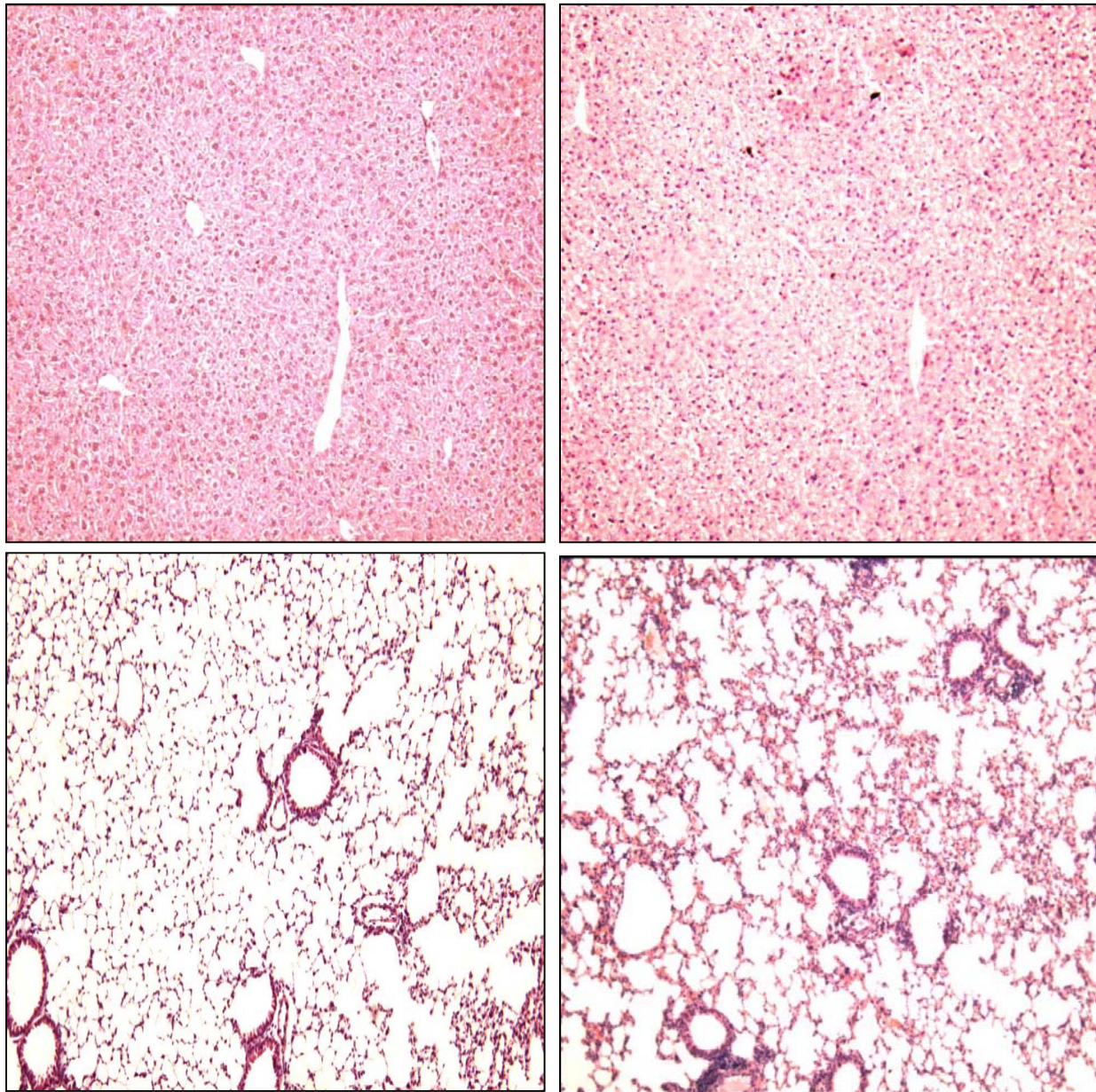


Figura 12. Análise histológica de secções pulmonares e hepáticas de camundongos WT e lpr. Fotomicrografias foram tiradas aos 180 dias de vida. A e C: Animais WT; B e D: Animais lpr. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento de 1000x.

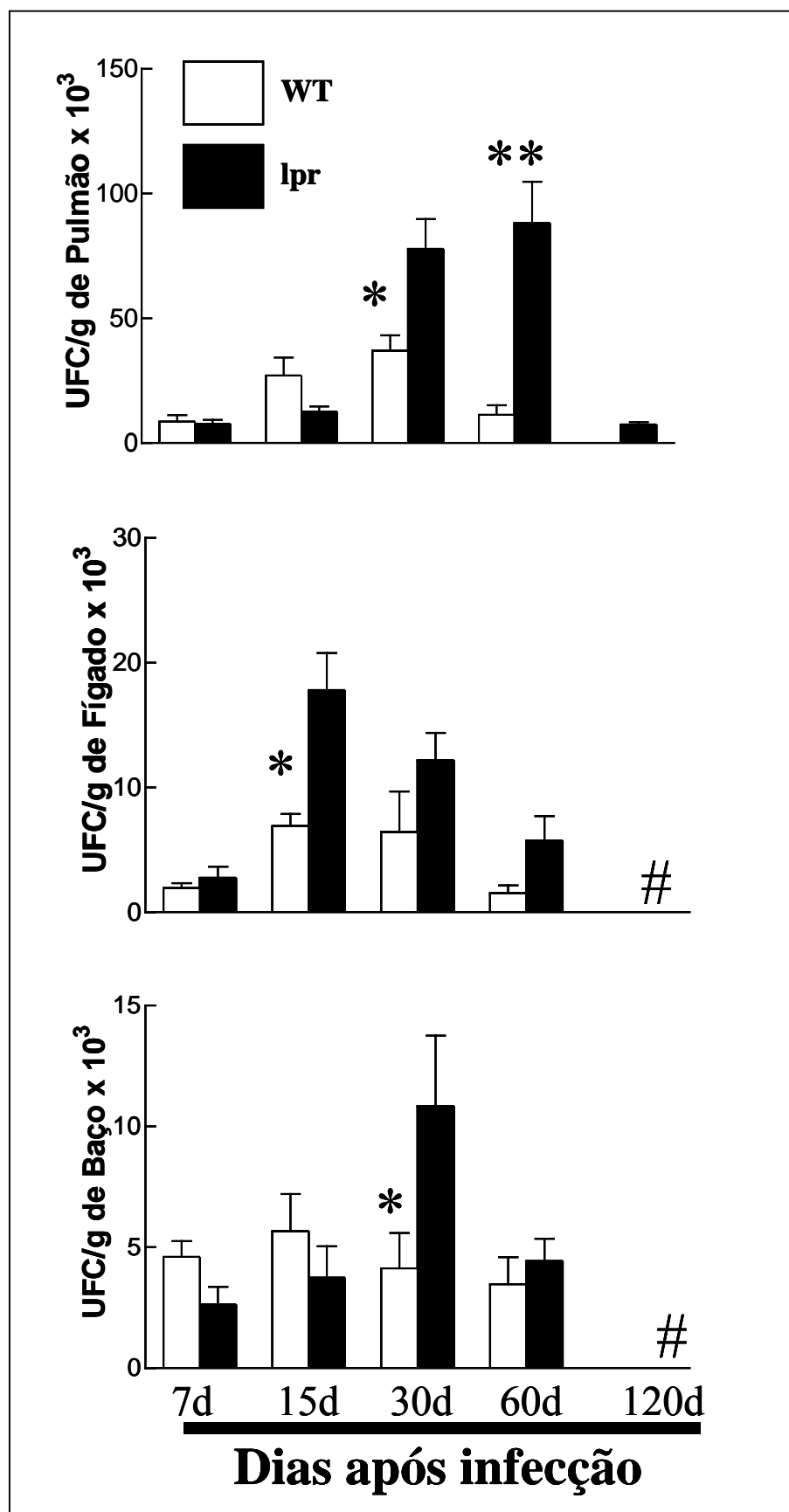


Figura 13. Quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) nos órgãos de animais WT e lpr infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos C57BL/6 e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30, 60 e 120 dias de infecção os animais foram sacrificados e tiveram seus órgãos retirados, pesados, homogeneizados e plaqueados em Agar BHI. Após 14 dias foram determinados os valores de UFC no baço, fígado e pulmão. Cada ponto corresponde a 3 animais, sendo os dados representativos de 3 experimentos independentes. As barras representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$ em relação aos animais selvagens. #ausência de fungos viáveis.

4. Análise Histopatológica de secções pulmonares de animais WT ou lpr infectados por *P. brasiliensis*

4.1 Observação do infiltrado inflamatório- Coloração de Hematoxilina & Eosina

Animais WT e lpr foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30, 60 e 120 dias os animais foram sacrificados e seus órgãos (pulmão, fígado e baço) retirados, fixados e processados em álcool/xilol e incluídos em parafina.

Pulmões: A análise histopatológica realizada após coloração de H&E revelou um padrão inflamatório diferenciado entre animais WT e lpr (Figura 14). Notamos nos animais WT aos 7 dias após a infecção um infiltrado inflamatório focal difuso, composto por neutrófilos e células mononucleares, com elementos fúngicos dispersos, esperado nesse período de infecção. Em animais lpr, porém, verificamos um infiltrado inflamatório com grau maior de organização. Aos 14 dias observamos tanto em WT como em lpr a formação de granulomas epitelióides, com presença de histiócitos, células epitelióides, linfócitos e neutrófilos, com leveduras localizadas centralmente. Contudo, os granulomas de animais lpr eram menores e mais numerosos que os encontrados em WT. Aos 30 dias de infecção houve formação de granulomas bem definidos em ambos animais, compostos por histiócitos, células epitelióides, células gigantes agregadas ao redor das leveduras, menor número de neutrófilos e um cinturão externo composto por células monucleares e fibroblastos. Aos 60 dias de infecção notamos granulomas bem consolidados e muitas células epitelióides ao redor dos fungos (Figura 14 e 15). Aos 120 dias de infecção os animais WT estavam curados, apresentando resquícios de granulomas contendo fungos inviáveis, conforme demonstrado na contagem de UFC. Nos animais lpr, porém, verificamos a presença de granulomas maiores, confluentes, contendo poucos fungos viáveis.

Baço: A análise histopatológica foi realizada após coloração de H&E. Aos 15 dias de infecção observamos formação granulomatosa mais organizada no baço de animais lpr, comparativamente aos WT (Figura 16).

Fígado: A análise histopatológica foi realizada após coloração de Hematoxilina & Eosina (HE). Verificamos que a partir da segunda semana de infecção os granulomas hepáticos em animais WT são maiores que aqueles encontrados em lpr. A diferença foi mais marcante quando observamos o período de 30 dias após infecção (Figura 17).

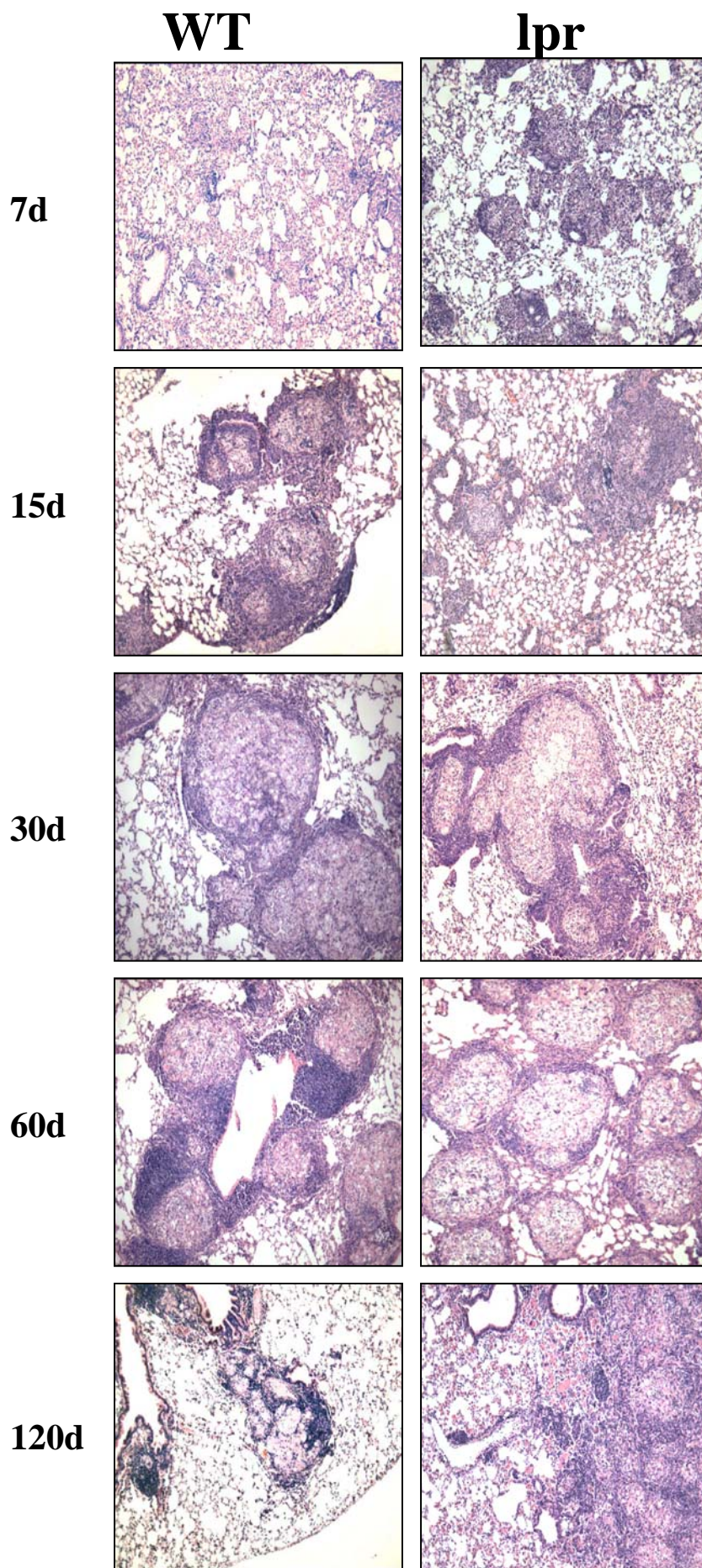
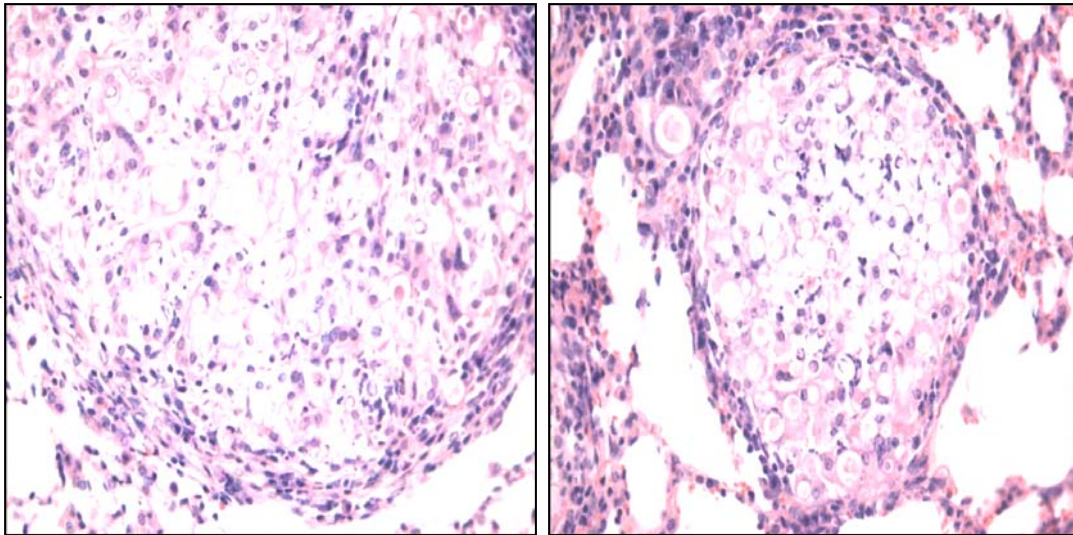


Figura 14. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos WT e lpr. Fotomicrografias foram tiradas aos 7, 15, 30, 60 e 120 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, C, E, G e I: Animais WT; B,

WT

lpr

60 d



120 d

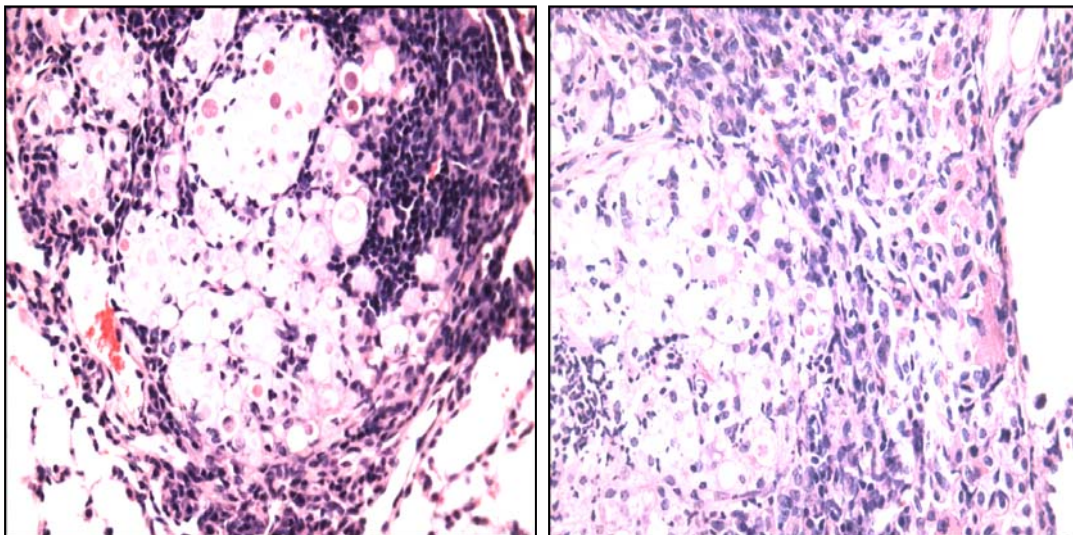
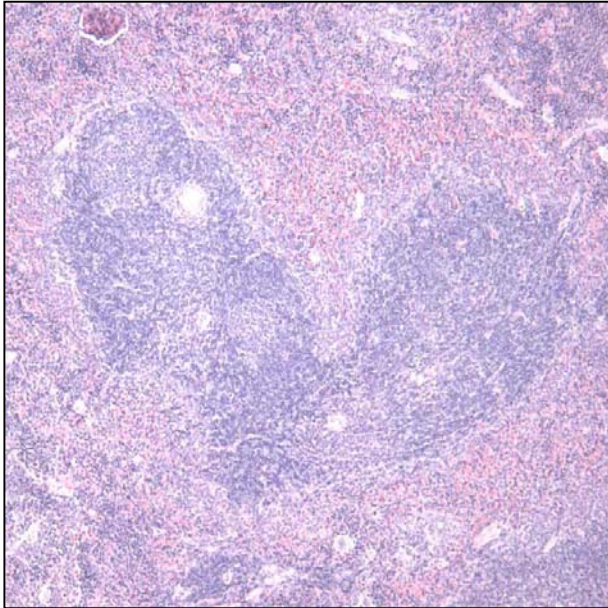


Figura 15. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos WT e lpr. Fotomicrografias foram tiradas 60 e 120 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A e C; Animais WT; B e D: Animais lpr. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento de 4000x.

WT



lpr

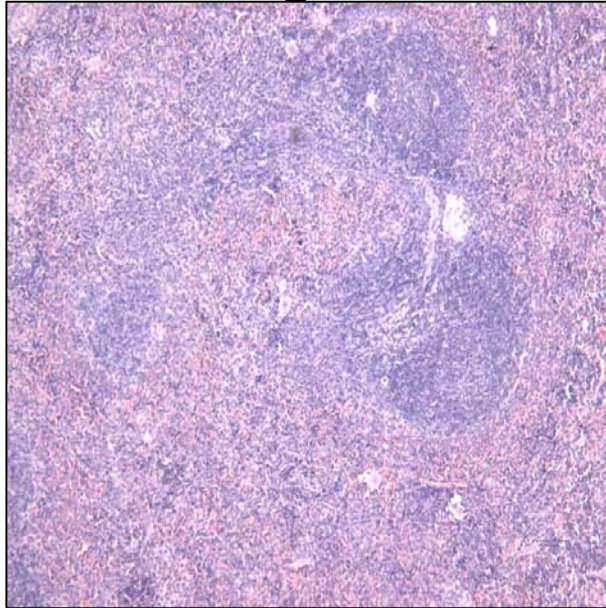


Figura 16. Análise histológica de secções de baço de camundongos WT e lpr. Fotomicrografias foram tiradas 15 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A: Animais WT; B: Animais lpr. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento de 1000x.

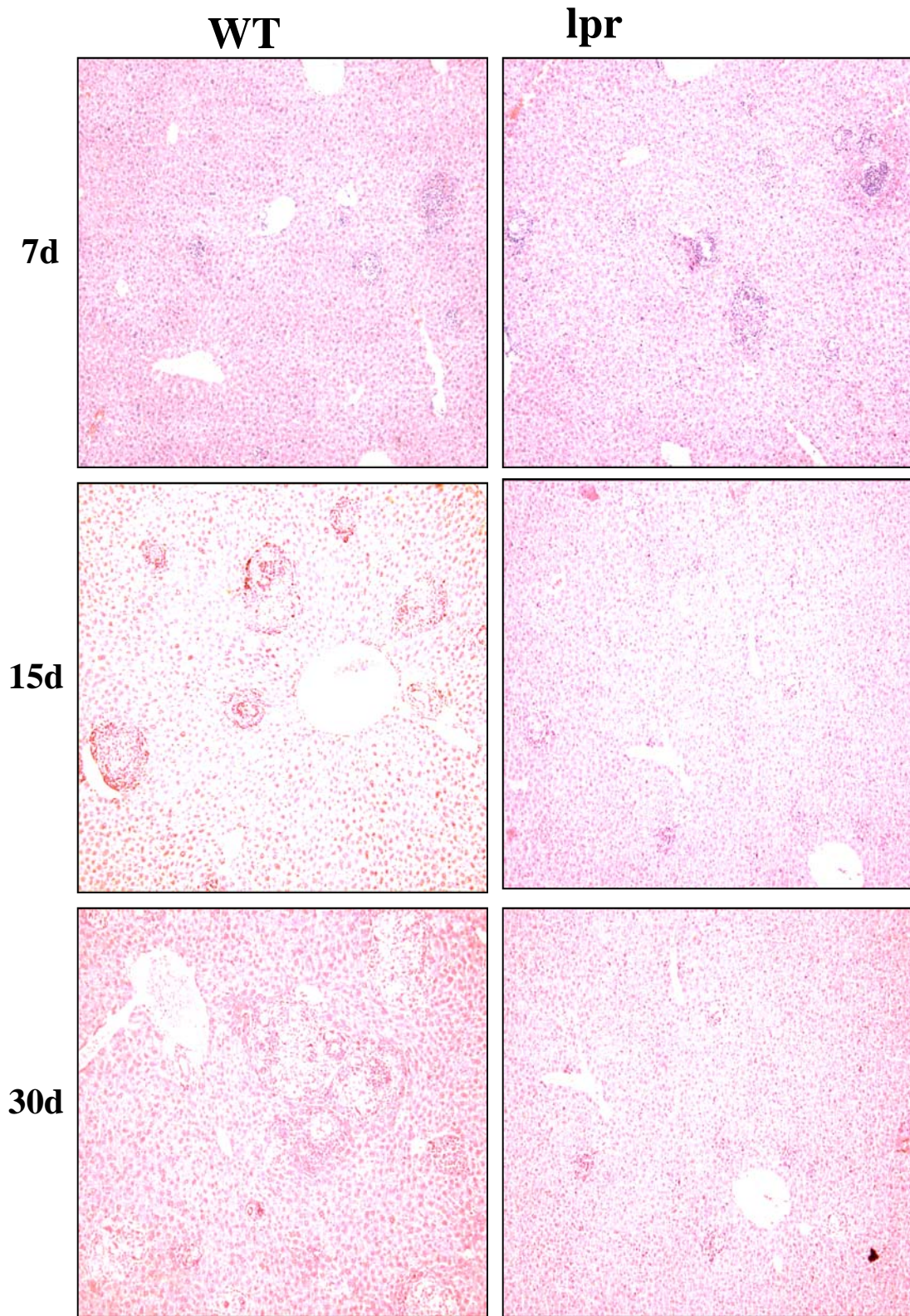


Figura 17. Análise histológica de seções de fígado de camundongos WT e lpr. Fotomicrografias foram tiradas 7, 15 e 30 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, C e E: Animais WT; B, D e F: Animais lpr. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento de 1000x.

4.2 Observação da carga parasitária- Coloração de Grocott

Animais lpr e WT foram infectados intravenosamente com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, 60 e 120 dias de infecção os animais foram sacrificados e seus pulmões foram retirados, fixados e processados em álcool/xilol e incluídos em parafina. A análise histopatológica foi realizada após coloração de Grocott (Figura 18), que cora os fungos em negro. Aos 15 e 30 dias de infecção observamos marcação dos fungos semelhante entre animais lpr e WT. Nos cortes histológicos de 30 e 60 dias após infecção observamos maior marcação de células fúngicas em animais lpr, relativamente aos WT, confirmando os dados obtidos pela contagem de UFC. Nos cortes histológicos de 120 dias observamos presença de fungos em animais lpr (período no qual há fungos viáveis nos pulmões, conforme demonstramos na Figura13), enquanto em WT, que não apresentam fungos viáveis nesse período, observamos presença de "poeira", que são restos de parede celular dos fungos.

4.3 Observação da deposição de colágeno- Coloração de Tricromo Massom

A PCM é uma doença que deixa sequelas fibróticas nos órgãos afetados, principalmente nos pulmões. Procuramos avaliar se a via de sinalização Fas/FasL é importante na deposição de colágeno e remodelamento da matriz extracelular após infecção por *P. brasiliensis*. Animais lpr e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, 60, 120, 150 e 180 dias de infecção os animais foram sacrificados e seus pulmões foram retirados, fixados e

processados em álcool/xilol e incluídos em parafina. A análise histopatológica foi realizada após coloração de Tricromo-Massom, na qual o colágeno cora-se em verde (Figura 19).

Observamos que durante o curso da PCM experimental houve atraso na deposição de colágeno nos camundongos lpr, comparativamente aos animais WT. A diferença foi marcante em estágio mais tardio da doença. Aos 120 dias de infecção ainda havia grande quantidade de colágeno nos pulmões de animais lpr, enquanto em WT ocorreu remodelamento e restauração quase total da arquitetura do parênquima pulmonar. Aos 150 dias de infecção animais WT apresentaram total remodelamento do parênquima pulmonar, enquanto nos animais lpr havia ainda grande presença de colágeno. Em animais lpr somente aos 180 dias de infecção observamos o remodelamento do parênquima pulmonar, quando granulomas não foram mais encontrados.

5. Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH)

A reação de DTH foi realizada através da injeção de 2 µg de exoantígeno (EXO) nas patas traseiras de animais infectados e não infectados por Pb18 (Figura 20). Vinte e quatro horas após a injeção de EXO a variação de edema nas patas foi medida nos animais 15, 30 e 60 dias após infecção com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Houve diferença significativa entre os animais lpr e WT ($p < 0,05$) apenas no período de 30 dias de infecção, quando a contagem de UFC foi mais elevada em animais lpr em relação aos WT.

