

TÂNIA ALVES DA COSTA

**A FUNÇÃO DA IL-10 NA PARACOCCIDIOIDOMISE
PULMONAR MURINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

TÂNIA ALVES DA COSTA

**A FUNÇÃO DA IL-10 NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
PULMONAR MURINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia
Garcia Calich

São Paulo
2010

*Aos meus pais, Néilson e Isabel,
à minha irmã Cris e ao meu cunhado Fred,
sempre presentes.
Meu afeto e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich, pela oportunidade, confiança e tornar possível esta conquista acadêmica. A sua experiência e seu conhecimento sempre serão para mim referências de profissionalismo;

À equipe do laboratório de Imunologia das Micoses: Adriana Pina, Alessandra Schnoski, Claudia Feriotti, Flávio Vieira Loures, Eliseu Frank Araújo, Maíra Felonato e Simone Bernardino pelos momentos que compartilhamos;

Aos docentes, funcionários e alunos do Departamento de Imunologia, por contribuírem de alguma forma no meu crescimento profissional e acadêmico;

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, Prof. Dr. Carlos P. Taborda e a Dra. Olga Célia Martinez Ibañez pela participação e sugestões no meu exame de qualificação;

Ao Dr. José Guilherme Xavier pela análise histológica deste trabalho;

À equipe do Biotério de Experimentação, em especial à Regina de Lucca e Silvia Manssironi;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro.

*"Não haverá borboletas
se a vida não passar por longas
e silenciosas metamorfoses."*

RUBEM ALVES

RESUMO

COSTA, T. A. **A função da IL-10 na paracoccidiodomicose pulmonar murina.** 2010. 85 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O principal mecanismo de defesa de hospedeiros infectados pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), fungo dimórfico que causa a mais importante micose sistêmica da América Latina, é a imunidade celular. Neste processo participam macrófagos ativados por IFN- γ e a IL-10 parece ser a citocina que se contrapõe a esta ativação. Tanto na patologia humana como em modelos experimentais há fortes indicações de que a IL-10 age como supressora da imunidade celular causando efeitos deletérios aos hospedeiros; entretanto, estudos diretos sobre a função da IL-10 na paracoccidiodomicose (PCM) não tinham sido ainda realizados. Então o objetivo fundamental deste trabalho foi estudar a função da IL-10 nos mecanismos da imunidade inata e adaptativa contra o Pb utilizando como modelo experimental camundongos geneticamente deficientes de IL-10 (IL-10 nocaute, IL-10 KO) em comparação com seus controles normais (WT). Demonstramos *in vitro* que macrófagos peritoneais normais de camundongos IL-10 KO apresentam uma maior atividade fagocítica e fungicida que os macrófagos de camundongos WT e isto esteve associado à maior produção de IFN- γ , TNF- α , óxido nítrico (NO) e da quimiocina MCP-1. Verificamos, entretanto, que a produção de IFN- γ era realizada por células NKT contaminantes de macrófagos aderentes nos camundongos IL-10 KO, sugerindo uma possível participação destas células na ativação de macrófagos e de células T de camundongos IL-10 KO. Estudos *in vivo* revelaram que a partir da 2ª semana de infecção os camundongos IL-10 KO apresentaram uma resposta imune precoce em relação aos WT, pois os pulmões dos primeiros apresentavam carga fúngica significativamente menor, associada com aumento da maioria dos isótipos de anticorpos (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b) específicos contra o fungo. Observamos também a inibição total da produção das citocinas IL-4 e IL-5, mostrando a ação reguladora da IL-10 na síntese de citocinas Th2. Na 4ª semana pós-infecção a carga fúngica continuou menor nos animais IL-10 KO, mas não foram observadas as diferenças quanto à síntese de anticorpos entre as duas linhagens. A análise dos leucócitos infiltrantes nos pulmões revelou um aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados nos camundongos IL-10 KO em relação aos WT. A partir da 8ª semana, a carga fúngica pulmonar dos camundongos IL-10 KO reduziu consideravelmente e não ocorreu disseminação para outros órgãos. Observou-se também, nesta linhagem, um aumento na

resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT), confirmando o padrão de resposta desviado para um perfil Th1. A análise histológica dos órgãos dos camundongos IL-10 KO revelou ausência de granulomas e fungos no pulmão em contraste aos seus controles WT que apresentavam elevado número de granulomas e fungos neste órgão. A análise dos linfócitos infiltrantes nos pulmões dos camundongos IL-10 KO mostrou redução na frequência de células B, o que é coerente com a baixa síntese de anticorpos observada. Houve aumento marcante na frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ memória/efetora, caracterizando mais uma vez a eficiente resposta imune celular nesses animais associada à ausência do papel regulador negativo da IL-10. Em fase mais tardia (16 semanas pós-infecção) a regressão da infecção nos camundongos IL-10 KO continuou evidente pelo pequeno número de fungos recuperados do pulmão, acompanhada de baixa síntese de citocinas (IL-5 e IL-2) e de anticorpos anti- *P. brasiliensis*. Na 23^a semana de infecção além da baixa carga fúngica nos camundongos IL-10 KO, associada à baixa frequência de células responsáveis pela imunidade celular ocorreu também redução na frequência de células Treg, indicando o papel regulador da IL-10 nesta subpopulação celular. A elevada sobrevivência (90%) dos animais IL-10 KO foi coerente com a baixa carga fúngica e eficiente resposta imune no curso da infecção. Em conjunto, nosso trabalho demonstra o importante papel regulador da IL-10 na imunidade da PCM.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose. Camundongos. IL-10 KO. Citocinas. IL-10. Imunidade inata. Imunidade adquirida.

ABSTRACT

COSTA, T. A. **The role of interleukin-10 in murine pulmonary paracoccidioidomycosis.** 2010. 85 p. PhD Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Cellular immunity is the main defense mechanism of hosts infected by the *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), a dimorphic fungus that causes the most important systemic mycosis in Latin America. IFN- γ activated macrophages participate in this activity that is antagonized by IL-10 an anti-inflammatory cytokine. Both, in the human pathology and in experimental models, there are a number of evidences indicating that IL-10 acts as a suppressor of cellular immunity leading to deleterious effects to the hosts. However, direct studies aimed at investigating the function of IL-10 in the immunity to paracoccidioidomycosis (PCM) have not been performed. Thus, the fundamental objective of this work was to study the function of IL-10 in the mechanisms of innate and adaptive immunity against Pb using as experimental model IL-10 deficient mice (IL-10 Knockout, IL-10 KO) compared to their respective wild type (WT) controls. We demonstrated *in vitro* that normal peritoneal macrophages of IL-10 KO mice presented increased phagocytic and microbicidal activities than macrophages of WT mice and this was associated with an elevated production of IFN- γ , TNF- α , nitric oxide (NO) and the chemokine MCP-1. However, the production of IFN- γ was seen to be performed by NKT cells contaminating adherent macrophages, suggesting a possible participation of these cells in the activation of macrophages and T cells of IL-10 KO mice. *In vivo* studies revealed that at the second week of infection IL-10 KO mice presented an earlier immune response when compared to wild-type mice, since their lungs exhibited a significantly reduced fungal burden and an increased production of almost all antibodies isotypes (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b). This effect was accompanied by a total absence of IL-4 and IL-5, showing a regulatory action of IL-10 in the synthesis of Th2 cytokines. Four weeks post-infection, the fungal load was still lower in the IL-10 KO mice but no differences in antibody synthesis was observed. However, the analysis of lung infiltrating leukocytes revealed an increased frequency of TCD4⁺ and TCD4⁺CD44^{high} lymphocytes in IL-10 KO mice, again demonstrating an early activation of cellular immunity in IL-10 KO mice. When compared with WT mice, the pulmonary fungal loads of IL-10 KO mice at week 8 of infection were drastically reduced and no dissemination to other organs were observed. The histopathological analysis revealed an absence of granulomas and fungi in the lungs of IL-10 KO in comparison with WT mice. The analysis of lung infiltrating leukocytes showed that IL-10 KO mice had a reduction in the frequency of B cells, in agreement with the reduced synthesis of immunoglobulins. An increased frequency of activated T CD4⁺ and a drastic increase of TCD4⁺ and T CD8⁺ effector/memory cells characterizing once again an efficient immune response associated with IL-10 deficiency. In later stages, sixteen

weeks after infection, a regressive infection of IL-10 KO mice was further characterized by low numbers of fungi in the lung, reduced synthesis of cytokines (IL-4 and IL-5) and anti- *P. brasiliensis* antibodies. By week 23 after infection, in addition to the characteristic reduction of fungal loads and reduced frequency of immune cells, we observed a decrease in the frequency of Treg cells, demonstrating the implication of IL-10 in the control of this T cell population. The elevated survival (90%) of IL-10 KO mice was in total agreement with the low fungal burdens and efficient immune response observed during infection. In conclusion, our work demonstrates for the first time that IL-10 plays a major role in the control of innate and adaptive immunity to Pb infection.

Key words: Paracoccidioidomycosis. IL-10 KO mice. Cytokines. IL-10. Innate Immunity. Adaptive Immunity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
APC	Célula apresentadora de antígeno
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCR7	<i>CC chemokine receptor 7</i>
CD11b	Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides ou Mac-1
CD11c	Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides ou CR4
CD4	Marcador do linfócito Th1/Th2/Th17, co-receptor para molécula MHC classe II
CD8	Marcador do linfócito T citotóxico, co-receptor para molécula MHC classe I
CD25	Marcador de ativação de celular em linfócitos, cadeia α do receptor de IL-2
D.O.	Densidade óptica
E.P.	Erro padrão
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3	<i>Forkhead family of transcriptional regulator Foxp3</i>
FSC	<i>foward scatter</i> , tamanho celular
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HTT	Hipersensibilidade do tipo tardio
IA^b	Marcador de expressão de MHC classe II em monócitos
IFN-γ	<i>Interferon – γ</i>
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E

IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G isótipo 1
IgG2a	Imunoglobulina G isótipo 2a
IgG2b	Imunoglobulina G isótipo 2b
IgG3	Imunoglobulina G isótipo 3
IgG4	Imunoglobulina G isótipo 4
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratraqueal
KO	<i>Knockout</i> ou deficiente
LPS	Lipopolissacáride
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MØ	Macrófago
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
OPD	Ortofenilenodiamina
Pb	<u><i>Paracoccidioides brasiliensis</i></u>
Pb 18	<u><i>Paracoccidioides brasiliensis</i></u> isolado 18
<i>P. brasiliensis</i>	<u><i>Paracoccidioides brasiliensis</i></u>
PBS	Solução salina em tampão fosfato
PCM	Paracoccidioidomicose
PI	Iodeto de propídio
PMA	<i>Phobol 12-myristane 13-acetate</i>
PMN	Polimorfonucleares
RPMI	Meio para cultura celular, tampão bicarbonato, pH 6,8

SFB	Soro fetal bovino
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
SSC	<i>Side scatte</i> , (granulosidade celular)
TCB	Tampão carbonato-bicarbonato
T CD4⁺	Linfócito T auxiliar
T CD8⁺	Linfócito T citotóxico
T_{cm}	Célula T de memória central
T_{em}	Célula T de memória efetora
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
Th1	Linfócitos T “helper” classe 1
Th2	Linfócitos T “helper” classe 2
Th17	Linfócitos T “helper” classe 17
TLR	<i>Toll-Like receptor</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
Treg	Célula T reguladora
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidade formadora de colônias
WT	<i>Wild Type</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Frequência de células NKT e T contaminantes da co-cultura de células do lavado peritoneal de camundongos KO e WT.....	44
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Fotografia do gel de PCR da caracterização genótipica dos camundongos WT e O.....	38
Figura 2.	Avaliação da atividade fungicida de macrófagos peritoneais dos camundongos WT e O.....	39
Figura 3.	Avaliação dos níveis de NO na co-cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos WT e O.....	40
Figura 4.	Avaliação dos níveis de citocinas da co-cultura de macrófagos peritoneais dos camundongos WT e O.....	41
Figura 5.	Avaliação da fagocitose/aderência de <i>P. brasiliensis</i> por macrófagos peritoneais dos camundongos WT e O.....	42
Figura 6.	Avaliação de células F4/80 ⁺ e F4/80 ⁺ IFN- γ ⁺ de células aderentes do lavado peritoneal dos camundongos WT e KO.....	43
Figura 7.	Avaliação da carga fúngica em pulmão, fígado e baço dos camundongos WT e KO após 2, 4, 8, 16 e 23 semanas de infecção.....	46
Figura 8.	Quantificação de isotipos de anticorpos específicos ao <i>P. brasiliensis</i> no soro dos camundongos WT e KO após 2, 4, 8 e 16 semanas de infecção....	47
Figura 9.	Quantificação de citocinas nos homogenatos de pulmão dos camundongos WT e KO após 2, 8 e 16 semanas de infecção.....	49
Figura 10.	Quantificação de células T, B, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos presentes nos pulmões dos camundongos WT e KO após 4, 8 e 23 semanas de infecção.....	52
Figura 11.	Quantificação de células T CD4 e CD8 ativadas e de memória/efetora presentes nos pulmões dos camundongos WT e KO após 4, 8 e 23 semanas de infecção.....	55
Figura 12.	Quantificação de células Treg presentes nos pulmões de camundongos WT e KO após 8 e 23 semanas de infecção.....	56
Figura 13.	Resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) em camundongos WT e KO após 8 semanas de infecção.....	57
Figura 14.	Fotomicrografias de corte histológico de órgãos de camundongos WT após 8 semanas de infecção.....	59
Figura 15.	Fotomicrografias de corte histológico de órgãos de camundongos KO após 8 semanas de infecção.....	60
Figura 16.	Tempo de sobrevivência de camundongos WT e KO infectados com <i>P. brasiliensis</i> durante 200 dias.....	61
Figura 17.	Avaliação da carga fúngica em camundongos WT e KO infectados com <i>P. brasiliensis</i> após 200 dias de infecção.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo Geral.....	27
2.2	Objetivos Específicos.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Animais.....	28
3.2	Fungo.....	28
3.3	Avaliação da atividade fungicida dos macrófagos (in vitro).....	29
3.4	Dosagem de óxido nítrico.....	30
3.5	Determinação dos níveis de citocinas.....	30
3.6	Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo.....	31
3.7	Citometria de fluxo para caracterização de IFN-γ intracelular.....	32
3.8	Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).....	33
3.9	Determinação dos isótipos dos anticorpos específicos.....	33
3.10	Digestão do pulmão para obtenção de células inflamatórias.....	34
3.11	Análise por citometria de fluxo de marcadores da superfície célula.....	35
3.12	Citometria de fluxo para caracterização de células T reguladoras TCD4⁺CD25⁺ através da expressão do fator de transcrição FoxP3.....	36
3.13	Hipersensibilidade do tipo tardio (HTT).....	36
3.14	Análise histopatológica dos órgãos.....	37
3.15	Avaliação do tempo médio de sobrevivência.....	37
3.16	Análise estatística dos dados.....	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Caracterização do gene para IL-10 por PCR em DNA genômico de camundongos normais e deficientes para esta molécula.....	38
4.2	Experimento <i>in vitro</i>.....	38
4.2.1	<i>Avaliação da atividade fungicida de macrófagos peritoneais através da determinação de unidades formadoras de colônias (UFC).....</i>	39
4.2.2	<i>Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais.....</i>	40

4.2.3	<i>Dosagem de citocinas do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais.....</i>	41
4.2.4	<i>Avaliação da fagocitose e/ou aderência de leveduras do P. brasiliensis a macrófagos peritoneais por citometria de fluxo.....</i>	42
4.2.5	<i>Expressão intracelular da citocina IFN-γ.....</i>	43
4.3	Experimentos <i>in vivo</i>.....	45
4.3.1	<i>Avaliação do grau de infecção dos camundongos pela determinação de unidades formadoras de colônias (UFC)</i>	45
4.3.2	<i>Determinação de anticorpos circulantes específicos contra o P. brasiliensis.....</i>	47
4.3.3	<i>Quantificação de citocinas nos homogenatos de pulmões após 2, 8 e 16 semanas de infecção.....</i>	48
4.3.4	<i>Caracterização de subpopulações celulares no infiltrado inflamatório dos pulmões.....</i>	50
4.3.5	<i>Avaliação da resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT).....</i>	57
4.3.6	<i>Análise histológica.....</i>	58
4.3.7	<i>Avaliação do tempo de sobrevivência.....</i>	61
5	DISCUSSÃO.....	63
6	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

O *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) descrito pela primeira vez por Lutz (1908), causa uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina – a paracoccidioidomicose (PCM); (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993; FRANCO et al., 1989; RESTREPO; MCEWEN; CASTAÑEDA, 2001). O Pb é um fungo dimórfico que sofre uma complexa transformação *in vivo*. Seu mecanismo de infecção é ainda controverso, porém, acredita-se que conídios, produzidos pelo micélio no ambiente, agem como propágulos infecciosos. Estes conídios quando inalados, atingem o pulmão do hospedeiro transformando-se em leveduras, a forma patogênica do fungo (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993).

A maioria dos indivíduos expostos ao fungo desenvolve uma infecção assintomática, a PCM-infecção, fato este que indica resistência genética ao fungo. Entretanto, outros indivíduos são mais suscetíveis à infecção, possibilitando a instalação da PCM-doença (FRANCO et al., 1989).

Há duas formas clínicas principais de PCM, a forma aguda (ou tipo juvenil) e a forma crônica (ou tipo adulto) (FRANCO, 1987). Ambas estão associadas com extensas seqüelas decorrentes de lesões sistêmicas e uma resposta imune inadequada.

A forma crônica da PCM progride lentamente e pode levar meses ou anos para se desenvolver. Atinge principalmente os pulmões, conduzindo a uma morbidade significativa por prejudicar de forma importante a função deste órgão. Posteriormente, a doença pode se disseminar para outros órgãos e tecidos, formando lesões secundárias na membrana das mucosas, pele e vísceras. De modo geral, na forma crônica, as lesões podem ser disseminadas ou localizadas. Nos granulomas tuberculóides, que caracterizam a forma organizada da lesão, predomina a presença de pequeno número de fungos. Na forma mais sistêmica, as lesões são mais desorganizadas e contém número elevado de fungos (DEL NEGRO et al., 1994).

A forma aguda da PCM desenvolve-se dentro de semanas ou meses, sendo em geral grave e com uma taxa significativa de mortalidade devido, principalmente, a hepatoesplenomegalia e a disfunção da medula óssea. Do ponto de vista imunopatológico, a forma aguda mostra lesões necrosantes com elevado número de células fúngicas, prejuízo da imunidade mediada por células e altos títulos de anticorpos circulantes.

Independente do órgão envolvido na PCM, usualmente a cura está associada à fibrose e as seqüelas fibróticas que podem interferir permanentemente com o bem estar do paciente

(BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993; CAMARGO e FRANCO, 2000; FRANCO, 1987; MONTENEGRO e FRANCO, 1994; RESTREPO, 1988).