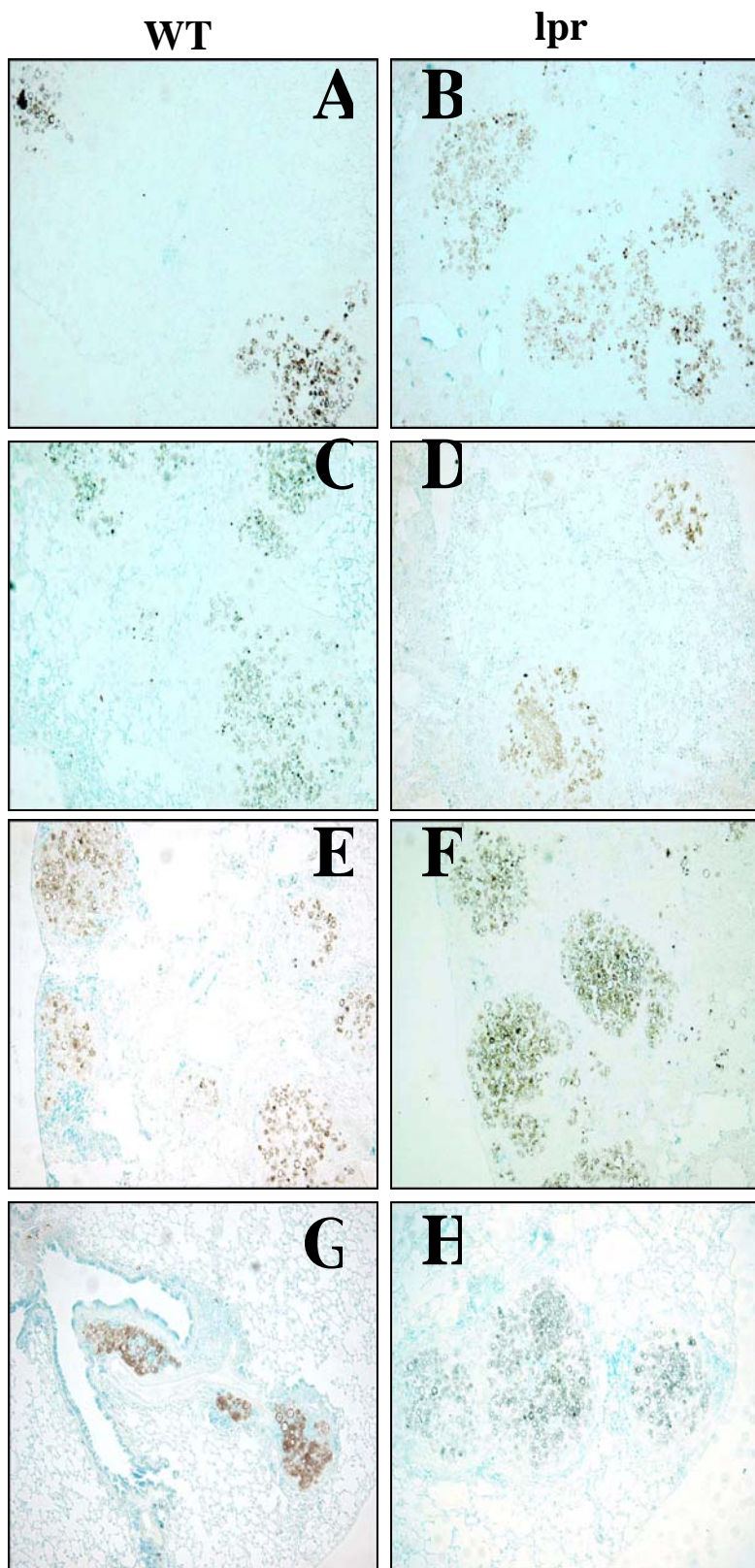


Figura 18. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos WT e lpr. Fotomicrografias foram tiradas 15, 30, 60 e 120 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, C, E e G: Animais WT; B, D, F e H : Animais lpr. Coloração de Grocott, aumento de 1000x.

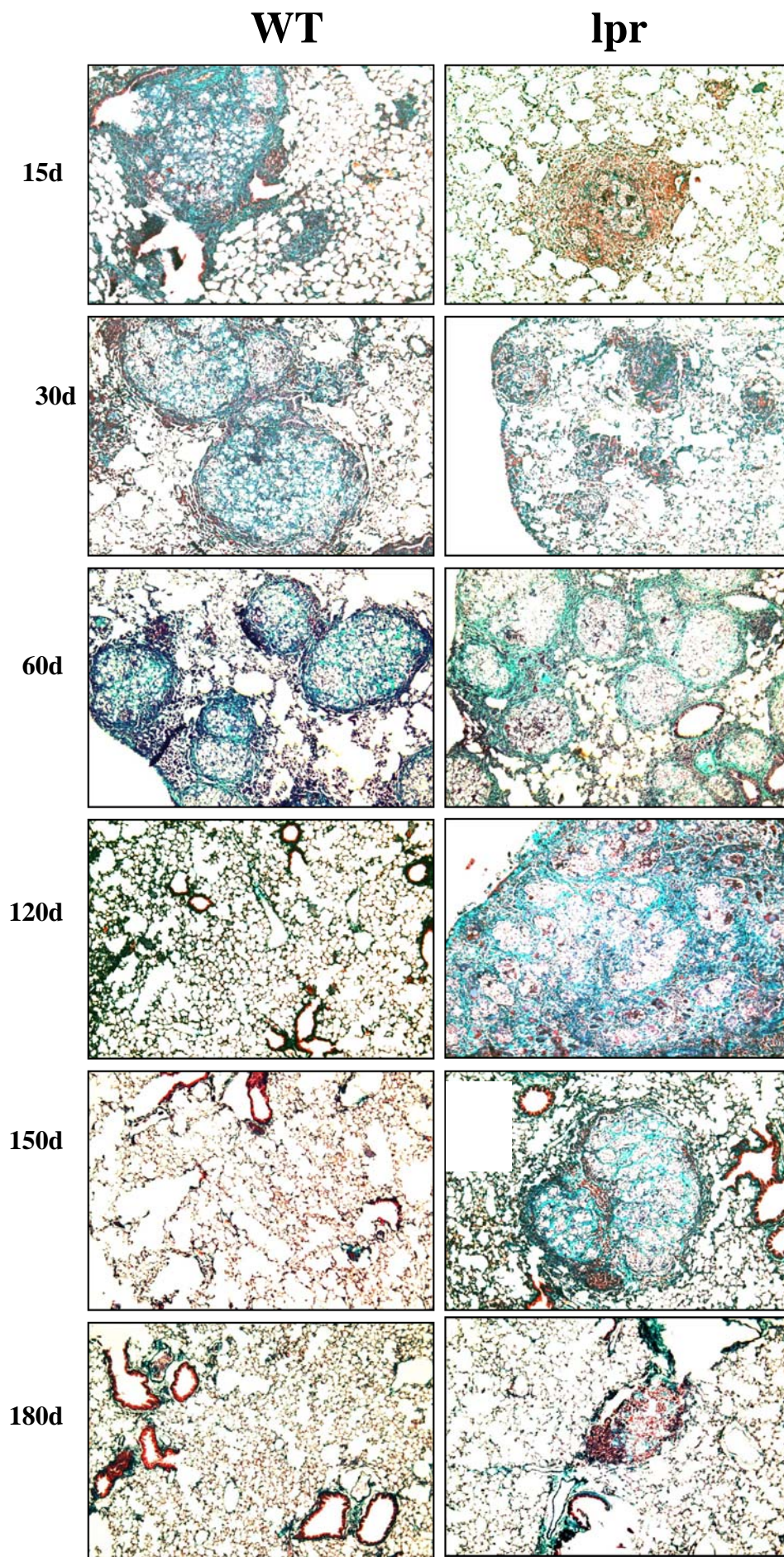


Figura 19.
Análise
histológica de
secções
pulmonares de
camundongos
WT e lpr.
Fotomicrografi
as foram
tiradas 15, 30,
60, 120, 150 e
180 dias após
infecção por
 1×10^6 leveduras
de Pb18. A, C,
E, G, I e K:
Animais WT;
B, D, F, H, J e
L: Animais lpr.
Coloração de
Tricromo
Masson,
aumento de
1000x.

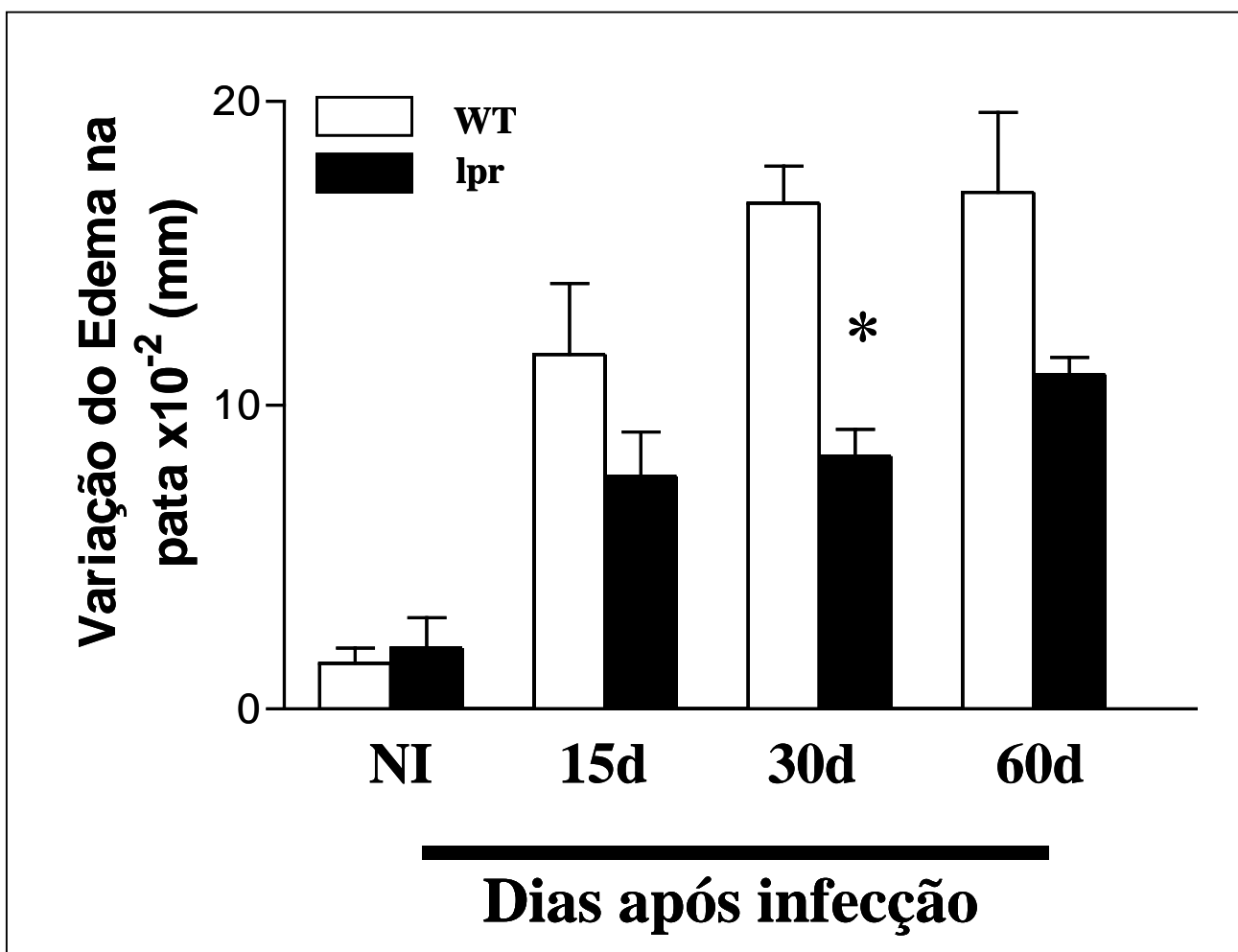


Figura 20. Reação de hipersensibilidade tardia (DTH). Camundongos C57BL/6 e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Nos dias 15, 30 e 60 após infecção foram desafiados pela injeção de 25 μ l de exoantígeno (EXO) derivados de Pb18 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) na pata traseira, enquanto na outra pata foram injetados 25 μ L de PBS. Vinte e quatro horas após o desafio o aumento de edema na pata foi aferido com paquímetro. Animais não infectados (NI) submetidos ao mesmo protocolo foram usados como controles. Cada ponto corresponde a 3 animais. O resultado apresentado é representativo de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, WT vs lpr no mesmo período de infecção.

6. Análise do infiltrado inflamatório pulmonar de camundongos WT ou lpr infectados por *P. brasiliensis* por citometria de fluxo

Analizamos pulmões de animais WT e lpr infectados por Pb18 nos períodos de infecção de 7, 15 e 30 dias. O tempo limite foi de 30 dias porque nessa fase os granulomas encontrados em WT e lpr apresentavam-se completamente organizados. Os pulmões foram retirados e processados especificamente para análise por citometria de fluxo. As células analisadas pertenciam às “gates” identificadas na Figura 21A e foram selecionadas quanto ao tamanho e granulosidade. Verificamos um aumento significativo ($p < 0,05$) da presença de células $CD11c^+GR1^+$ (NØ) em animais lpr e WT infectados, relativamente aos não infectados, em todos os períodos analisados (Figura 21B). Entre os animais infectados, porém, não houve diferença percentual entre animais lpr e WT. Em nossas análises processamos todos os lobos pulmonares de cada animal, de modo a minimizar as possíveis diferenças nos percentuais e valores obtidos. Verificamos sempre, em nossas contagens em câmara de Neubauer, um número total de leucócitos sempre mais elevados em animais lpr (dados não mostrados). Em conclusão, apesar de um número percentual similar entre animais lpr e WT, o número absoluto de NØ foi maior em animais lpr. Também analisamos outras populações celulares que freqüentemente são encontradas nos granulomas, como os linfócitos T e B. A população de células $CD19^+$ (linfócitos B) foi menor em animais lpr comparativamente aos animais WT ($p < 0,05$) aos 7 e 30 dias após infecção (Figura 21D). As células pertencentes às “gates” identificadas na Figura 22A foram selecionadas quanto ao tamanho e granulosidade e analisadas por citometria de fluxo. O percentual de células $CD3^+CD4^+$ (Figura 22B) e $CD3^+CD8^+$ (Figura 22D) pulmonares foi semelhante entre lpr e WT não infectados ou infectados por Pb18.

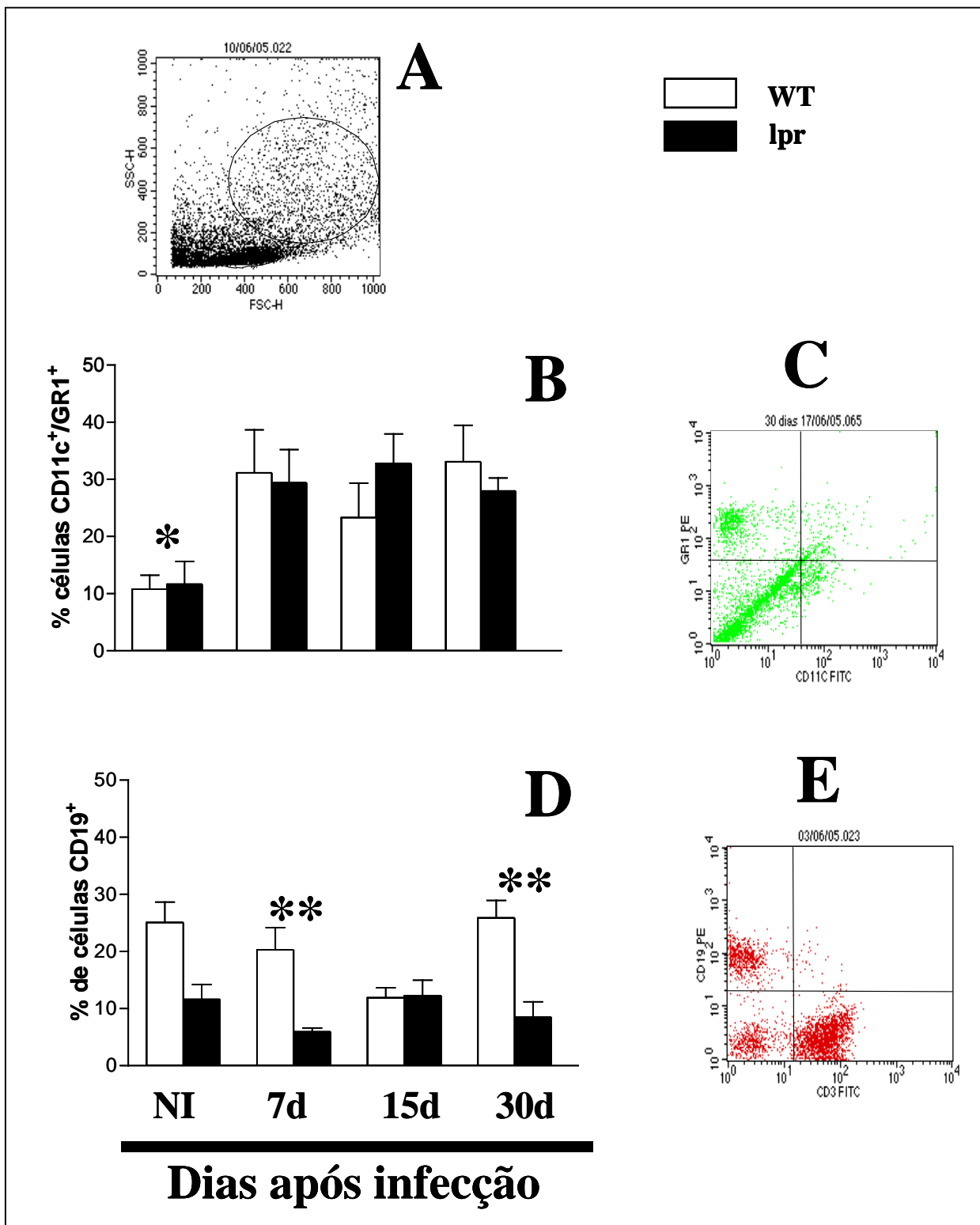


Figura 21. Expressão de moléculas de superfície. Camundongos C57BL/6 e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15 e 30 dias de infecção os pulmões foram retirados, tratados com liberase e triturados em Medimachine®. Células pulmonares foram marcadas com anticorpos específicos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). As células pertencentes às janelas (gates) indicadas (A) foram selecionadas quanto ao tamanho e granulosidade e analisadas por citometria de fluxo (B e D). Cada ponto representa a média \pm SD de amostras em quadruplicatas e são

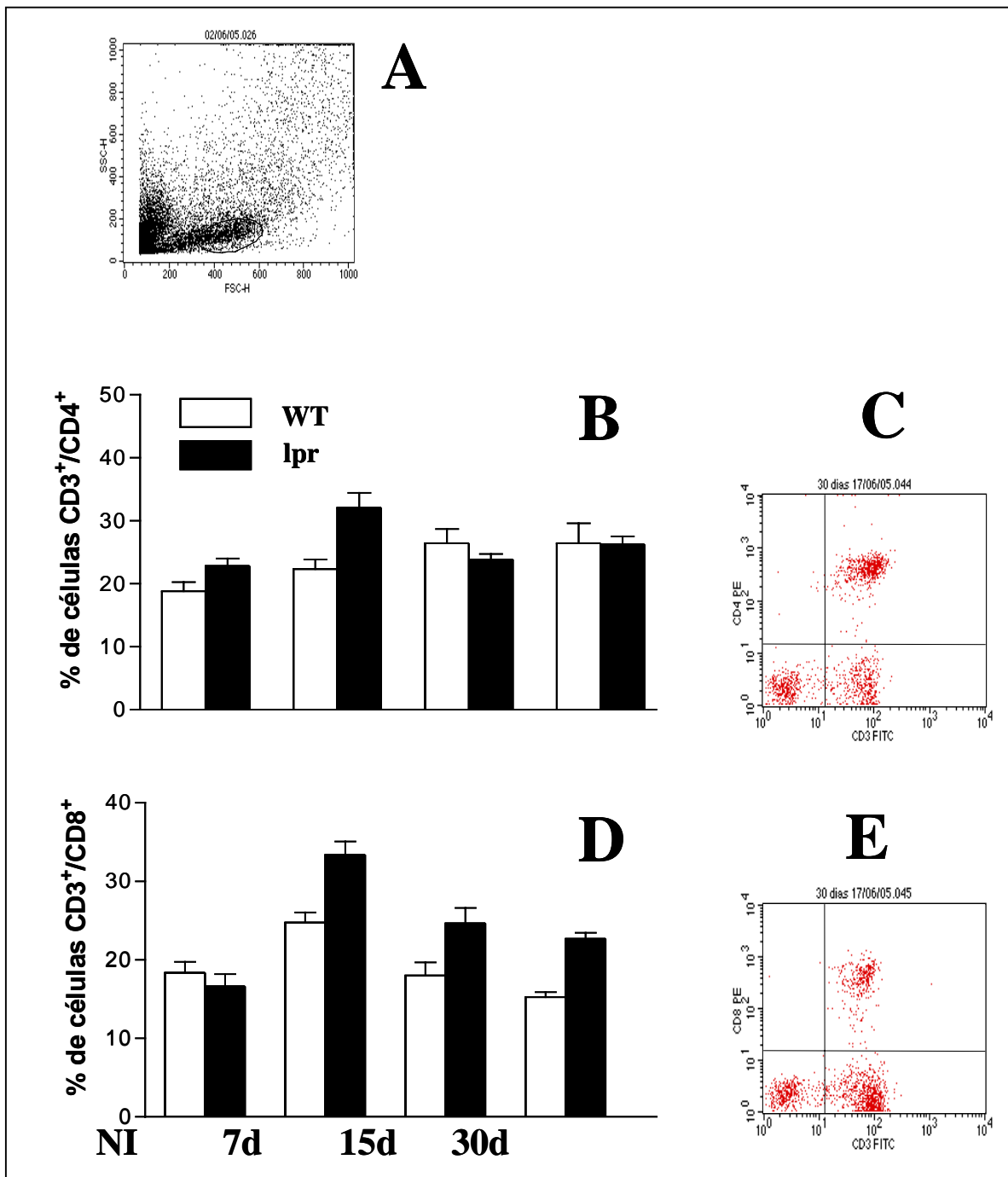


Figura 22. Expressão de moléculas de superfície. Camundongos C57BL/6 e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15 e 30 dias de infecção os pulmões foram retirados, tratados com liberase e triturados em Medimachine®. Células pulmonares foram marcadas com anticorpos específicos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). As células pertencentes à janela (gate) indicada (A) foram selecionadas quanto ao tamanho e granulosidade e analisadas por citometria de fluxo (B e D). Cada ponto representa a média \pm SD de amostras em

7. Migração de leucócitos peritoneais de camundongos WT ou lpr após estímulo por Tioglicolato de Sódio

Como relatamos anteriormente, apesar de um infiltrado celular maior em pulmões de camundongos lpr, o percentual de NØ foi semelhante ao encontrado em WT. Alguns estudos mostraram que neutrófilos de animais deficientes de Fas apresentam migração ineficiente. Dessa forma, procuramos descobrir se a migração de NØ de animais lpr é de alguma forma inefetiva comparadamente aos animais WT. Averiguamos capacidade migratória de leucócitos duas horas após injeção intraperitoneal de tioglicolato de sódio. Nesse período de tempo sabe-se que a maior parte dos leucócitos que migram em resposta ao estímulo são NØ. Após microscopia intravital capturamos e selecionamos imagens representativas das vênulas de animais WT (Figura 23) e lpr (Figura 24) no momento em que leucócitos seguem o fluxo sanguíneo. Verificamos que não houve diferença significativa no número de leucócitos que migraram pelas vênulas mesentéricas entre animais WT e lpr (Figura 25 A). Contudo, observamos que a quantidade de células aderidas nas paredes dos vasos foi significativamente maior em animais WT (Figura 25B).

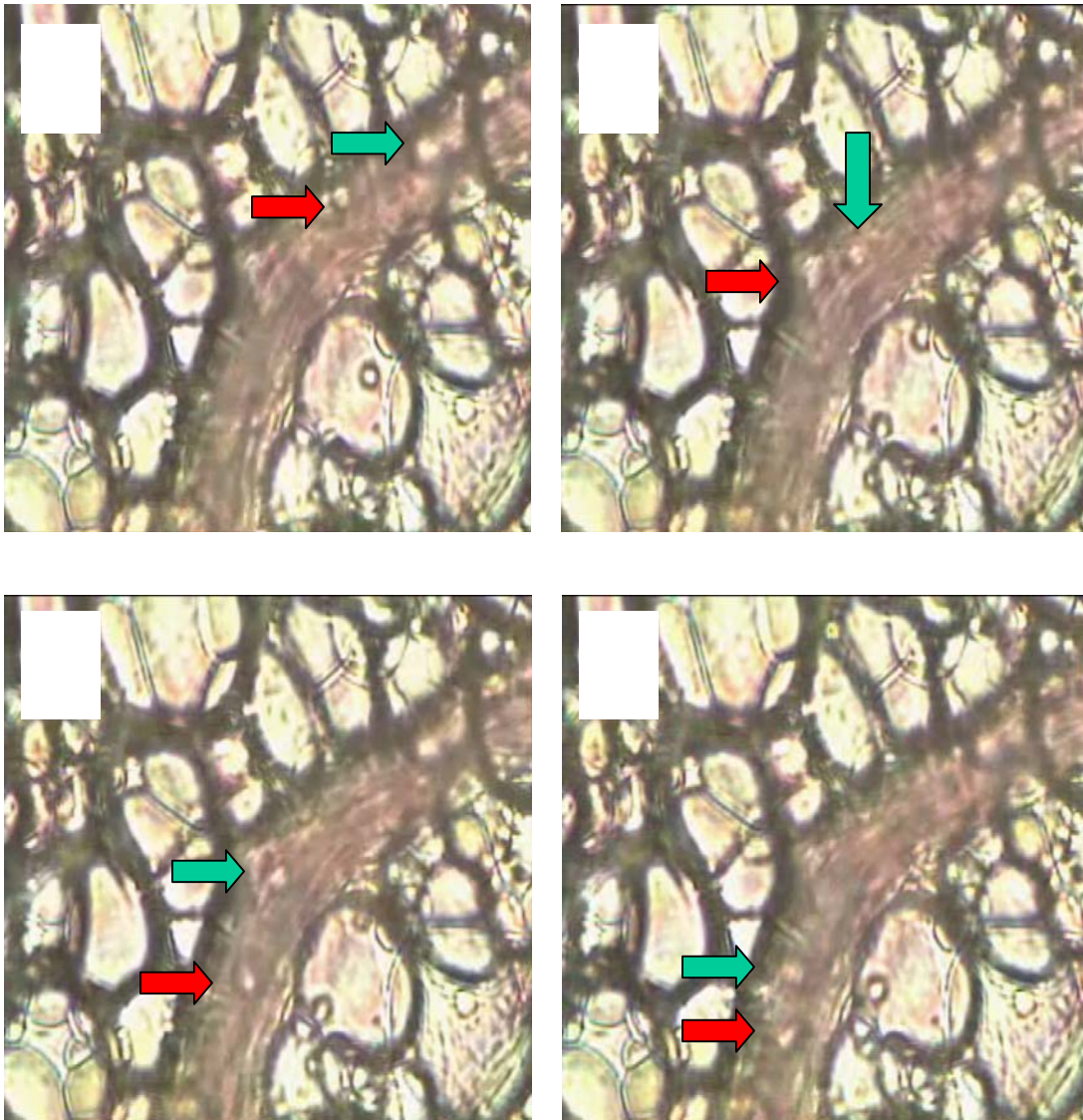


Figura 23. Rolamento e adesão de leucócitos peritoneais. Camundongos WT receberam 500 μ L de Tioglicolato de sódio 3% pela via intraperitoneal. Duas horas após o estímulo inflamatório os foram anestesiados e submetidos à microscopia intravital. As setas indicam a exata localização dos leucócitos durante migração em vênulas pós-capilares mesentéricas. Tempo decorrido de A a D: aproximadamente 2 segundos. Resultados representativos de dois experimentos independentes. Aumento final de 3400x.

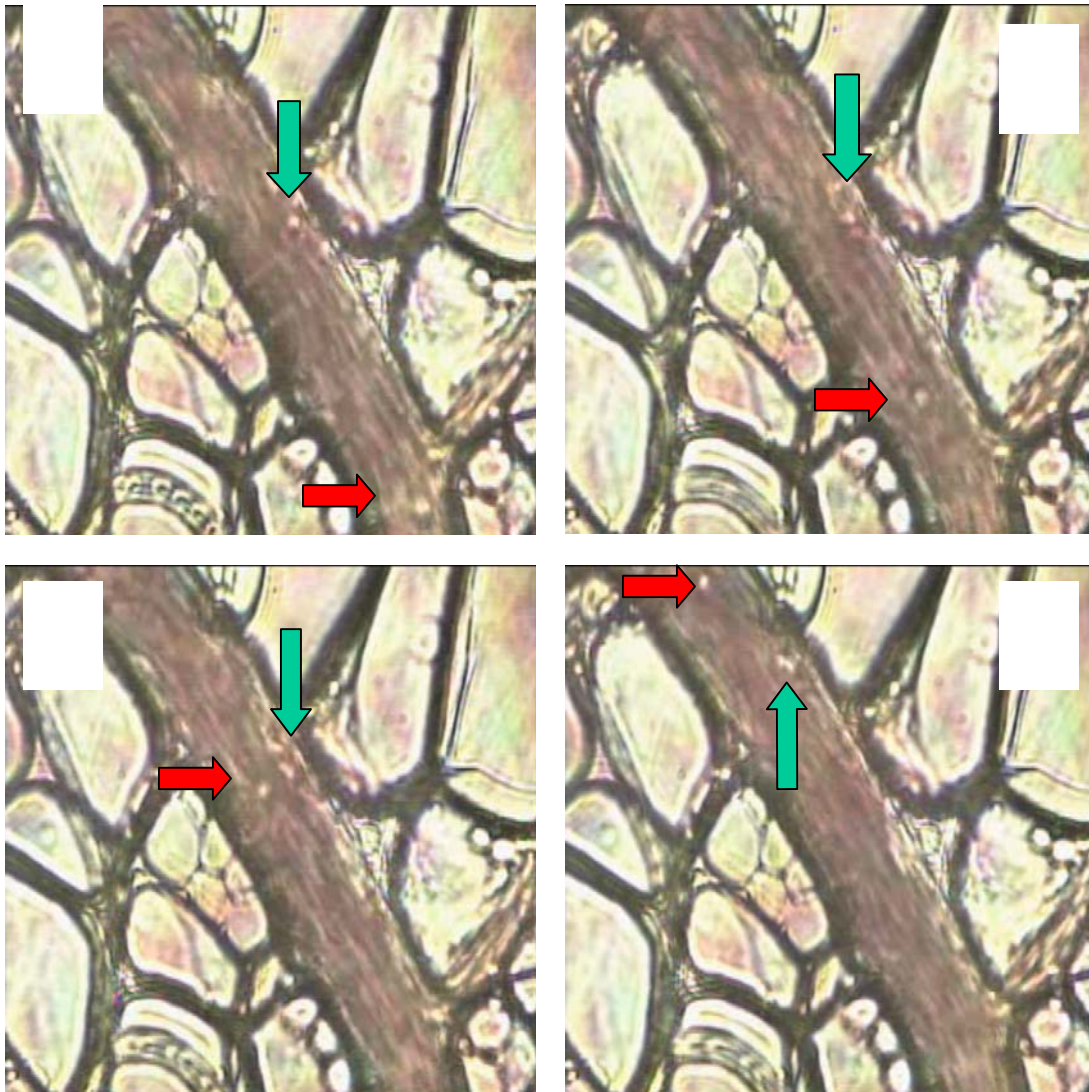


Figura 24. Rolamento e adesão de leucócitos peritoneais. Camundongos Ipr receberam 500 μ L de Tioglicolato de sódio 3% pela via intraperitoneal. Duas horas após o estímulo inflamatório os foram anestesiados e submetidos à microscopia intravital. As setas indicam a exata localização dos leucócitos durante migração em vênulas pós-capilares mesentéricas. Tempo decorrido de A a D: aproximadamente 2 segundos. Resultados representativos de dois experimentos independentes. Aumento final de 3400x.

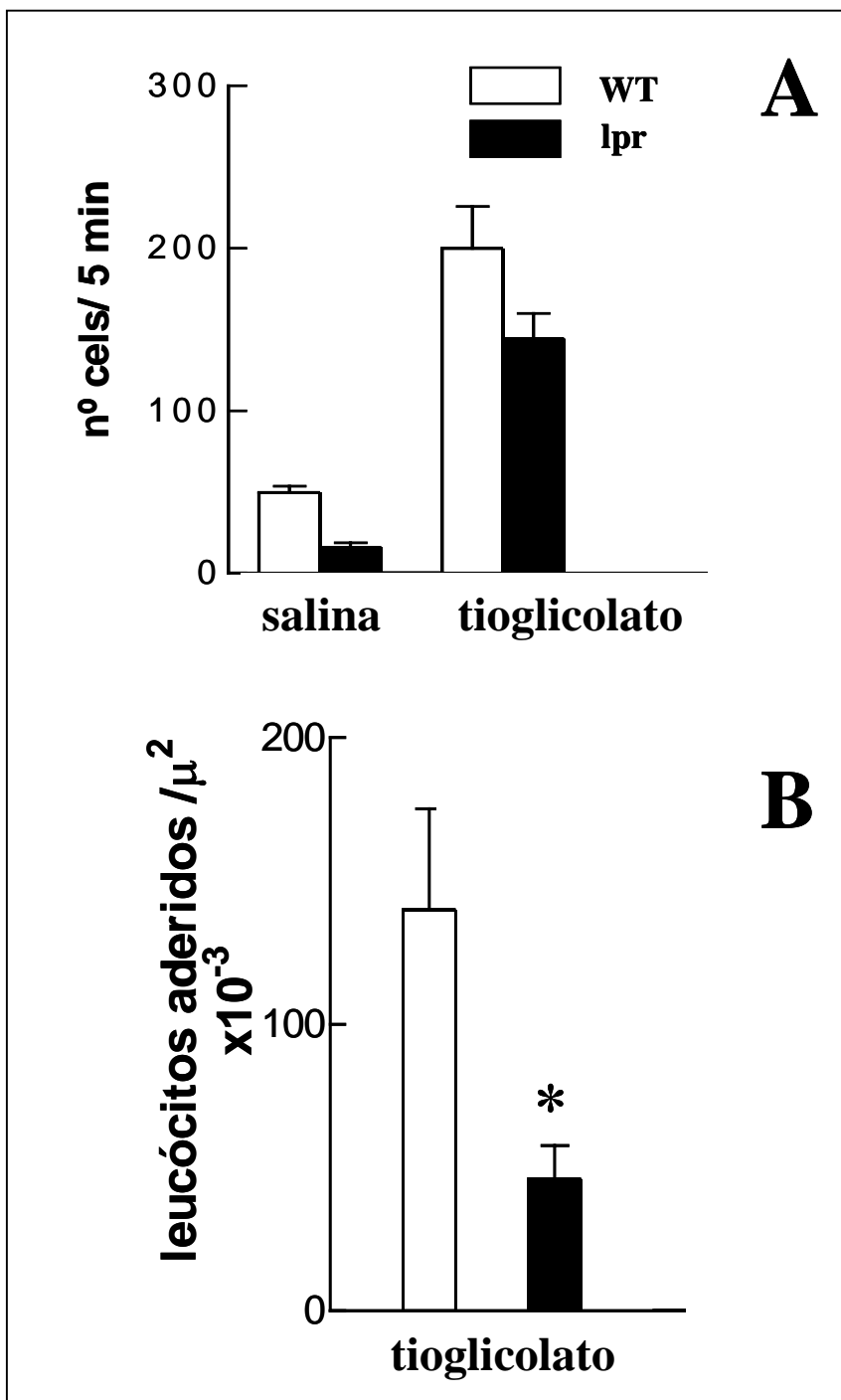


Figura 25. Rolamento e adesão de leucócitos peritoneais. Camundongos WT e lpr receberam 500 μ L de Tioglicolato de sódio 3% ou salina pela via intraperitoneal. Duas horas após o estímulo inflamatório os animais foram anestesiados e submetidos à microscopia intravital. Vênulas pós-capilares mesentéricas com diâmetro entre 10 e 16 μ M foram selecionadas para visualização. A: Número de leucócitos em migração; B: Número de leucócitos aderidos nas vênulas pós-capilares. Cada ponto corresponde a 3 animais, sendo os dados representativos de 2 experimentos independentes. As barras representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$, WT vs lpr. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

8. Quantificação de quimiocinas em lisado pulmonar de camundongos WT e lpr infectados por *P. brasiliensis*

Vimos que no infiltrado inflamatório pulmonar, a despeito do maior número total de leucócitos em animais lpr após infecção por Pb18, houve percentual semelhante ao encontrado em WT. Vimos também que houve menor aderência de NØ de animais lpr. Dessa forma, procuramos identificar se aumento da produção nos pulmões de quimiocinas que recrutam NØ em animais lpr compensaria a menor aderência encontrada nessas células. Fizemos a dosagem em pulmões de animais de MIP-1 α e KC, duas das principais quimioatratadoras de neutrófilos. Os níveis de MIP-1 α foram maiores em animais lpr comparativamente aos WT em todos os períodos analisados (Figura 26A). Contudo, verificamos que a diferença foi significativa ($p < 0,05$) após 60 dias de infecção, quando os níveis da quimiocina foram cerca de três vezes maior em animais lpr. Semelhantemente, os níveis de KC também foram maiores em animais lpr em todos os períodos de infecção (Figura 26B). Mas diferença significativa ocorreu somente aos 60 dias após infecção ($p < 0,05$), quando níveis de KC foram cerca de duas vezes maior em animais lpr comparativamente aos WT.

9. Atividade de mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos pulmonares de camundongos WT e lpr infectados por *P. brasiliensis*

Existem relatos sobre produção deficiente de reagentes oxidativos por neutrófilos de animais lpr. A ação dos NØ contra *P. brasiliensis* nas primeiras semanas de infecção é fundamental para eliminação do patógeno. Verificamos a produção de mieloperoxidase por neutrófilos de animais lpr e WT após 15 dias de infecção por Pb18 (Figura 27). Em nossa dosagem, apesar de uma

maior produção de MPO por neutrófilos de animais infectados em relação a não infectados, não encontramos diferença significativa entre animais lpr e WT infectados.

10. Quantificação de citocinas em lisado pulmonar de camundongos WT e lpr infectados por *P. brasiliensis*

Animais lpr e WT foram infectados IV com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, 60 e 120 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas.

IFN- γ : A produção de IFN- γ foi semelhante entre camundongos WT e lpr durante a PCM (Figura 28A).

IL-10: Verificamos que a produção de IL-10 foi maior em animais lpr, comparativamente a WT, nas quatro primeiras semanas de infecção (Figura 28B). Após 15 dias de infecção os níveis de IL-10 em lpr foram cerca de 8 vezes mais elevados que aqueles de WT ($p < 0,05$). Aos 30 dias de infecção os níveis de IL-10 reduziram-se cerca de três vezes mas, contudo, permaneceram mais elevados que os encontrados em WT ($p < 0,05$).

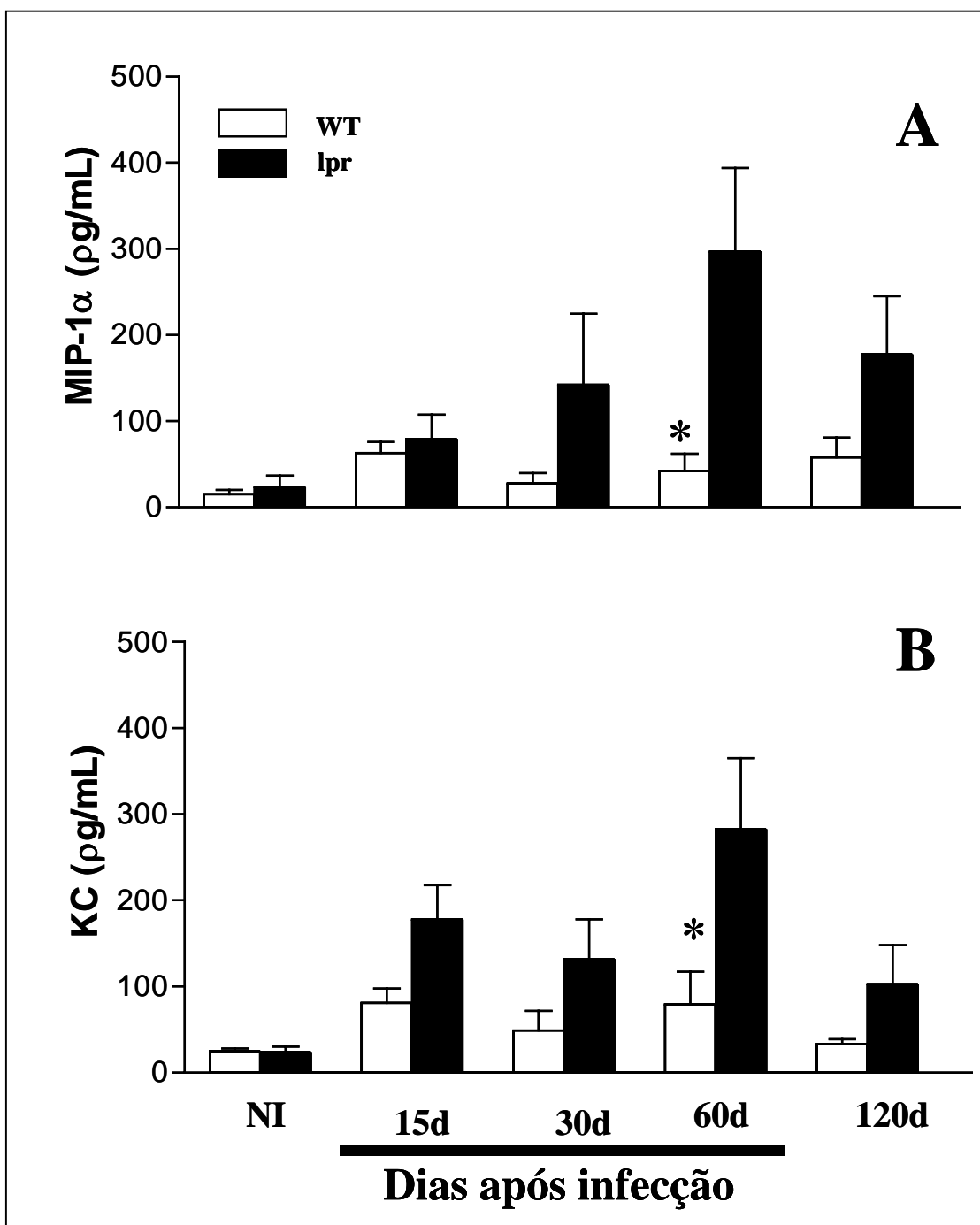


Figura 26. Detecção de quimiocinas nos pulmões de camundongos WT e lpr infectados com *P. brasiliensis*. Os animais foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, 60 e 120 dias de infecção os pulmões foram retirados e homogeneizados. O sobrenadante foi colhido e a dosagem de MIP-1 α (A) e KC (B) realizada por ELISA. Pulmões de animais não infectados (NI) foram utilizados como controle. Cada ponto

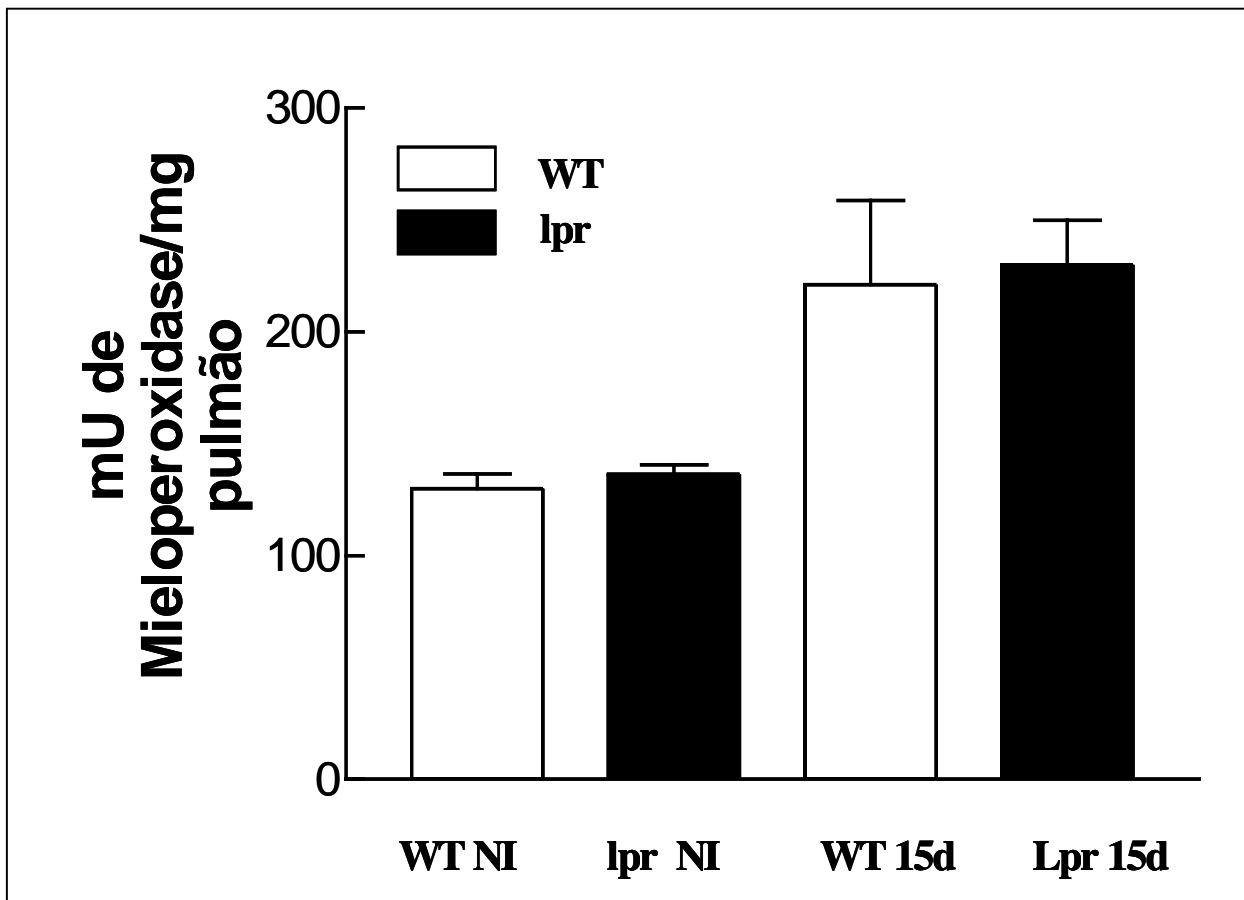


Figura 27. Atividade da mieloperoxidase (MPO) por neutrófilos pulmonares. A intensidade do acúmulo de neutrófilos nos pulmões dos animais infectados por *P. brasiliensis* foi aferida pelo ensaio da mieloperoxidase. Camundongos WT e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15 dias de infecção o pulmão direito foi perfundido com solução salina, pesado e homogeneizado em Pollytron®. Cada ponto corresponde a 3 animais, sendo os dados representativos de 2

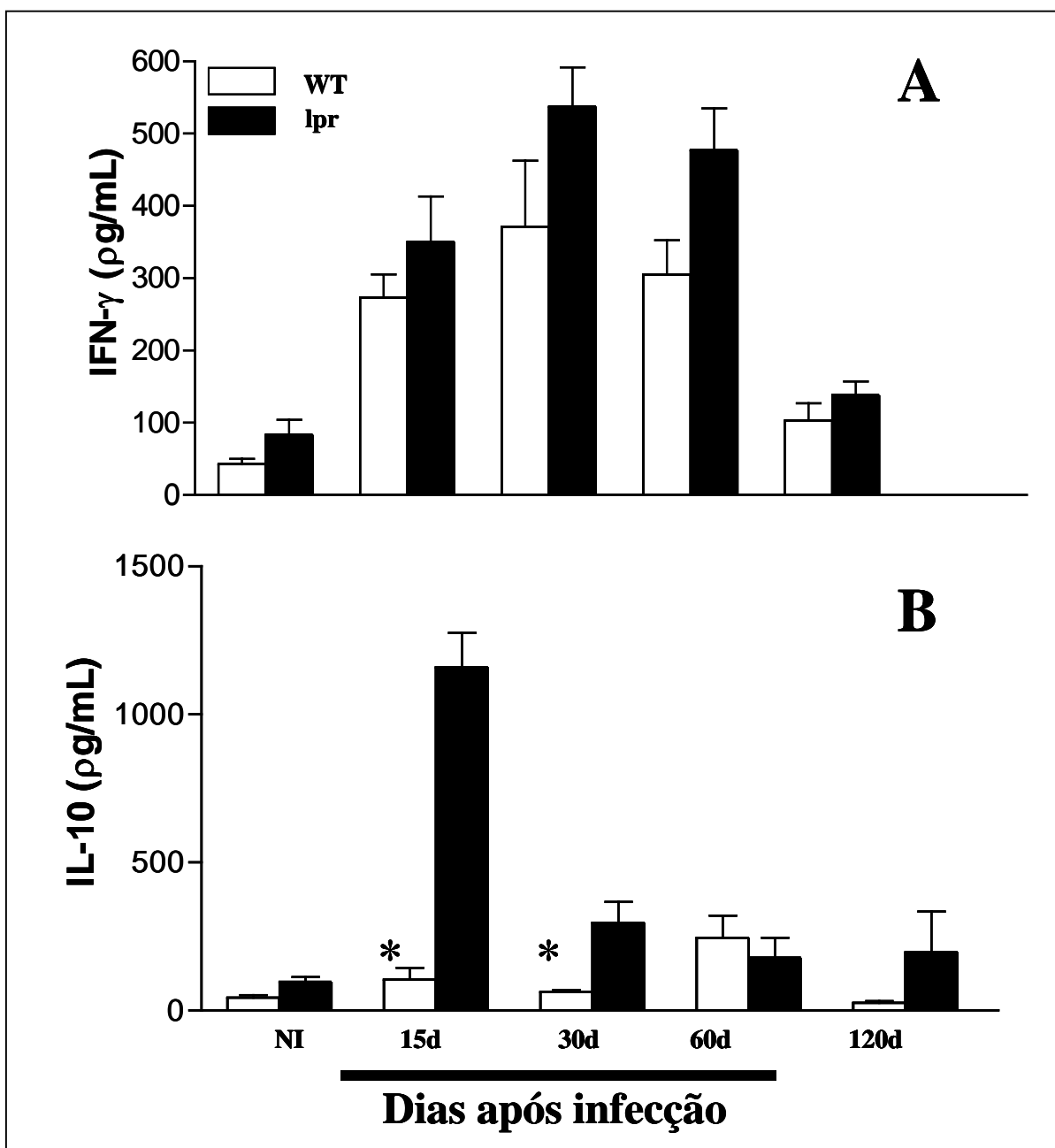


Figura 28. Detecção de citocinas nos pulmões de camundongos WT e lpr infectados com *P. brasiliensis*. Os animais foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, 60 e 120 dias de infecção os pulmões foram retirados e homogeneizados. O sobrenadante foi colhido e a dosagem de de IFN (A) e IL-10 (B) realizada por ELISA. Pulmões de animais não infectados (NI) foram utilizados como controle. Cada ponto representa a média \pm SD de órgãos de 3 camundongos.

11. Dosagem de Óxido Nítrico (NO) no soro de camundongos WT e lpr infectados por *P. brasiliensis*

A produção de NO foi avaliada nos soro de animais infectados com 10^6 formas leveduriformes de Pb18 (Figura 29). Os períodos analisados foram 7, 15, 30, 60 e 120 dias após infecção. Os resultados apresentados mostraram houve maior produção de NO ($p < 0,05$) em animais lpr comparativamente a WT no período de 30 dias após infecção.

12. *Paracoccidioides brasiliensis* induz apoptose de leucócitos pulmonares de camundongos WT e lpr

A apoptose é um mecanismo de evasão utilizado por vários parasitas, especialmente extracelulares. *P. brasiliensis* é um parasita intracelular facultativo, o que nos permitiu colocar suspeição sobre o fungo como indutor de morte celular. Os dados sobre a participação de *P. brasiliensis* na indução de apoptose são escassos. Para averiguarmos o envolvimento do fungo na indução de apoptose na PCM sistêmica infectamos animais lpr e WT com 10^6 leveduras de Pb 18 e coletamos todos os lobos pulmonares após 7, 15 e 30 dias de infecção. Coletamos também pulmões de animais não infectados. As células analisadas pertenciam às “gates” identificadas na Figura 30A e foram selecionadas quanto ao tamanho e granulosidade. As células apoptóticas foram marcadas com Anexina-FITC e analisadas por citometria de fluxo (Figura 30B). Observamos em animais WT um aumento de cerca de três vezes no percentual de células apoptóticas ($p < 0,05$) aos 7 e 15 dias de infecção, comparativamente aos animais WT não infectados. Após 30 dias de infecção houve queda no percentual de apoptose para níveis similares aos de animais WT não infectados. Em animais lpr o percentual de células apoptóticas elevou-se também aos 7 dias de infecção, comparativamente aos animais não infectados

($p < 0,05$). A apoptose permaneceu elevada após 15 dias, com redução acentuada após 30 dias de infecção. Quando comparamos percentual de células pulmonares apoptóticas entre animais WT e lpr encontramos, surpreendentemente, após 7 dias de infecção, um número de células apoptóticas maior em animais lpr ($p < 0,05$). Aos 15 e 30 dias de infecção, porém, houve igual percentual de apoptose de células pulmonares entre lpr e WT.