Na PCM, como em outras infecções granulomatosas crônicas, a resposta imune celular representa o principal mecanismo de defesa. Tem sido proposto que o balanço entre as respostas Th1/Th2 regule o resultado clínico em muitas doenças infecciosas (SPELLBERG e EDDWARDS, 2001). Usando modelo murino isogênico foram observadas diferenças no grau de suscetibilidade ao fungo, as quais foram relacionadas ao patrimônio genético do hospedeiro. Comparando a sobrevivência de diferentes linhagens de camundongos isogênicos à infecção i.p. com o isolado virulento Pb18, estas puderam ser classificadas em resistentes (A/Sn), intermediárias (BALB/c, C57BL/6, C3He/Fe) e suscetíveis (B10.A, B10.D2/oSn e B10.D2/nSn). Em trabalho posterior utilizando híbridos F1, gerados do cruzamento de camundongos B10. A (suscetíveis) e A/Sn (resistentes), observou-se que a resistência ao fungo parece ser controlada por um gene autossômico dominante, denominado pbr (CALICH et al., 1987).

Desenvolveu-se posteriormente um modelo pulmonar de PCM utilizando camundongos resistentes (A/Sn) e suscetíveis (B10.A) e como via de infecção a intratraqueal (i.t.). Os resultados obtidos demonstraram que camundongos A/Sn e B10.A desenvolvem os mesmos padrões de resistência e suscetibilidade observados no modelo de infecção intraperitoneal (i.p.). Na infecção i.t., os animais resistentes apresentam uma infecção pulmonar crônica e benigna, reação de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) positiva, com produção preferencial dos anticorpos IgG2a e IgG3, baixas taxas de mortalidade, ativação de macrófagos pulmonares e disseminação apenas eventual do fungo. Por outro lado, animais suscetíveis desenvolvem uma infecção progressiva, com disseminação para outros órgãos como fígado e baço, anergia das reações de HTT, produção preferencial de anticorpos da classe IgG2b (regulados por TGF- β) e menor sobrevivência (CANO, 1995).

Como os perfis de citocinas estão fortemente relacionados à gravidade de diversas infecções (MOSMANN e COFFMAN, 1989), várias citocinas têm sido estudadas na tentativa de se compreender sua função imunoregulatória na PCM murina experimental. Os resultados obtidos no modelo de infecção intraperitoneal sugerem que a secreção elevada e precoce de TNF- α , IFN- γ e IL-2 por animais A/Sn, está associada à ativação preferencial de células Th1 e resistência ao Pb. Por outro lado, a produção de baixos níveis de IFN- γ e TNF- α e níveis elevados de IL-5 e IL-10, está relacionada ao predomínio de resposta Th2 e progressão da doença em animais suscetíveis (KASHINO e CALICH, 1998). O perfil de citocinas foi também avaliado na infecção pulmonar, observando-se que camundongos B10.A

apresentaram maiores níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 em comparação aos camundongos A/Sn e também valores de IFN- γ inesperadamente mais elevados no pulmão (CANO et al., 1998). Posteriormente, verificou-se que camundongos depletados ou geneticamente deficientes (nocaute) para IFN- γ são altamente suscetíveis à PCM, produzindo granulomas frouxos e, devido à rápida disseminação fúngica, sucumbem à doença em pequeno espaço de tempo (CANO et al., 1998; SOUTO et al., 2000). Além disso, alguns estudos indicaram que o IFN- γ ativa macrófagos e induz a produção de óxido nítrico (NO), que inibe a transformação dos conídios em leveduras (GONZALEZ et al., 2000). Contudo, já foi demonstrado que a produção de NO em excesso gera um efeito secundário de imunossupressão da resposta imune celular (BOCCA et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2002).

Sabe-se que o IFN- γ também estimula a secreção de TNF- α por macrófagos infectados com Pb; esta última citocina desempenha papel importante na proteção ao fungo e é necessária para a organização de granulomas. Camundongos geneticamente deficientes para o componente p55 do receptor para TNF- α mostraram-se mais suscetíveis à infecção, com aumento no número de leveduras viáveis e uma baixa formação de granuloma (SOUTO et al., 2000). IFN- γ e TNF- α são, portanto, as citocinas protetoras mais importantes tanto em camundongos suscetíveis como nos resistentes, aparentemente por estimularem a formação de granulomas bem estruturados, a produção de NO e outros metabólitos fungicidas, controlando assim a infecção.

Em outros estudos, o tratamento de animais suscetíveis (B10.A) com IL-12 recombinante (rIL-12) levou a uma doença menos disseminada, confirmada pela diminuição da carga fúngica no fígado e no baço. Embora a administração de rIL-12 tenha induzido um aumento da inflamação e maior afluxo de células mononucleares para o pulmão, ela não foi capaz de alterar o crescimento fúngico dos pulmões. A IL-12 induziu um aumento precoce de IFN- γ no pulmão (primeira semana) e, associado a uma menor disseminação pela inibição de síntese de citocinas e da produção de anticorpos específicos na oitava semana pós-infecção (ARRUDA et al., 2002). Apesar da doença menos grave, a reação inflamatória exagerada demonstra um efeito prejudicial desta citocina. Por outro lado, a infecção de camundongos geneticamente deficientes de IL-12 apresentou um aumento de carga fúngica pulmonar acompanhada por uma maior disseminação para o fígado e baço, além da mortalidade precoce (DEEPE et al., 2000).

A função da IL-4 também foi avaliada na PCM, através da infecção i.t em camundongos geneticamente deficientes para IL-4 que apresentaram uma habilidade maior na produção de NO pelos macrófagos em comparação aos dos animais controle. Por outro lado,

no curso da infecção camundongos nocaute para IL-4 não apresentaram diferença na carga fúngica pulmonar em relação aos animais controle, mas houve uma menor disseminação para fígado e baço (PINA et al., 2004). Em outro trabalho verificou-se que a neutralização de IL-4 em camundongos B10.A implicou num aumento de infecção pulmonar, em contraste com a infecção pulmonar menos grave verificada em camundongos C57Bl/6, submetidos ao mesmo tratamento (ARRUDA et al., 2004). Esses dados demonstraram, portanto, que a IL-4 apresenta um duplo papel (protetor e promotor da doença) na PCM, dependendo da carga genética do hospedeiro.

Estudos com camundongos mostraram que o paradigma Th1/Th2 pode ser aplicado para explicar o crescimento ou disseminação fúngica no fígado e baço: IL-4 e IL-10 são citocinas que promovem doença, enquanto que IL-12 e IFN- γ são citocinas protetoras. Entretanto, o controle do crescimento fúngico nos pulmões é mais complexo e ambas as populações Th1 e Th2 parecem exercer um papel protetor. Várias observações clínicas sugerem que há uma relação inversa entre a produção de IFN- γ e IL-10 em pacientes com infecção fúngica. Altos níveis de IL-10 afetam negativamente a produção de IFN- γ ; isto foi detectado na candidíase, aspergilose e na forma grave de micoses endêmicas.. No caso de infecções fúngicas crônicas, a IL-10 pode ser a resposta dirigida para garantir a homeostase do hospedeiro e para manter a inflamação sob controle (ROMANI et al., 2008).

A IL-10 foi identificada, em 1989, primeiro a nível molecular, no Instituto de Pesquisa DNAX, sendo chamada de fator inibitório da síntese de citocinas (CSIF), por ser produzida pelas células T-helper 2 (Th2) que inibiam a produção de citocinas das células Th1 (CHEN e LIU, 2009; HEDRICH e BREAM, 2010; O’GARRA et al., 2008).

Desde sua descoberta, a descrição da diversidade de células hematopoiéticas que produzem IL-10 tem crescido; atualmente se sabe que é produzida tanto por células da imunidade inata como da adquirida, incluindo monócitos, macrófagos, células natural killer (NK), células dendríticas (DCs), eosinófilos, células B, células TCD8⁺, células T regulatórias (Tregs), células Th1 e mais recentemente células Th17 (HEDRICH e BREAM, 2010; O’GARRA et al., 2008).

A IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias amplas, que incluem a inativação de macrófagos, células dendríticas, diminuição da expressão das citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1 α e β , IL-6, IL-12, IL-18 e TNF- α) e quimiocinas (MCP-1, MCP-5, RANTES, IL-8, IP-10 e MIP-2), repressão da expressão de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e das moléculas co-estimulatórias B7-1/B7-2 (CD80/CD86). Em contraste às suas funções supressivas, a IL-10 também pode ter

efeitos positivos na resposta imune, que inclui o aumento direto da produção IL-10 por células T CD4⁺ regulatórias, a estimulação de mastócitos, a estimulação de alguns genes nos fagócitos, a promoção da diferenciação e migração das células TCD8⁺ citotóxicas, a ativação de células B por estimulação da expressão de moléculas do MHC de classe II e IgA, bem como a diferenciação e crescimento de queratinócitos, além do aumento da proliferação e/ou da produção de IFN- γ por células NK (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008; HEDRICH e BREM, 2010; MAYNARD e WEAVER, 2008; O’GARRA e VIEIRA, 2007).

Essas diversas funções da IL-10 demonstram uma economia na evolução dos mecanismos efetores do sistema imune, pois a IL-10 tanto pode ter um papel regulador, inibindo danos ao hospedeiro em função da resposta imune ao patógeno, como pode também aumentar certas funções da resposta imune para ajudar a erradicar o patógeno (O’GARRA et al., 2008).

A função supressiva dominante da IL-10 é reforçada pelo fenótipo dos camundongos deficientes de IL-10, que desenvolvem colite na presença da flora intestinal normal, sugerindo o importante papel da IL-10 em limitar a resposta imune contra microorganismos e evitar dano ao hospedeiro (KUHN et al., 1993; SELTON et al., 1998).

A imunidade de camundongos deficientes em IL-10 (por deleção gênica) é preferencialmente do tipo Th1 e resulta em uma maior eliminação de infecções bacterianas, fúngicas ou por protozoários. Esses camundongos deficientes de IL-10 mostram respostas asmáticas e alérgicas exageradas, indicando que a IL-10 também controla as respostas do tipo Th2. Devido aos efeitos antiinflamatórios e imunossupressivos, a IL-10 tem atraído muita atenção para seu potencial em aplicações clínicas. A principal preocupação na manipulação clínica dos níveis de IL-10 é seu papel crítico na homeostase imunológica, pois a longa aplicação de IL-10 pode causar imunodeficiência, enquanto que o uso contínuo de anti-IL-10 pode levar a reações hiperimunes (PETSKA et al., 2004). Investigações da década passada têm demonstrado claramente que a manipulação da disponibilidade de IL-10 é uma potente terapia imune, podendo promover um tratamento adequado para muitas doenças tanto naquelas de natureza neoplásica quanto nas auto-imunes ou alérgicas.

Na PCM humana, independentemente da forma clínica, a produção de IL-10 é bem preservada e parece ter efeito imunoregulatório importante (BERNARD et al., 2001; FORNARI et al., 2001; NEWORAL et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2002). O tratamento *in vitro* de células sanguíneas mononucleares de pacientes com PCM com anticorpo monoclonal anti-IL-10 adicionado de rIL-12, elevou os níveis de IFN- γ (ROMANO et al., 2002). No modelo intraperitoneal da PCM murina, a IL-10 foi a citocina mais importante e

precocemente produzida quando células de linfonodos de camundongos suscetíveis foram estimuladas com antígeno de Pb (KASHINO et al., 2000), enquanto que os camundongos resistentes apresentaram uma secreção tardia dessa citocina. Em conjunto, estes dados sugerem que o atraso na produção de IL-10 pode permitir o estabelecimento de uma resposta Th1, suficiente para evitar o desenvolvimento ou agravamento da doença. Em adição, a produção de IL-10 em uma fase posterior da infecção pode ter um efeito benéfico ao hospedeiro por minimizar a ação de citocinas do tipo 1, e moderar seus efeitos inflamatórios deletérios aos tecidos dos hospedeiros. Verificou-se também, em modelo murino *in vitro*, que a infecção dos macrófagos alveolares de camundongos suscetíveis apresentavam melhor controle do crescimento do *P. brasiliensis* do que os dos hospedeiros resistentes. O aumento da habilidade fungicida dos macrófagos da linhagem B10.A foi associada com a elevada secreção de NO e IL-12 e que podia ser abolida pela inibição de NO. Em contraste, os macrófagos dos camundongos A/J que secretaram altos níveis de IL-10 e GM-CSF, produziam baixas quantidades de NO e apresentaram uma desprezível atividade microbicida que foi revertida pela neutralização de TGF- β (PINA; BERNARDINO; CALICH, 2008).

O dogma corrente da imunologia sugere três tipos de células T efetoras: células T auxiliares 1 (Th1), que são protetoras contra bactérias intracelulares; células Th2, que protegem contra parasitas, mas são responsáveis também por reações alérgicas e as células Th17, que são efetivas na proteção contra bactérias extracelulares e na amplificação das doenças autoimunes (ROMAGNANI, 2006). Respostas Th efetoras anormais ou excessivas são reguladas por diferentes mecanismos. O desvio da resposta imune para Th1 ou Th2 é providenciado pelas citocinas IFN- γ e IL-4, respectivamente. Entretanto, tanto respostas do tipo Th1 como Th2 podem ser suprimidas por células T reguladoras (Treg) adaptativas através de mecanismos dependentes de contato e/ou pela produção de IL-10 e *transforming growth factor* (TGF- β). Finalmente, TGF- β pode estimular tanto células Th17 efetoras ou células Treg adaptativas. A produção de IL-6 concomitante com TGF- β contribui para o desenvolvimento de células Th17 e para a inibição de células Treg. A resposta Th17 também pode ser inibida por IL-4 (padrão Th2) e IFN- γ (padrão Th1). Em adição, as células Th17 são linfócitos TCD4⁺ que produzem IL-17, uma citocina pró-inflamatória que induz a diferenciação e a migração de neutrófilos através da indução de síntese de G-CSF e IL-8 pelas células que expressam IL-17R. Estudos recentes demonstram que a IL-17 também tem um papel fundamental na imunidade protetora contra infecções fúngicas, por agir como um regulador negativo de respostas Th1 descontroladas (MATSUZAKI e UEMURA, 2007; ZELANTE et al., 2007;). Além disso, estudos sobre a influencia da deficiência em *Toll like*

Receptor 2 (TLR-2) na PCM demonstraram uma tendência para um padrão de resposta imune Th17 associado a um infiltrado rico em polimorfonucleares (PMN) sendo que camundongos TLR-2-deficientes apresentaram uma menor carga fúngica, porém lesões tão graves quanto aquelas apresentadas pelos animais TLR-2 normais, sugerindo que o receptor TLR-2 além de inibir a resposta Th17, regula negativamente a patologia pulmonar (LOURES et al., 2009).

Estudos mostram que células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Treg) constituem uma subpopulação especial de células T que suprimem uma série de células efetoras que contribuem para a manutenção da homeostase imunológica (SAKAGUCHI et al., 2006). O desenvolvimento e função das células Treg requerem a expressão do fator de transcrição FoxP3, que é considerado um marcador específico para esta linhagem celular (FONDENOT e RUDENSKY, 2005; GAVIN et al., 2007). A supressão imunológica mediada por células Treg é dependente de contato celular, mas citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10 têm um importante papel (PRESSER et al., 2008). A atividade em conjunto de TGF- β e IL-10 assegura uma resposta inflamatória controlada sem provocar imunopatologia excessiva aos próprios tecidos (LI et al., 2008). A IL-10 é a citocina indispensável no mecanismo de supressão mediado pelas células Treg, por apresentar atividade anti-inflamatória e suprimir indiretamente a produção de citocinas e proliferação de células T efetoras antígeno-específicas. Esta citocina também é produzida por células T CD4⁺ com função reguladora (RONCAROLO et al., 2006) e tem-se mostrado essencial na supressão *in vivo*, uma vez que células Treg de camundongos deficientes de IL-10 não regulam a colite induzida por células T efetoras (RUBTSOV et al., 2008).

Na PCM humana foram encontradas células com fenótipo clássico de células Treg T CD4⁺CD25⁺, tanto nas lesões como no sangue de pacientes. Os leucócitos do sangue desses pacientes exibiam uma frequência maior de células Treg expressando CTLA-4, GITR, TGF- β de membrana e FoxP3 e uma habilidade superior aos seus controles de suprimir a proliferação de células T (CAVASSANI et al., 2006). Estudos recentes mostraram que a migração de células T CD4⁺CD25⁺ para o granuloma é dependente do receptor de quimiocina CCR5; estas células além de inibir a resposta de memória/efetora, também podem facilitar a reativação da doença (MOREIRA et al., 2008). Na PCM murina verificou-se tanto *in vivo* como *in vitro* que a ausência da sinalização do TLR-4 diminui a gravidade da infecção associada à baixa ativação da imunidade inata e adaptativa e está associada com a alta expansão de células Treg (LOURES et al., 2010).

Em conjunto, pode-se afirmar que a IL-10 tem efeito regulador importante na resposta imune e nos mecanismos de imunoproteção contra patógenos de várias naturezas.

Como a IL-10 pode ser sintetizada por células da imunidade natural, células Th e células Treg esta citocina pode ter várias funções e pode atuar em diferentes aspectos da resposta imune à microrganismos, inclusive ao *P. brasiliensis*. Este fato adquire maior relevância uma vez que tem sido demonstrada uma participação importante da IL-10 tanto na PCM humana como na experimental.

Considerando-se que o papel da IL-10 não foi ainda definitivamente estabelecido no contexto da PCM, a proposta deste projeto consiste em avaliar a sua importância na PCM pulmonar utilizando camundongos geneticamente deficientes para esta citocina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a função da IL-10 na imunidade inata e adaptativa em um modelo de PCM pulmonar murina.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram estudar comparativamente em animais deficientes de IL-10 e seus respectivos controles selvagens infectados via i.t. com o *P. brasiliensis*, alguns parâmetros como:

- a atividade fungicida de macrófagos e correlacioná-la com a síntese de óxido nítrico (NO) e citocinas;
- a carga fúngica por Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em pulmão, baço e fígado, como indicadora da gravidade de doença;
- as subpopulações celulares presentes nos pulmões (linfócitos infiltrantes) através de citometria de fluxo;
- a imunidade celular *in vivo* através de reações de HTT;
- a produção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* através de ELISA;
- as citocinas presentes no sítio primário da infecção (pulmões) também por ELISA.
- os aspectos histopatológicos de fragmentos de pulmão, fígado e baço para caracterização da presença de granulomas.
- o perfil de sobrevivência de camundongos infectados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6 e C57BL/6-II10^{tm1Cgn} foram utilizados entre 8 e 12 semanas de idade. As matrizes dos animais C57BL/6-II10^{tm1Cgn} foram adquiridas na Jackson Laboratory (USA) em 1999. Os animais foram criados em condições livre de patógenos (SPF) no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB-USP e manuseados de acordo com as normas do comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas/ USP (registro n° 76 de 2005). Os camundongos receberam ração NUVILAB (NUVITAL) autoclavada e água ad libitum.