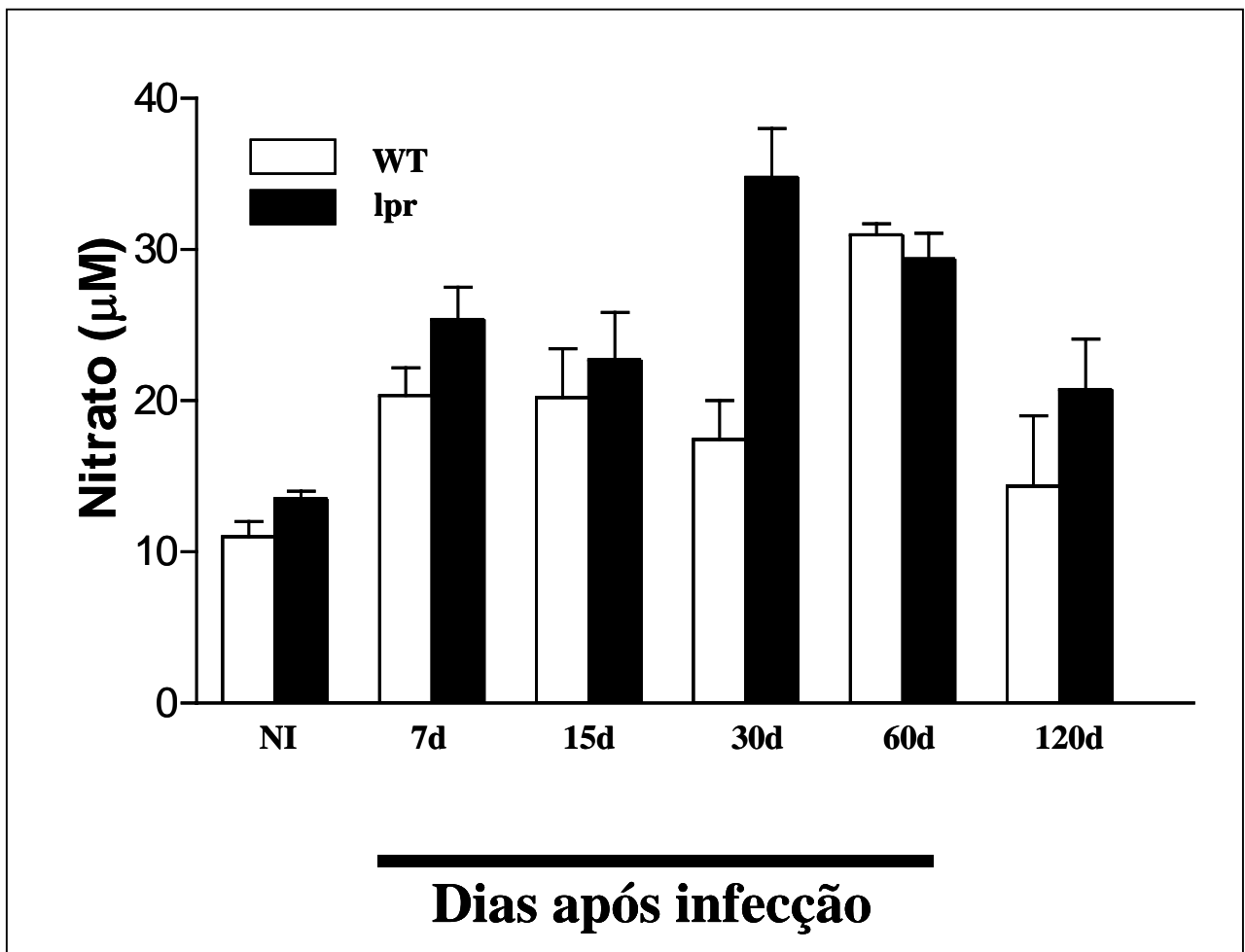


Figura 29. Dosagem de Óxido Nítrico no soro. Camundongos WT e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30, 60 e 120 dias de infecção o sangue foi colhido e o soro separado. A produção de NO foi indiretamente avaliada pela mensuração da produção de nitrato (NO_3^-), realizada pelo método de Griess. Soro de animais não infectados (NI) foram utilizados como controle. Cada ponto representa a média \pm SD de órgãos de 3 camundongos. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

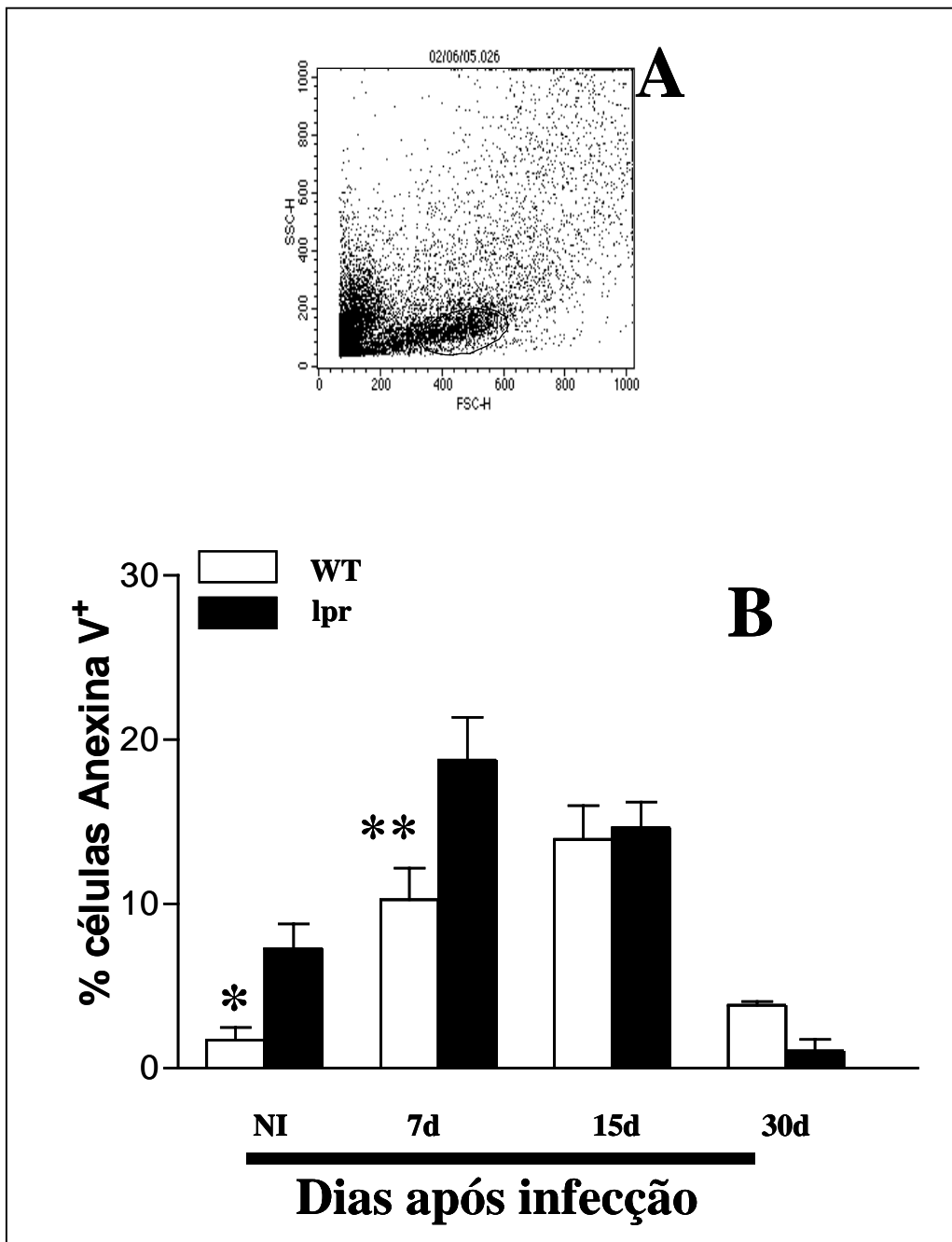


Figura 30. Marcação por Anexina V-FITC. Camundongos C57BL/6 e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15 e 30 dias de infecção os pulmões foram retirados, incubados com liberase e triturados em Medimachine®. As células pulmonares foram marcadas com Anexina V conjugada com FITC. As células pertencentes à janela (gate) indicada (A) foram selecionadas quanto ao tamanho e granulosidade e analisadas por citometria de fluxo (B). Cada ponto representa a média \pm SD de amostras em quadruplicatas e são representativos de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$, infectados NI vs infectados 7d. ** $p < 0,05$, WT 7d vs lpr 7d. NI: animais não infectados.

13. Expressão de Fas/FasL em leucócitos pulmonares de camundongos WT e lpr infectados por *P. brasiliensis*

A indução da expressão de Fas e FasL e marcação por Anexina V em monócitos de pacientes por *P. brasiliensis* foi demonstrada. Infectamos animais lpr e WT com 10^6 leveduras de Pb 18 e coletamos todos os lobos pulmonares após 7, 15 e 30 dias de infecção. Coletamos também pulmões de animais não infectados. Em camundongos WT não houve aumento significativo da expressão de Fas em células $CD4^+$ ou $CD8^+$ até 30 dias de infecção (Figura 31). A expressão de FasL, contudo, aumentou na população $CD4^+$ no dia 7 após infecção, comparativamente aos animais não infectados ($p < 0,05$). Houve diminuição da expressão de FasL em células $CD4^+$ no período de 15 e 30 dias após infecção, comparativamente ao período de 7 dias de infecção ($p < 0,05$). Em células $CD8^+$ de animais WT não houve elevação da expressão de FasL durante todo o período de infecção. Células de animais lpr de linhagem C57BL6 expressam Fas truncado, e também uma também apresentam pequena expressão de Fas funcional. Em nossa análise de FACS encontramos em células $CD4^+$ e $CD8^+$ ínfima expressão de Fas nos diversos períodos de infecção observados e também em animais não infectados. O percentual de células $CD8^+$ expressando FasL elevou-se significativamente nos pulmões de animais lpr após 7 dias de infecção, comparativamente tanto aos animais WT no mesmo período ($p < 0,05$) e quanto às células de lpr analisadas aos 15 e 30 dias após infecção e às células de animais não infectados ($p < 0,05$). Não houve aumento da expressão de FasL em animais após 15 e 30 dias de infecção, comparativamente ao grupo não infectado. Contrariamente ao observado em células $CD8^+$, o percentual de células $CD4^+$ expressando FasL não aumentou nos pulmões de animais lpr após 7 dias de infecção. Houve, além do mais, uma baixa expressão de FasL nas células $CD4^+$, que se manteve aos 15 e 30 dias de infecção.

14. Dosagem de anticorpos no soro de camundongos WT e lpr infectados por *P. brasiliensis*

Conforme mostrado anteriormente (Figura 21D), em pulmões de animais lpr infectados por *P. brasiliensis* encontramos menor número de células CD19⁺ (linfócitos B) nos dias 7 e 30 de infecção, comparativamente a animais WT ($p < 0,05$). A fim de investigarmos se haveria alteração na produção de anticorpos específicos em animais lpr, retiramos soro de animais lpr e WT após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção. Verificamos aumento na produção de IgG total (Figura 32A) específica no decorrer da infecção, mas não houve diferença entre lpr e WT quando comparados no mesmo dia de infecção. Na dosagem de anticorpos característicos de resposta Th1 (IgG2a) e Th2 (IgG1) não verificamos variação significativa nos níveis de anticorpos entre animais lpr e WT (Figuras 32 B e 32C). Dessa forma, as células CD19⁺ podem participar na defesa contra *P. brasiliensis* não só como produtoras de anticorpos, mas também exercendo papel como apresentadora de antígenos ou produtora de citocinas.

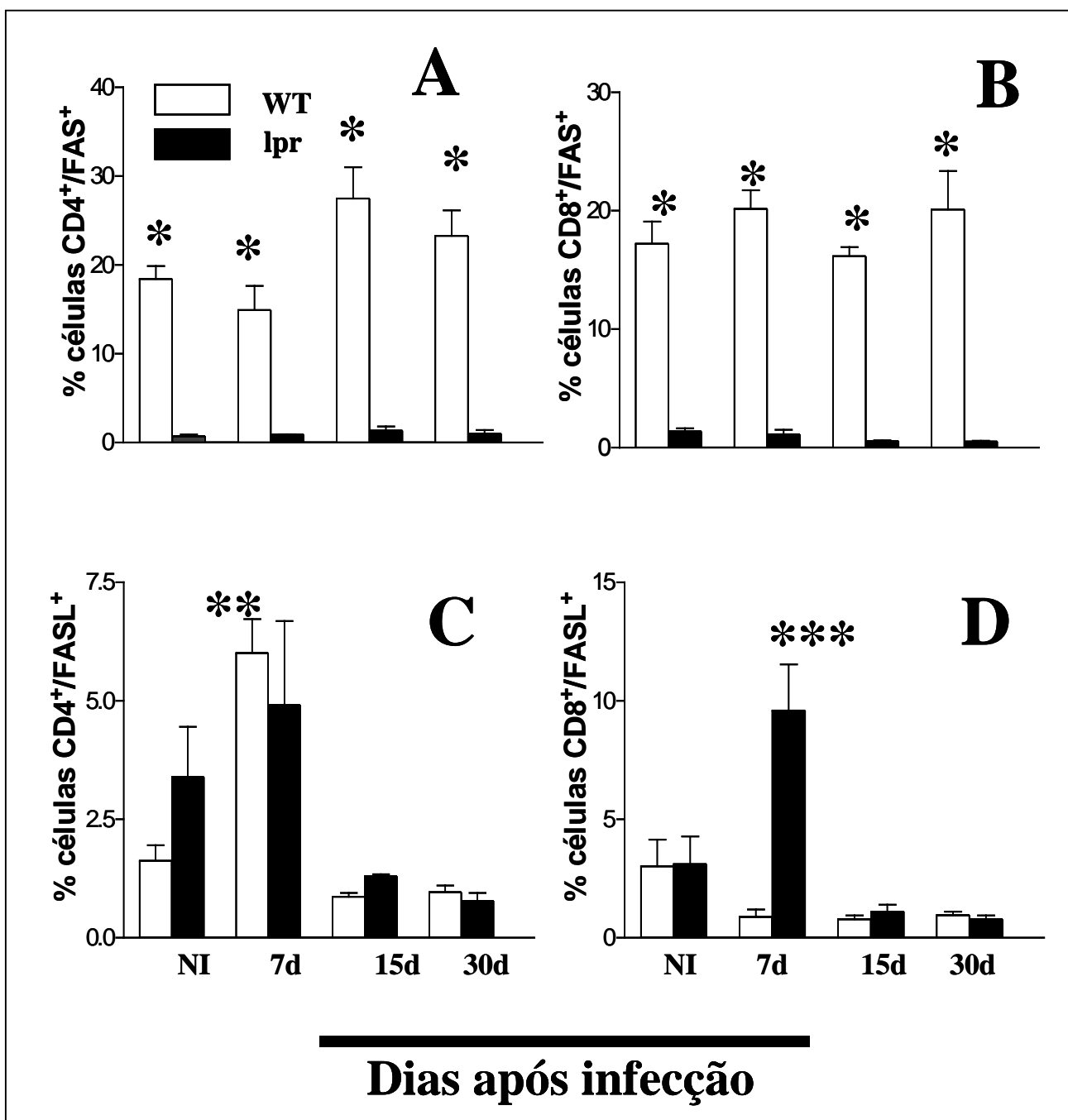


Figura 31. Expressão de moléculas de superfície. Camundongos C57BL/6 e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15 e 30 dias de infecção os pulmões foram retirados, tratados com liberase e triturados em Medimachine®. Células pulmonares foram marcadas com anticorpos específicos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). As células foram selecionadas quanto ao tamanho e granulosidade e analisadas por citometria de fluxo. Cada ponto representa a média \pm SD de amostras em quadruplicatas e são

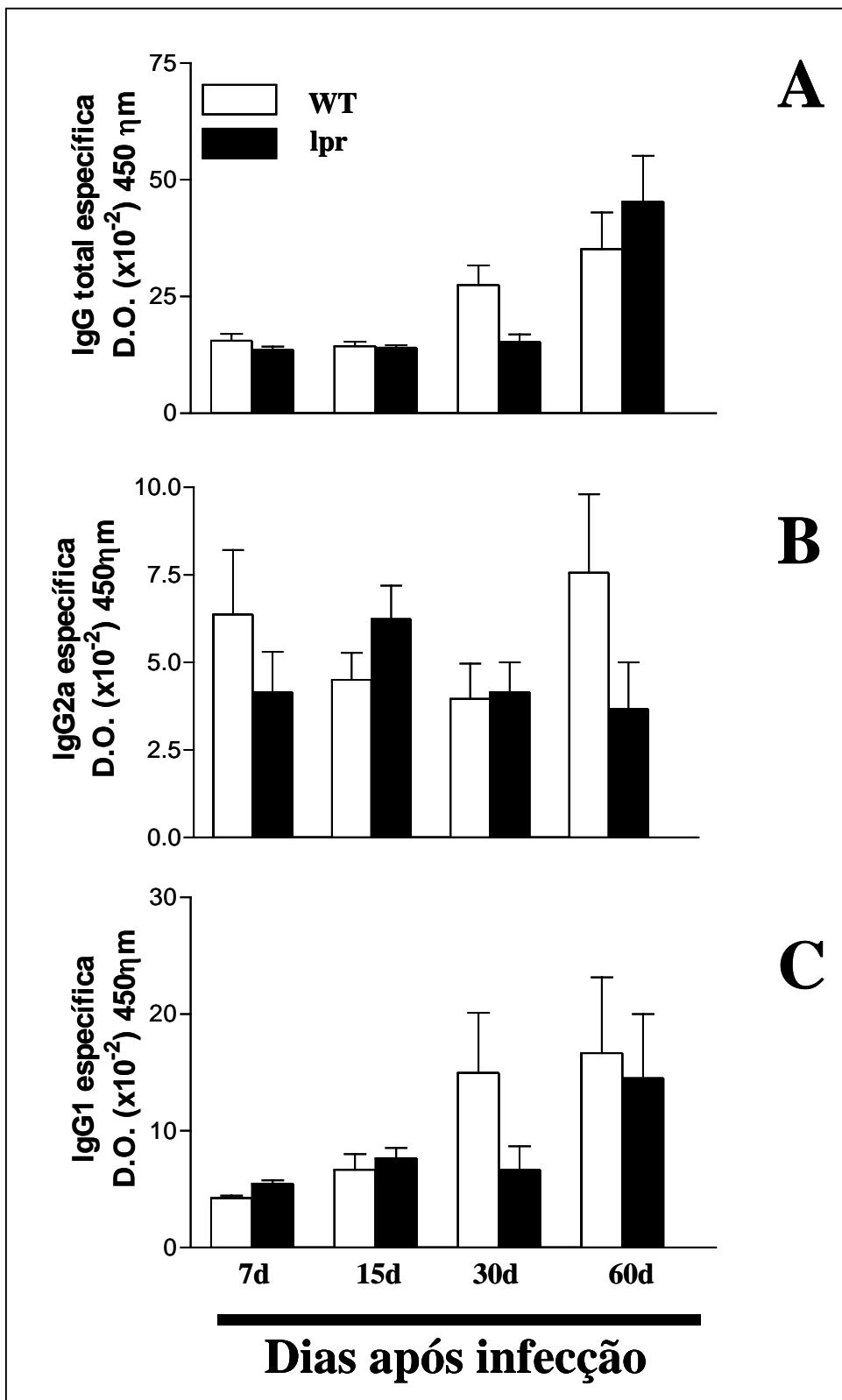


Figura 32. Detecção de Imunoglobulinas específicas ao exoantígeno (EXO) de Pb18 em amostras de soro de animais infectados com *P. brasiliensis*. Camundongos WT e lpr foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção o soro foi retirado e a produção de IgG total (A), IgG2a (B) e IgG1 (C) realizada. Cada ponto representa a média \pm SD do soro proveniente de 3 camundongos. Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

C) DETERMINAÇÃO DO PAPEL DE LINFÓCITOS B E ANTICORPOS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE SISTÊMICA MURINA

1. Susceptibilidade de camundongos WT e BKO ao *P. brasiliensis*

Conforme mostrado anteriormente, em pulmões de animais lpr infectados por *P. brasiliensis* encontramos menor número de células CD19⁺ nos dias 7 e 30 de infecção, comparativamente a animais WT ($p < 0,05$). Além do mais, diversos estudos demonstram que alta quantidade de anticorpos está associada a susceptibilidade à PCM. A fim de compreendermos melhor o papel de linfócitos B e anticorpos na PCM, inicialmente investigamos a sobrevivência de animais deficientes de linfócitos B (BKO) infectados intravenosamente com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 120 dias de infecção cerca de 60% dos animais BKO morreram (Figura 33).

2. Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Nosso próximo passo foi determinar o grau de parasitismo nos órgãos de animais infectados pelo Pb18 (pulmões, fígado e baço). Os animais foram infectados com 10^6 formas leveduriformes do fungo e sacrificados 7, 15, 30, 60 e 90 dias após infecção (Figura 34). No baço houve maior contagem de UFC em camundongos BKO aos 15 dias de infecção em relação aos WT ($p < 0,05$). Conforme o esperado, com o progresso da infecção houve diminuição constante de UFC, e aos 90 dias de infecção não foram encontrados fungos viáveis, tanto em BKO como em WT. No fígado encontramos carga fúngica sempre mais elevada em animais BKO. Aos 60 dias de infecção observamos parasitismo significativamente maior em animais BKO, comparativamente aos WT ($p < 0,05$). Quando realizamos a contagem de UFC nos pulmões ficou evidenciada a grande susceptibilidade de animais BKO. No período de 15 dias

após infecção a quantidade de fungos no pulmão de animais BKO foi aproximadamente o dobro da encontrada em WT ($p < 0,05$). Aos 30 e 60 e 90 dias, semelhantemente, a carga fúngica foi significativamente maior em animais BKO ($p < 0,05$) relativamente aos WT.

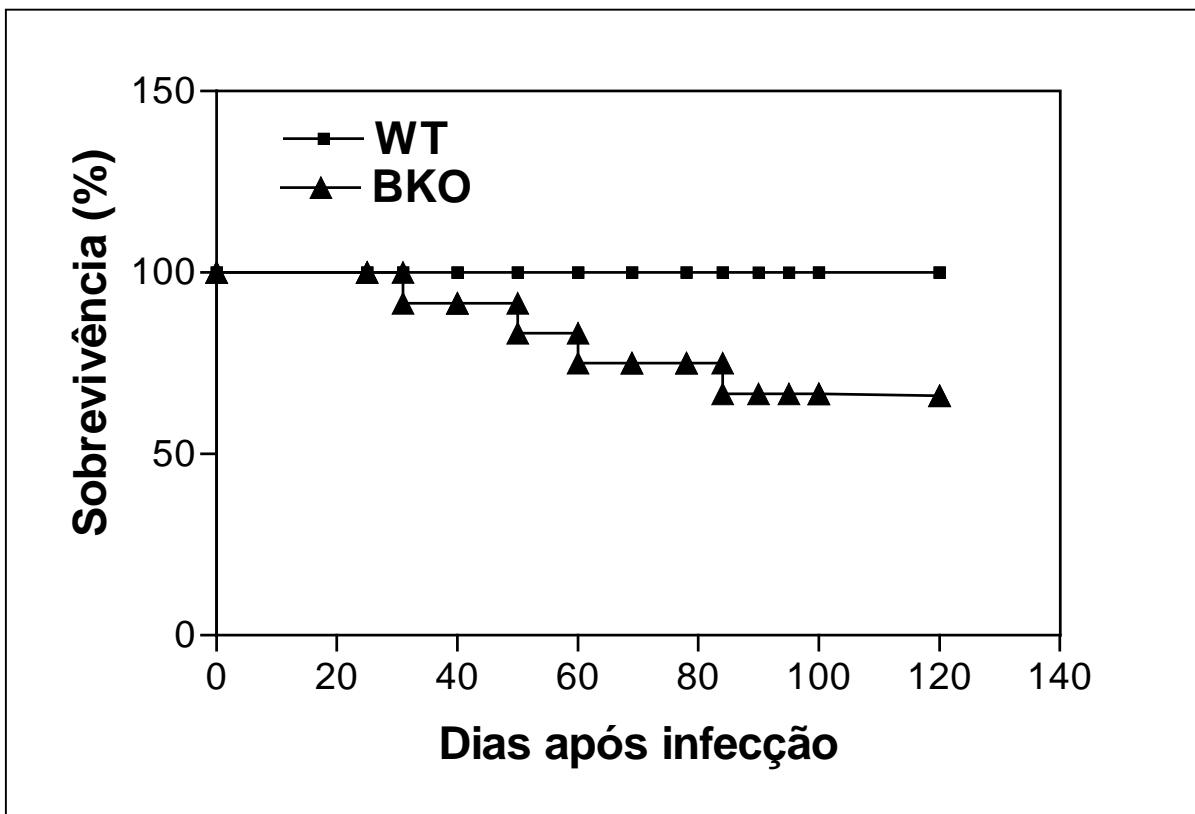


Figura 33: Sobrevivência de camundongos normais (WT) e geneticamente deficientes de linfócitos B (BKO) após infecção com *P. brasiliensis*. Camundongos C57BL/6 e BKO foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes da cepa 18 de *P. brasiliensis*. O tempo de vida dos animais foi avaliado por 120 dias. 10 animais foram utilizados em cada grupo, sendo os dados representativos de dois experimentos independentes.

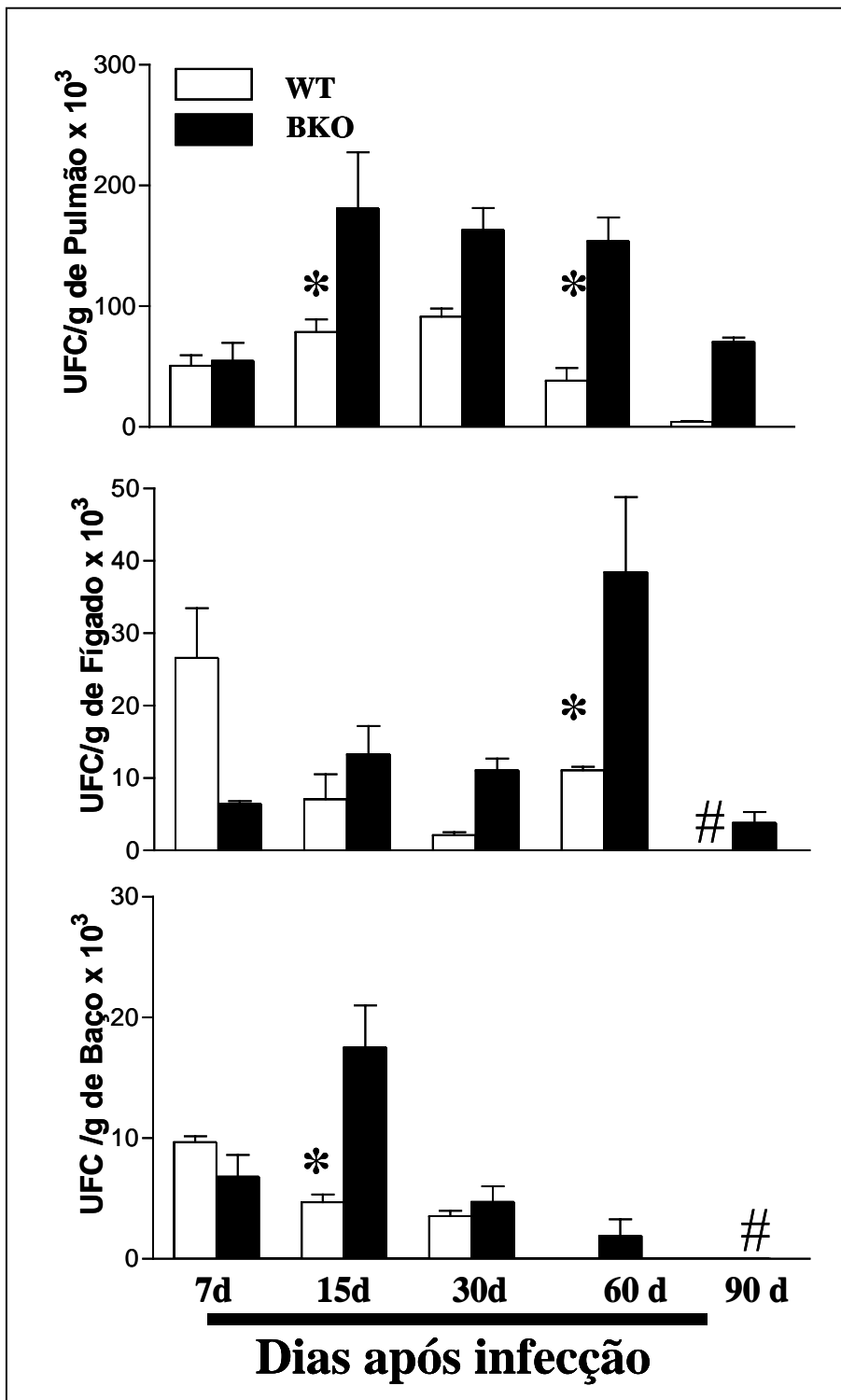


Figura 34. Quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC) nos órgãos de animais WT e BKO infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias de infecção os animais foram sacrificados e tiveram seus órgãos retirados, pesados, homogeneizados e plaqueados em Agar BHI. Após 14 dias foram determinados os valores de UFC no baço, fígado e pulmão. Cada ponto corresponde a 3 animais, sendo os dados

3. Análise Histopatológica de secções pulmonares de animais WT ou BKO infectados por *P. brasiliensis*

Observação do infiltrado inflamatório- Coloração de Hematoxilina & Eosina

Animais BKO e WT foram infectados intravenosamente com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30,60 e 90 dias os animais foram sacrificados e seus órgãos (pulmão, fígado e baço) retirados, fixados e processados em álcool/xilol e incluídos em parafina. A análise histopatológica foi realizada após coloração de H&E (Figura 35 e 36). Em animais WT notamos que 7 dias após a infecção houve um infiltrado inflamatório focal difuso, composto por neutrófilos e células mononucleares, com elementos fúngicos dispersos, esperado nesse período de infecção. Camundongos BKO, no entanto, apresentaram infiltrado inflamatório muito mais intenso. Aos 14 dias já havia granulomas epitelióides organizados em animais WT, com presença de histiócitos, células epitelióides, linfócitos e neutrófilos, com leveduras localizadas centralmente. Nesse período de infecção os animais BKO apresentaram infiltrado inflamatório totalmente difuso, composto por neutrófilos e células mononucleares dispersas, além de leveduras espalhadas pelo parênquima pulmonar. A presença de edema e deposição protéica foi marcante. Em camundongos WT houve aos 30 dias de infecção formação de granulomas bem definidos, composto por histiócitos, células epitelióides, células gigantes agregadas ao redor das leveduras, menor número de neutrófilos e um cinturão externo composto por células mononucleares e fibroblastos. Nesse período, em animais BKO, encontramos um padrão inflamatório misto, predominantemente difuso com muito edema e deposição protéica, além da presença concomitante de granulomas incipientes. Aos 60 dias após infecção notamos em animais WT granulomas bem consolidados e muitas células epitelióides ao redor dos fungos. Em animais BKO notamos ainda um padrão inflamatório misto, com áreas de edema e

deposição protéica e presença de alguns granulomas epitelióides. Aos 90 dias há pequena quantidade de granulomas epitelióides em animais WT, ao passo que em BKO há maior número de granulomas com fungos viáveis, conforme demonstrado pela contagem de UFC.

4. Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH)

A reação de hipersensibilidade tardia (DTH) foi realizada através da injeção de 2 µg de exoantígeno (EXO) nas patas traseiras de animais infectados e não infectados por Pb18 (Figura 37). Vinte e quatro horas após a injeção de EXO a variação de edema nas patas foi medida nos animais 15, 30 e 60 dias após infecção com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Não houve diferença significativa entre os animais BKO e WT analisados nos mesmos períodos de infecção. Contudo, verificamos que houve aumento significativo na DTH em animais BKO aos 30 dias de infecção, relativamente ao período de 15 dias ($p < 0,05$).

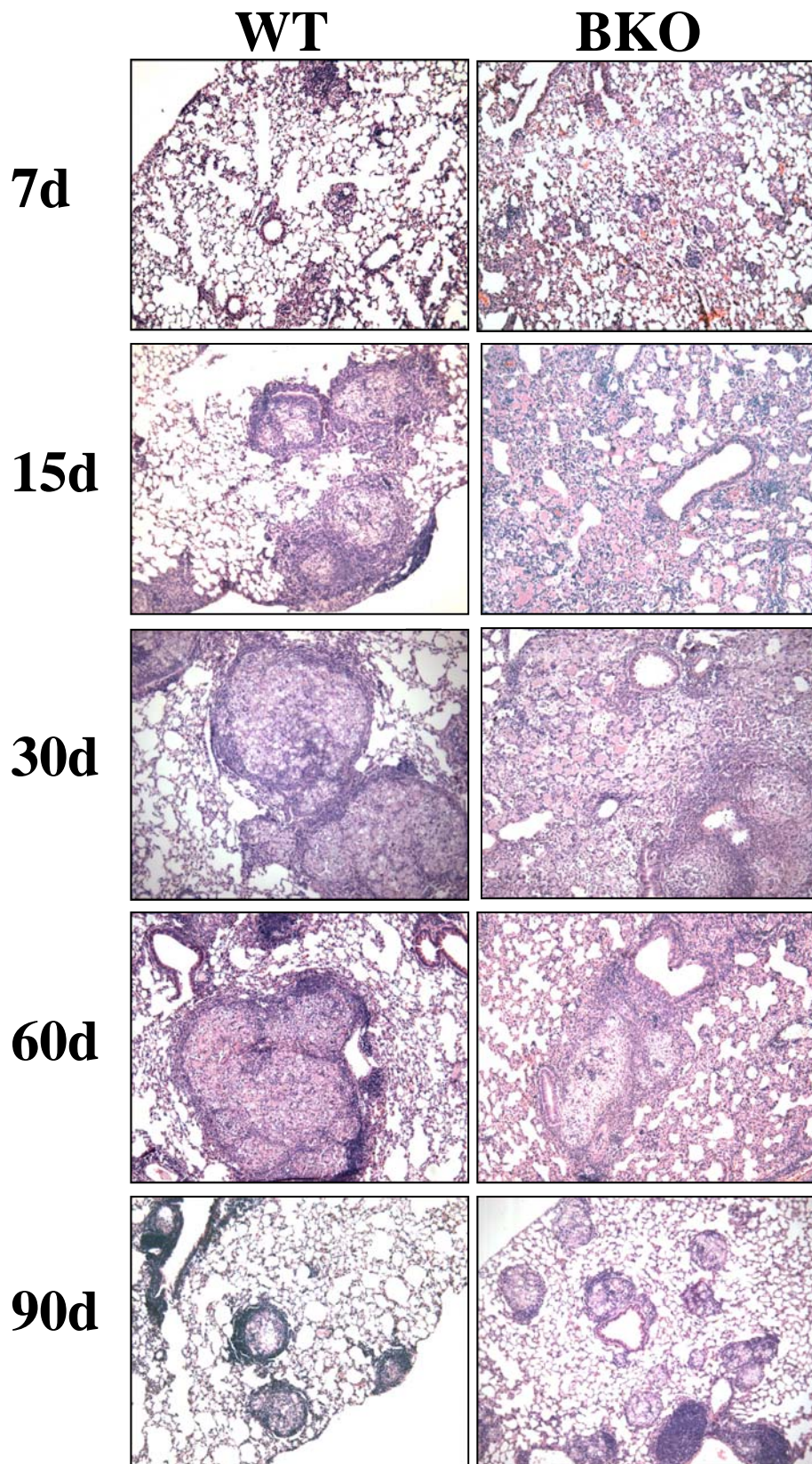


Figura 35. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos WT e BKO. Fotomicrografias foram tiradas 7, 15, 30, 60 e 90 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, C, E, G e I: Animais WT; B, D, F, H e J: Animais BKO. Coloração de Hematxilina & Eosina (H&E), aumento de 1000x.

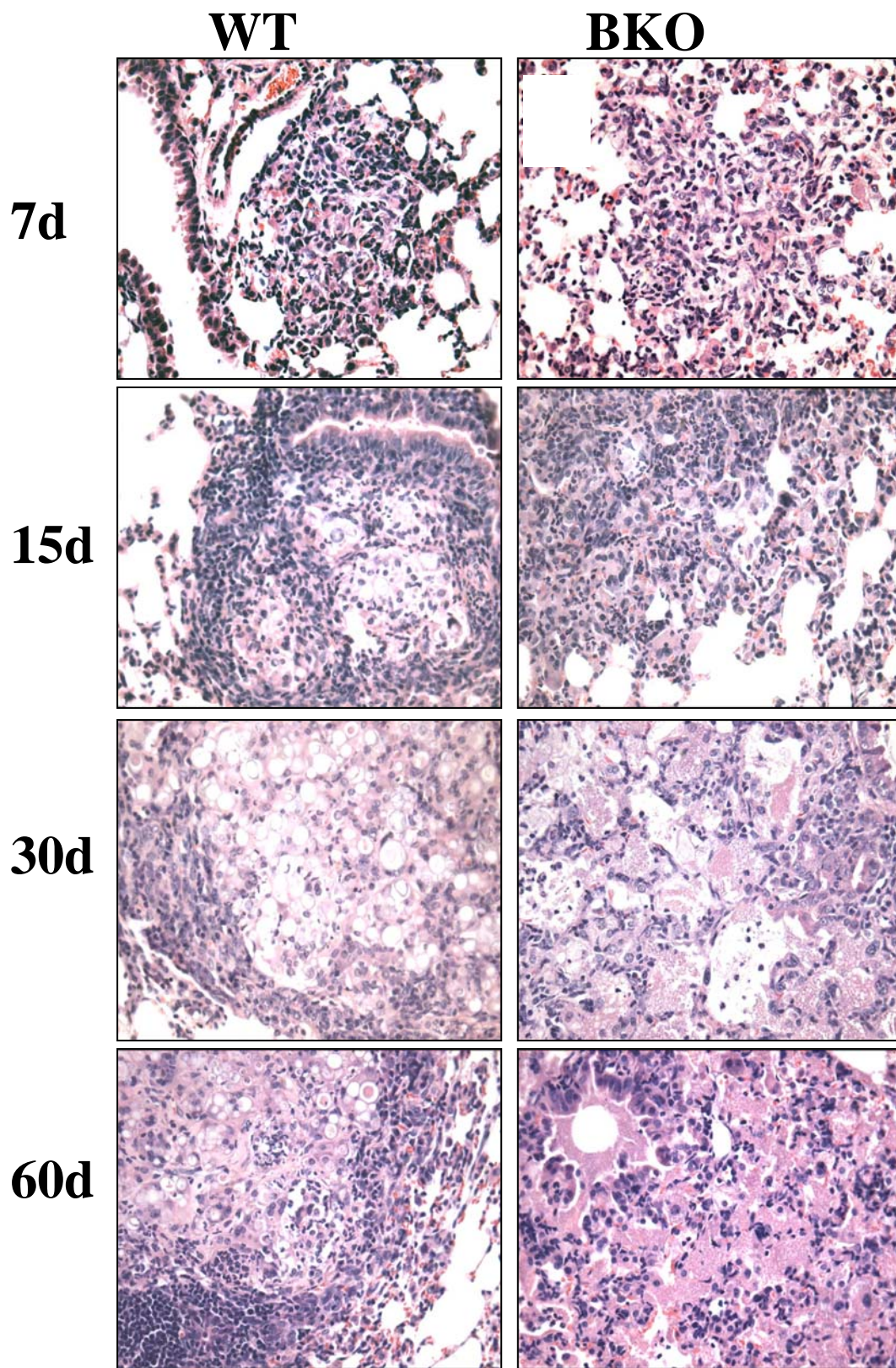


Figura 36. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos WT e BKO. Fotomicrografias foram tiradas 15, 30 e 60 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, C, E e G: Animais WT; B, D, F e H: Animais BKO. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E), aumento de 4000x.

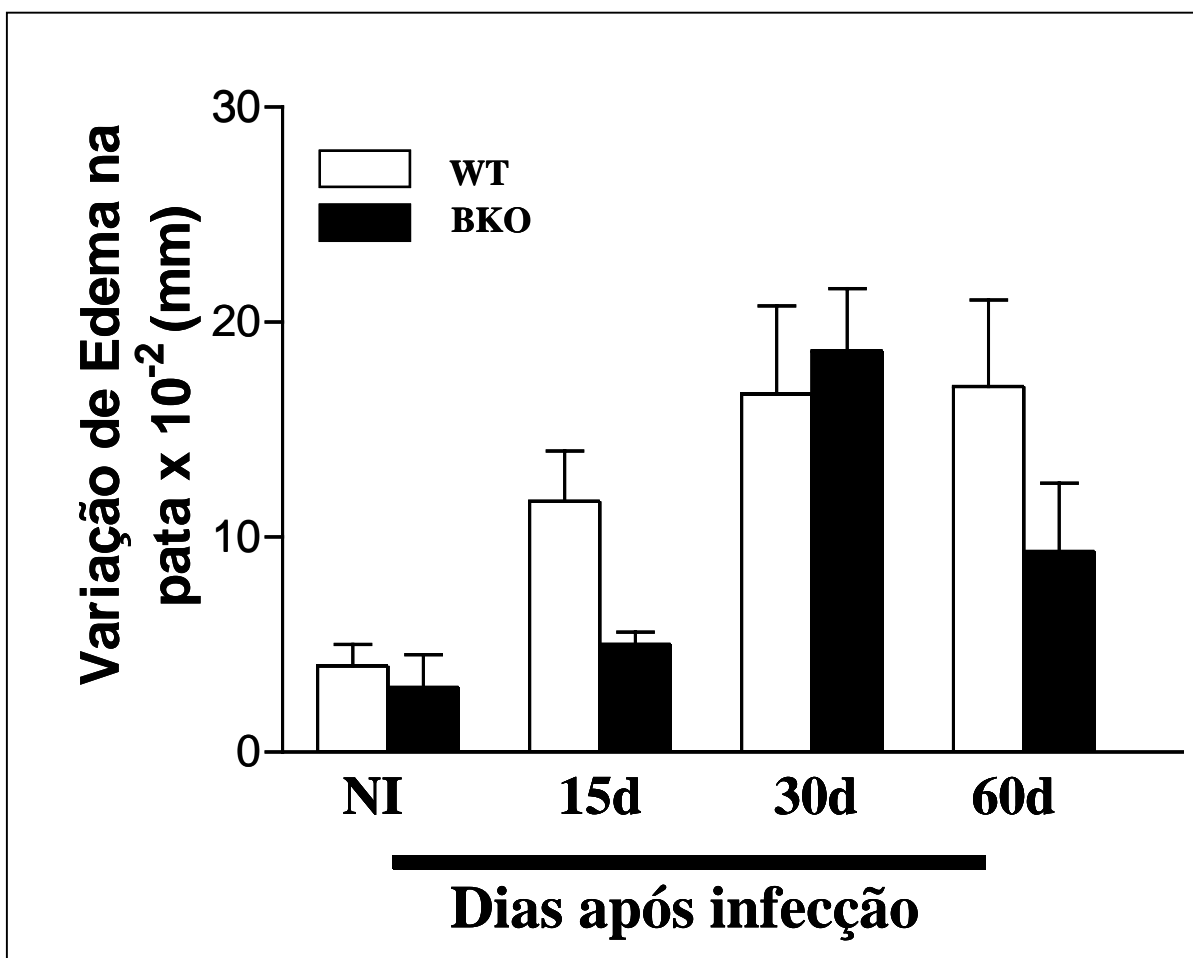


Figura 37. Reação de hipersensibilidade tardia (DTH). Camundongos C57BL/6 e BKO foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Nos dias 15, 30 e 60 após infecção foram desafiados pela injeção de 25 μ l de exoantígeno (EXO) derivados de Pb18 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) na pata traseira, enquanto na outra pata foram injetados 25 μ L de PBS. Vinte e quatro horas após o desafio o aumento de edema na pata foi aferido com paquímetro. Animais não infectados (NI) submetidos ao mesmo protocolo foram usados como controles. Cada ponto corresponde a 3 animais. O resultado apresentado é representativo de dois experimentos independentes.

5. Quantificação de citocinas em lisado pulmonar de camundongos WT e BKO infectados por *P. brasiliensis*

IFN- γ : Animais BKO e WT foram infectados intravenosamente com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. Os níveis de IFN- γ (Figura 38A) foram semelhantes entre animais infectados BKO e WT nas primeiras semanas de infecção, mas maiores em animais BKO ($p < 0,05$) em relação aos animais WT aos 60 dias.

TNF- α : Animais BKO e WT foram infectados intravenosamente com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, 60 e 90 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. Os níveis de TNF- α (Figura 38B) foram semelhantes entre animais infectados BKO e WT nas primeiras semanas de infecção, mas maiores em animais BKO ($p < 0,05$) em relação aos animais WT aos 60 e 90 dias.

IL-10: Animais BKO e WT foram infectados intravenosamente com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. Os níveis de IL-10 (Figura 39A) foram semelhantes entre animais infectados BKO e WT nas duas primeiras semanas de infecção, mas maiores em animais BKO ($p < 0,05$) relativamente aos animais WT aos 30 dias, período em que a contagem de UFC foi significativamente maior em animais BKO.

IL-4: Animais BKO e WT foram infectados intravenosamente com 10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 15, 30, e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e processados para dosagem de citocinas. Os níveis de IL-4 (Figura 39B) foram semelhantes entre animais infectados BKO e WT durante o período analisado.

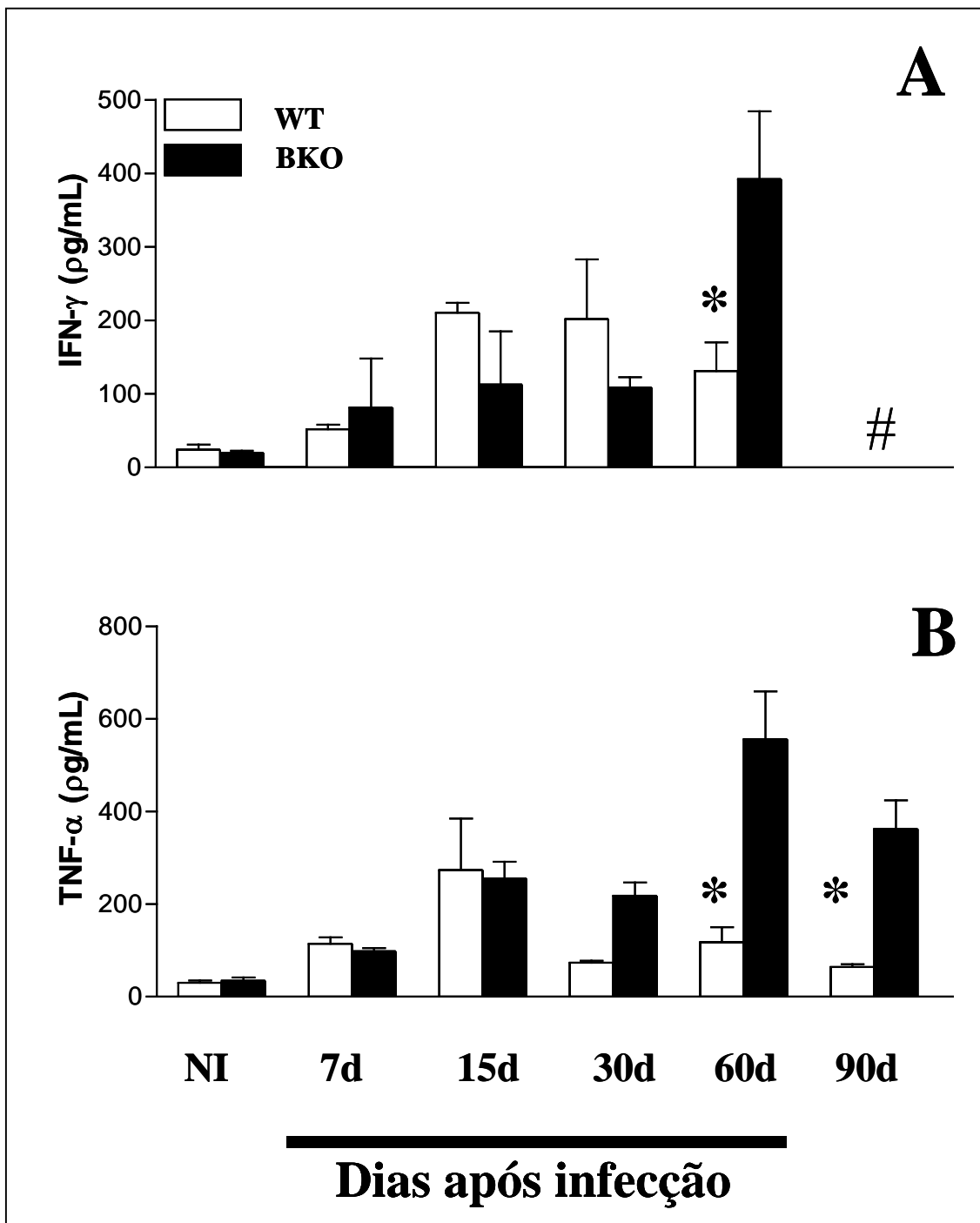


Figura 38. Detecção de citocinas Th1 nos pulmões de camundongos WT e BKO infectados com *P. brasiliensis*. Os animais foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias de infecção os pulmões foram retirados e homogeneizados. O sobrenadante foi colhido e a dosagem de IFN- γ (A) e TNF- α (B) realizada por ELISA. Pulmões de animais não infectados (NI) foram utilizados como controle. Cada ponto representa a média \pm SD de órgãos de 3 camundongos. Resultados representativos de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$, WT vs KO no mesmo período de infecção. # dosagem não realizada.

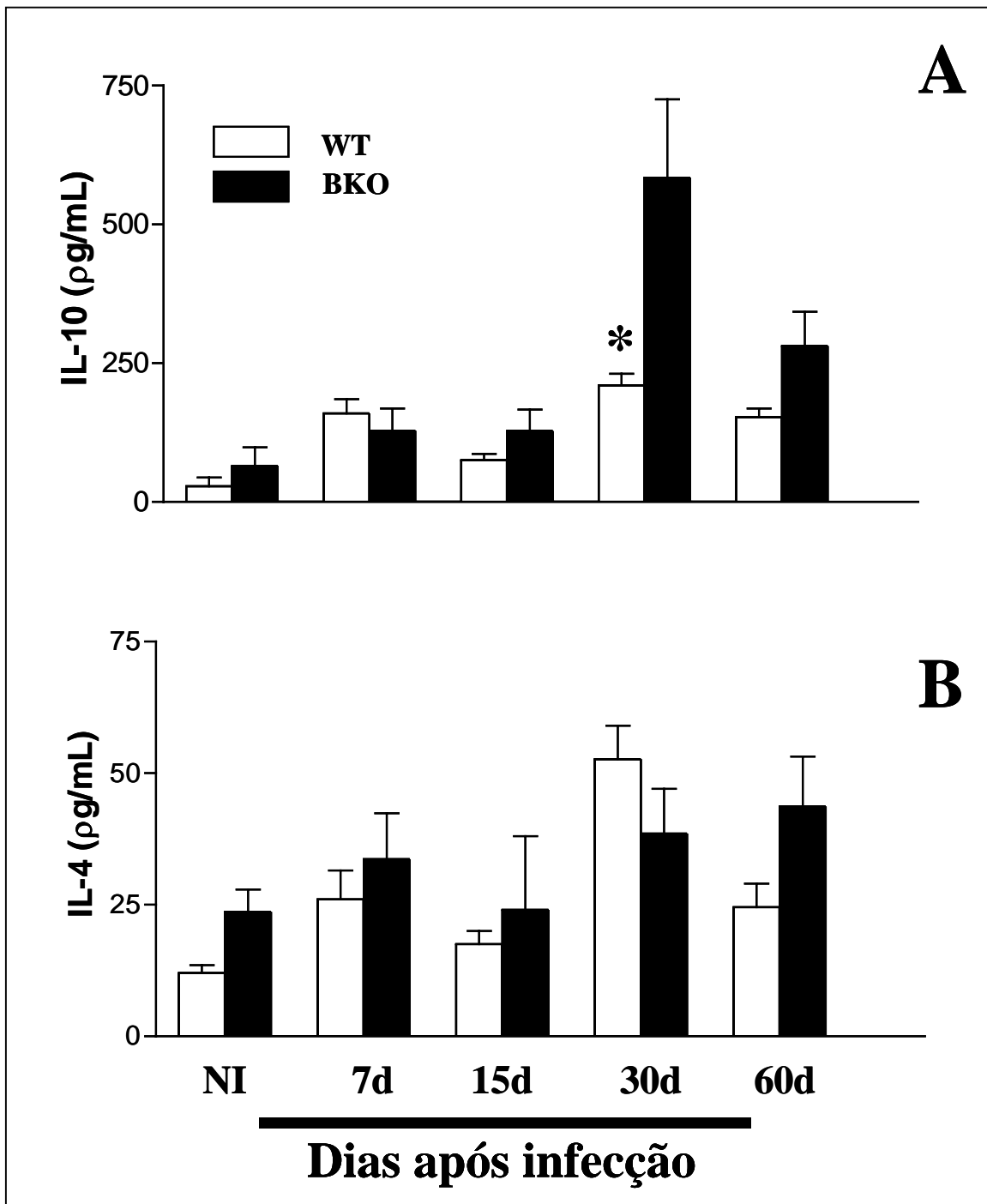


Figura 39. Detecção de citocinas Th2 nos pulmões de camundongos WT e BKO infectados com *P. brasiliensis*. Os animais foram infectados intravenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. Após 7, 15, 30 e 60 dias de infecção os pulmões foram retirados e homogeneizados. O sobrenadante foi colhido e a dosagem de IL-10 (A) e IL-4 (B) realizada por ELISA. Pulmões de animais não infectados (NI) foram utilizados como controle. Cada ponto representa a média \pm SD de órgãos de 3 camundongos. Resultados representativos de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$, WT vs BKO no mesmo período de infecção.

6. Transferência de soro imune para camundongos BKO promove melhora no quadro histopatológico

Os resultados apresentados anteriormente demonstraram que linfócitos B foram importantes na defesa contra PCM, visto que camundongos normais foram mais resistentes que os BKO. Para entendermos se a presença de linfócitos B é requerida para montagem de defesa consistente contra o fungo ou se fatores produzidos por esses linfócitos, como anticorpos, são essenciais para regulação da resposta imune contra *P. brasiliensis*, delineamos um protocolo de transferência de soro. Animais BKO receberam soro um dia antes de inoculação intravenosa de 10^6 formas leveduriformes de Pb18 e também nos dias 4 e 12 de infecção. Sacrificamos os camundongos no 15º dia de infecção e verificamos que tratamento com soro normal ou imune resultou em menor infiltrado inflamatório, com presença de granulomas razoavelmente organizados (Figura 40), enquanto animais que receberam soro de BKO apresentaram, conforme esperado, grandes áreas de edema e infiltrado difuso. Repetimos o protocolo de inoculação de soro e sacrificamos os animais após 30 dias de infecção. Encontramos, contrariamente ao observado aos 15 dias de infecção, um infiltrado desorganizado, com muito edema e deposição protéica (Figura 41). Procuramos verificar se tratamento mais prolongado com anticorpos seria conferiria proteção contra *P. brasiliensis*. Outro grupo de animais foi tratado por tempo mais prolongado com soro (receberam soro nos dias -1, 5, 15 e 25 de infecção) e sacrificados 30 dias após infecção (Figura 42). Na análise histopatológica encontramos formação de granulomas mais organizados nos animais tratados com soro imune, relativamente aos que receberam soro não imune. Animais que receberam soro de BKO apresentaram infiltrado difuso e desorganizado, o que nos mostrou a presença de anticorpos

durante as primeiras semanas de infecção por *P. brasiliensis* é essencial para formação de granulomas organizados que controlam a multiplicação e disseminação do fungo.

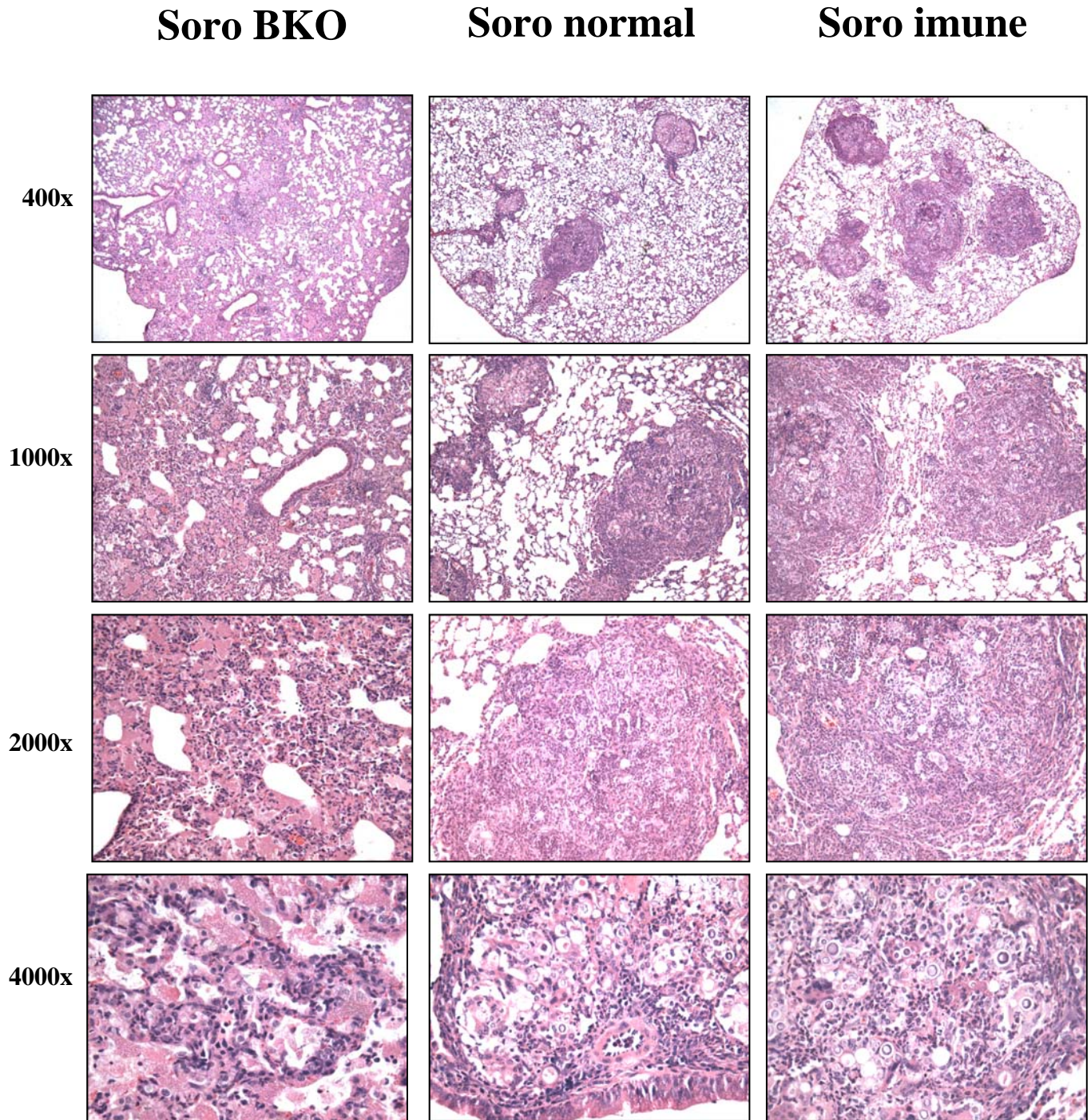


Figura 40. Efeito da transferência de soro. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos BKO tratados com 500 μ L de soro nos dias -1, 5 e 12 após infecção por *P. brasiliensis*. Fotomicrografias foram tiradas 15 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, D, G e J: Animais tratados com soro de BKO; B, E, H e K: Animais tratados com soro normal; C, F, I e L: Animais tratados com soro imune. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E). Aumento indicado.