A genotipagem dos camundongos deficientes em IL-10 foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se como iniciadores as seqüências de oligonucleotídios:

IMR 86 5'-GTGGGTGCAGTTATTGTCTTCCCG-3';

IMR 87 5' -GCCTTCAGTATAAAAGGGGGACC-3';

IMR 88 5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTG-3'.

As condições para amplificação do DNA foram: um ciclo de denaturação primária do DNA a 94 °C por 3min, separando-o em duas fitas simples; 12 ciclos compostos por 3 partes: denaturação a 94 °C por 20 segundos, anelamento ou pareamento dos iniciadores a 64°C por 30 segundos (a cada ciclo a temperatura diminui 0,5 °C) e extensão da cadeia complementar a 72 °C por 35 segundos; 25 ciclos compostos por 3 etapas: denaturação a 94 °C por 20 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 35 segundos; etapa final de extensão de 2 minutos a 72 °C, utilizando o termociclador PTC200 (MJ Research). Os produtos da PCR foram analisados em agarose a 1,5% em tampão Tris acetato EDTA. Os géis foram corados com brometo de etídio, agente que se intercala entre as bases de ácidos nucléicos, visualizados e fotografados sob luz ultravioleta.

O par IMR 86, IMR 87 amplifica uma banda de 200 bp, correspondente ao alelo endógeno e o par IMR 87, IMR 88 amplifica uma banda de aproximadamente 400 bp, correspondente ao alelo mutante.

3.2 Fungo

Foi utilizado o isolado Pb 18 (virulento) do *P. brasiliensis* (KASHINO et al., 1985; SINGER VERMES et al., 1989) em sua forma leveduriforme. A perda de virulência tem sido

evitada renovando-se a amostra de Pb 18. Novas amostras do fungo são obtidas e reisoladas após 8 semanas infecção de camundongos B10.A (susceptíveis). O fungo foi mantido, por repiques semanais, em meio semi-sólido de Fava Netto (FAVA NETTO, 1955) a 36 °C.

Para as inoculações o fungo foi cultivado em meio semi-sólido de Fava Netto à temperatura de 36 °C por 6 a 7 dias, tempo em que apresenta máximo crescimento e viabilidade (KASHINO et al., 1985). As células leveduriformes foram recolhidas e lavadas por 3 vezes em solução PBS estéril. Após suspensão das leveduras e decantação dos grumos mais grosseiros, por 5 minutos, foi feita uma rápida centrifugação, separando-se o sobrenadante com uma suspensão mais fina. Esta suspensão foi passada por agulha fina, tipo tuberculina, para desfazer os grumos e evitar embolização dos bronquíolos.

A suspensão final foi acertada para conter 20×10^6 células viáveis do fungo por mL de PBS (inoculação via intratraqueal de 1×10^6 de leveduras em 50 μ L de PBS), pela contagem em câmara hemocitométrica e determinação da viabilidade pelo corante Janus Green B (BERLINER e RECA, 1966).

3.3 Avaliação da atividade fungicida dos macrófagos (*in vitro*)

Grupos de camundongos KO e WT (n=4) foram injetados com 2 mL de meio tioglicolato Brewer (DIFCO) a 3 %, estéril, pela via intraperitoneal para induzir o afluxo de células. Após 72 horas de estímulo, os animais foram submetidos à lavagem peritoneal. Para isto, os animais foram sacrificados por excesso de anestésico, a pele abdominal foi rebatida, e com a musculatura abdominal exposta, foram injetados 5 mL de meio RPMI ou DMEM. A seguir, o meio foi aspirado e centrifugado a 250 g por 10 minutos a 4 °C e a viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando-se o corante Trypan Blue, e foi sempre superior a 80%.

A concentração de células foi ajustada para 4×10^5 células/mL e 500 μ L da suspensão foram colocados nos orifícios da placa de cultura de 24 poços (Costar, USA). As culturas foram incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% CO₂ por duas horas. As células não aderentes foram removidas por aspiração e a monocamada foi lavada com meio suplementado. O número de células não aderentes foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica, sendo subtraído do número total de células peritoneais incubadas.

Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com 500 μ L de meio de cultura suplementado contendo IFN- γ (10.000 pg/mL) e em outras foi adicionado apenas meio suplementado seguido de incubação a 37 °C em estufa com 5 % CO₂ por 24 horas.

Os macrófagos tratados e não tratados com IFN- γ foram infectados com 500 μ L de uma suspensão de leveduras (8×10^3 /mL), estabelecendo-se uma relação levedura-macrófago de 1:10. Após co-cultivo de 2 horas, os poços foram lavados e incubados novamente por 72 horas. Ao final desta incubação os sobrenadantes foram retirados e armazenados a -70 °C para dosagem de citocinas e óxido nítrico e as monocamadas foram tratadas por quatro ou mais vezes com água destilada para lisar os macrófagos. O material foi recolhido, centrifugado, ressuspenso em 1 mL de meio de cultura e em seguida foi plaqueado (100 μ L/placa) em meio BHI-ágar contendo 5% de fator de crescimento do fungo e 4% de soro equino (CASTAÑEDA et al., 1988; RESTREPO e JIMÉNEZ, 1980; SINGER-VERMES et al., 1992;). As placas foram incubadas a 36 °C e as colônias contadas diariamente por um período de 15 dias.

3.4 Dosagem de Óxido Nítrico

A concentração de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foi medida pelo reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% diidrocloreto de naftilenodiamina, 2,5% H_3PO_4). Um volume de 50 μ L do sobrenadante de cultura foi adicionado em placa de poliestireno de 96 poços e fundo chato (Costar, USA) com igual volume do reagente de Griess. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, realizou-se a leitura das densidades ópticas em leitor automático (VERSAmax – Molecular Devices Corporation) em comprimento de onda de 540 nm. A concentração de óxido nítrico foi determinada utilizando-se curva-padrão obtida com diferentes concentrações de nitrito de sódio em μ M (DING; NATHAN; STUEHR, 1988).

3.5 Determinação dos níveis de citocinas

As citocinas foram dosadas a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais ou a partir do homogenato obtido do macerado dos órgãos utilizados na determinação de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) nos diferentes tempos de infecção. As concentrações das citocinas foram determinadas por testes de ELISA de captura, baseados na utilização de pares de anticorpos monoclonais específicos para cada citocina, um dos quais marcados por biotina. O uso de complexos biotina-avidina e H_2O_2 -peroxidase permitem a determinação da concentração da citocina presente por medidas de densidade óptica.

Foram seguidos os procedimentos recomendados pelo fabricante dos anticorpos utilizados (Pharmigen).

A sensibilização da placa de poliestireno de 96 poços e fundo chato com 100 µL/orifício do anticorpo primário na concentração determinada, diluído em tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH 5,0. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas por 24h a 4 °C. O bloqueio dos sítios livres foi feito pela adição de 200 µL / poço com 1 % de gelatina em PBS pH 7,0. Após 2h de incubação em temperatura ambiente, foram adicionadas as respectivas citocinas recombinantes, em diluições seriadas em PBS acrescido de 10% soro fetal bovino (SFB), em volume de 100 µL / poço, para obtenção das curvas-padrão. As amostras puras (50 µL) foram adicionadas em duplicata aos demais orifícios. A incubação a 4 °C foi realizada por um período aproximado de 18 horas. O anticorpo secundário foi adicionado após diluição em PBS acrescido de 10 % SFB, em volume de 100 µL/poço. A placa foi novamente incubada em temperatura ambiente por 1 hora. O conjugado estreptavidina-peroxidase diluído adequadamente em PBS com 0,25% foi acrescentado e a placa incubada a 37 °C por 1hora. Destaca-se que cada adição de reagente mencionada foi precedida por 3 lavagens da placa com PBS-Tween 20 (PBS pH 7,0 e 0,05% de Tween 20). A reação do substrato foi feita com 100 µL de uma solução de ortofenilenodiamina (OPD) em tampão fosfato 0,2 M, ácido cítrico 0,1 M, pH 5,0, acrescida de H₂O₂ 30% imediatamente antes do uso. A reação, ao abrigo da luz, foi aguardada por 45 minutos em temperatura ambiente. A finalização se deu pela colocação de 100 µL de ácido sulfúrico 4 N em cada orifício. A leitura das densidades ópticas foi então realizada em leitor automático (VERSAmax – Molecular Devices Corporation) em comprimento de onda de 490 nm e as concentrações das citocinas foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear obtida com os dados referentes às diluições das citocinas recombinantes (curva-padrão).

3.6 Ensaio de fagocitose por citometria de fluxo

A determinação da aderência/fagocitose foi realizada por citometria de fluxo, a partir do co-cultivo das culturas de macrófagos e leveduras em placas de 24 orifícios, a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. A infecção foi realizada com leveduras não viáveis que foram previamente mortas pelo calor em banho-maria a 60 °C por 30 minutos e isoladas por tratamento ultrassônico (3 ciclos de 15 segundos) em sonicador (Vibra cell VCX 750 – SONICS & MATERIALS, INC., Newtown CT USA). As leveduras foram centrifugadas por 10 minutos a 250 g, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi utilizado. Para a marcação das leveduras utilizamos iodeto de propídio (PI) da SIGMA na concentração de 100 µg para cada 1x10⁶ leveduras; a incubação foi feita por 30 minutos a 37 °C no escuro segundo a

técnica de HATANO et al., 2009. A suspensão de leveduras marcada com PI foi aliqüotada e estocada em freezer a -70 °C. Macrófagos foram infectados com as leveduras marcadas (relação macrófago:levedura de 1:1) por 2 horas e após este período o sobrenadante da cultura foi removido, as células foram lavadas com meio RPMI e retiradas das placas através de choque térmico com banho de gelo e raspagem mecânica utilizando “scraper”. As células foram transferidas para tubo cônico e centrifugadas por 10 minutos a 4 °C em 250 g, o sedimento foi suspenso em 1 mL de meio RPMI suplementado com soro bovino fetal. A concentração das células foi ajustada para 1×10^6 , adquiriu-se cerca de 20.000 eventos no citometro FACSCanto da Becton Dickinson (USA), utilizando o software Cell-Quest (BD Pharmingen).

3.7 Citometria de fluxo para caracterização de IFN- γ intracelular

Células do lavado peritoneal aderentes a placas de culturas, conforme descrito no item 3.3, foram estimuladas por 2 horas com leveduras de *P. brasiliensis*. As monocamadas de células aderentes foram lavadas e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera umidificada por 12 horas com meio RPMI suplementado com soro bovino fetal. A seguir o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 3mM de brefeldina à monocamada de células que ficou mais 3 horas em incubação a 37 °C, 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. As monocamadas de células aderentes foram removidas da placa da mesma forma que no item 3.6, a concentração celular foi ajustada para 1×10^6 células para cada orifício da placa de fundo em U. Adicionou-se então 25 μ L da solução de anticorpo anti-F4/80 APC na diluição adequada em tampão PBS com 0,1 % de azida de sódio e 2 % SBF, e incubação de 30 minutos a 4 °C. A seguir a placa foi lavada e centrifugada 1 vez com 200 μ L do mesmo tampão. O botão celular foi permeabilizado com Per/Wash Buffer (BD Biociences) e incubado com 25 μ L do anticorpo anti-IFN- γ Percp também por 30 minutos a 4 °C. Após a incubação as células foram lavadas por centrifugação após a adição de 200 μ L de PBS contendo 0,01 % de azida de sódio e 2 % SBF. Os botões celulares resultantes foram ressuspensos em 200 μ L de uma solução de paraformaldeído a 1%, para fixar o material que era armazenado em geladeira (4°C) até sua análise em citômetro de fluxo.

A análise citométrica foi realizada utilizando-se o aparelho FACSCalibur da BD Pharmingen. Foram adquiridas no mínimo 20.000 células totais e após a aquisição dos dados, estes foram analisados utilizando o programa “FlowJo” com base na população de macrófagos, considerando-se o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) celular.

3.8 Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC)

Ensaio de UFC, que permitem quantificar o número de *P. brasiliensis* viáveis isolados de um animal infectado, foram realizados para a determinação da gravidade da doença. Os animais foram anestesiados, sangrados pelo plexo axilar e sacrificados por deslocamento cervical. O soro resultante da sangria foi aliquoteado e congelado a -20 °C. Um dos pulmões, um lóbulo do fígado e uma parte do baço foram separados, pesados e macerados em 5 mL de PBS com o uso de homogenizadores. O macerado dos órgãos foi submetido à centrifugação, o sobrenadante (homogenato) foi separado, aliquoteado e conservado a -70 °C e o sedimento foi ressuscitado em 1 mL de PBS. Uma alíquota de 100 µL desta suspensão e de suas diluições foi semeada em placas de Petri com o meio de cultura, constituído de BHI-água suplementado com 5% de fator de crescimento do fungo (RESTREPO e JIMÉNEZ, 1980; SINGER-VERMES et al., 1992) e 4 % de soro equino, conforme preconizado por CASTAÑEDA et al., 1988. As placas foram incubadas a 36°C e o crescimento das colônias de *P. brasiliensis* foi acompanhado e registrado diariamente por um período de 15 dias. Os outros fragmentos dos pulmões, fígado e baço foram reservados para estudos histopatológicos.

3.9 Determinação dos isótipos dos anticorpos específicos

A quantificação de anticorpos séricos anti - *P. brasiliensis* específicos produzidos e os seus isótipos IgM, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram quantificados pelo método de ELISA previamente padronizado para esse sistema antígeno-anticorpo por MENDES-GIANNINI et al., 1984 e modificado por VAZ et al., 1998. O antígeno utilizado foi do tipo solúvel, obtido pela lavagem de células leveduriformes de 6 diferentes isolados (Pb339, Pb265, Pb18 REI, Pb18 BIREI e Pb18 TRIREI, Pb339, Pb265) do *P. brasiliensis* em tampão fosfato 0,1M pH 7,2 (CFA – “cell free antigen” – CAMARGO et al., 1991).

A técnica utilizada consiste basicamente em um método indireto para detecção dos anticorpos específicos. Foram utilizados anti-soros contra imunoglobulinas murinas produzidas em cabra, não marcados (anti-Ig total, anti-IgM, anti-IgA, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3) e anticorpos anti-IgG de cabra marcados com peroxidase (Shouthern Biotecnologies). Cada anti-soro foi utilizado de acordo com a titulação previamente padronizada em nosso laboratório.

O ensaio imunoenzimático consistiu na sensibilização de microplacas de 96 poços de fundo chato (COSTAR) com 100 µL do antígeno CFA diluído em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) 0,1 M pH 9,5 por poço para uma concentração de 39,3µg/mL de proteína (3,93 µg/poço). As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C e mantidas a 4 °C por aproximadamente 18 horas. Após incubação foram feitas 3 lavagens com 200 µL/poço com uma solução de PBS contendo Tween 20 a 0,5 %, processo este repetido a cada etapa.

Os sítios livres foram bloqueados com 200 µL de gelatina a 0,5 % em TCB e as placas foram novamente incubadas a 37 °C/1 hora.

Os controles positivo e negativo e as amostras foram adicionadas à placa, na diluição de 1:40 para os controles e, para as amostras diluições iniciais de 1:20 em PBS 0,1M, pH 7,2 com subseqüentes diluições seriadas de 1:2, em volume de 100 µL do mesmo tampão. E novamente as placas foram mantidas sob incubação por 1h a 37 °C.

Após lavagem, o anti-soro conjugado a peroxidase foi adicionado à placa e incubado. A reação do substrato foi feita com 100 µL de uma solução de ortofenilenodiamina (OPD) em tampão citrato de sódio a 0,1 M, pH 5,0 acrescida de H₂O₂ a 30% imediatamente antes do uso. A reação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz foi aguardada por 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL ácido sulfúrico 4 N.

A leitura da densidade óptica (DO) foi feita em comprimento de onda de 490 nm em leitor automático (VERSAmax – Molecular Devices Corporation). O “cut-off” da reação foi determinado, em cada placa, pela média das DOs obtidas para um pool de soros controle negativos (de animais não inoculados), dosado em quadruplicada.

As DOs obtidas para cada soro experimental foram comparadas ao controle negativo, sendo que o título para amostra foi expresso como a recíproca da maior diluição que apresentava DO mais alta do que o controle.

3.10 Digestão do pulmão para obtenção de células inflamatórias

Os pulmões de camundongos WT e IL-10 KO foram retirados após 4, 8 e 23 semanas de infecção com 1×10^6 de *P. brasiliensis* via i.t. Os leucócitos destes órgãos foram isolados por centrifugação diferencial em solução de Percoll, após digestão enzimática (LINDELL et al., 2006), marcados com anticorpos fluorescentes e analisados por citometria de fluxo.

Os pulmões de cada animal (n=4, de cada grupo) foram fragmentados em pequenos pedaços com bisturi, depois colocados em 1 mL de uma solução de colagenase (2 mg/mL) e DNase (30 µg/mL) em meio RPMI. Os fragmentos dos órgãos nesta solução enzimática foram

incubados a 37 °C por 30-40 minutos sob agitação e depois macerados em “Cell Strainer” (70 µm Nylon da BD Falcon) com a adição de meio suplementado com soro bovino fetal . O filtrado foi centrifugado a 250 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado, as hemácias do sedimento foram lisadas com tampão de lise (150 mM NH₄Cl, 10mM NaHCO₃ e 0,1 mM EDTA). A seguir, a suspensão celular foi lavada com meio suplementado e centrifugada a 250 g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi então ressuspensionado em 3 mL de meio suplementado e adicionado a 3 mL de uma solução de Percoll a 20 % em PBS vagarosamente para depois ser centrifugado a 1500 g por 20 minutos em temperatura ambiente.

Neste ambiente de Percoll restos celulares e células mortas são separados dos leucócitos viáveis no sedimento, que é lavado uma vez com meio suplementado. O sedimento final é ressuspenso em 1 mL de meio suplementado e mantido no gelo.

3.11 Análise por citometria de fluxo de marcadores da superfície celular

O fenótipo das células, após digestão dos pulmões dos camundongos IL-10 KO e WT, foi determinado por incubação dos leucócitos pulmonares com os anticorpos abaixo discriminados depois do bloqueio de ligações inespecíficas com o anticorpo anti-CD16/32.

Os leucócitos foram marcados a 4 °C por 15 minutos em PBS contendo 2 % de soro bovino fetal e 0,01 % de azida sódica. As células foram marcadas com a combinação adequada dos seguintes anticorpos titulados: em FL-1 CD62L e CD19 FITC, CD8, e I-A^b Alexa Flúor; em FL-2 CD44, GITR, CD11c, CD44R/B220 PE e para FL-3 CD4, CD8, F4/80 e CD11b Percp e CD45R/B220 PE-Cy5 da BD Biosciences. As células foram lavadas no mesmo tampão de marcação e ressuspensionadas em 1% de paraformaldeído para fixá-las. A análise foi realizada por citometria de fluxo no FACSCalibur da Becton Dickinson (USA) e analisados no programa FlowJo com base na população de linfócitos e macrófagos de 50.000 eventos, considerando-se o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) celular. Os resultados foram expressos em percentagem e em número absoluto de células.

3.12 Citometria de fluxo para caracterização de células T reguladoras TCD4⁺CD25⁺ através da expressão do fator de transcrição FoxP3

Após a obtenção de suspensão de células da digestão do pulmão, procedeu-se a marcação externa de 1x10⁶ de células com 25 µL da mistura dos anticorpos anti-CD4 Percp e anti-CD25 FITC na diluição adequada, por 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, as células

foram lavadas com PBS contendo 2% de soro bovino fetal e 0,01 % de azida sódica. A seguir foi feita a permeabilização da membrana plasmática com adição de 200 µL de Cytofix/Cytoperm (“Fixation/Permabilization” Kit BD Biosciences) em temperatura ambiente por 30 minutos, protegido da luz. Após a lavagem das células, realizou-se a permeabilização da membrana nuclear com a utilização com 130 µL de solução contendo 750 µL de PBS, 250 µL de paraformaldeído 4 %, 5 µL de Tween 20 da Sigma, as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro.

As células foram lavadas em PBS gelado e prosseguiu-se a marcação com o anticorpo para o fator de transcrição nuclear FoxP3 PE, diluído 1/50 em PBS contendo 2 % de soro bovino fetal e 0,01 % de azida sódica. Após incubação de 1,5 hora a 4 °C, as células foram lavadas com PBS gelado e fixadas com 2 % de paraformaldeído, armazenadas a 4 °C no escuro até a análise por citometria de fluxo. Foram adquiridos em torno de 50.000 eventos dentro do gate de linfócitos no citômetro FACSCalibur da Becton Dickinson (USA) e utilizamos o programa FlowJo para análise das células T reguladoras (TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), cujos resultados também foram expressos em percentagem e em número absoluto de células.

3.13 Hipersensibilidade do tipo tardio (HTT)

Grupos de camundongos foram avaliados 8 semanas após a inoculação i.t. do fungo quanto à resposta de hipersensibilidade tardia ao antígeno homólogo, pelo teste do coxim plantar, de acordo com a metodologia descrita por FAZIOLI et al., 1994.

A expressão da resposta de HTT é dada pelo aumento da espessura da pata dos camundongos, obtido pela diferença de leituras realizadas imediatamente antes e 24 horas após a injeção intradérmica de 25 µL (5 µg) do antígeno polissacarídico (FAVA NETTO, 1955), no coxim plantar traseiro esquerdo. As leituras dos inchaços das patas foram realizadas utilizando-se um espessímetro da marca Mitutoyo (com 0,01 mm de precisão) e os resultados foram expressos em mm.

3.14 Análise histopatológica dos órgãos

Os pulmões, fígado e baço de cada um dos animais utilizados na determinação de UFC no tempo de 8 semanas pós-infecção foram analisados histologicamente. Os órgãos foram preservados em formol Millonig modificado (CARSON; MARTIN; LYNN, 1973) à temperatura ambiente por 24 horas e até o momento do processamento em solução de álcool

70 %. Posteriormente, já incluídos em parafina foram cortados na espessura de 4 a 5 μm e submetidos à coloração por hematoxilina-eosina (HE), para identificação celular, e impregnação pela prata metamina (Grocot), para melhor identificação da localização dos fungos no corte. O preparo das lâminas foi feito no Departamento de Imunologia do ICB. A análise histológica e a documentação fotográfica foram realizadas pelo Dr. José Guilherme Xavier, patologista e docente na Universidade Paulista e Universidade Metodista do Estado de São Paulo.

3.15 Avaliação do tempo Médio de sobrevida

Grupos de 12 camundongos IL-10 KO e seus controles foram infectados com *P. brasiliensis* e a mortalidade acompanhada diariamente.

3.16 Análise estatística dos dados

Os números de UFC/g de tecido ou UFC/mL foram transformados em unidades logarítmicas (\log_{10}) e as linhagens foram comparadas pelo teste t-Student, método não pareado nos diferentes tempos de infecção.

Os títulos de anticorpo por ELISA foram transformados em unidades logarítmicas (\log_2) e comparados pelo teste t - Student, método não pareado. Os outros resultados, HTT (mm), citocinas (pg/mL) e citometria de fluxo também foram analisados pelo teste t-Student, método não pareado.

A análise de sobrevida foi analisada empregando-se Kaplan-Meier com objetivo de comparar as curvas de sobrevida entre as duas linhagens e utilizou-se o teste de Log-Rank.

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do gene para IL-10 por PCR em dna genômico de camundongos normais e deficientes para esta molécula

Os resultados, apresentados na figura 1, referem-se à análise eletroforética dos compostos gerados pela técnica de PCR para confirmação do patrimônio genético dos camundongos KO. Camundongos que apresentam uma banda em torno de 200 pb correspondem ao padrão selvagem C57BL/6 (WT), enquanto que a revelação de uma banda em torno de 400pb corresponde ao genótipo C57BL/6 IL-10 KO (KO). A expressão de ambas as bandas ocorre apenas em camundongos heterozigotos.

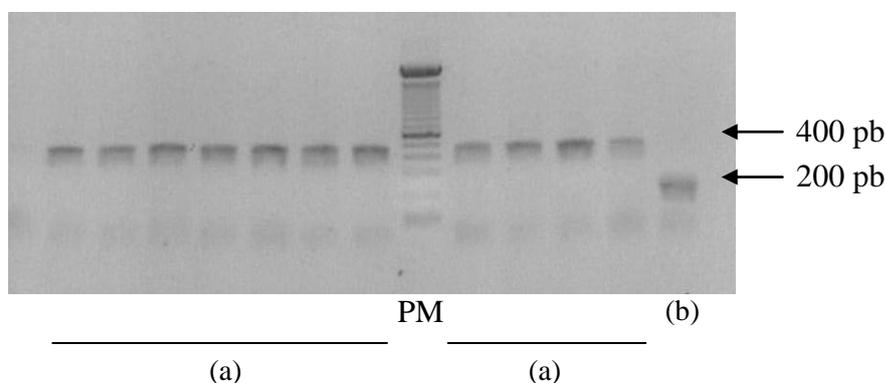


Figura 1. Fotografia do gel de PCR para caracterização dos genótipos dos camundongos KO (a), WT (b) e padrões de peso molecular (PM). As setas indicam as bandas de interesse.

4.2 Experimentos *in vitro*

4.2.1 Avaliação da atividade fungicida de macrófagos peritoneais através da determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Macrófagos peritoneais de camundongos IL-10 KO e WT foram cultivados *in vitro*, pré-tratados ou não com IFN- γ e infectados por 2 horas com o *P. brasiliensis*; e co-cultivados por um período adicional de 48 horas. A figura 2 representa o número de fungos viáveis recuperados após a lise desses macrófagos. Observamos que macrófagos de camundongos IL-10 KO apresentaram maior atividade fungicida que dos camundongos WT, uma vez que um menor número de fungos viáveis foi recuperado após co-cultivo de 48 horas. O fenômeno ocorreu tanto com células tratadas e não tratadas pelo IFN- γ . Observamos também que o IFN- γ aumentou a atividade fungicida apenas nos macrófagos dos camundongos WT (MØ+Pb 4,82 \pm 0,07 log₁₀; MØ+Pb+IFN γ 4,21 \pm 0,07 log₁₀) e não dos camundongos IL-10 KO (MØ+Pb 4,10 \pm 0,07 log₁₀; MØ+Pb+IFN γ 3,96 \pm 0,05 log₁₀).

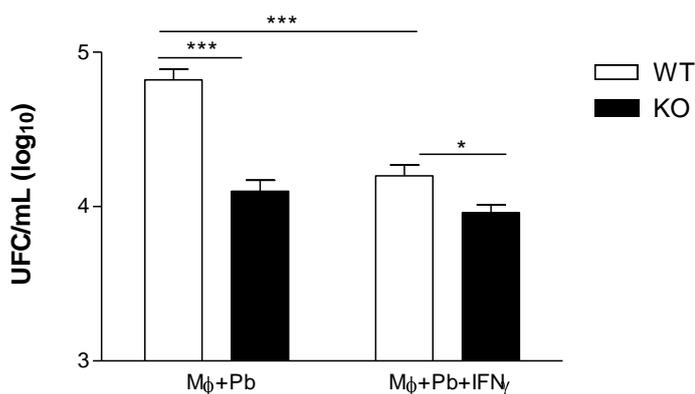


Figura 2. Avaliação da atividade fungicida de macrófagos peritoneais através da recuperação de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) após 48 horas de co-cultivo. Algumas monocamadas foram tratadas com IFN- γ (10.000 pg/mL) por 24 horas antes da infecção com *P. brasiliensis*. Ensaio realizado em sextuplicata (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.2.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais

A figura 3 mostra os resultados obtidos na dosagem de NO dos sobrenadantes de cultura dos macrófagos peritoneais de camundongos WT e IL-10 KO. Os macrófagos não infectados dos camundongos IL-10 KO sintetizaram mais NO em comparação aos dos camundongos WT (NO WT $0,27 \pm 0,06$ e KO $7,26 \pm 0,90$ μM). Após estímulo com o *P. brasiliensis*, a síntese de NO dos macrófagos dos camundongos IL-10 KO foi maior que a de camundongos WT (MØ+Pb WT $1,35 \pm 0,35$ e KO $60,31 \pm 1,47$ μM). Após a adição de IFN- γ houve uma diminuição na produção de NO pelos macrófagos dos camundongos IL-10 KO, com ou sem o estímulo do fungo (KO MØ+IFN- γ $16,61 \pm 1,48$ μM ; KO MØ+ IFN- γ +Pb $39,32 \pm 11,73$ μM). Vale ressaltar que nos camundongos WT só houve aumento na síntese de NO após o acréscimo do IFN- γ e deste com Pb (WT MØ+IFN- γ $26,81 \pm 0,91$ μM e WT MØ+IFN- γ +Pb $45,24 \pm 9,53$ μM). Este experimento demonstrou uma capacidade intrínseca de macrófagos IL-10 KO de secretar altos níveis de NO, que foi potenciada pela adição do fungo mas não pela adição de IFN- γ exógeno.

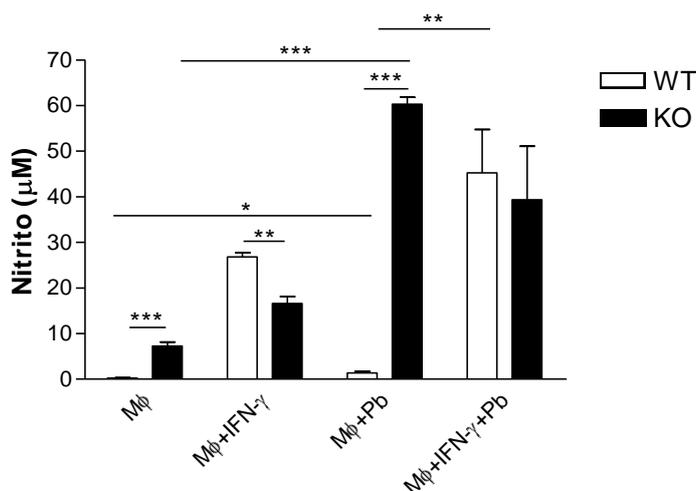


Figura 3. Avaliação dos níveis de NO em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos WT e KO. Amostras foram tratadas ou não com IFN- γ (10.000 pg/mL) por 24 horas antes da infecção com *P. brasiliensis*. Ensaio realizado em quintuplicata (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

4.2.3 Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais

Os níveis de citocinas obtidos nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos peritoneais de camundongos WT e IL-10 KO, nas diferentes condições, estão apresentados na figura 4. Verificamos que os macrófagos dos camundongos IL-10 KO produziram espontaneamente mais TNF- α , IFN- γ e MCP-1 em comparação os macrófagos de camundongos WT (TNF- α WT $9,23 \pm 1,03$ e KO $47,15 \pm 5,84$ pg/mL; IFN- γ WT $< 3,2$ e KO $81,88 \pm 19,96$ pg/mL; MCP-1 WT $635,91 \pm 71,07$ e KO $1679,98 \pm 61,18$ pg/mL). Além disso, a adição de IFN- γ exógena reduziu a produção de TNF- α ($5,74 \pm 0,23$ pg/mL) e MCP-1 ($959,10 \pm 38,34$ pg/mL), além de suprimir a produção de IFN- γ endógena ($< 3,2$ pg/mL) dos macrófagos dos camundongos IL-10 KO. Após acrescentar o fungo nas culturas de macrófagos houve um aumento significativo na produção de IFN- γ e de MCP-1 nos camundongos IL-10 KO frente aos seus controles (IFN- γ WT $< 3,2$ e KO $1407,02 \pm 126,27$ pg/mL; MCP-1 WT $1637,34 \pm 137,48$ e KO $3083,08 \pm 86,57$ pg/mL). Na presença do fungo e de IFN- γ exógeno apenas TNF- α ($47,81 \pm 3,87$ pg/mL) e MCP-1 ($1494,12 \pm 87,02$ pg/mL) tiveram a produção aumentada, sendo que a produção de IFN- γ endógena continuou bloqueada ($< 3,2$ pg/mL) nos camundongos IL-10 KO.

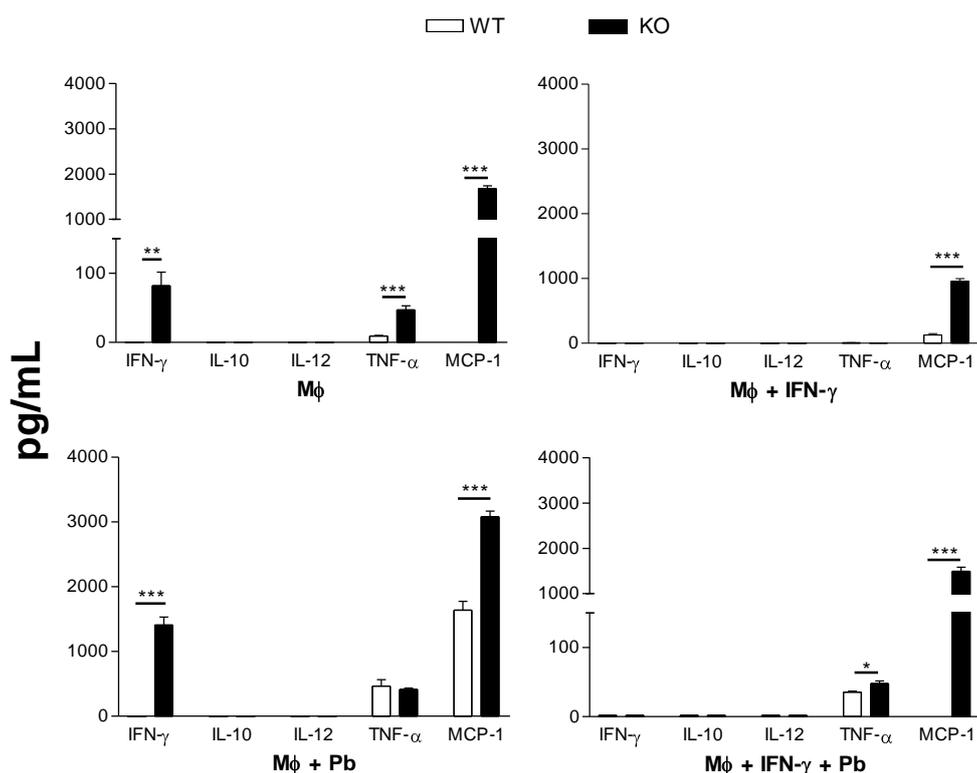


Figura 4. Avaliação dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos WT e KO. Amostras foram tratadas ou não com IFN- γ (10.000 pg/mL) por 24 horas antes da infecção com *P. brasiliensis*. Ensaio realizado em sextuplicata (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.4 Avaliação da fagocitose e/ou aderência de leveduras do *P. brasiliensis* A macrófagos peritoneais por citometria de fluxo

Os macrófagos peritoneais de camundongos IL-10 KO e WT foram previamente tratados ou não com IFN- γ e depois desafiados com leveduras de *P. brasiliensis* não viáveis e marcadas com iodeto de propídio (PI), numa relação Pb:MØ de 1:1 por 2 horas. Após este período as células foram removidas e ajustadas para 1×10^6 /mL. A leitura da fluorescência do PI foi realizada no FACSCanto juntamente com o controle positivo da marcação do fungo. Os resultados obtidos, na figura 5, demonstraram que macrófagos de camundongos IL-10 KO têm maior capacidade de aderir e/ou ingerir as leveduras de *P. brasiliensis* em relação aos macrófagos dos camundongos controle (WT $19,04 \pm 0,95$ e KO $33,95 \pm 1,62$ %). O fenômeno também ocorreu nos macrófagos pré-tratados com IFN- γ (WT $17,41 \pm 0,53$ e KO $31,75 \pm 0,53$ %).