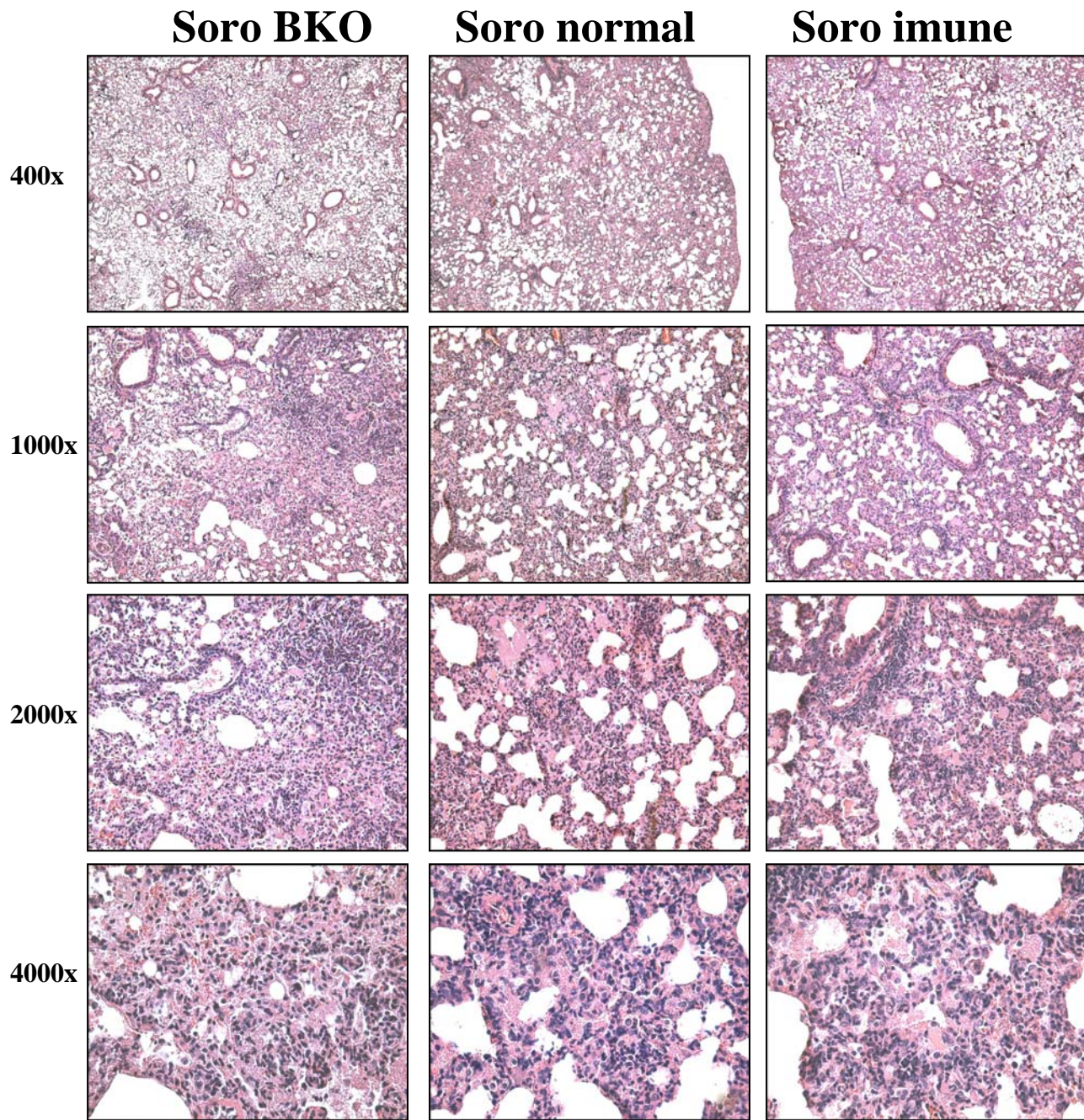


Figura 41. Efeito da transferência de soro. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos BKO tratados com 500 μ L de soro nos dias -1, 5 e 15 após infecção por *P. brasiliensis*. Fotomicrografias foram tiradas 30 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, D, G e J: Animais tratados com soro de BKO; B, E, H e K: Animais tratados com soro normal; C, F, I e L: Animais tratados com soro imune. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E). Aumento indicado.

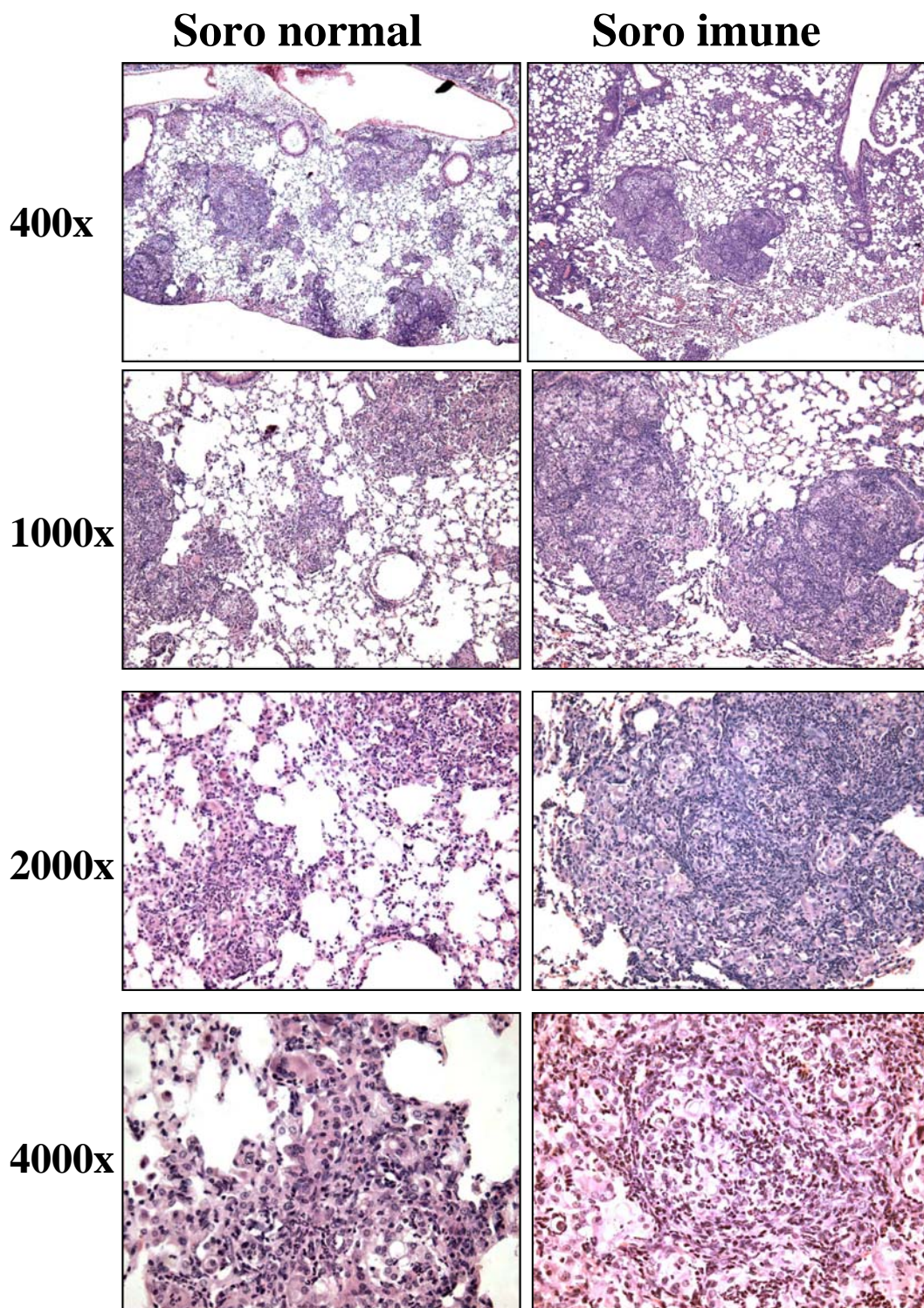


Figura 42. Efeito da transferência de soro. Análise histológica de secções pulmonares de camundongos B612 tratados com 500 μ L de soro nos dias -1, 5, 15 e 25 dias após infecção por *P. brasiliensis*. Fotomicrografias foram tiradas 30 dias após infecção por 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. A, C, E e G: Animais tratados com soro normal; B, D, F e H: Animais tratados com soro imune. Coloração de Hematoxilina & Eosina (H&E). Aumento indicado.

4. DISCUSSÃO

A infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* induz a utilização de todo o repertório da resposta imune. Os elementos da resposta imune celular tanto como da humoral agem integradamente para que o processo de eliminação do fungo seja eficiente e controlado, visto que resposta exacerbada traz conseqüências danosas ao hospedeiro.

Vários estudos demonstraram que a resposta imune celular íntegra é fundamental para proteção contra a paracoccidioidomicose (PCM), com a geração de resposta tipo Th1 e produção de IFN- γ (MURPHY et al, 1998; CANO et al, 1998; KASHINO et al, 2000). O IFN- γ induz produção de NO por macrófagos e sua ausência está implicada em marcante susceptibilidade ao *P. brasiliensis* (SOUTO ET AL, 2000).

Procuramos nesse trabalho estabelecer o papel da IL-18 na PCM. Partimos do pressuposto que, isoladamente, IL-18 não é suficiente para proteção contra *P. brasiliensis*, pois a produção de INF- γ é regulada em grande parte por outras citocinas, como IL-12, em diferentes infecções (Dinarello & Fantuzzi, 2003). Em nosso laboratório foi demonstrado que animais deficientes (KO) de IL-12 foram extremamente susceptíveis à infecção sistêmica por *P. brasiliensis* e apresentaram elevadíssima mortalidade (LIVONESI, 2001). A administração de IL-12 induziu uma infecção menos severa em camundongos (ARRUDA et al, 2002).

Após inoculação de intravenosa de *P. brasiliensis* verificamos que a mortalidade foi pouco maior em animais WT comparativamente ao IL-18 KO (Figura 1). Em princípio esse resultado foi inesperado, visto que nas doenças infecciosas a IL-18 é uma citocina do tipo Th1. Nosso resultado contrasta com o descrito por STUYT et al (2004), que mostraram a fundamental função de IL-18 na proteção em candidíase sistêmica. Esse mesmo estudo, porém, demonstrou

que a IL-12 é dispensável na proteção contra *Candida albicans*. Nossos resultados são diferentes também em relação à infecção por *Cryptococcus neoformans*, onde IL-18 também é fundamental para resistência e sobrevivência (KAWAKAMI et al, 1997).

Quando analisamos a carga parasitária nos órgãos após infecção sistêmica por *P. brasiliensis* verificamos que houve, durante todo o período de infecção analisado, contagem semelhante de UFC no baço e fígado dos animais WT e IL-18KO (Figura 2). No entanto, aos 30 dias de infecção, a quantidade de fungos foi significativamente maior nos pulmões de camundongos WT. Nossos resultados são mais uma vez diferentes do observado em infecção por *C. neoformans* e *C. albicans*, onde ausência de IL-18 promove maior carga fúngica (ZHANG et al, 1997; NETEA et al, 2003). Esses resultados mostraram que IL-18, ao menos em nosso modelo experimental, não exerce função essencial. Ao contrário, há maior susceptibilidade em animais WT.

Nas análises histopatológicas (Figuras 3 e 4) dos animais infectados por *P. brasiliensis* não encontramos diferenças substanciais no padrão de formação dos granulomas epitelióides, tanto em animais IL-18KO quanto WT.

A produção de óxido nítrico (NO) é fundamental para proteção contra vários tipos de patógenos. No entanto, não encontramos níveis diferentes de NO no soro de animais IL-18 WT (figura 7). Nosso resultado está em concordância com o estudo sobre tuberculose experimental (SUGAWARA et al, 1999), onde também níveis iguais de NO foram encontrados em animais IL-18KO e WT.

Quando analisamos a produção de IL-12 e IFN- γ nos animais KO encontramos resultados semelhantes àqueles de WT (figura 8). No entanto, maior produção de TNF α foi encontrada em animais WT aos 60 dias de infecção. Nesse período, a contagem de UFC (maior em WT aos 30

dias de infecção, figura 2) voltou a ser semelhante à encontrada em animais KO. Encontramos em nossas dosagens de citocinas Th2 a mesma produção de IL-4. No entanto, a produção de IL-10 (figura 9) foi significativamente maior em WT que em KO, no período em que a contagem de UFC foi maior nos animais normais.

Em nosso modelo experimental a participação de IL-18 é dispensável na proteção contra *P. brasiliensis*. Nossa conclusão está em acordo com de outros autores. PATERSON et al (2005) infectaram animais IL-18KO e BALB/c intranasalmente com cepas diferentes de *Streptococcus pneumoniae* e mostraram a participação de IL-18 na diminuição de carga parasitária depende da via de inoculação do patógeno ou da cepa utilizada. O "background" genético parece ser muito importante também quando se avalia função de IL-18. Quando o mesmo experimento foi realizado em animais C57BL/6, animais IL-18KO foram susceptíveis (LAUW et al, 2002). Nos estudos com *Leishmania major* a importância de IL-18 também varia com background genético do animal infectado e tempo de infecção. WEI et al (1999) mostraram que camundongos IL-18 KO de linhagem C57BL/6 são mais susceptíveis, enquanto MONTEFORTE et al (2000) mostraram que são resistentes, quando o período de observação foi maior. Animais BALB/c são normalmente susceptíveis a *L. major*, mas quando deficientes de IL-18 apresentam resistência a infecção (WEI et al, 2004). Em suma, o papel da IL-18 nas infecções é muito complexo, variando muito dependendo das condições experimentais.

IL-18 é uma citocina pleiotrópica, que entre outras funções eleva a expressão de Fas/FasL (HASHIMOTO et al, 1999; FAGGIONI et al, 2001). A ativação da via Fas/FasL pode induzir apoptose, importante para controle da resposta ou inflamação. Nossas análises em citometria de fluxo mostraram que *P. brasiliensis* induziu aumento de Fas/FasL em linfócitos CD4⁺ e CD8⁺

(figura 10). No entanto, houve elevação somente quando comparamos animais infectados aos não infectados. Entre IL-18KO e WT não encontramos diferente expressão.

Nossos resultados nos levam a pensar que IL-18 exerce inicialmente uma função predominantemente regulatória nas primeiras semanas de PCM (figura 9). Houve aumento de TNF- α aos dois meses de infecção, o que pode representar um efeito compensatório à elevação de IL-10. Foi demonstrado que há aumento de IL-18 no soro de pacientes com a forma aguda de PCM (CORVINO et al, 2004). Portanto, na PCM IL-18 realmente parece exercer função, se não Th2, associada a susceptibilidade, com certeza irrelevante. Alguns trabalhos têm proposto a utilização de IL-18 como adjuvante terapêutico contra *C. albicans* e *C. neoformans* (ZHANG et al, 1997; STUYT et al, 2004), mas nossos resultados (somados com o estudo de CORVINO et al (2004)) nos permitem sugerir que, no tratamento da PCM, a instituição terapêutica de IL-18 não seria efetiva.

Por tratar-se de citocina normalmente Th1, esperávamos que após infecção por *P. brasiliensis* animais WT apresentariam aumento da expressão de Fas/FasL, o que não ocorreu. Contudo, vimos que infecção por *P. brasiliensis* induziu aumento de Fas/FasL, tanto em IL-18KO como em WT (figura 10). Assim, nos pareceu que esse poderia ser um mecanismo de evasão do fungo, já que infecção por outros patógenos induz apoptose de leucócitos pela via Fas/FasL. Monócitos de pacientes com PCM tiveram, após exposição a antígenos de *P. brasiliensis*, aumento de expressão de Fas/FasL e apoptose (CAMPANELLI et al, 2003).

Procuramos investigar em modelo experimental de PCM sistêmica se *P. brasiliensis* induziria apoptose via Fas/FasL de leucócitos pulmonares. Em nosso trabalho utilizamos animais lpr, que apresentam Fas truncado. Na literatura há diversos trabalhos mostrando que ausência de Fas conduz à autoimunidade (CHEN et al, 1998; GREEN, 2003; KRUEGER et al,

2003; LI-WEBER & KRAMER, 2003). O camundongo utilizado em nosso trabalho é de linhagem C57BL/6, apresenta pouca predisposição a doença linfoproliferativa e, dos quatro loci que predispõem à doença autoimune, possuem apenas o *Lmb1* (WESTON et al, 1988; VIDAL et al, 1998). Confirmamos histopatologicamente que camundongos *lpr* não infectados não apresentaram sinais evidentes de autoimunidade, como por exemplo infiltrado inflamatório no fígado e pulmões (figura 12), órgãos mais afetados em animais deficientes de Fas (ADACHI et al, 1996).

Tínhamos a idéia pré-concebida que *lpr* apresentaria menor taxa de apoptose, devido à ausência da via Fas/FasL, e que dessa maneira eliminassem o fungo mais rapidamente. Quando inoculamos os animais com *P. brasiliensis*, verificamos uma taxa de sobrevivência de 100% (figura 11). Esse resultado era esperado. Contudo, quando analisamos contagem de UFC, surpreendentemente os animais *lpr* demandaram mais tempo para eliminação do fungo. (figura 13). A análise histopatológica nos mostrou, contudo, maior organização dos granulomas em animais *lpr* (figura 14 e 15). Assim, camundongos *lpr* formam granuloma epitelióide mais rapidamente, mas não eliminam o fungo com a mesma eficiência que animais WT.

Quando analisamos secções pulmonares de animais infectados por *P. brasiliensis*, notamos em animais WT grande presença de fibras de colágeno randomicamente dispersas pelo granuloma, evidenciada pela coloração de Tricromo-Masson (figura 19). No entanto, encontramos sempre menor presença de colágeno em granulomas de animais *lpr*, quando comparados aos WT no mesmo período de infecção. Nosso resultado mostra que a via Fas/FasL é necessária para remodelamento tecidual na PCM. De fato, a ligação Fas/FasL é fundamental para mecanismo de reparo tecidual em modelo experimental de fibrose pulmonar (HAGIMOTO et al, 1997; MATUTE-BELLO et al, 2001). Em humanos, infecção por *P. brasiliensis* provoca

sequelas fibróticas. Na PCM experimental murina, porém, nem sempre ocorrem sequelas fibróticas (RESTREPO et al, 1992).

Quando verificamos a DTH encontramos menor valor em lpr aos 30 dias, comparativamente aos animais WT (figura 20). Nesse período, a contagem de UFC foi maior em lpr, mostrando que linfócitos de camundongos lpr exibem falha na resposta aos antígenos de *P. brasiliensis* que possivelmente compromete a resposta celular.

Os neutrófilos (NØ) são os primeiros leucócitos a chegar ao sítio inflamatório e exercem fungistase nas primeiras semanas da PCM. Foi demonstrado que NØ de animais MRL/lpr apresentavam menor migração após injeção intraperitoneal de tioglicolato, comparativamente aos animais normais (GRESHAM et al, 1991). Além disso, FasL provoca inflamação neutrofílica, o que sugere papel importante de Fas no recrutamento de NØ (SEINO et al, 1998; OTONELLO et al, 1999; WAKU et al, 2000). A ligação de FasL solúvel (sFasL) ou FasL não induzem apoptose de NØ, devido ao aumento da produção de glutathione e diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas e pró-caspases 3 e 8 (WATSON et al, 1997; LE'NEGRATE et al, 2003; HU et al, 2004). Procuramos conhecer melhor a composição do infiltrado inflamatório de animais lpr durante a PCM. Para tanto, fizemos análise por citometria de fluxo. Optamos por estudar o infiltrado inflamatório dos pulmões de animais infectados por *P. brasiliensis* em um período de até 30 dias, quando há ainda presença de NØ e formação de granulomas compactos em animais lpr e WT. Como mostramos na figura 21B, não houve diferença percentual de neutrófilos (NØ), ao contrário do que esperávamos. Contudo, o número absoluto de leucócitos encontrados nos pulmões de animais lpr foi sempre maior. Verificamos também que os percentuais de células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ permaneceram iguais em ambos grupos. Encontramos diferença significativa na população de células CD19⁺ (linfócitos B), que

estão diminuídas proporcionalmente em animais lpr após infecção (figura 21D). Esse resultado nos instigou a novas investigações, que relataremos mais adiante. A demora na eliminação do fungo não pôde, portanto, ser atribuída a uma diferente composição do infiltrado inflamatório, ao menos no que diz respeito à presença de linfócitos T e NØ.

Alguns trabalhos mostram que NØ de animais lpr têm, além de menor migração a estímulos inflamatórios, diminuição das funções oxidativas e digestivas. Em regra, após inoculação de tioglicolato, a maior parte do leucócitos é composta por NØ nas primeiras horas da estimulação. Injetamos tioglicolato de sódio na cavidade peritoneal e observamos, após duas horas, resultado diferente daquele descrito em outros trabalhos: houve migração semelhante entre leucócitos de animais lpr e WT (figura 25A). Essa diferença pode ser devido à linhagem genética dos animais estudados. Encontramos, porém, diferença considerável quando analisamos a aderência dos leucócitos (figura 25B). Os leucócitos (provavelmente NØ) de animais lpr aderiram menos ao endotélio. Contudo, não podemos afirmar categoricamente que NØ apresentem esse padrão de migração e aderência durante a PCM, que envolve mecanismos mais complexos de regulação. Em nosso modelo, a migração de NØ obviamente não pode ser dirigida via Fas. Investigamos então se aumento de quimiocinas seria responsável pela migração das células aos pulmões. Conforme mostrado na figura 26, houve realmente elevação nos pulmões de animais infectados pelo *P. brasiliensis* aumento das quimiocinas KC e MIP-1 α , importantes para recrutamento de NØ.

A produção de mieloperoxidase (MPO) por NØ de animais lpr é diminuída em relação a animais WT (GRESHAM et al, 1991). Nossos resultados, contudo, mostraram que animais lpr infectados por *P. brasiliensis* apresentam a mesma acumulação de MPO por NØ que animais WT (figura 27).

A principal citocina protetora na PCM é o IFN- γ , responsável pelo incremento da produção de óxido nítrico por macrófagos. Há relatos de que camundongos lpr produzem mais IFN- γ que seu correspondente selvagem, C3H (DAVIDSON et al, 1991). Quando dosamos IFN- γ nos pulmões de animais infectados não encontramos diferença importante entre os grupos de animais (figura 28A). Ao analisarmos a produção de IL-10, (figura 28B) encontramos valores muito elevados em animais lpr, em um período em que a contagem de UFC foi maior nesses animais. IL-10 é um potente agente regulatório, e poderia dessa forma interferir na ação protetora proporcionada por IFN- γ . Encontramos significativamente maiores de NO em animais lpr aos 30 dias de infecção (figura 29). Contudo, o aumento de IL-10 no mesmo período pode contrapor-se ao efeito protetor de NO, determinando maior contagem de UFC. Nossos resultados estão em acordo com aqueles de CONCEICÃO-SILVA et al (1998), que mostraram em linfonodos de animais lpr infectados por *L. major* uma produção semelhante de NO e IFN- γ .

Indução de apoptose é um mecanismo de evasão utilizado por diversos patógenos. *P. brasiliensis* induziu apoptose de células epiteliais *in vitro* (MENDES-GIANNINI et al, 2004). Monócitos de pacientes com PCM expressavam mais Fas e FasL e marcavam-se por Anexina V, característica comum às células apoptóticas (CAMPANELLI et al, 2003). Assim procuramos identificar experimentalmente se *P. brasiliensis* induz apoptose de leucócitos. Os linfócitos são células mais sensíveis à morte celular por ativação (DAVIDSON et al, 2002) e coordenam a regulação da resposta granulomatosa. Conforme demonstrado na figura 30, verificamos que infecção por *P. brasiliensis* induziu apoptose de linfócitos. Contudo, aumento expressivo de apoptose ocorreu somente na primeira semana de infecção, provavelmente pelo excesso de antígenos disponíveis no início da infecção. Com o progresso da infecção e formação de

granulomas, há menor disponibilidade de antígenos fúngicos, pois macrófagos encarceram os fungos no centro da lesão. Nesse momento a maior parte dos linfócitos encontra-se na área externa do granuloma. Obtivemos um resultado inesperado após nossas análises: observamos maior apoptose em animais lpr, o que evidencia que *P. brasiliensis* pode induzir apoptose não só pela via Fas/FasL, mas também por outros mecanismos.

Analisamos então a expressão de Fas/FasL (figura 31) em linfócitos, para estimarmos em que nível a apoptose seria induzida por essa via. Durante o curso da infecção não encontramos aumento de Fas significativo, mas o aumento de FasL foi evidente, tanto em linfócitos CD4⁺ como em CD8⁺, de animais WT e lpr. Em animais WT, o aumento de expressão de FasL traduziu-se em maior apoptose, mesmo que a expressão de Fas não tenha aumentado, pois FasL é um trímero, necessitando de pequeno aumento para indução de apoptose. No entanto, nos animais lpr, apoptose não pode ser atribuída somente à via Fas/FasL, visto que a expressão de Fas nos linfócitos desses animais é cerca de 10x menor que o normal (Chu et al, 1993). Isso nos permite sugerir que *P. brasiliensis* induz apoptose de linfócito por diferentes vias.

Na PCM os anticorpos são associados com susceptibilidade (ARANGO et al, 1982; CANO et al, 1995; BISELLI et al, 2001). Realmente, indivíduos com PCM ativa apresentam altos índices de anticorpos em uma resposta policlonal, o mesmo ocorrendo em modelos experimentais. Entretanto, cabe lembrar que anticorpos podem ser protetores também (BIAGIONI et al, 1987; CANO et al, 1995). O excesso de anticorpos na PCM é que pode aumentar susceptibilidade, promovendo formação de imunocomplexos. Encontramos em animais WT e lpr aumento substancial de imunoglobulinas totais específicas a exoantígeno de *P. brasiliensis* somente 60 dias de infecção (figura 32). Porém a produção foi semelhante entre animais WT e lpr. Mostramos que houve menor percentual de linfócitos B em granulomas de

camundongos lpr (figura 21). Porém, devido à produção semelhante de imunoglobulinas entre camundongos lpr e WT em resposta ao *P. brasiliensis*, não podemos atribuir a essa redução de linfócitos B a maior susceptibilidade de animais lpr à PCM.