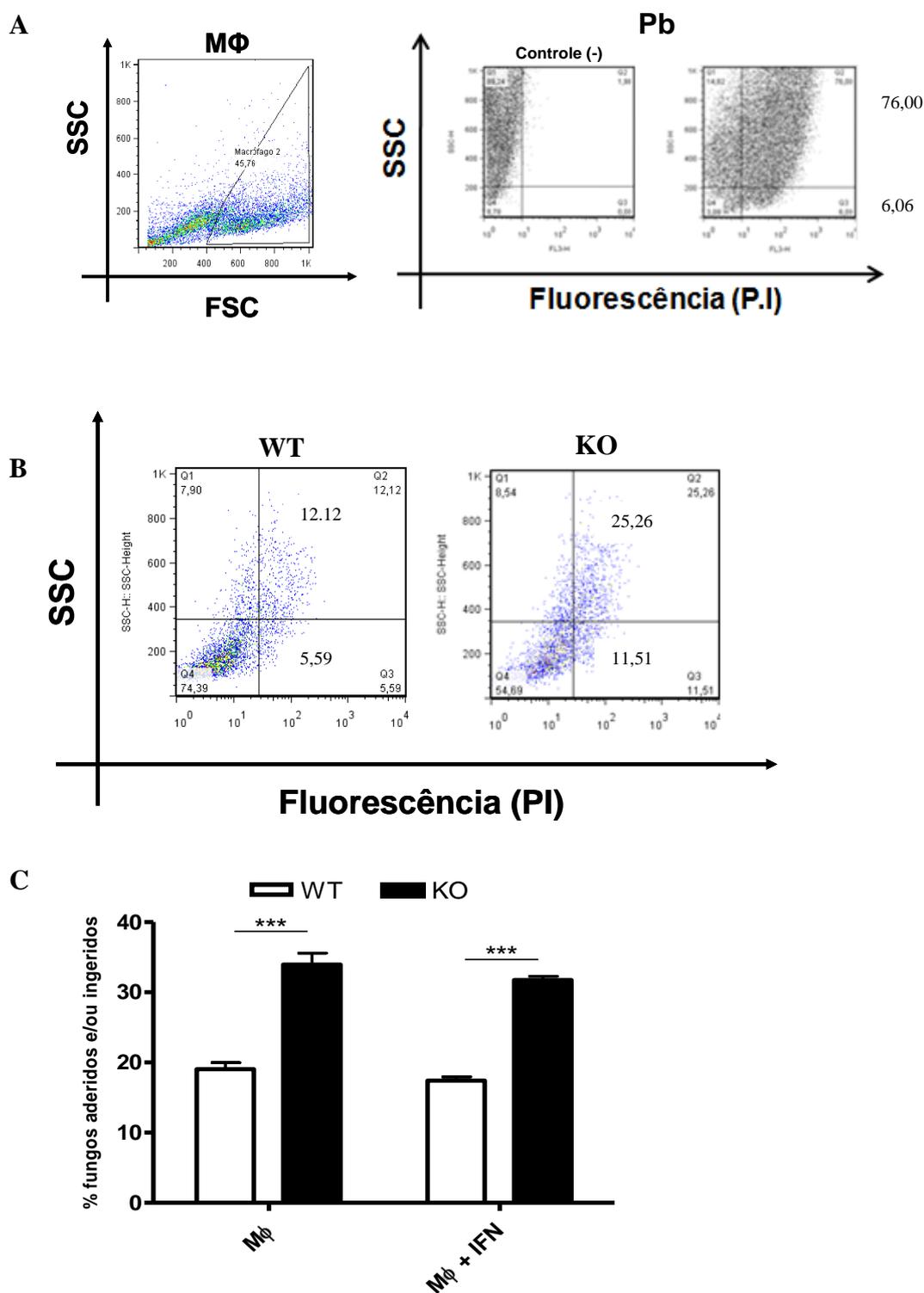


Figura 5. Avaliação da fagocitose/aderência de leveduras de *P. brasiliensis* por macrófagos peritoneais de camundongos WT e KO tratados ou não com IFN- γ por citometria de fluxo. (A) controle do macrófago não marcado e do fungo não marcado e marcado com PI; (B) apresentação em *dot-plot* da fagocitose e/ou aderência do Pb marcado (PI) em M ϕ dos camundongos WT e KO; (C) frequência de fungos aderidos e/ou ingeridos obtida pela somatória dos quadrantes Q2 e Q3 de SSC por PI. Ensaio realizado em duplicata (***) $p < 0,001$.

4.2.5 expressão intracelular da citocina IFN- γ

Para verificarmos se os altos níveis de IFN- γ presentes nos sobrenadantes da cultura de macrófagos dos camundongos IL-10 KO eram mesmo produzidos por estas células ou por outras células contaminantes da cultura, investigamos a presença de IFN- γ intracelular por citometria de fluxo caracterizando o fenótipo das células aderidas às placas.

Os macrófagos foram duplamente marcados, externamente pelo marcador F4/80 e internamente para IFN- γ . Os macrófagos F4/80⁺ não apresentaram marcação para IFN- γ intracelular, estimulados ou não pelo *P. brasiliensis* conforme figura 6. Portanto, não são os macrófagos as células responsáveis pela produção de IFN- γ nos sobrenadantes dos cultivos (figura 4), o que sugere contaminação por outras populações celulares (BOGDAN e SCHLEICHER, 2006; SCHLEICHER; HESSER; BOGDAN, 2005). Pela análise do tamanho e granulosidade (SSC x FSC) das células adquiridas no citômetro confirmamos esta hipótese, pois, em média, cerca de 10% do total de células presentes nos cultivos eram linfócitos.

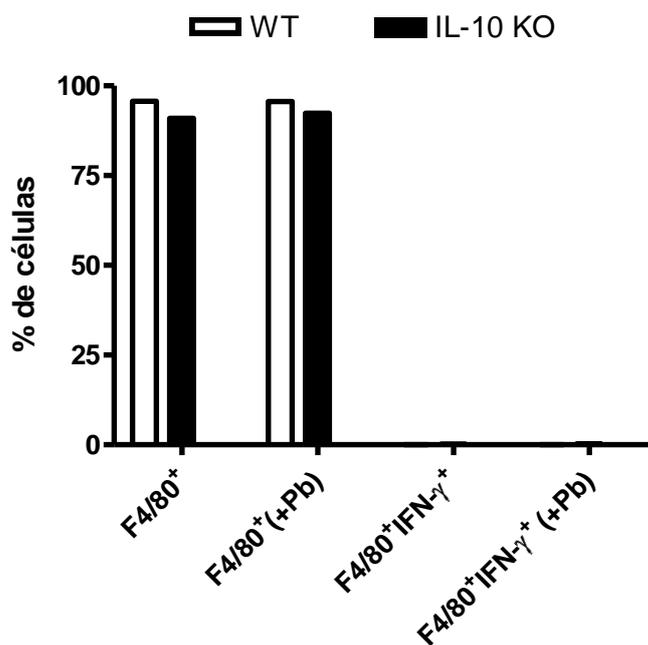


Figura 6. Avaliação da frequência de células F4/80⁺ e F4/80⁺IFN- γ ⁺ por citometria de fluxo no lavado peritoneal de camundongos das linhagens WT e KO tratados ou não com *P. brasiliensis*. O ensaio foi realizado utilizando o *pool* de células de 8 camundongos para cada linhagem. Após o desafio de 2 horas com o fungo, as células aderentes permaneceram por 12 horas em cultivo seguidas de mais 3 horas de cultivo com 3 μ g/mL de brefeldina. Depois foram feitas a marcação extracelular e intracelular das células com os fluorocromos adequados.

Além da marcação de macrófagos pesquisamos a presença de IFN- γ intracelular em outros fenótipos celulares, tais como células T (CD3⁺NK1.1⁻), T γ δ (CD3⁺TCR γ δ ⁺), células B

(CD45R/B220⁺CD19⁺), células NK (CD3⁻NK1.1⁺) e NKT (CD3⁺NK1.1⁺), nas células aderentes

As células foram analisadas a partir do *gate* de linfócitos (5-10% do total de células adquiridas), determinado em função do tamanho e granulosidade das células (SSC x FSC). Neste *gate* foram analisados a percentagem de células duplamente marcadas na membrana ou não em relação a intensidade média de fluorescência (MFI) para IFN- γ .

Na tabela 1 observamos que nas células mononucleares aderentes obtidas do lavado peritoneal de camundongos IL-10 KO, independente do estímulo do fungo, ocorre uma maior frequência de células NKT expressando mais IFN- γ do que os controles WT. Em contrapartida, as células T de camundongos IL-10 KO apresentaram apenas um aumento na expressão de IFN- γ após estímulo do fungo. As outras populações celulares (T $\gamma\delta$ e B) apresentaram uma frequência bem inferior em relação às anteriores e não detectamos a expressão de IFN- γ nas mesmas.

Tabela 1– Frequência de células NKT e T contaminantes de células mononucleares aderentes obtidas do lavado peritoneal de camundongos WT e KO. As células foram tratadas ou não com *P. brasiliensis*.

Linhagem/tratamento	Fenótipo	% (<i>gate</i> de linfócitos)	MFI de IFN- γ
WT		49,97	8,1
IL-10 KO	CD3 ⁺ NK1.1 ⁺	64,74	10,97
WT (+Pb)	(NKT)	31,81	6,93
IL-10 KO (+Pb)		70,97	15,89
WT		16,21	3,52
IL-10 KO	CD3 ⁺ NK1.1 ⁻	13,71	3,73
WT (+Pb)	(T)	15	2,49
IL-10 KO (+Pb)		13	8,84

4.3 Experimentos in vivo

4.3.1 Avaliação do grau de infecção dos camundongos pela determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Grupos de camundongos WT e IL-10 KO infectados pela via intratraqueal (i.t.) com 1×10^6 leveduras viáveis do *P. brasiliensis* foram sacrificados após 2, 4, 8, 16 e 23 semanas de infecção.

Observamos na figura 7 que nas 2ª e 4ª semanas de infecção os camundongos IL-10 KO apresentaram uma discreta, porém significativa diminuição do, número de fungos viáveis nos pulmões em relação aos WT (**pulmão de 2 semanas** WT=5,5±0,05 e KO=5,0±0,26; **pulmão de 4 semanas** WT=5,0±0,08 e KO=4,6±0,06 \log_{10}). Nos demais órgãos não houve diferenças significativas entre as duas linhagens estudadas.

A partir da 8, 16 e 23 semanas de infecção verificamos nos pulmões dos camundongos IL-10 KO um número de fungos expressivamente menor quando comparado ao dos camundongos WT, ocorrendo uma diferença média de 4 \log_{10} (**pulmão de 8 semanas** WT 6,15±0,10 e KO 2,48±0,48; **pulmão de 16 semanas** WT 5,99±0,10 e KO 1,55±0,34; **pulmão de 23 semanas** WT 5,5±0,32 e KO 2,2±0,63 \log_{10}).

Uma diferença ainda maior ocorreu em relação aos outros órgãos, pois houve grande disseminação do fungo para o fígado (**8 semanas** 3,63±0,22; **16 semanas** 4,02±0,02; **23 semanas** 2,6±1,37 \log_{10}) e para o baço (**8 semanas** 3,43±0,28; **16 semanas** 1,5±0,63; **23 semanas** 3,8±0,47 \log_{10}) dos camundongos WT, enquanto nos camundongos IL-10 KO a presença de fungos nesses órgãos de disseminação foi praticamente nula.

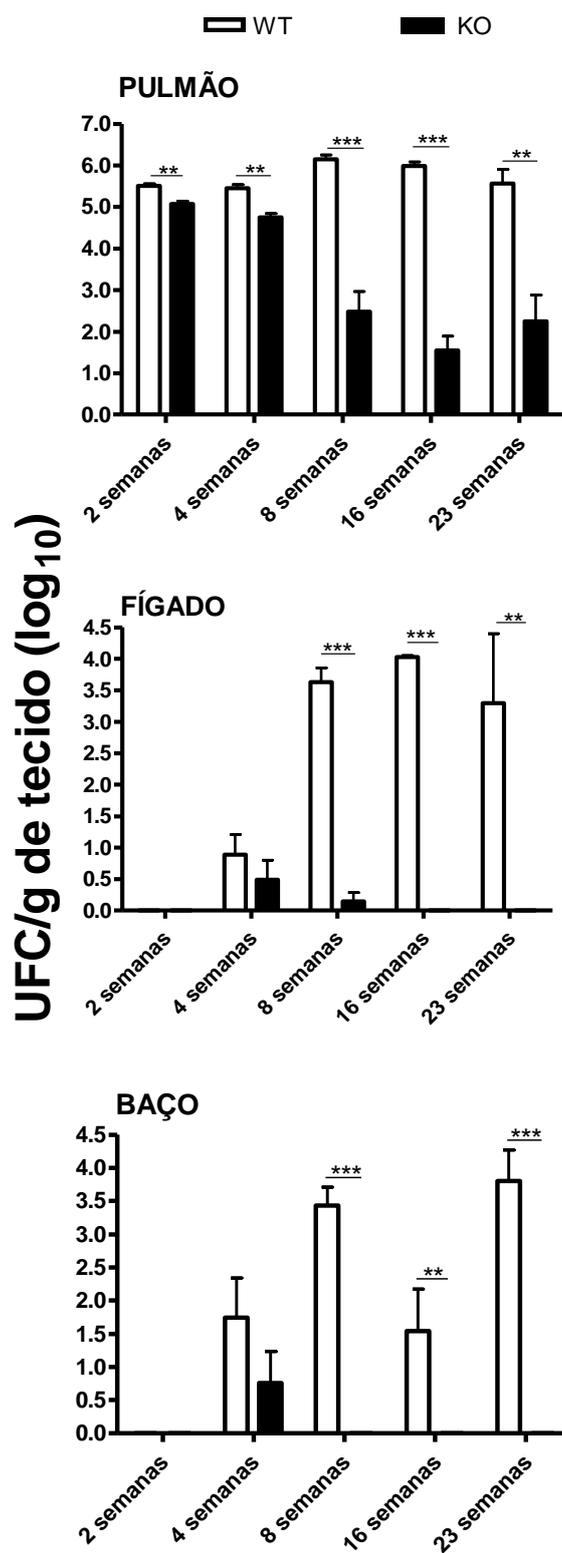


Figura 7. Avaliação da carga fúngica em pulmão, fígado e baço através da contagem do número de UFC/g (em log₁₀) em camundongos WT e KO (n=4-8) após 2, 4, 8, 16 e 23 semanas de infecção com 1x10⁶ leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t. (** p<0,01; *** p<0,001).

4.3.2 Determinação de Anticorpos Circulantes Específicos contra o *P. brasiliensis*

A quantificação dos isótipos de anticorpos anti- *P. brasiliensis* foi realizada nos tempos de 2, 4, 8 e 16 semanas de infecção por ELISA, como descrito em materiais e métodos. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 8 (título em média \pm erro padrão \log_2).

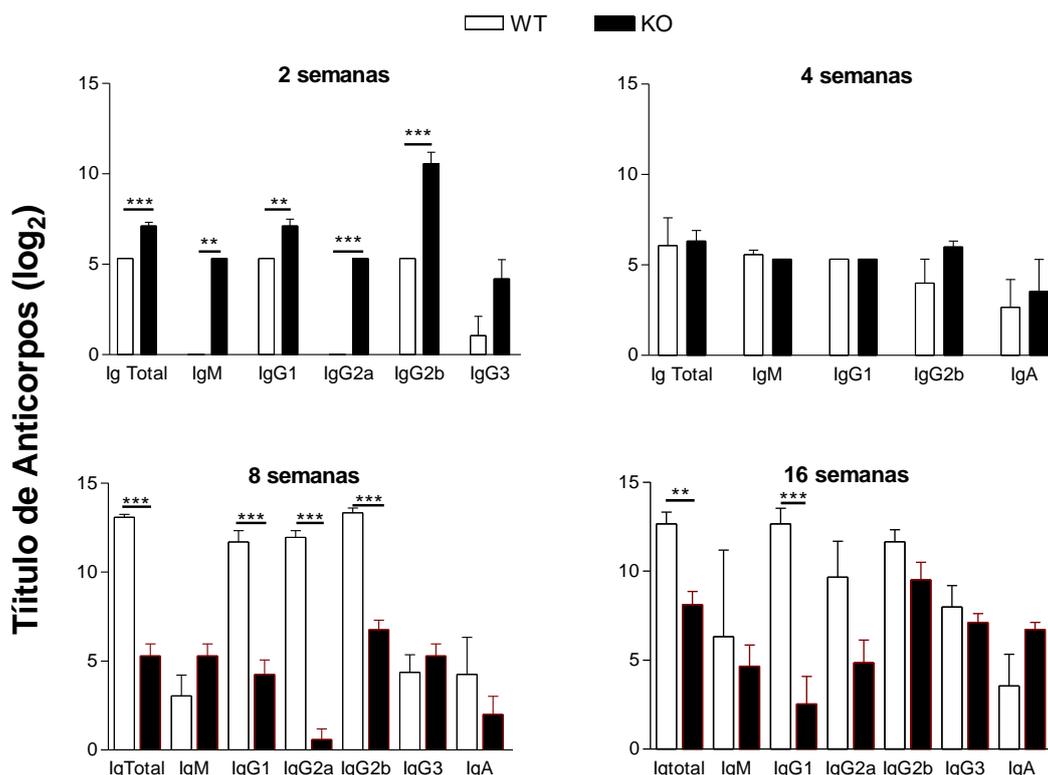


Figura 8. Quantificação de isótipos de anticorpos específicos ao *P. brasiliensis* presentes no soro de camundongos WT e KO após 2, 4, 8 e 16 semanas de infecção com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t. (n=5-10; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Na 2^a semana pós-infecção os níveis séricos da maioria dos isótipos específicos anti- *P. brasiliensis* detectados em camundongos IL-10 KO foram significativamente maiores que nos camundongos WT (título **IgT** WT $5,32 \pm 0,001$ e KO $7,12 \pm 0,2$; **IgM** WT 0 e KO $5,32 \pm 0,001$; **IgG1** WT $5,32 \pm 0,001$ e KO $7,12 \pm 0,37$; **IgG2a** WT 0 e KO $5,32$; **IgG2b** WT $4,2 \pm 1,06$ e KO $8,46 \pm 2,17 \log_2$).

Com 4 semanas de infecção não houve diferença significativa entre as duas linhagens, porém a partir de 8 semanas de infecção a situação se inverteu e os títulos dos isótipos IgG1, IgG2a e IgG2b dos camundongos IL-10 KO foram significativamente menores que aqueles do grupo WT (título **IgG1** WT $11,70 \pm 0,62$ e KO $4,25 \pm 0,81$; **IgG2a** WT $11,95 \pm 0,38$ e KO $0,59 \pm 0,59$; **IgG2b** WT $13,32 \pm 0,27$ e KO $6,77 \pm 0,53 \log_2$). Embora um padrão semelhante

tenha sido mantido com 16 semanas, houve diferença significativa apenas entre os isótipos Ig total (IgT) e IgG1 dos camundongos IL-10 KO em relação aos controles WT (título **IgT** WT $12,66 \pm 0,66$ e KO $8,12 \pm 0,73$; **IgG1** WT $12,66 \pm 0,88$ e KO $2,53 \pm 1,56 \log_2$).

4.3.3 Quantificação de citocinas nos homogenatos de pulmões após 2, 8 e 16 semanas de infecção

Os homogenatos obtidos a partir do macerado dos pulmões, conservados a -70°C , foram utilizados para a pesquisa de citocinas TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e GM-CSF em camundongos IL-10 KO e WT. Os resultados obtidos em pg/ml estão expressos em média \pm erro padrão na figura 9.

Verificamos que, apenas na 16^a semana de infecção, a produção de IL-2 no homogenato do pulmão dos camundongos IL-10 KO apresentou uma diminuição significativa em relação aos WT (**IL-2 16 semanas** WT $660 \pm 32,50$ e KO $406 \pm 48,24$ pg/mL). A produção de IL-4 nos camundongos IL-10 KO sempre foi menor frente aos WT, porém esta diferença foi significativa apenas na 2^a semana de infecção (**IL-4 2 semanas** WT $6,83 \pm 1,6$ e KO $<3,2$ pg/mL). O mesmo fenômeno ocorreu em relação à produção de IL-5 nos camundongos IL-10 KO, esta foi sempre muito reduzida em todos os tempos analisados em relação aos WT, mas esta diferença foi significativa na 2^a e 16^a semana de infecção (**IL-5 2 semanas** WT $9,03 \pm 1,36$ e KO $<3,2$ pg/mL; **16 semanas** WT $5543 \pm 962,56$ KO $106 \pm 67,03$).

Em relação aos níveis do fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos (GM-CSF), foram reduzidos nos camundongos IL-10 KO em todos os tempos de infecção em relação aos WT, embora a diferença só fosse significativa na 2^a e 8^o semana de infecção (**GM-CSF 2 semanas** WT $30,86 \pm 2,72$ e KO $50,27 \pm 6,84$ pg/mL; **8 semanas** WT $1570 \pm 156,10$ e KO $1184 \pm 125,85$ pg/mL).

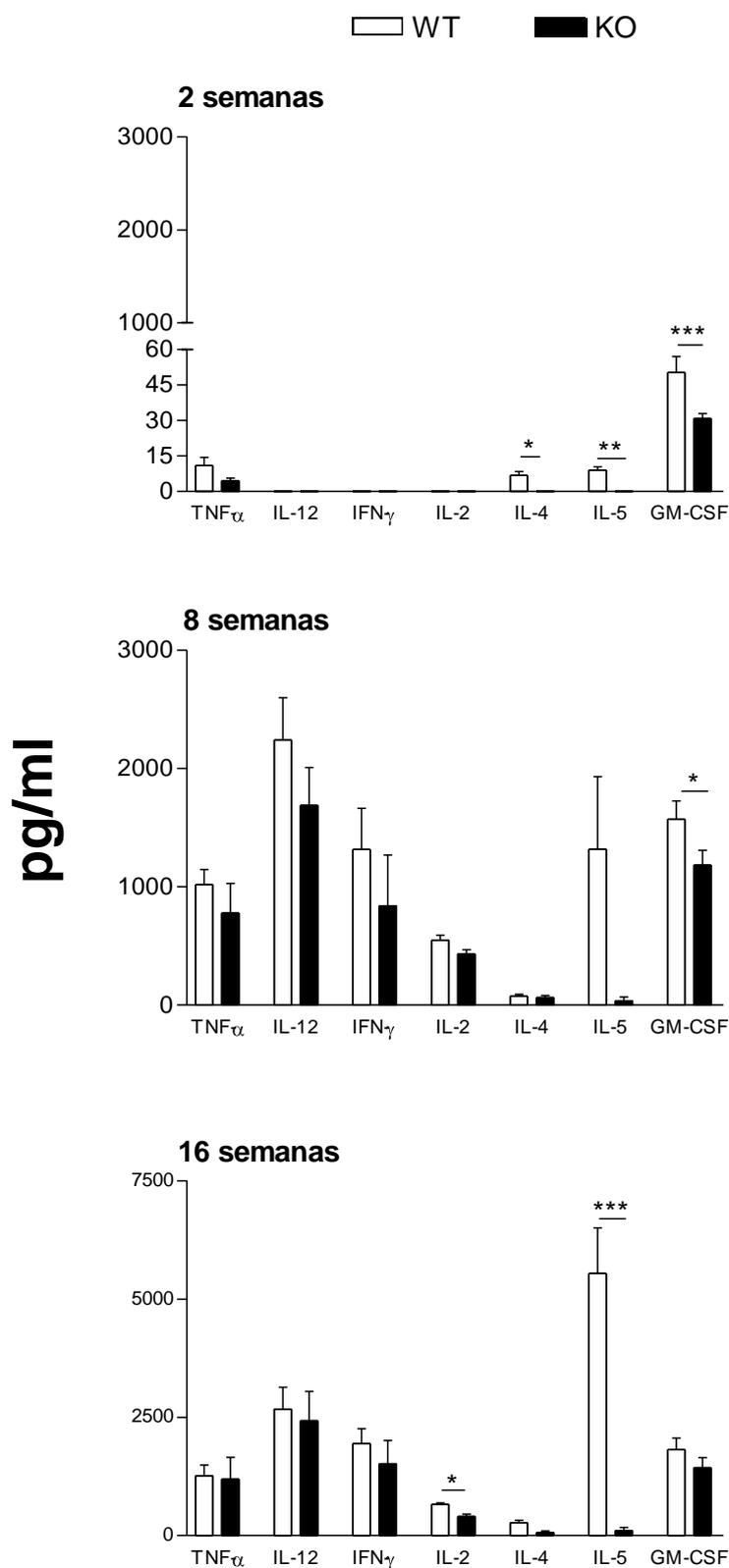


Figura 9. Quantificação de citocinas TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e GM-CSF nos homogenatos de pulmão de camundongos KO e WT após 2, 8 e 16 semanas de infecção com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t.; n=8-10 (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

4.3.4 Caracterização das subpopulações celulares no infiltrado inflamatório dos Pulmões

Foram caracterizadas subpopulações celulares após 4, 8 e 23 semanas de infecção com *P. brasiliensis* para análise do perfil do infiltrado pulmonar. Analisamos as células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais, células B (CD45R/B220⁺CD19⁺), macrófagos (CD11b⁺), macrófagos ativados (F4/80⁺IA^{b+}), células dendríticas ativadas (CD11c⁺IA^{b+}) e neutrófilos (F4/80⁺GR1⁺). Em relação às células dendríticas, estas foram caracterizadas em células dendríticas linfóides (CD11c⁺CD8⁺), plasmocitóides (CD45R/B220⁺CD11c⁺) ou mielóides (CD11b⁺CD11c⁺).

Os resultados foram apresentados em percentagem e em número absoluto de células em relação à população de linfócitos e de granulócitos, que foram determinadas em função do tamanho e granulosidade das mesmas.

A figura 10 mostra que camundongos IL-10 KO após 4 semanas de infecção apresentaram uma frequência maior de células T CD4⁺ em relação ao grupo controle (**T CD4⁺ total** WT 28,2±1,56 e KO 39,2±2,6 %), em número absoluto de células esta diferença não ocorreu. Em relação às células T CD8⁺ não houve diferenças tanto em frequência como em número absoluto de células entre as duas linhagens. Em contrapartida, neste tempo observamos uma diminuição significativa de macrófagos dos camundongos IL-10 KO em relação aos WT tanto em frequência (**CD11b⁺** WT 29,8±1,73 e KO 22,8±1,36 %) como em número absoluto de células (**CD11b⁺** WT 51±0,24; KO 31,9±0,19 x10⁵ células).

Após 8 semanas de infecção os camundongos IL-10 KO apresentaram uma frequência maior de células dendríticas ativadas (**CD11c⁺IA^{b+}** WT 11,55±0,56 e KO 13,06±0,05 %) e de neutrófilos (**F4/80⁺GR1⁺** 3,20±0,46 e KO 5,7±0,54 %) em relação aos camundongos WT. Em número absoluto de células, os camundongos IL-10 KO mantiveram este aumento também nestas populações celulares em relação aos seus controles (**CD11c⁺IA^{b+}** WT 16±0,08 e KO 20±0,13 x10⁵ células; **F4/80⁺GR1⁺** WT 4,5±0,06 e KO 8,9±0,09 x10⁵ células). As células T CD8⁺ apresentaram um aumento significativo apenas em número absoluto de células em relação à linhagem controle (**TCD8⁺ totais** WT 6,9±0,05 e KO 9,5±0,09 x10⁵ células). Em relação às células B os camundongos IL-10 KO apresentaram uma frequência menor em relação ao grupo controle (**CD45R/B220⁺CD19⁺** WT 11,96±0,28 e KO 5,17±0,9 %), e esta redução manteve-se também em número absoluto de células (**CD45R/B220⁺CD19⁺** WT 8,4±0,05 e KO 4±0,09 x10⁵ células).

Observamos após 23 semanas de infecção uma diminuição significativa na frequência das células dendríticas (DC) linfóides, DC plasmocitóides e das DC mielóides dos camundongos IL-10 KO em relação aos seus controles. (**DC linfóide CD8⁺CD11c⁺** WT

0,81±0,05 e KO 0,34±0,05 %; **DC plasmocitóide CD45R/B220⁺CD11c⁺** WT 1,57±0,22 e KO 0,65±0,06 %; **DC mielóide CD11b⁺CD11c⁺** WT 4,35±0,29 e KO 1,49±0,25 %). Este fenômeno manteve-se também em número absoluto de células (**DC linfóide CD8⁺CD11c⁺** WT 1,2±0,01 e KO 0,2±0,005 x10⁵ células; **DC plasmocitóide CD45R/B220⁺CD11c⁺** WT 2,3±0,03 e KO 0,35±0,03 x10⁵ células; **DC mielóide CD11b⁺CD11c⁺** WT 6,6±0,03 e KO 1±0,01 x10⁵ células). Além disso, observamos uma diminuição, apenas em números absolutos, de células de T CD4⁺, de macrófagos e neutrófilos dos camundongos IL-10 KO em relação aos WT (**T CD4⁺ total** WT 26±0,14 e KO 9,4±0,12 x10⁵ células; **macrófago ativado F4/80⁺IA^{b+}** 11±0,13 e KO 3,7±0,02 x10⁵ células; **neutrófilo F4/80⁻GR1⁺** 10,8±0,1 e KO 3±0,04 x10⁵ células).

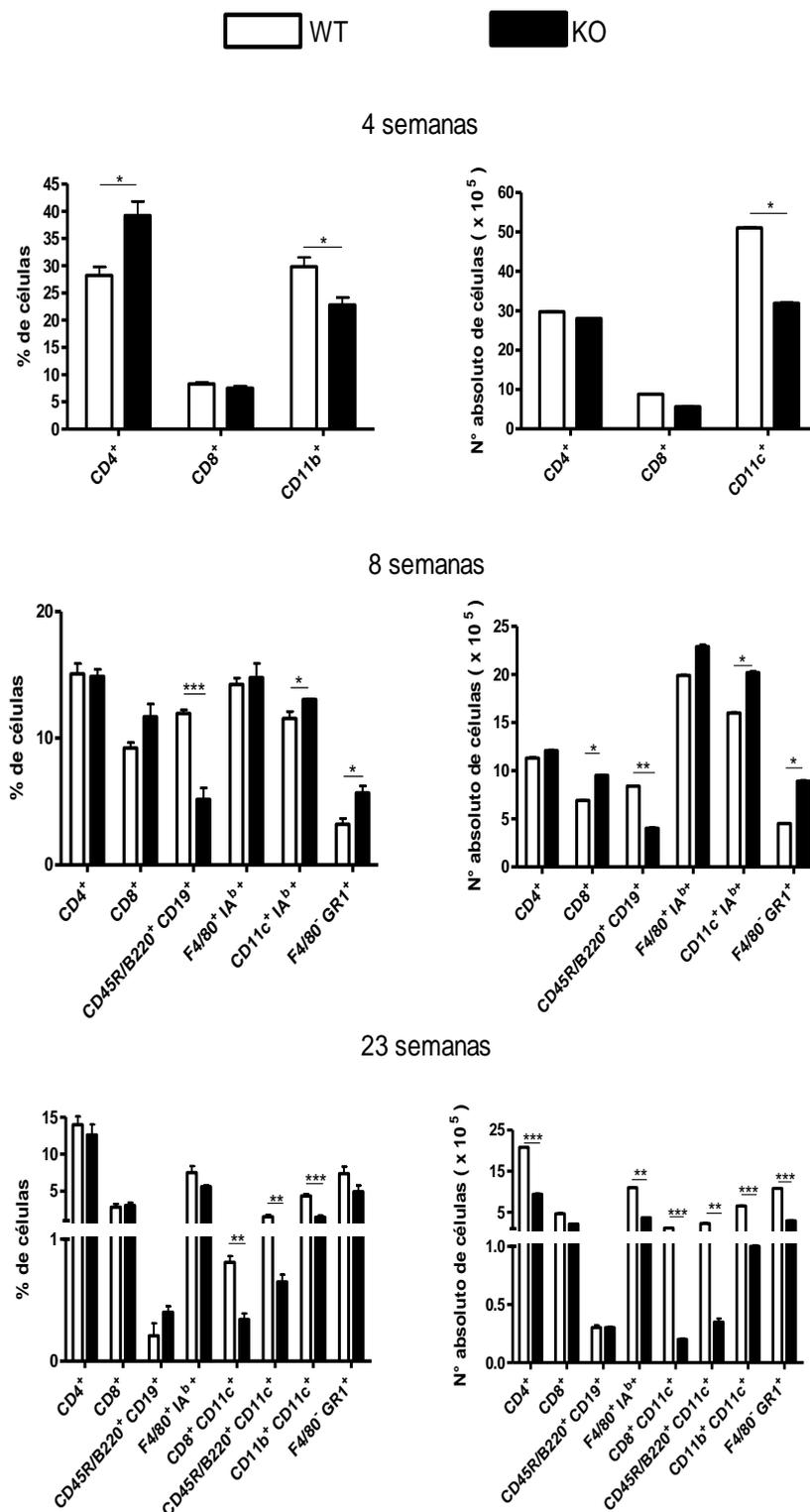


Figura 10. Quantificação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais; células B (CD45R/B220⁺CD19⁺), macrófagos (CD11b⁺); macrófagos ativados (F4/80⁺IA^{b+}), células dendríticas (DC) ativadas (CD11c⁺IA^{b+}); DC linfóide (CD8⁺CD11c⁺), DC plasmocitóide (CD11b⁺CD11c⁺); DC mielóide (CD11b⁺CD11c⁺); neutrófilo (F4/80⁺GR1⁺) em frequência (%) e número absoluto de células (x10⁵) presentes nos pulmões de camundongos WT e KO (n=5) após 4, 8 e 23 semanas de infecção com 1x10⁶ leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Analisamos também, o grau de ativação dos linfócitos infiltrantes do pulmão dos camundongos IL-10 KO e WT, bem como a presença de linfócitos de memória nesta população através da expressão dos marcadores **CD44** (molécula de adesão multifuncional de alta expressão tanto em células ativadas ou de memória), **CD62L** (L-selectina é uma molécula de adesão, cuja expressão é elevada em linfócitos que migram para sítios de inflamação e de baixa expressão em células de memória) e **GITR** (proteína que pertence à família de receptores de TNF [TNFR] e induzida por glicocorticóide; sua expressão está aumentada em células T efetoras e participa da modulação da atividade de células Treg; é um marcador mais específico para células T efetoras do que de células Treg -NOCENTINI et al., 2007).

A figura 11 mostra que camundongos IL-10 KO após 4 semanas de infecção apresentaram uma frequência maior de células T CD4⁺ de memória/efetora (CD4⁺CD44^{high}) e de células T CD8⁺ de memória/efetora (CD8⁺CD44^{high}) em relação aos camundongos WT (CD4⁺CD44^{high} WT 15,7±0,49 e KO 19,4±0,64 %; CD8⁺CD44^{high} WT 6,1±0,11 e KO 7±0,19 %). Em números absolutos de células o aumento foi mantido apenas para as células T CD4⁺ ativadas ou de memória na linhagem KO em relação ao seu grupo controle (CD4⁺CD44^{high} WT 4,8±0,01 e KO 5,5±0,02 x10⁵ células).

Verificamos após 8 semanas de infecção que a frequência de células T CD4⁺ de memória/efetora (CD4⁺CD62L^{low}CD44^{high}) e de T CD8⁺ memória/efetora (CD8⁺CD62L^{low}CD44^{high}) dos camundongos IL-10 KO foi maior do que nos camundongos WT (CD4⁺CD62L^{low}CD44^{high} WT 0,4±0,05 e KO 0,84±0,09 %; CD8⁺CD62L^{low}CD44^{high} WT 3,58±0,28 e KO 6,48±0,77 %).

As células T CD4⁺ ativadas (CD4⁺GITR⁺) dos camundongos IL-10 KO apresentaram uma frequência menor em relação ao grupo controle (CD4⁺GITR⁺ WT 2,18±0,23 e KO 1,15±0,10 %). Em números absolutos de células estas diferenças entre as linhagens foram mantidas (CD4⁺CD62L^{low}CD44^{high} WT 0,33±0,006 e KO 0,72±0,01 x10⁵ células; CD8⁺CD62L^{low}CD44^{high} WT 2,6±0,02 e KO 5,3±0,06 x10⁵ células; CD4⁺GITR⁺ WT 1,64±0,015 e KO 0,94±0,008 x10⁵ células).

A população de células T de memória é heterogênea em termos de fenótipo, distribuição anatômica e propriedades funcionais. A heterogeneidade do 7^o receptor de quimiocina CC (CCR7) e da L-selectina (CD62L) tem sido usada para classificar as células T de memória em duas populações funcionalmente distintas. As células T de memória central (T_{CM}) com fenótipo CD62L⁺CCR7⁺, que se localizam preferencialmente nos tecidos linfóides; enquanto células T de memória efetora (T_{EM}) são CD62L⁻CCR7⁻ e localizam-se preferencialmente nos tecidos periféricos (LEES e FARBER, 2010; OJDANA et al., 2008;

WOODLAND e KOHLMEIER, 2009). Alguns estudos mostraram que a expressão reduzida ou a perda de CD62L é mais rápida em células T CD8⁺ do que em células T CD4⁺ de memória (STOCKINGER; BOURGEOIS; KASSOTIS, 2006).

Após 23 semanas de infecção não observamos diferenças nas frequências das subpopulações estudadas, apenas em números absolutos de células houve redução de células T CD4⁺ memória/efetora (CD4⁺CD62L⁻CD44^{high}) dos camundongos IL-10 KO em relação aos camundongos WT (CD4⁺CD62L⁻CD44^{high} WT 12,2±0,23 e KO 1,8±0,03). As células T CD8⁺ de memória/efetora (CD8⁺CD62L⁻CD44^{high}) dos camundongos IL-10 KO também se apresentaram em menor número (CD8⁺CD62L⁻CD44^{high} WT 3,6±0,02 e KO 1,3±0,004 x10⁵ células). A frequência das células T CD4⁺ ativadas (CD4⁺GITR⁺) e T CD8⁺ ativadas (CD8⁺GITR⁺) dos camundongos IL-10 KO também foi menor em relação ao grupo controle (CD4⁺GITR⁺ WT 7±0,07 e KO 2±0,03 x10⁵ células; CD8⁺GITR⁺ WT 0,16±0,03 e KO 0,03±0,0006 x10⁵ células).