Os linfócitos B são responsáveis, além da produção de anticorpos, pela apresentação de antígenos e produção de citocinas. Procuramos então investigar se, em nosso modelo experimental, ausência de linfócitos B e portanto também de anticorpos haveria proteção contra *P. brasiliensis*. Infectamos animais deficientes de linfócitos B (BKO) de linhagem C57BL/6, Conforme mostrado na figura 33, animais BKO foram mais susceptíveis ao *P. brasiliensis* que animais WT. A contagem de UFC deixou evidente a maior susceptibilidade de animais BKO (figura 34). Na análise histopatológica de animais BKO infectados (figuras 35 e 36) encontramos uma intensa inflamação, mas desorganizada e com muitas áreas de edema. Alguns estudos têm relacionado aos linfócitos B direcionamento de resposta tipo Th2 (FERREIRA et al, 2003). Verificamos em dosagens nos pulmões que animais BKO apresentam aumento de IFN- γ ao dois meses de infecção (figura 38A), período em que a contagem de UFC diminuiu em relação ao mês anterior. Semelhantemente, a produção de TNF- α (figura 38B) também aumentou em períodos mais tardios da doença, quando a contagem de UFC diminuiu. Se esses resultados fossem olhados isoladamente, induziriam a idéia de que a ausência de linfócitos B é benéfica. Devemos, porém, perceber que a produção de IFN- γ e TNF- α é semelhante entre camundongos BKO e WT até 30 dias de infecção. O aumento de IFN- γ e TNF- α seria na verdade um mecanismo de compensação utilizado por animais BKO para contenção da infecção. Quando quantificamos IL-10 encontramos valores mais elevados em animais BKO. Nosso resultado está em concordância com o descrito por ALMEIDA et al (1998), onde linfócitos B de animais susceptíveis estimulam linfócitos T produtores de altos níveis de IL-10.

A principal citocina Th2 envolvida na PCM é IL-4 (PINA et al, 2004). Não encontramos, no entanto, diferença significativa na produção de IL-4 entre animais WT e BKO.

O tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos pelo emprego de anticorpos tem sido empregado, com resultados diversos, de protetores a não protetores. (PEARSALL et al, 1978; MATTHEWS & BURNIE, 1992; HAN et al, 2000). Há , entretanto, poucos estudos sobre o uso de anticorpos no tratamento da PCM, até porque nessa micose anticorpos são associados com susceptibilidade. Foi demonstrado, porém, que anticorpos anti-gp70 de *P. brasiliensis* foram capazes de impedir o estabelecimento da doença (de MATOS GROSSO et al, 2003).

Em nossos experimentos, quando administramos soro imune (obtido conforme descrito em materiais e métodos) intraperitonealmente em animais BKO obtivemos resultados interessantes. Nos animais que receberam soro de BKO não houve nenhuma evolução do estado inflamatório, que permaneceu desorganizado e edemaciado (figura 40). Houve diminuição do infiltrado inflamatório e presença de granulomas organizados nos animais que receberam soro imune. Contudo, animais que receberam soro não imune também apresentaram inflamação mais organizada. Nossa primeira conclusão é que a proteção provavelmente foi devida a anticorpos, pois os outros fatores séricos que poderiam interferir na resposta (complemento, citocinas, etc) estavam presentes nos três “pools” de soros utilizados. Em relação à resposta com soro não imune, cremos que pode dever-se à presença de anticorpos anti-glucanas, de ocorrência comum em diversos animais. Glucanas são polissacarídeos constituintes da parede celular de fungos, patogênicos ou não. Nossos animais foram mantidos em salas climatizadas e limpas diariamente, mas não é improvável que em algum momento tenham entrado em contato com fungos ambientais.

Em relação ao estabelecimento do tratamento mais eficaz, verificamos que a transferência de soro deve ser mantida por tempo prolongado. Animais que receberam 3 inoculações de soro e foram sacrificados aos 30 dias de infecção não apresentaram melhora no infiltrado, ao passo que aqueles que receberam 4 inoculações (sendo a última apenas 5 dias antes do sacrifício) apresentaram melhora consistente, significando que o soro deve ser administrado continuamente. No tratamento prolongado com soro não imune a contribuição para formação de infiltrado organizado ocorreu também, porém não de maneira eficiente com soro imune. O que poderia explicar essa diferença é o fato de que aos 30 dias de infecção, com a multiplicação das leveduras, é necessária a presença maior de anticorpos específicos contra *P. brasiliensis*, presentes apenas no soro imune. No entanto, só poderemos certificar nossas suspeitas com uso de anticorpos purificados, que afastariam qualquer dúvida.

Como descrevemos anteriormente, há formação de grandes áreas de edema nos pulmões de animais BKO infectados por *P. brasiliensis*. Em nosso trabalho observamos que administração de anticorpos, além de promover organização da inflamação, diminuiu a formação de edema pulmonar. Situação semelhante foi mostrada após instilação de anticorpos específicos nos pulmões de camundongos infectados por *P. aeruginosa* (FAURE et al, 2003). Nesse estudo, a administração de imunoglobulinas, além de proteger os animais, diminuindo a carga bacteriana e o edema pulmonar. Resultado semelhante foi demonstrado em modelo experimental com ratos (ERNST et al, 1999). Provavelmente a imunização passiva, nos trabalhos citados e também em nosso estudo, reduza a incidência de dano vascular no parênquima pulmonar, impedindo extravasamento de líquidos e proteínas. Contudo, nossos resultados nos permitem apenas presumir, visto não havermos empregado imunização com anticorpos purificados.

O primeiro dos objetivos deste trabalho foi de estabelecermos se a IL-18, predominantemente de ação Th1, exerceria atividade importante na PCM. Descobrimos que não houve diferença substancial em quase todos os parâmetros analisados. No decorrer desse trabalho trocamos informações com outros pesquisadores que também utilizaram camundongos IL-18KO em seus modelos experimentais e, quase em unanimidade, houve concordância de que esses animais, de background BALB/c, não apresentam maior susceptibilidade a infecções que os animais normais. Bem ao contrário, mostramos aqui que, se a ausência de IL-18 influi no mecanismo de defesa, o faz positivamente, visto que animais IL-18KO têm maior percentual de sobrevivência e apresentam níveis mais baixos de IL-10 que os normais. O emprego de citocinas como adjuvantes terapêuticos vem sendo sugerido para tratamento de infecções fúngicas. Nossos resultados mostraram que, ao menos experimentalmente, tratamento com IL-18 não seria de valia para PCM. Também demonstramos que a via Fas/FasL funcional é importante para rápida eliminação do *P. brasiliensis*. Além disso, utilizando o mesmo modelo experimental com camundongos lpr demonstramos que *P. brasiliensis* induz apoptose de linfócitos pulmonares *in vivo* (mas não exclusivamente pela via Fas/FasL), que pode ser responsável pela demora na eliminação do fungo. Paralelamente demonstramos, *in vivo*, que linfócitos B são fundamentais na proteção contra *P. brasiliensis*. Além disso, mostramos que fatores séricos, provavelmente anticorpos, auxiliam na organização da inflamação granulomatosa e diminuição de edema pulmonar.

CONCLUSÕES

- 1) IL-18 não é essencial na resistência ao *P. brasiliensis*
- 2) IL-18 não induz aumento de expressão de Fas/FasL em linfócitos T
- 3) A diminuição de sinalização da via Fas/FasL afeta a eliminação de fungos nos órgãos de animais lpr após infecção sistêmica por *P. brasiliensis*
- 4) Há indução de apoptose de linfócitos pulmonares nos estágios precoces da PCM
- 5) A ausência de linfócitos B aumenta a susceptibilidade ao *P. brasiliensis* na PCM murina
- 6) Anticorpos são importantes para a formação de granulomas compactos na PCM. A transferência de soro imune para animais deficientes de linfócitos B infectados por *P. brasiliensis* restabeleceu a resistência ao fungo.

RESUMO

Na Paracoccidiodomicose (PCM) a geração de resposta do tipo Th1 no sítio de infecção gera um ambiente ideal para atração de células inflamatórias e formação de granulomas, fator crucial para proteção. A citocina de maior relevância na proteção contra *Paracoccidioides brasiliensis* é o INF- γ , responsável pelo aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Durante a PCM a produção de INF- γ depende da estimulação de leucócitos principalmente por IL-12. A IL-18 é uma citocina estruturalmente semelhante a IL-12, também indutora de INF- γ e TNF- α em doenças infecciosas e responsável também por induzir expressão de FasL em leucócitos. A ligação de FasL ao receptor Fas encontrado em diversos tipos celulares pode conduzir à apoptose ou ativação de vias inflamatórias. Nossos estudos demonstraram que IL-18 não é essencial para proteção na PCM sistêmica. Animais selvagens, inclusive, apresentam níveis de citocinas Th1 e Th2 similares àqueles encontrados em animais deficientes de IL-18, mas quantidades mais elevadas de IL-10. A expressão de Fas/FasL em linfócitos pulmonares aumentou durante a PCM, mas de maneira semelhante entre animais deficientes de IL-18 e animais selvagens. Desse modo, concluímos que IL-18 é dispensável na indução de Fas/FasL. Parte da hiporresponsividade de monócitos humanos ao *P. brasiliensis* deve-se à apoptose resultante da elevação de Fas e FasL em resposta a antígenos do fungo. Em nosso trabalho utilizamos animais lpr infectados por *P. brasiliensis* ou não infectados e não encontramos evidências de autoimunidade que pudessem interferir nos resultados. Assim, validamos nosso modelo experimental. Seria predizível, contudo, que animais lpr infectados por *P. brasiliensis* apresentariam carga fúngica menor que animais normais no mesmo período de infecção, devido a uma provável diminuição de apoptose de leucócitos e maior resposta imune. Verificamos, ao contrário, que animais lpr demandam mais tempo para cura da PCM. Analisamos a composição do infiltrado inflamatório por citometria de fluxo e observamos uma similaridade entre lpr e WT, embora o número absoluto de células nos pulmões de animais lpr tenha sido maior. Avaliamos a migração de leucócitos em resposta a estímulo por tioglicolato e verificamos uma igual migração entre lpr e WT. Porém, leucócitos de animais lpr apresentam menos aderência ao endotélio. Houve maior produção das quimiocinas KC e MIP-1 α em pulmões de animais lpr infectados, mas isso não se traduziu em aumento proporcional de neutrófilos em relação aos camundongos

WT. Verificamos a atividade oxidativa de neutrófilos pulmonares pela atividade da mieloperoxidase, que foi semelhante em ambos animais. Em nossas investigações encontramos níveis similares de óxido nítrico no soro de animais lpr e WT, achado compatível com a quantidade similar de IFN- γ produzida nos pulmões de animais infectados por *P. brasiliensis*. Inesperadamente, encontramos maior número de células pulmonares apoptóticas em animais lpr infectados por *P. brasiliensis*, a despeito da menor expressão de Fas nessas células, significando que durante PCM a apoptose ocorre por diferentes vias. Há uma elevação significativa de FasL em linfócitos pulmonares CD8⁺ de animais lpr nas primeiras semanas de PCM, mas essa elevação provavelmente não é responsável pelo aumento de apoptose, devido à baixa expressão de Fas. Talvez mecanismos independentes de Fas/FasL induziram apoptose desses linfócitos, fato que poderia ter contribuído para aumento de susceptibilidade em animais lpr. Encontramos diminuição de linfócitos B em animais lpr durante PCM. Paralelamente descobrimos que animais deficientes de linfócitos B são mais susceptíveis ao *P. brasiliensis*. No entanto, nossos resultados nos permitem inferir que a maior susceptibilidade de lpr deva-se em parte à redução de linfócitos B. A transferência de soro imune para animais deficientes de células B, porém, protegeu parcialmente contra *P. brasiliensis*, o que nos permite sugerir que tanto a presença de células B quanto de anticorpos é fundamental na defesa contra o *P. brasiliensis*. Em suma, nossos resultados nos permitem afirmar que na PCM sistêmica murina IL-18 não é essencial, suscitando cautela na utilização de IL-18 como adjuvante terapêutico. A via de sinalização Fas/FasL participa na resistência contra o fungo na PCM murina, pois animais demandam mais tempo para debelar a infecção. É aceito que a resposta policlonal em pacientes e em modelos experimentais favorece susceptibilidade na PCM. Contudo, a idéia de que anticorpos e células B são dispensáveis na resistência ao *P. brasiliensis* são incorretas. A resposta ao *P. brasiliensis* envolve mecanismos imunológicos complexos, através da ativação de diversas vias inflamatórias, envolvendo resposta imune inata, adaptativa e humoral. Esse trabalho vem contribuir para um melhor entendimento da resposta imune contra *P. brasiliensis*.

Referências Bibliográficas

ADACHI M, SUEMATSU S, SUDA T, WATANABE D, FUKUYAMA H, OGASAWARA J, TANAKA T, YOSHIDA N, NAGATA S. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. **Proc. Natl. Sci.**, v. 93, p. 2131-2136, 1996.

AKIRA S, TAKEDA K, KAISHO T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 675-680, 2001.

ALBORNOZ MB. Isolation of *P. brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248-253, 1971.

ALLENDÖRFER R, BRUNNER GD, DEEPE JR GS. Complex requirements for nascent and memory immunity in pulmonary histoplasmosis. **J. Immunol.**, v. 162 p. 7389-7396, 1999.

ALMEIDA SR, MORAES JZ, CAMARGO ZP, GESZTESI JL, MARIANO M, LOPES JD. Pattern of immune response to gp 43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cel. Immunol.**, v. 190, p. 68-76, 1998.

ALMEIDA SR & LOPES JD. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 529-537, 2001.

ANDREOTTI PF, DA SILVA JLM, BAILAO AM, SOARES CM, BENARD G, SOARES CP, MENDES-GIANNINI MJ. Isolation and partial characterization of a 30 kDa adhesin from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mic. Infect.**, v. 7, p. 875-881, 2005.

ARANGO M & YARZABAL L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 79, p. 115-123, 1982.

ARRUDA C, FRANCO MF, KASHINO SS, NASCIMENTO FRF, FAZIOLI RA, VAZ CAC, RUSSO M, CALICH VLG. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 185-195, 2002.

ASHKENAZI A & DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v. 281, p. 1305-1308, 1998.

ASHKENAZI A & VISHVA MD. Apoptosis control by death and decoy receptors. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 255-260, 1999.

BAGAGLI E, FRANCO M, BOSCO SMG, HEBELER-BARBOSA F, TRINCA LA. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 217-223, 2003.

BEAUSÉJOUR RA, GRENIER D, GOULET JP, DESLAURIERS N. Proteolytic activation of the interleukin-1 β precursor by *Candida albicans*. **Inf. Immun.**, v. 66, p. 676-681, 1998.

BENARD G, ROMANO CC, CACERE CR, JUVENALE M, MENDES-GIANNINI MJS, DUARTE AJS. Imbalance of IL-2, INF- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248-252, 2001.

BIAGIONI LMV, ORSI S, CHAMMA LG, SADATSUNE T, FRANCO M. Imunoglobulinas e C₃ no granuloma paracoccidióidico. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 29, p. 97-103, 1987.

BISELLI PJC, JUVENALE M, MENDES-GIANINNI MJS, DUARTE AJS, BENARD G. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 475-478, 2001.

BLEASE K, KUNKEL SL, HOGABOAM CM. IL-18 modulates chronic fungal asthma in a murine model; putative involvement of Toll-like receptor-2. **Inflamm. Res.**, v. 50, p. 552-560, 2001.

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

BORGES-WALMSLEY MI, CHEN D, SHU X, WALMSLEY AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Immunol.**, v. 10, p. 80-87, 2002.

BRADY LJ. Antibody-mediated immunomodulation: a strategy to improve host responses against microbial antigens. **Inf. Immun.**, v. 73, p. 671-678, 2005.

BRUMMER E, HANSON LH, RESTREPO A, STEVENS DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Inf. Immun.**, v. 57, p. 2289-2294, 1989.

BRUMMER E, RESTREPO A, HANSON LH, STEVENS DA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis*: The influence of *in vitro* passage and storage. **Mycopathologia**, v. 109, p. 13-17, 1990.

BRUMMER E, CASTANEDA E, RESTREPO A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.

CACERE CR, ROMANO CC, GIANNINI MJSM, DUARTE AJS, BENARD G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin. Immunol.**, v. 105, p. 215-222, 2002.

CALICH VLG, PURCHIO A, PAULO CR. A new fluorescent viability test for fungi cells. **Mycopathologia**, v. 66, p. 175-177, 1978.

CALICH VLG, KIPNIS TL, MARIANO M, FAVA-NETTO C, DIAS 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.**, v. 12, p. 20-30, 1979.

CALICH VLG, KIPNIS TL, MARIANO M, FAVA-NETTO C, DIAS WD. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 585-594, 1985.

CAMPANELLI AP, MARTINS GA, SOUTO JT, PEREIRA MSF, LIVONESI MC, MARTINEZ R, SILVA JS. Fas-FasL (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1496-1505, 2003.

CANO LE, SINGER-VERMES LM, VAZ CAC, RUSSO M, CALICH VLG. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Inf. Immun.**, v. 63, p. 1777-1783, 1995.

CANO LE, KASHINO SS, ARRUDA C, ANDRÉ D, XIDIEH CF, SINGER-VERMES L M, VAZ CAC, BURGER E, CALICH VLG. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Inf. Immun.**, v. 66, p. 800-806, 1998.

CANO LE, SINGER-VERMES LM, COSTA TA, MENGEL JO, XIDIEH CF, ARRUDA C, ANDRE DC, VAZ CAC, BURGER E, CALICH VLG. Depletion of CD8 (+) T cells *in vivo* impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Inf. Immun.**, v. 68, p. 352-359, 2000.

CASADEVALL A. Antibody immunity and invasive fungal infections. **Inf. Immun.**, p. 4211-4218, 1995.

CASADEVALL A. Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 102-107, 1998.

CASADEVALL A & PIROFSKI LA. New concepts in antibody-mediated immunity. **Inf. Immun.**, v. 72, p. 6191-6196, 2004.

CASTANEDA E, BRUMMER E, PAPPAGIANIS D, STEVENS DA. Impairment of cellular but not humoral immune responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Inf. Immun.**, v. 56, p. 1771-1777, 1988.

CHEN LM, KANIGA K, GÁLAN JE. *Salmonella spp* are cytotoxic for cultured macrophages. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 1101-1115, 1996.

CHEN JJ, SUN Y, NABEL GJ. Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). **Science**, v. 282, p. 1714-1717, 1998.

CHENSUE SW, WARMINGTON KS, RUTH JH, LINCOLN P, KUNKEL SL. Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. **J. Immunol.**, v. 154, p. 5969-5976, 1995.

CHEQUER-BOU-HABIB D, RIBEIRO CD, BANIC DM, DO VALLE ACF, CASTRO BG. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 108, p. 89-93, 1989.

CHIU BC, FREEMAN CM, STOLBERG VR, HU JS, KOMUNIECKI E, CHENSUE SW. The innate pulmonary granuloma. **Am. J. Pathol.**, v.164, p. 1021-1030, 2004.

CHU JL, DRAPPA J, PARNASSA A, ELKON KB. The defect in Fas mRNA expression in MRL/lpr mice is associated with insertion of the retrotransposon, *Etn*. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 723-730, 1993.

COCK AM, CANO LE, VÉLEZ D, ARISTIZÁBAL BH, TRUJILLO J, RESTREPO A. Fibrotic sequelae in pulmonary paracoccidioidomycosis: histopathological aspects in BALB/c mice infected with viable and non-viable *Paracoccidioides brasiliensis* propagules. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 42 , p. 59-66, 2000.

CONCEIÇÃO-SILVA F, HAHNE M, SCHRÖTER M, LOUIS J, TSCHOPP J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 237-245, 1998.

CORVINO CT, MAMONI RL, BLOTTA MHSL. Serum IL-18 is associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis (PCM). In: XXIX Meeting of The Brazilian Society of **Immunology**, Ouro Preto, MG. Resumos, INF-45, p. 111, 2004.

CURTIN JF & COTTER TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. **Cel. Signaling.**, v.15, p. 983-992, 2003.

DAVIDSON WF, CALKINS C, HUGIN A, GIESE T, HOLMES KL. Cytokine secretion by C3H-lpr and -gld T cells. **J. Immunol.**, v. 146 , p. 4138-4148, 1991.

DAVIDSON WF, HAUDENSCHILD C, KWON J, WILLIAMS MS. T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6218-6230, 2002.

DE MARIA R, TESTA U, LUCHETTI L, ZEUNER A, STASSI G, PELOSI E, RICCIONI R., FELLI N, SAMOGGIA P, PESCHLE C. Apoptotic role of Fas/FasL ligand system in the regulation of erythropoiesis. **Blood**, v. 93, p. 796-803, 1999.

DE MATTOS GD, DE ALMEIDA SR, MARIANO M, LOPES JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Inf. Immun.**, v. 71, p. 6534-6542, 2003.

DINARELLO CA. IL-18: a Th1 inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.103(1 Pt 1), p. 11-24, 1999.

DINARELLO CA & FANTUZZI G. Interleukin-18 and host defense against infection. **J. Infect. Dis.**, v. 187 (suppl 2):, p. S370-S384, 2003.

DOS REIS GA, BORGES VM, ZIN WA. The central role of Fas-ligand cell signaling in inflammatory lung diseases. **J. Cell Mol. Med.**, v.8, p. 285-293, 2004.

DROMER F, CHARREIRE J, CONTREPOIS A, CARBON C, YENI P. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. **Inf. Immun.**, v. 55, p. 749-752, 1987.

ELKINS KL, BOSIO CM, RHINEHART-JONES TR. Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. **Inf. Immun.**, v. 67, p. 6002-6007, 1999.

ERNST EJ, HASHIMOTO S, GUGLIELMO J, SAWA T, PITTET JF, KROPP H, JACKSON JJ, WIENER-KRONISH JP. Effects of antibiotic therapy on *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury in a rat model. **Antimic. Agents Chemot.**, v. 43, p. 2389-2394, 1999.

FAGGIONI R, CATTLEY RC, GUO J, FLORES S, BROWN H, QI M, Yin S, HILL D, SCULLY S, CHEN C, BRANKOWD, LEWIS J, BAIKALOV C, YAMANE H, MENG T, MARTIN F, HU S, BOONE T, SENALDI G. IL-18 binding protein protects against lipopolysaccharide-induced lethality and prevents the development of Fas-Fas ligand-mediated models of liver disease in mice. **J. Immunol.**, v. 167, p. 5913-5920, 2001.

FANTUZZI G, REED DA, DINARELLO CA. IL-12-induced INF- γ is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 761-767, 1999.

FAURE K, FUJIMOTO J, SHIMABUKURO DW, AJAYI T, SHIME N, MORIYAMA K, SPACK EG, WIENER-KRONISH JP, SAWA T. Effects of monoclonal anti-PcrV antibody on *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury in a rat model. **J. Immune Based Ther. and Vaccines**, v. 1, p. 1-9, 2003.

FAVA-NETO C. Contribuição ao estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). **Rev. Inst. Ad. Lutz**, v.21, p. 99-194, 1961.

FERREIRA KS, LOPES JD, ALMEIDA SR. Regulation of T helper cell differentiation *in vivo* by gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scand. J. Immunol.**, v.58, p. 290-297, 2003.

FERRU I, ROYE O, DELACRE M, AURIAULT C, WOLOWCZUK I. Infection of B-cell-deficient mice by the parasite *Shistosoma mansoni*: demonstration of the participation of B cells in granuloma modulation. **Scand. J. Immunol.**, v. 48, p. 233-240, 1998.

FINK SL & COOKSON BT. Apoptosis, Pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Inf. Immun.**, v. 73, p. 1907-1916, 2005.

FRANCO M. Host parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18, 1986.

FRANCO M, MONTENEGRO MR, MENDES RP, MARQUES SA, DILLON NL, MOTA NS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p. 129-132, 1987.

FRANCO L, NAJVAR L, GOMEZ BL, RESTREPO S, GRAYBILL JR, RESTREPO A. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v. 58, p. 424-430, 1998.

FREEMAN CM, CHIU BC, STOLBERG VR, HU J, ZEIBECOGLOU K, LUKACS NW, LIRA SA, KUNKEL SL, CHENSWE SW. CCR8 is expressed by antigen-elicited, IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ T cells, which regulate Th2-mediated granuloma formation in mice. **J. Immunol.**, v. 174, p. 1962-1970.

GLUCKSMANN A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. **Biol. Rev.**, v. 26, p. 59-86, 1951.

GOIHMAN-YAHR M, ESSENFELD-YAHR E, ALBORNOZ MC. Defect of in vitro digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. **Inf. Immun.**, v. 28, p. 557-566, 1980.

GOLDANI LZ, MONTEIRO CMC, DONADI EA, MARTINEZ R, VOLTARELLI JC. HLA antigens in brazilian patients with paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 114, p. 89-91, 1991.

GONZALEZ A, DE 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. **Inf. Immun.**, v. 68, p. 2546-2552, 2000.

GONZALEZ A, SAHAZA JH, ORTIZ BL, RESTREPO A, CANO LE. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 391-399, 2003.

GREEN DR. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. **Immunol. Rev.**, v. 193, p. 5-9, 2003.

GREEN DR, DROIN N, PINKOSKI M. Activation-induced cell death in T cells. **Immunol. Rev.**, v. 193, p. 70-81, 2003.

GRESHAM HD, RAY CJ, O'SULLIVAN FX. Defective neutrophils function in the autoimmune mouse strain MRL/lpr. **J. Immunol.**, v. 146, p. 3911-3921, 1991.

HACHICHA M, RATHANASWAMI P, NACCACHE PH, MICCILL SR. Regulation of chemokine gene expression in human peripheral blood neutrophils phagocytosing microbial pathogens. **J. Immunol.**, v.160, p. 449-454, 1998.

HAGIMOTO N, KUWANO K, MIYAZAKI H, KUNITAKE R, FUJITA M, KAWASAKI M, KANEKO Y, HARA N. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.**, v. 17, p. 272-278, 1997.

HASHIMOTO W, OSAKI T, OKAMURA H, ROBBINS PD, KURIMOTO M, NAGATA S, LOTZE MT, TAHARA H. Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand – and perforin- induced tumor apoptosis, respectively, **J. Immunol.**, 163, p. 583-589, 1999.

HALL AE, DOMANSKI PJ, PATEL PR, VERNACHIO JH, SYRIBEYS PJ, GOROVITZ EL, JOHNSON MA, ROSS JM, HUTCHINS JT, PATTI JM. Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM protein clumping factor A. **Inf. Immun.**, v. 71, p. 6864-6870, 2003.

HAN Y, RIESSELMAN MH, CUTLER JE. Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. **Inf. Immun.**, v. 68, p. 1649-1654, 2000.

HEIDEN MG, CHANDEL NS, WILLIAMSON EK, SCHUMACKER PT, THOMPSON CB. Bcl-x_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell**, v. 91, p. 627-637, 1997.

HOGAN LH, KLEIN BS, LEVITZ SM. Virulence factors of medically important fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 9, p. 469-488, 1996.

HOSHINO T, WILTROUT RH, YOUNG HA. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. **J. Immunol.**, v.162, p. 5070-5077, 1999.

HU M, LIN X, DU Q, MILLER EJ, WANG P, SIMMS HH. Regulation of polymorphonuclear leukocyte apoptosis: role of lung endothelium-epithelium bilayer transmigration. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, v.288, p. 266-274, 2005.

HUANG C, LEVITZ SM. Stimulation of macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and RANTES by *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* in peripheral blood mononuclear cells from persons with and without human immunodeficiency virus infection. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 791-794, 2000.

HUFFNAGLE GB, STRIETER RM, STANDIFORD TJ, MCDONALD RA, BURDICK MD, KUNKEL SL, TOEWLS GB. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) is required for the efferent phase of pulmonary cell-mediated immunity to a *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Immunol.**, v. 159, p. 318-327, 1997.