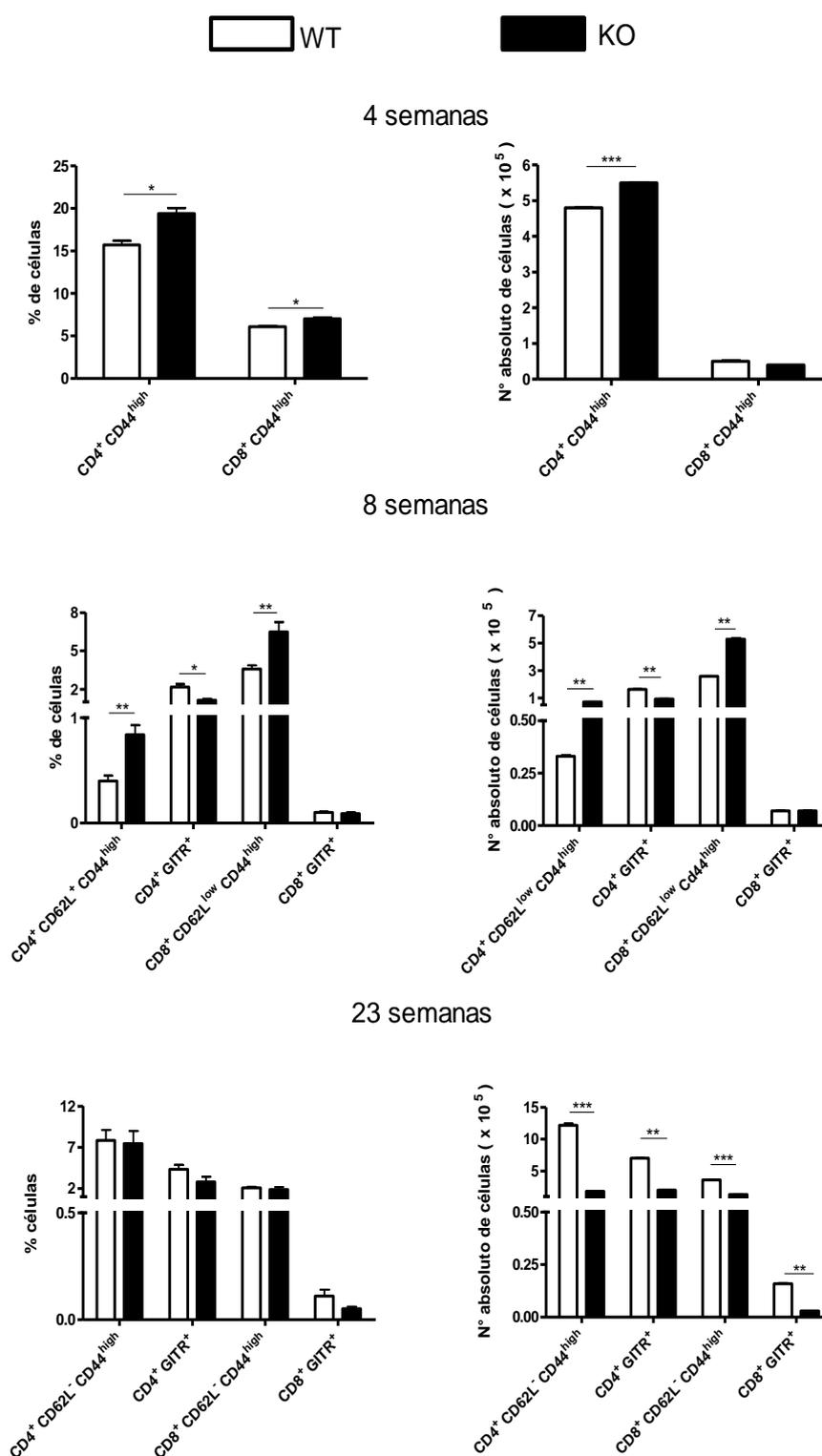


Figura 11. Quantificação de células T CD4 ativadas (CD4⁺GITR⁺); T CD8 ativadas (CD8⁺GITR⁺); T CD4 de memória/efetora (CD4⁺CD62L^{low} ou - CD44^{high}); T CD8 de memória/efetora (CD8⁺CD62L^{low} ou - CD44^{high}) em frequência (%) e em número absoluto de células (x10⁵ células) presente nos pulmões de camundongos WT e KO (n=5) após 4, 8 e 23 semanas de infecção com 1x10⁶ leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Verificamos também a presença de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) no infiltrado pulmonar de camundongos IL-10 KO e no WT, pela técnica de citometria de fluxo. A percentagem de células T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ foi obtida pela quantificação de células triplamente positivas em *gate* de células T $CD4^+CD25^+$. As populações de linfócitos totais, linfócitos T $CD4^+$, T $CD4^+CD25^+$ e T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ com relação ao tamanho e granulosidade dessas células, foram determinadas em percentagem utilizando *gates* individuais.

A figura 12 mostra que na 8ª semana após infecção não há diferenças tanto em percentagem como em número absoluto de células T reguladoras entre as linhagens IL-10 KO e WT. Contudo, em relação à 23ª semana de infecção observamos uma significativa redução em número absoluto de células T reguladoras nos camundongos IL-10 KO em relação aos WT ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$ WT $4,6 \pm 0,04$ e KO $2,2 \pm 0,05 \times 10^5$ células).

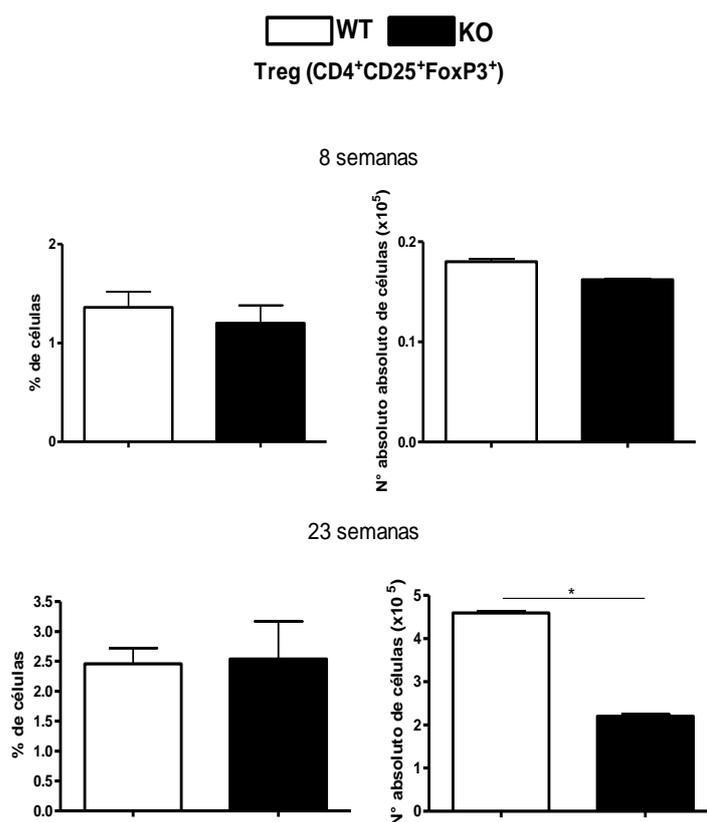


Figura 12. Quantificação de células Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) em frequência (%) e número absoluto de células ($\times 10^5$) presentes nos pulmões de camundongos WT e KO ($n=5$) após 8 e 23 semanas de infecção com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t. (* $p < 0,05$).

4.3.5 Avaliação da Resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT)

Os camundongos WT e IL-10 KO infectados pelo *P. brasiliensis* foram submetidos ao teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) pela inoculação do antígeno de Fava Netto no coxim plantar dos camundongos vinte e quatro horas antes do sacrifício.

A figura 13 mostra a média de valores obtidos no teste de HTT em mm, após 8 semanas de infecção. Nossos resultados mostram que os camundongos IL-10 KO ($0,210 \pm 0,024$ mm) tiveram uma resposta maior quando comparados ao grupo WT ($0,130 \pm 0,018$ mm). Ambas as linhagens mostraram-se positivas no teste quando comparadas aos seus controles normais (não infectados).

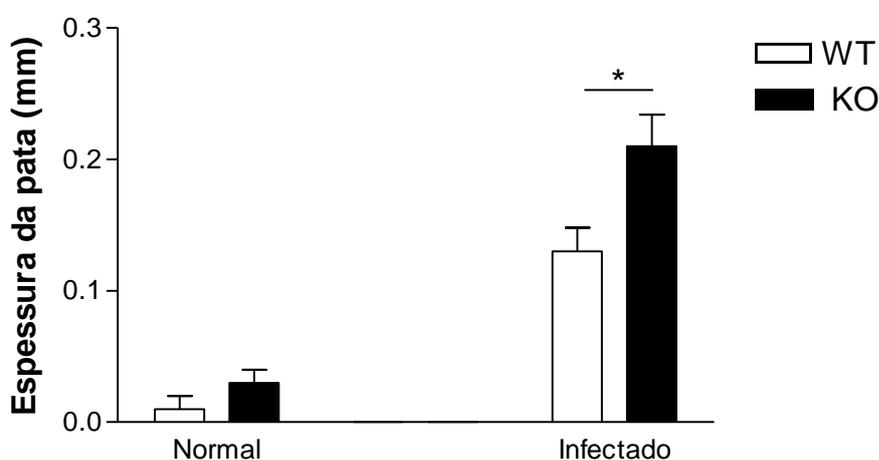


Figura 13. Efeito da infecção com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* na resposta de Hipersensibilidade do Tipo Tardio (HTT) em camundongos WT e KO ($n = 10$). Os camundongos foram submetidos ao ensaio de HTT com antígeno de Fava Netto 8 semanas após a infecção. Camundongos de cada linhagem não infectados foram usados como controle adicional (* $p < 0,05$).

4.3.6 Análise Histopatológica

Utilizamos também a análise histopatológica de órgãos após 8 semanas de infecção como outro parâmetro de avaliação da gravidade da doença.

Em todos os camundongos do grupo WT foi identificada pneumonia piogranulomatosa de magnitude variada, relacionada à quantidade de colônias micóticas presentes. Estas se localizaram preferencialmente em territórios peribronquiolares, constituindo sítios de consolidação parenquimatosa, com perda de áreas de trocas gasosas. Presença de múltiplas lesões piogranulomatosas, subvertendo a arquitetura pulmonar, evidenciando-se lesões nodulares, amíúde confluentes, concentrando-se nas cercanias de estruturas bronquiolares. Ao centro identificam-se exemplares do parasita, associados a popul populações celulares predominantemente macrofágica e neutrofílica. Destaque para a modulação macrofágica, observando-se células gigantes multinucleadas e células epitelióides. As lesões apresentam-se parcialmente delimitadas por linfócitos (Figura 14A). Lesões análogas, porém com menor frequência e de menores dimensões aparecem em fígado, principalmente em territórios centroacinares e mediozonais (Figura14C). No baço, discretos agregados parasitários são achados infreqüentes (Figura 14D). Em todas as situações a visualização das estruturas fúngicas foi otimizada com o uso do método de Grocott.

Nos camundongos KO as estruturas de fígado e baço mostraram-se preservadas, sendo identificado em território pulmonar processo inflamatório que variou de intersticial a piogranulomatoso difuso, em 5 dos 9 camundongos avaliados, com menor infiltração linfocitária (Figura 15), se comparado ao padrão evidenciado nos camundongos controle. Estruturas parasitárias foram identificadas ocasionalmente (Figura 15D).

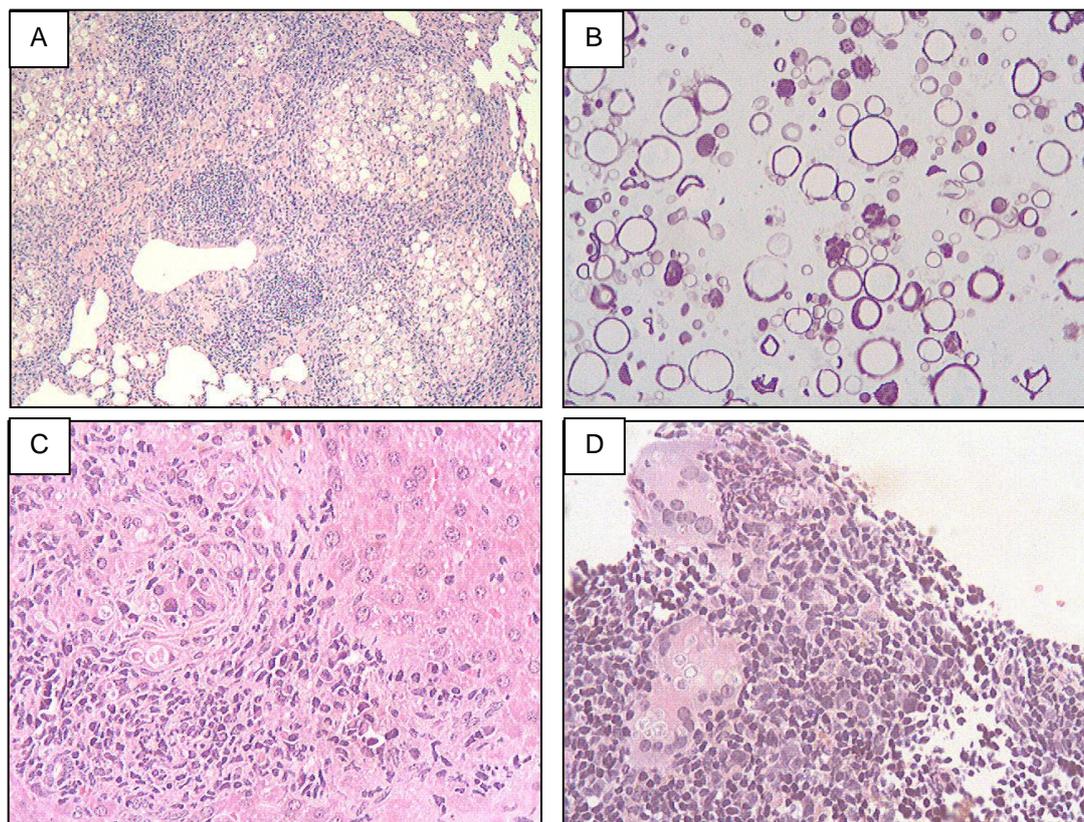


Figura 14. Fotomicrografias de corte histológico de órgãos na 8ª semana após a infecção de camundongos WT com 1×10^6 leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*. (A) Pulmão apresentando consolidação do parênquima tecidual, caracterizada por múltiplas lesões piogranulomatosas, com frequente confluência, exibindo parasitas ao centro, associados a macrófagos e polimorfonucleares e periféricamente a linfócitos. H/E, 10x. (B) Detalhe da fotomicrografia anterior evidenciando agregados de *P. brasiliensis* em parênquima pulmonar. Grocott, 40x. (C) Fígado evidenciando lesão piogranulomatosa circundada por linfócitos. H/E, 40x. (D) Baço apresentando células gigantes em periferia tecidual albergando exemplares de *P. brasiliensis*. H/E, 40x.

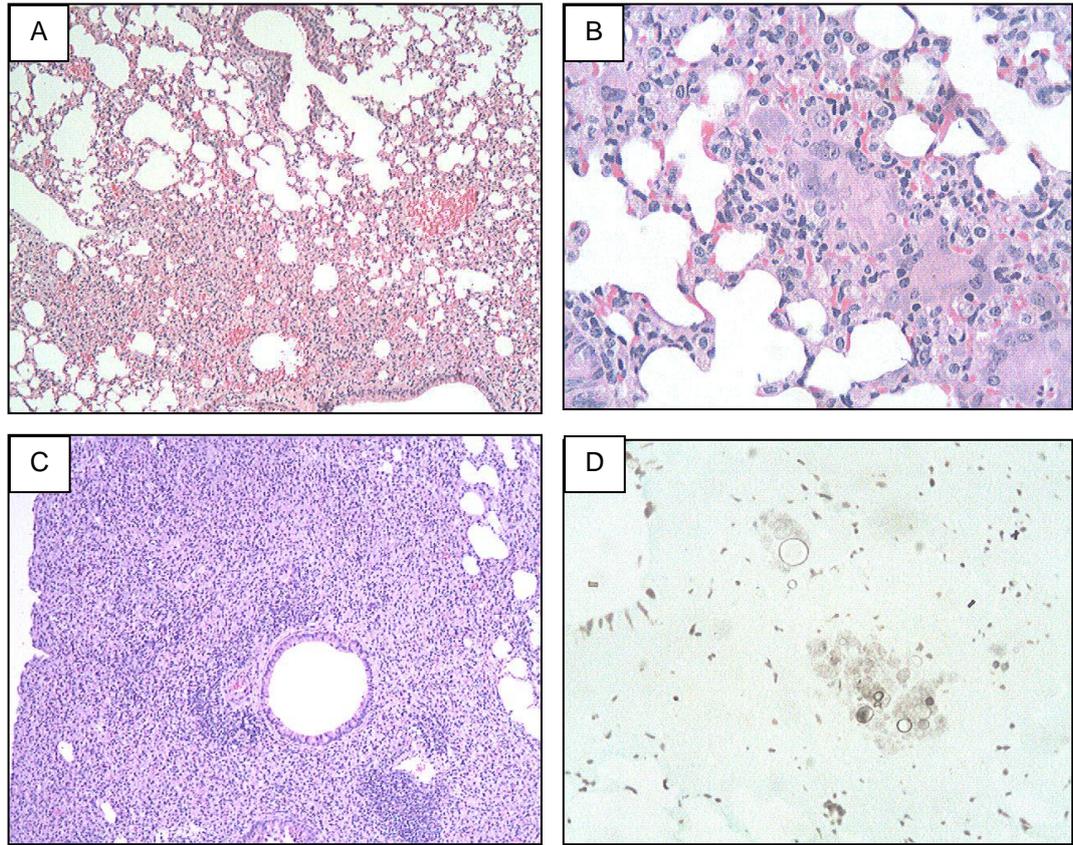


Figura. 15. Fotomicrografias de corte histológico do pulmão de camundongos KO na 8ª semana após a infecção com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* (A) Destacando incremento intersticial. H/E, 10x. (B) Detalhe da fotomicrografia anterior evidenciando agregação leucocitária mista, com freqüente presença de células gigantes multinucleadas e neutrófilos. H/E, 40x. (C) Pulmão evidenciando importante consolidação de parênquima associada à densa infiltração macrófagica e polimorfonuclear, com escassa participação linfocitária. H/E, 10x. (D) Pulmão evidenciando escassos parasitas em meio ao parênquima consolidado. Grocott, 10x.

4.3.7 Avaliação do tempo médio de sobrevivida

Grupos de 12 camundongos WT e IL-10 KO infectados com 1×10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* foram mantidos sob observação para o estudo da mortalidade. Os resultados obtidos são apresentados na figura 16.

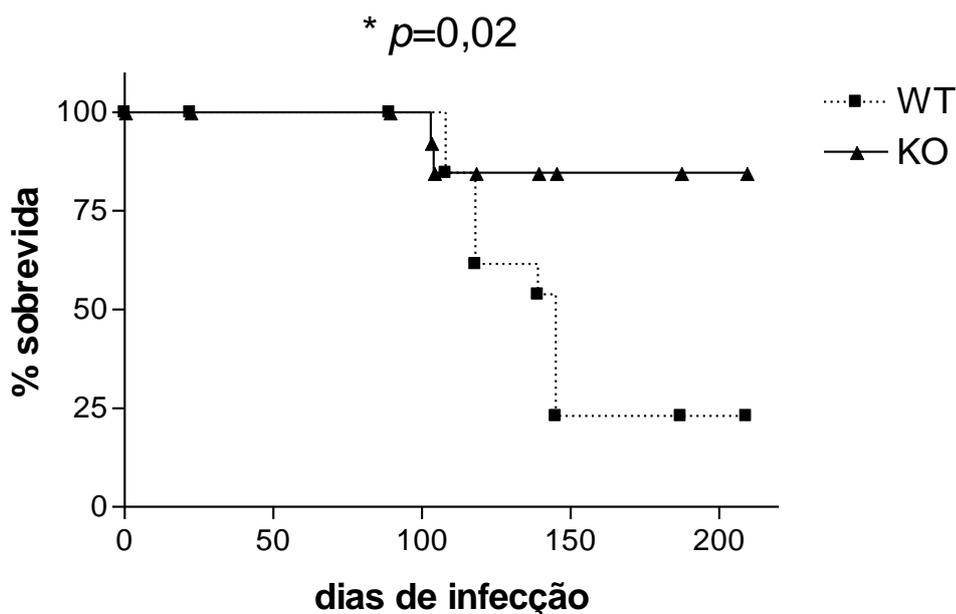


Figura 16. Tempo de sobrevivida de camundongos WT e KO infectados com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* via i.t. O experimento foi acompanhado durante 200 dias de infecção, $n=12$ (* $p<0,05$).