HUNOT S & FLAVELL RA. Death of a monopoly? **Science**, v. 292, p. 865-866, 2001.

JIMENEZ BE & MURPHY JW. *In vitro* effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. **Inf. Immun.**, v.46, p. 552-558, 1984.

JOZA N, SUSIN AS, DAUGAS E, STANFORD WL, CHO SK, LI CYJ, SASAKI T, ELIA AJ, CHENG HYM, RAVAGNAN L, FERRI KF, ZAMZAMI N, WAKEHAM A, HAKEM R, YOSHIDA H, KONG YY, MAK TW, UCKER JCZ, KROEMER G, PENNINGER JM.

Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, p. 549-554, 2001.

JU ST, PANKA DJ, CUI H, ETTINGER R, EL-KHATIB M, SHERR DH, STANGER BZ, MARSHAK-ROTHSTEIN A. Fas (CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. **Nature**, v. 373, p. 444-448, 1995.

KAGAYA K, SHINODA T, FUKAZAWA Y. Murine defense mechanism against *Candida albicans* infection. **Microbiol. Immunol.**, v. 25, p. 647-654, 1981.

KANDUC D, MITTELMAN A, SERPICO R, SINIGAGLIA E, SINHA AA, NATALE C, SANTACROCE R, DI CORCIA MG, LUCCHESI A, DINI L, PANI P, SANTACROCE S, SIMONE S, BUCCI R, FARBER E. Cell death: apoptosis versus necrosis. **Int. J. Oncol.**, v. 21, p. 165-170, 2002.

KASER A, KASER S, KANEIDER NC, ENRICH B, WIEDERMANN CJ, TILG H. Interleukin-18 attracts plasmacytoid dendritic cells and promotes Th1 induction by DC2s through IL-18 receptor expression. **Blood**, v. 103, p. 648-655, 2004.

KAUFMANN SH & HENGARTNER MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. **Trends Cel. Biol.**, v. 11, p. 526-534, 2001.

KAWAKAMI K, QURESHI MH, ZHANG T, OKAMURA H, KURIMOTO M, SAITO A. IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- γ production. **J. Immunol.**, v. 159, p. 5528-5534, 1997.

KAWAKAMI K. Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. **J. Immunol.**, v. 25 (Suppl. 1), p. S12-S-19, 2002.

KELLY RM, CHEN J, YAUCH LE, LEVITZ SM. Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*. **Inf. Immun.**, v. 73, p. 592-598, 2005.

KERR JFR., WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KERR IB, OLIVEIRA PC, LENZI HL. Connective matrix organization in chronic granulomas of experimental paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 103, p. 11-20, 1988.

KOCHI SK & COLLIER RJ. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cell treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. **Exp. Cell. Sci.**, v. 208, p. 296-302, 1993.

KOHNO K, KURIMOTO M. Interleukin 18, a cytokine which resembles IL-1 structurally and IL-12 functionally but exerts its effect independently of both. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 86, p. 11-15.1998.

KOMAI-KOMA M, GRACIE JA, WEI XQ, XU D, THOMSON N, MCINNES IB, LIEW FY. Chemoattraction of human T cells by IL-18. **J. Immunol.**, v. 170, p. 1084-1090, 2003.

KROLL M, ARENZANA-SEISDEDOS F, BACHELERIE F, THOMAS D, FRIGUET B, CONCONI M. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. **Chem. & Biol.**, v. 6, p. 689-698, 1999.

KURITA N, BISWAS SK, OARADA M, SANO A, NISHIMURA K, MIYAJI M. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 19-24, 1999 a.

KURITA N, OARADA M, ITO E, MIYAJI M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 261-267, 1999 b.

KURITA N, OARADA M, MIYAJI M, ITO E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 177-182, 2000.

LACAZ CS, ZAMITH VA, DEL NEGRO G, SIQUEIRE AM. Aspectos clínicos gerais. Formas polares de paracoccidioidomicose. Particularidades clínicas, infanto-juvenil. In: DEL NEGRO G, LACAZ CS, FIORILLO AM. (eds). **Paracoccidioidomicose**, São Paulo, Savier, Edusp, p. 141-147, 1982.

LACAZ CS, PORTO E, MARTINS JEC. Paracoccidioidomicose. In: LACAZ CS, PORTO E, MARTINS JEC. Eds. **Micologia Médica**, São Paulo, Sarvier, 1991.

LACERDA GB, ARCE-GOMES B, TELLES FILHO FQ. Increased frequency of HLA-B40 in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, p. 253-256, 1988.

LAURENZI VD, & MELINO G. The little devil of death. **Nature**, v. 406, p. 135-136, 2000.

LEHRER RI. Primate defensins. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 727-738, 2004.

LE'NEGRATE G, ROSTAGNO P, AUBERGER P, ROSSI B, HOLFMAN P. Downregulation of caspases and Fas ligand expression, and increased lifespan of neutrophils after transmigration across intestinal epithelium. **Cell Death Differ.**, v. 10, p. 153-162, 2003.

LEUNG BP, CULSHAW S, GRACIE JA, HUNTER D, CANNETTI CA, CAMPBELL C, CUNHA F, LIEW FY, MCINNES IB. A role for IL-18 in neutrophil activation. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2879-2886, 2001.

LEVITZ SM. Overview of host defenses in fungal infections. **Clin. Inf. Dis.**, (suppl. 1), p. S37-S42, 1992.

LIEW FY. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunol. Let.**, v. 85, p. 131-134, 2003.

LIU X, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. **Cell**, v. 89, p. 175-184, 1997.

LIVONESI MC. Papel de IL-12 e IL-4 na modulação da resposta imune induzida por *Paracoccidioides brasiliensis*. 115 f. **Tese de Mestrado em Ciências** (Área de concentração - Imunologia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2001.

LI-WEBER M, KRAMMER PH. Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. **Sem. Immunol.**, v. 15, p. 145-157, 2003.

LOPES MF, VEIGA F, SANTOS AR, FONSECA ME, DOSREIS GA. Activation-induced T cells death by apoptosis in experimental Chaga's disease. **J. Immunol.**, v. 154, p. 744-752, 1995.

LOPES MF, NUNES MP, HENRIQUES-PONS A, GIESE N, MORSE III HC, DAVIDSON WF, ARAÚJO JORGE TC, DOSREIS GA. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient gld mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 81-89, 1999.

LUNDY SK, LERMAN SP, BOROS DL. Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL(+) T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection. **Inf. Immun.**, v. 69, p. 271-280, 2001.

MAJNO G & JORIS I. Apoptosis, Oncosis, and necrosis. An Overview of cell death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MARIANO M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 37, p. 161-176, 1995.

MARTINS GA, CARDOSO MGA, ALIBERTI JCS, SILVA JS. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunol. Lett.**, v. 63, p. 113-120, 1998.

MARTINS GA, VIEIRA LQ, CUNHA FQ, SILVA JS. Gamma interferon modulates CD 95 (Fas) and CD95 ligand (FasL) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. **Inf. Immun.**, v. 67, p. 3864-3871, 1999.

MARTINS GA, PETKOVA SB, MACHADO FS, KITSIS RN, WEISS LM, WITTNER M, TANOWITZ HB, SILVA JS. Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Immunology**, v. 103, p. 122-129, 2001.

MATTHEWS R & BURNIE J. The role of hsp90 in fungal infection. **Immunol. Today**, v. 13, p. 345-348, 1992.

MATTHEWS R & BURNIE J. Antibodies against Candida: potential therapeutics? **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 354-358, 1996.

MCINESS IB, GRACIE JA, LEUNG BP, WEI XQ, LIEW FY. Interleukin 18: a pleiotropic participant in chronic inflammation. **Immunol Today**, v. 21, p. 312-316, 2000.

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. **Cel. Microbiol.**, v. 5, p. 561-570, 2003.

MELONI-BRUNERI LH, CAMPA A, ABDALLA DSP, CALICH VLG, LENZI HL, BURGER E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J. Leuk. Biol.**, v. 59, p. 526-533, 1996.

MENDES-GIANNINI MJS, TAYLOR ML, BOUCHARA JB, BURGER E, CALICH VLG, ESCALANTE ED, HANNA SA, LENZI HL, MACHADO MP, MYIAJI M, SILVA JLM, MOTA EM, RESTREPO A, RESTREPO S, TRONCHIN G, VINCENZI LR, XIDIEH CF, ZENTENO E. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med. Mycol.**, v. 38 (Suppl 1), p. 113-123, 2000.

MENDES-GIANNINI MJS, HANNA SA, DA SILAVA JLM, ANDREOTTI PF, VICENZI LR, BENARD G, LENZI HL, SOARES CP. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Mic. Infect.**, v. 6, p. 882-891, 2004.

MIYAKE T, TAKEYA K, NOMOTO K, MURAOKA S. Cellular elements in the resistance to *Candida* infection in mice. **Microbiol. Immunol.**, v. 21, p. 703-725, 1977.

MILLS JC, STONE NL, PITTMAN RN. Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. **J. Cell Biol.**, v. 146, p. 703-707, 1999.

MONGA DP, KUMAR R, MOHAPATRA LN, MALAVIYA AN. Experimental cryptococcosis in normal and B-cell-deficient mice. **Inf. Immun.**, p. 1-3, 1979.

MONTAGNOLI C, BOZZA S, BACCI A, GAZIANO R, MOSCI P, MORSCHHÄUSER J, PITZURRA L, KOPF M, CUTLER J, ROMANI L. A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity. **Eur. J. Immunol.**, v. 33 p. 1193-1204, 2003.

MONTEFORTE GM, TAKEDA K, RODRIGUEZ-SOSA M, AKIRA S, DAVID JR, SATOSKAR AR. Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 164, p. 5890-5893, 2000.

MOSCARDI-BACCHI M, SOARES A, MENDES R, MARQUES S, FRANCO M. *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 27, p. 149-158, 1989.

MUKHERJEE J, NUSSBAUM G, SCHARFF MD, CASADEVALL A. Protective and non-protective monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B-cell. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 405-409, 1995.

MURPHY JW, WU-HSIEH BA, SINGER-VERMES LM, FERRANTE A, MOSER S, RUSSO M, VAZ CA, BURGER E, CALICH VL, KOWANKO IC. Cytokines in the host response to mycotic agents. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 203-210, 1994.

MURPHY JW, BISTONI F, DEEPE JR GS, BLASCKSTOCK RA, BUCHANAN K, ASHMAN RB, ROMANI L, MENCACCI A, CENCI E, D'OSTIANI CF, DEL SERO G, CALICH VLG, KASHINO SS. Type 1 and type 2 cytokines: from basic science to fungal infections. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 109-118, 1998.

NAKANISHI K, YOSHIMOTO T, TSUTSUI H, OKAMURA H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cyt. G. Fac. Dis.**, v. 12, p. 53-72, 2001.

NASCIMENTO FRF, CALICH VLG, RODRÍGUEZ D, RUSSO M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NEGRONI R, IOVANNITTI C, COSTA EMR, GONZALEZ JL. Paracoccidioidomycosis diseminada experimental del cobayo, Rev. Arg. Micol., v. 2, pp. 5, 1979. In: FRANCO MF,

LACAZ CS, RESTREPO-MORENO A, DEL NEGRO G, editors. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 203-212, 1994.

NETEA MG, VAN DER MEER JWM, MEIS JFGM, KULLBERG B. J. Fas-FasL interactions modulate host defense against systemic *Candida albicans* infection. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 1648-1655, 1999.

NETEA MG, KULLBERG BJ, VERSCHUEREN I, VAN DER MEER JW. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1 beta. *Eur. J. Immunol.*, v. 30, p. 3057-3060, 2000.

NETEA MG, VAN DER GRAAF CAA, VONK AG, VERSCHUEREN I, VAN DER MEER JWM, KULLBERG BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **J. Inf. Dis.**, v. 185, p. 1483-1489, 2002.

NETEA MG, VONK AG, VAN DEN HOVEN M, VERSCHUEREN I, JOOSTEN LA, VAN KRIEKEN JH, VAN DEN BERG WB, VAN DER MEER JWM, KULLBERG BJ. Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Eur. J. Immunol.*, v. 33, p. 3409-3417, 2003.

NIEDBALA W, WEI XQ, PIEDRAFITA D, XU D, LIEW FY. Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells. *Eur. J. Immunol.*, v. 29, p. 2498-2505, 1999.

OHKUSU K, YOSHIMOTO T, TAKEDA K, OGURA T, KASHIWAMURA SI, IWAKURA Y, AKIRA S, OKAMURA H, NAKANISHI K. Potentiality of interleukin-18 as a useful reagent for treatment and prevention of *Leishmania major* infection. **Inf. Immun.**, v. 68, p. 2449-2456, 2000.

OHTSUKI T, MICALLEFF MJ, KOHNO K, TANIMOTO K, IKEDA M, KURIMOTO M. Interleukin 18 enhances Fas ligand expression and induces apoptosis in Fas-expressing human myelomonocytic KG-1 cells. **Anticancer Res.**, v. 17, p, 3253-3258, 1997.

OKAMURA H, TSUTSUI H, KOMATSU T, YUTSUDO M, HAKURA A, TANIMOTO T, TORIGOE K, OKURA T, NUKADA Y, HATTORI K. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. **Nature**, v. 378, p. 88-91, 1995.

ONO MA, BRACARENSE AP, MORAIS HS, TRAPP SM, BELITARDO DR, CMARGO ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 277-282, 2001.

OPPENHEIM JJ, ZACHARIE CO, MUKAIDA N, MATSUSHIMA K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 617-648, 1991.

OTTONELLO L, TORTOLINA G, AMELLOTI M, DALLEGRI F. Soluble Fas ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v. 162, p. 3601-3606, 1999.

PAN G, O'ROURKE K, CHINNAIYAN AM, GENTZ R, EBNER R, NI J, DIXIT VM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, **Science**, v. 276, p. 111-114, 1997.

PANAGIO LA, FELIPE I, VIDOTTO MC, GAZIRI LCJ. Early membrane exposure of phosphatidylserine followed by late necrosis in murine macrophages induced by *Candida albicans* from an HIV-infected individual. **J. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 929-936, 2002.

PANUNTO-CASTELO A, FREITAS GS, BRAGHETO IC, MARTINEZ R, ROQUE-BARREIRA MC. *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens: recognition by IgG from patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Mic. Infect.**, v. 5, p. 1205-1211, 2003.

PARK CC, MOREL JC, AMIN MA, CONNORS MA, HARLOW LA, KOCH AE. Evidence of IL-18 as a novel angiogenic mediator. **J. Immunol.**, v. 167, p.1644-1653, 2001.

PARK DR, THOMSEN AR, FREVERT CW, PHAM U, SKERRETT SJ, KIENER PA, LILES WC. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. **J. Immunol.**, v. 170, p. 6209-6216, 2003.

PEARSALL NN, ADAMS BL, BUNNI R. Immunologic responses to *Candida albicans*. III. Effects of passive transfer of lymphoid cells or serum on murine candidiasis. **J. Immunol.**, v. 120, p. 1176-1180, 1978.

PENNINGER JM & KROEMER G. Molecular and cellular mechanisms of lymphocyte apoptosis. **Adv. Immunol.**, v. 68, p. 51-144, 1998.

PERAÇOLI MTS, MOTA NGS, MONTENEGRO MR. Experimental paracoccidioidomycosis in Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. **Mycopathologia**, v. 76, p. 7-12, 1982.

PINA A, VALENTE-FERREIRA RC, MOLINARI-MADLUM EEW, VAZ CAC, KELLER AC, CALICH VLG. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Inf. Immun.**, v. 72, p. 2369-2378, 2004.

POPI AF, LOPES JD, MARIANO M. Gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophages functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cel. Immunol.**, v. 218, p. 87-94, 2002.

QURESHI MH, ZHANG T, KOGUCHI Y, NAKASHIMA K, OKAMURA H, KURIMOTO M, KAWAKAMI K. Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 643-649, 1999.

RESTREPO A, GREER DL, VASCONCELOS M. Paracoccidioidomycosis, a review. **Review Med. Trop. Vet. Mycol.**, v. 8, p. 97-123, 1973.

RESTREPO A, STEVENS DA, GÓMEZ I, LEIDERMAN E, ANGEL R, FUENTES J, ARANA A, MEJÍA G, VANEGAS AC, ROBLEDO M. Ketoconazole: a new drug for the treatment of paracoccidioidomycosis. **Rev. Inf. Dis.**, v. 2, p. 633-642, 1980.

RESTREPO A. Imunidade humoral: In: DEL NEGRO G, LACAZ CS, FIORILLO AM (eds). **Paracoccidioidomicose**, p. 127-133. Savier-Edusp, São Paulo, 1982.

RESTREPO A, SALAZAR ME, CANO LE, STOVER EP, FELDMAN D, STEVENS DA. Transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Inf. Immun.**, v. 46, p. 346-353, 1984.

RESTREPO A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, p. 323-334, 1985.

RESTREPO S, TOBON A, TRUJILLO J, RESTREPO A. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 173-184, 1992.

RESTREPO A, McEWEN JG, CASTAÑEDA E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, p. 233-241, 2001.

RIVERA J, MUKHERJEE J, WEISS LM, CASADEVALL A. Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide. **J. Immunol.**, v. 168 p. 3419-3427, 2002.

RIVERA J, ZARAGOZA O, CASADEVALL A. Antibody-mediated protection against *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection is dependent on B cells. **Inf. Immun.**, v. 71, p. 1141-1150, 2005.

ROBINSON D, SHIBUYA K, MUI A, ZONIN F, MURPHY E, SANA T, HARTLEY SB, MENON S, KASTELEIN R, BAZAN F, O'GARRA A. IgG does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon- γ production and activates IRAK and NF κ B. **Immunity**, v. 7, p. 571-581, 1997.

ROEDER A, KIRSCHNING CJ, RUPEC RA, SCHALLER M, WEIDL G, KORTING HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 485-498, 2004.

ROLLINS BJ. Chemokines. **Blood**, v. 90, p. 909-928, 1997.

ROMANI L. The T cell response against fungal infections. **Cur. Op. Immunol.**, v. 9, p. 484-490, 1997 a.

ROMANI L, MENCACCI A, CENCI E, DEL SERO G, BISTONI F, PUC CETTI P. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4⁺ T helper subset selection in mice with candidiasis. **J. Immunol.**, v. 158, p. 2356-2362, 1997 b.

ROMANI L. Immunity to fungal infections. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 1-23, 2004.

ROSSI D, ZLOTNIK A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 217-242, 2000.

RUMBLEY CA, SUGAYA H, ZEKAVAT SA, PERRIN PJ, PHILLIPS M. Elimination of lymphocytes, but not eosinophils, by Fas-mediated apoptosis in murine schistosomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 442-449, 2001.

SALAZAR ME, RESTREPO A, STEVENS DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Inf. Immun.**, v. 56, p. 711-713, 1988.

SASAKI Y, YOSHIMOTO T, MARUYAMA H, TEGOSHI T, OHTA N, ARIZONO N, NAKANISHI K. IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. **J. Exp. Med.**, v. 202, p. 607-616, 2005.

SCHNIZLEIN-BICK C, DURKIN M, KOHLER S, CONNOLLY P, LEMONTE A, GARRINGER T, GOLDBERG J, SMEDEMA M, BRIZENDINE E, WHEAT LJ. Effects of CD4 and CD8 T lymphocyte depletion on the course of histoplasmosis following pulmonary challenge. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 189-97, 2003.

SEINO KI, IWABUCHI K, KAYAGAKI N, MIYATA R, NAGAOKA I, MATSUZAWA A, FUKAO K, YAGITA H, OKUMURA K. Chemotatic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. **J. Immunol.**, v. 161, p. 4484-4488, 1998.

SELSTED ME & OULLETTE AJ. Mammalian defensins in antimicrobial immune response. **Nature Immunol.**, vol.6, p. 551-557, 2005.

SHERIDAN JP, MARSTERS SA, PITTI RM, GURNEY A, SKUBATCH M, BALDWIN D, RAMAKRISHNAN L, GRAY CL, BAKER K, WOOD WI, GODDARD AD, GODOWSKI P, ASHKENAZI A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. **Science**, v. 277, p. 818-821, 1997.

SINGER-VERMES LM, SAKAMOTO TM, VAZ CA, CALICH VLG. Influence of the genetic pattern and sex of mice in experimental paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 101, p. 114-120, 1995.

SMELTZ RB, CHEN J, EHRHARDT R, SHEVAC EM. Role of INF- γ in Th1 differentiation: IFN- γ regulates IL-18R α expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor β 2 expression. **J. Immunol.**, v. 168, p. 6165-6172, 2002.

SOUTO JT, FIGUEIREDO F, FURLANETTO A, PFEFFER K, ROSSI MA, SILVA JS. Interferon- γ and Tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p. 1811-1820, 2000.

SOUTO JT, ALIBERTI JC, CAMPANELLI AP, LIVONESI MC, MAFFEI CML, FERREIRA BR, TRAVASSOS LR, MARTINEZ R, ROSSI MA, SILVA JS. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . **Am. J. Pathol.**, v. 163, p. 583-590, 2003 a.

SOUTO PCS, BRITO VN, GAMEIRO J, CRUZ-HOFLING MA, VERINAUD L. Programmed cell death in thymus during experimental paracoccidioidomycosis. **Med. Microbiol. Immunol.**, 192, p. 225-229, 2003 b.

SOUZA AR, GESZTESI JL, DEL NEGRO GMB, BENARD G, SATO J, SANTOS MVB, ABRAHÃO TB, LOPES JD. Anti-idiotypic antibodies in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 7, p. 175-181, 2000.

STAVITSKY AB. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Inf. Immun.**, v. 72, p. 1-12, 2004.

STRENGELL M, MATIKAINEN S, SIRÉN J, LEHTONEN A, FOSTER D, JULKUNEN I, SARANEVA T. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances INF- γ production in human NK and T cells. **J. Immunol.**, v. 170, p. 5464-5469, 2003.

STRIETER RM, BELPERIO JA, KEANE MP. Cytokines in innate host defense in the lung. **J. Clin. Inv.**, v. 109, p. 699-705, 2002.

STUYT RJ, NETEA MG, GEIJTENBEEK TBH, KULLBERG BJ, DINARELLO CA, VAN DER MEER JWM. Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 in human monocytes. **Immunology**, v. 110, p. 329-334, 2003.

STUYT RJ, NETEA MG, van KRIEKEN JH, van der MEER JW, KULLBERG BJ. Recombinant Interleukin-18 protects against disseminated *Candida albicans* infection in mice. **J. Inf. Dis.**, v. 189, p. 1524-1527, 2004.

SUGAWARA I, YAMADA H, KANEKO H, MIZUNO S, TAKEDA K, AKIRA S. Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. **Inf. Immun.**, v. 67, p. 2585-2589, 1999.

TABORDA CP, JULIANO MA, PUCCIA R, FRANCO M, TRAVASSOS LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Inf. Immun.**, v. 66, p. 786-793, 1998.

TAKEDA K, TSUITSUI H, YOSHIMOTO T, ADACHI O, YOSHIDAN, KISHIMOTO T, OKAMURA H, NAKANISHI K, AKIRA S. Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. **Immunity**, v. 8, p. 383-390, 1998.

TAVARES AH, SILVA SS, BERNARDES VV, MARANHÃO AQ, KYAW CM, FONSECA MP, PEREIRA IS. Virulence insights from the *Paracoccidioides brasiliensis* transcriptome. **Gen. Mol. Res.**, v. 4, p. 372-389, 2005.

TOROSANTUCCI A, BROMURO C, CHIARI P, DE BERNARDIS F, BERTI F, GALLI C, NORELLI F, BELLUCCI C, POLONELLI L, CONSTANTINO P, RAPPUOLI R, CASSONE

A. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. **J. Exp. Med.**, v. 202, p. 597-606, 2005.

TUDER RM, EL IBRAHIM R, GODOY CE, BRITO T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 92, p. 179-188, 1985.

VAN PARIJS L & ABBAS A. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science**, v. 280, p. 243-248, 1998.

VIDAL S, KONO DH, THEOFILOPOULOS NA. Loci predisposing to autoimmunity in MRL-Fas^{lpr} and C57BL/6-Fas^{lpr} mice. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 696-702, 1998.

VIGNA AFG, GODOY LC, ALMEIDA SR, MARIANO M, LOPES JD. Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro. **Immunol. Let.**, v. 83, p.61-66, 2002.

VISSER KE, KORETS LV, COUSSENS LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer Cell**, v. 7, p. 411-423, 2005.

VORDERMEIER HM, VENKATAPRASAD N, HARRIS DP, IVANYI J. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 106, p. 312-316, 1996.

WAKU T, FUJIWARA T, SHAO J, ITOSHIMA T, MURAKAMI T, KATAOKA M, GOMI S, ROTH JA, TANAKA N. Contribution of CD95 ligand-induced neutrophils infiltration to the bystander effect in p53 gene therapy for human cancer. **J. Immunol.**, v. 165, p. 5884-5890, 2000.

WATSON RWG, ROTSTEIN OD, JIMENEZ M, PARODO J, MARSHALL JC. Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils. **Blood**, v. 89, p. 4175-4181, 1997.

WEI XQ, LEUNG BP, NIEDBALA W, PIEDRAFITA D, FENG GJ, SWEET M, DOBBIE L, SMITH AJH, LIEW FY. Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 163, p. 2821-2828, 1999.

WEI XQ, NIEDBALA W, XU D, LUO ZX, POLLOCK KGJ, BREWER JM. Host genetic background determines whether IL-18 deficiency results in increased susceptibility or resistance to murine *Leishmania major* infection. **Immunol. Let.**, v. 94, p. 35-37, 2004.

WEIJER S, SEWNATH MF, DE VOS AF, FLORQUIN S, VAN DER LUIS K, GOUMA DJ, TAKEDA K, AKIRA S, VAN DER POLL T. Interleukin-18 facilitates the early antimicrobial host response to *Escherichia coli* peritonitis. **Inf. Immun.**, v. 71, p. 5488-5497, 2003.

WESTON KM, JU ST, LU CY, SY MN. Autoreactive T cells in MRL/Mpr-lpr/lpr mice. **J. Immunol.**, v. 141, p. 1941-1948, 1988.

WYLLIE AH, KERR JF, CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-306, 1980.

XIDIEH CF, LENZI HL, CALICH VLG, BURGER E. Influence of the genetic background on the pattern of lesions developed by resistant and susceptible mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 188, p. 41-49, 1999.

XU BD, CHAN WL, LEUNG BP, HUNTER D, SCHULZ K, CARTER RW, MCINNES IB, ROBINSON JH, LIEW FY. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. **J. Exp. Med.**, v.188, p. 1485-1492, 1998.

YAMADA T & OHYAMA H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 53, p. 65-75, 1988.

YANG X & BRUNHAM RC. Gene knockout B cell-deficient mice demonstrate that B cells play an important role in the initiation of T cell responses to *Chlamydia trachomatis* (mouse pneumonitis) lung infection. **J. Immunol.**, v. 161, p. 1439-1446, 1998.

YOSHIMOTO T, TAKEDA K, TANAKA T, OHKUSU K, KASHIWAMURA S, OKAMURA H, AKIRA S, NAKANISHI K. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: Synergism with IL-18 for INF- γ production. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3400-3407, 1998.

YOSHIMOTO T, TSUTSUI H, TOMINAGA K, HOSHINO K, OKAMURA H, AKIRA S, PAUL WE, NAKANISHI K. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 13962-13966, 1999.

YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. **Cell**, v. 75, p. 641-652, 1993.

ZARAGOZA O & CASADEVALL A. Antibodies produced in response to *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in mice have characteristics of nonprotective antibodies. **Inf. Immun.**, p. 4271-4274, 2004.

ZHANG T, KAWAKAMI K, QURESHI MH, OKAMURA H, KURIMOTO M, SAITO A. Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. **Inf. Immun.**, v.65, p. 3594-3599, 1997.

ZYCHLINSKY A, PREVOST MC, SANSONETTI PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. **Nature**, v. 358, p. 167-169, 1992.

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](#)