No ensaio de sobrevivida dos camundongos IL-10 KO, após 200 dias de infecção, 10 camundongos continuaram vivos (sobrevivida em torno de 90%); enquanto nos camundongos WT apenas dois camundongos continuaram vivos (sobrevivida em torno de 25%). Portanto, a análise estatística destes dados de sobrevivida (método de comparação de curvas de sobrevivida pelo teste de LogRank) demonstrou haver diferença significativa entre as duas linhagens.

Analisamos o número de fungos viáveis (UFC) presentes no pulmão, fígado e baço dos camundongos sobreviventes aos 200 dias pós-infecção e verificamos que leveduras viáveis foram encontradas apenas nos pulmões dos camundongos IL-10 KO, sem presença de leveduras nos outros órgãos. Em contraste, camundongos WT apresentavam neste tempo carga fúngica expressiva nos pulmões e presença de grande número de fungos nos órgãos de disseminação (baço e fígado), figura 17.

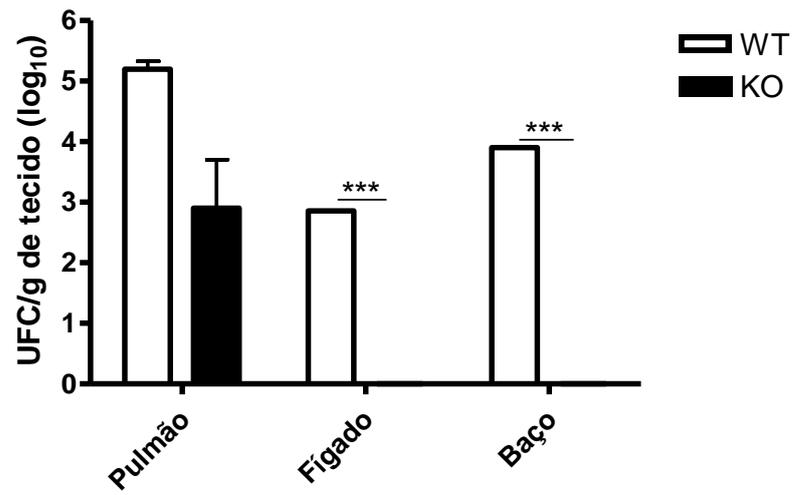


Figura 17. Avaliação da carga fúngica por contagem do número de UFC/g de tecido (em log₁₀) em camundongos WT e KO (n = 12) após 200 dias de infecção com 1x10⁶ leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t. (***) p<0,001).

5 DISCUSSÃO

Monócitos e macrófagos têm um papel fundamental na resposta imune inata e adaptativa contra infecções fúngicas sistêmicas. O desequilíbrio na secreção de citocinas supressoras e estimulatórias, causada por estas células, pode influenciar no desenvolvimento da doença, na morte do microorganismo e na natureza da resposta imune adaptativa. Como os macrófagos são as primeiras células que interagem com *P. brasiliensis* (BRUMMER et al., 1988, 1989), iniciamos nossos estudos a partir desta interação usando ensaios *in vitro*.

Ao analisarmos a interação dos macrófagos com o Pb verificamos uma menor recuperação de leveduras viáveis nas culturas de macrófagos provenientes dos camundongos IL-10 KO infectados por 2 horas e co-cultivados por 48 horas. Além disso, observamos uma maior atividade fagocítica destas células, acompanhada de uma elevada produção de IFN- γ , TNF- α , óxido nítrico (NO) e MCP-1 tanto espontaneamente como na presença do fungo. Assim, macrófagos de camundongos deficientes de IL-10 têm uma atividade biológica aumentada por estímulo direto do fungo e/ou de IFN- γ , que foi produzido por outra célula presente nesta cultura. Nossos dados sugerem que a presença de células NKT contaminantes na cultura destes macrófagos seja a responsável pela produção de IFN- γ detectada. Assim, na PCM nossos dados sugerem o papel supressor da IL-10 sobre o comportamento de macrófagos *in vitro* frente ao Pb e na ação protetora das células NKT secretoras de IFN- γ , que podem funcionar como ativadoras de fagócitos.

Os resultados *in vitro* dão boas indicações do comportamento da imunidade inata *in vivo*. Os mecanismos subjacentes aos resultados obtidos necessitam, entretanto, de investigações posteriores. Apesar de não termos estudado os mecanismos de ativação celular dos macrófagos de camundongos IL-10 KO em comparação com os selvagens, nossos resultados demonstram uma maior atividade fungicida dos macrófagos deficientes em IL-10, estando esse fato possivelmente correlacionado com a síntese de NO e de citocinas ativadoras de macrófagos, tais como IFN- γ e TNF- α .

Células *T natural killer* (NKT) constituem uma subpopulação de células efetoras da imunidade inata, que têm características tanto de células T quanto de células *natural killer* (NK). Sua habilidade de secretar rapidamente grandes quantidades de citocinas pré-formadas sob ativação torna-as uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa (VASAN e TSUJI, 2010).

Vários estudos têm demonstrado a expansão de células NKT durante processos infecciosos e sua importância na defesa do hospedeiro, pois células NKT podem secretar

grandes quantidades de IFN- γ ou IL-4 imediatamente após o encontro com o antígeno e contribuírem tanto na diferenciação de células Th1 como Th2. Corroborando com nossos dados, foi verificado por Kawakami e colaboradores em modelo murino para *Cryptococcus neoformans* um acúmulo de células NKT no pulmão dos camundongos infectados e o importante papel destas células no desenvolvimento da resposta Th1, gerando resistência a este fungo patogênico pelo hospedeiro (KAWAKAMI et al., 2001).

A IL-10 é uma importante citocina imunoreguladora que interfere no balanço Th1/Th2 além de inibir a síntese de NO estimulada por IFN- γ (CUNHA et al., 1992). Fato este que resulta na diminuição da resistência a patógenos, uma vez que mecanismos dependentes de NO são empregados por macrófagos murinos para destruir leveduras de *P. brasiliensis* (CANO, 1995; GONZALES, et al., 2000). Além disso, o IFN- γ também confere resistência ao *P. brasiliensis* por estimular a formação de granuloma e produção de NO (BOCCA et al., 1998; GONZALEZ et al., 2000; SOUTO et al., 2000).

Nossos resultados também mostraram que camundongos IL-10 KO produzem espontaneamente, ou sob infecção, grandes quantidades de NO em relação aos seus controles. Dados semelhantes foram observados por Del Sero, et al. (1999), que demonstraram a produção espontânea ou induzida de NO, por macrófagos de camundongos IL-10 KO, pela infecção com *C. albicans*. Estudos recentes *in vitro* demonstraram que a IL-10 inibe a atividade fungicida de macrófagos de BALB/c, contra o *P. brasiliensis*, ativados com IFN- γ ou TNF- α e que sua supressão foi associada à redução da liberação de NO e H₂O₂. Neste mesmo estudo o TGF- β não teve efeito sobre a atividade fungicida dessas mesmas células. Os autores propõem que a IL-10 possa representar um mecanismo de escape do fungo à resposta imune do hospedeiro (MOREIRA; DIAS-MELICIO; SOARES, 2010).

A MCP-1 é uma quimiocina que tem um papel fundamental na patogênese de várias doenças e no recrutamento de células mononucleares para o órgão alvo da infecção (OMATA et al., 2002). Uma das principais fontes de quimiocinas durante infecções agudas são os macrófagos (FLESCHE; BARSIG; KAUFMANN, 1998), cuja atividade é modulada positivamente, principalmente, por IFN- γ (IKEDA et al., 2002). A IL-10 tanto pode inibir a produção da quimiocina MCP-1 em macrófagos ativados através do fator de transcrição NF- κ B, como pode estimular sua produção nos macrófagos em repouso pelo fator de transcrição STAT1 (IKEDA et al., 2002). A elevada produção de MCP-1 nos macrófagos dos camundongos IL-10 KO, observada em nossos experimentos talvez possa ser justificada pela ausência de IL-10 que inibiria a sua formação.

Verificamos também que a produção de MCP-1 por macrófagos peritoneais aumentou na presença do fungo. Na infecção pulmonar com *Cryptococcus neoformans*, MCP-1 além de recrutar leucócitos também amplificou a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (HUFFNAGLE et al., 1995). Em outro estudo, a infecção de camundongos deficientes de MCP-1 com *Cryptococcus neoformans* reduziu significativamente o número de células NKT no pulmão destes animais, sugerindo que a produção de MCP-1 precede o aumento de células NKT no pulmão (KAWAKAMI et al., 2001). Supomos que este fenômeno possa também ocorrer em nosso modelo, uma vez que observamos a presença de células NKT na cultura de macrófagos com elevada produção de MCP-1.

Outro dado obtido, no experimento *in vitro*, refere-se à inibição da síntese de IFN- γ e na diminuição das concentrações NO, MCP-1 e TNF- α nos animais IL-10 KO após a adição exógena de IFN- γ , independente da presença do fungo. Supomos que tal resultado possa ser justificado pela presença de proteínas supressoras da via de sinalização de citocinas (SOCS). Vários estudos mostram que as proteínas SOCS são reguladores fisiológicos tanto da imunidade inata como da adaptativa. Estas moléculas regulam positivamente e negativamente macrófagos e são essenciais no desenvolvimento e diferenciação das células T (MUHL e PFEILSCHIFTER, 2003; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007). Além da regulação por SOCS, outros mecanismos em paralelo podem ocorrer como a inibição da produção de MCP-1 através da existência de níveis elevados de NO. Tal fenômeno é dependente da molécula I κ B, um fator inibidor de NF- κ B (BLEASE; KUNKEL; HOGABOAM, 2000). Em contrapartida, a MCP-1 pode inibir a síntese de NO através da ativação do seu receptor, o CCR2, que em modelo murino suprime a expressão de mediadores inflamatórios através da regulação do gene da iNOS (OKUMA et al., 2006). Portanto, como macrófagos expressam o receptor CCR2, isto também poderia explicar a redução de MCP-1 observada em nossos experimentos.

Após 2 semanas de infecção *in vivo* observamos uma menor carga fúngica nos pulmões de camundongos IL-10 KO associada a um acentuado aumento da imunidade humoral, com predomínio dos isótipos IgG1, IgG2a e IgG2b. Como a ausência de IL-10 também pode causar um ambiente mais pró-inflamatório nos órgãos linfóides secundários, com síntese elevada de IL-6, esta poderia desempenhar um papel importante na ativação de células B (KUROKAWA et al., 2007). Outros estudos corroboram com esta hipótese Del Sero verificou que camundongos IL-10 KO produzem espontaneamente ou quando infectados com *C. albicans* ou *A. fulmigatus* elevadas quantidades de IL-6 e dos isótipos IgG2a e IgG1 (DEL SERO et al., 1999). Além disso, em pacientes com paracoccidiodomicose (PCM) a produção

de IL-6 endógena pode ocorrer devido a uma ação direta do fungo sobre os macrófagos, justificando os altos níveis de anticorpos encontrados nesses pacientes (PERAÇOLI et al., 2003).

A elevada presença de anticorpos sugere que o sistema imune de animais IL-10 KO seja ativado mais precocemente em relação aos animais WT. Como na PCM a produção de anticorpos já foi mostrada ser um fenômeno T-dependente (BURGER et al., 1996), pode-se supor que pela menor carga fúngica, após duas semanas de infecção, o sistema imune dos camundongos KO (tanto as células T como as células B) esteja precocemente ativadas. Além disso, a ausência de IL-10 determinaria uma maior atividade das citocinas pró-inflamatórias e ativadoras do sistema imune.

O padrão de isótipos observado na 2ª semana pós-infecção sugere uma ativação mista do tipo Th1/Th2, pois a mudança para o isótipo IgG1 pode ser mediada por IL-4 ou IL-12 ou IFN- γ (FAQUIM-MAURO et al., 1999), IgG2a por IFN- γ e IgG2b por TGF- β (SNAPPER e MOND, 1993).

As citocinas IL-4 e IL-5 não foram detectadas nos homogenatos de pulmão dos animais KO, porém, isso não exclui a ativação de células B na resposta imune dos órgãos linfóides periféricos. A produção de anticorpos parece estar refletindo a ativação de células Th2, importantes para a indução da resposta imune humoral, assim como a síntese de citocinas que regulam a mudança de isótipo para IgG1, IgG2a e IgG2b (SNAPPER e MOND, 1993). Contrariando os dados da resposta sérica, níveis maiores de IL-4 e IL-5 foram observados nos pulmões de camundongos WT. Assim, há uma dissociação do achado sistêmico (soro) daquele do sítio de infecção. A maior persistência de IL-5 em animais IL-10 normais parece refletir a maior influência da IL-10 sobre a síntese de IL-5 do que na IL-4 (STUMPO et al., 2003).

Após 4 semanas de infecção, a carga fúngica manteve padrão equivalente ao de 2 semanas quanto à diferença entre as duas linhagens, e, novamente, animais IL-10 KO apresentaram infecção mais branda, cerca de 4 vezes menor que a dos animais WT. Verificamos, porém, neste tempo, redução na produção de anticorpos nos camundongos KO e os valores tornaram-se similares aos dos controles. Parece então que a maior ativação do sistema imune ocorrido na 2ª semana de infecção continue contribuindo com o controle da carga fúngica. Corroborando com esta interpretação, observamos uma frequência aumentada de células T CD4⁺ e uma maior expressão do marcador CD44^{high}, tanto em células T CD4⁺ como T CD8⁺. Assim, apesar do número absoluto de células ser equivalente nas duas linhagens, o grau de ativação do sistema imune através do marcador CD44^{high} parece ser

maior nos camundongos IL-10 KO. A população de macrófagos neste tempo de infecção também foi analisada, e a frequência das células CD11b⁺ nos camundongos KO foi significativamente menor que a dos WT. Como observamos maior ativação das células TCD4⁺ e TCD8⁺ nos animais IL-10 KO e menor frequência de células CD11b⁺, é possível que neste tempo da inflamação os monócitos tenham se diferenciado para macrófagos ativados ou células dendríticas, baixando a expressão de CD11b⁺ e aumentando a expressão de CD11c⁺ (BYRNE; KNOX; HALLIDAY, 2008). Estudos posteriores de caracterização de outros marcadores de ativação de macrófagos e células dendríticas puderam contribuir para o esclarecimento deste achado.

CD44 é uma molécula de adesão multifuncional expressa na superfície de muitos tipos celulares e o principal receptor do ácido hialurônico ou hialuronato, um componente fundamental da matriz extracelular (BOLLYKY et al., 2007; CABRERA et al., 2004; CICHY e PURÉ, 2003). Quando o hialuronato é degradado durante infecção ou injúria tecidual, moléculas de baixo peso molecular são geradas e suas interações com componentes celulares podem influenciar na inflamação (BOLLYKY et al., 2007).

Em relação à expressão de CD44 nas células T, demonstrou-se que o TNF- α é a principal citocina que induz a sua expressão, enquanto a IL-4 é responsável pela sua inibição (BOLLYKY et al., 2007; CICHY e PURÉ., 2003). A IL-10, entretanto, tem duplo efeito; sozinha esta citocina induz a ligação do hialuronato ao CD44, mas inibe a ligação do hialuronato induzida por IL-1 em monócitos (PURÉ e CUFF, 2001).

Alguns estudos têm mostrado que CD44 está envolvido no recrutamento das células T para locais de inflamação, bem como na regulação da injúria endotelial mediada por estas células (TEDER et al., 2002). Em adição, as células T através de CD44 estimulam os macrófagos a produzir mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α (BLASS; PURÉ; HUNTER, 2001). Assim, nossos dados sugerem que a expressão aumentada de CD44 tenha sido facilitada nos camundongos IL-10 KO devido à ausência de seu principal inibidor, a IL-4. Realmente, foi observada uma produção muito baixa, ou ausência de IL-4, nos homogenatos de tecidos dos animais KO. Neste ponto da infecção observamos evidente ativação da imunidade celular, com visível redução da imunidade humoral. Pelos dados da literatura podemos supor que com 4 semanas de infecção a maior ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ via CD44 tenha proporcionado uma migração facilitada aos locais inflamados. Além disso, células T com alta expressão de CD44 têm sua atividade efetora ampliada.

Em paralelo à sua ação estimulatória na imunidade celular, o CD44 na imunidade inata apresenta uma ação inversa, ou seja, é regulador negativo desta resposta. Na literatura há

evidências da importância do CD44 na superfície de macrófagos para regulação da resposta inflamatória. Além de CD44 ser importante na remodelação da matriz extracelular de tecidos danificados, foi sugerido também que exerce uma ação inibidora da resposta inflamatória na imunidade inata, através da promoção da expressão de importantes reguladores negativos de macrófagos, prevenindo a injúria tecidual por inflamação excessiva (LIANG et al., 2007; PURÉ e CUFF, 2001).

Vale ressaltar que células T de memória formam um grupo heterogêneo de células de vida-longa que são caracterizadas fenotipicamente pelos altos níveis de expressão de CD45RO em humanos e de CD44 em camundongos (BOYMAN et al., 2009).

A partir de 8 semanas de infecção a diferença na carga fúngica entre as duas linhagens ficou muito evidente, em torno de 3.700 vezes menor nos camundongos KO. Esta grande atividade fungicida dos animais KO está possivelmente associada ao aumento da eficiência da imunidade celular em relação à imunidade humoral. Realmente, neste tempo os camundongos KO apresentaram um aumento significativo no teste de hipersensibilidade do tipo tardio e seus níveis de anticorpos foram significativamente mais baixos em relação que aqueles dos camundongos WT.

Na 8ª semana de infecção houve aumento na concentração de todas citocinas em ambas as linhagens estudadas, mas só a IL-5 apareceu em menor concentração nos camundongos KO. Assim, a ausência de IL-10 resultou na redução dessa citocina Th2, mas os níveis de IFN- γ foram semelhantes nas duas linhagens. É bastante interessante este achado. A ausência de IL-10 resultou em inibição de síntese de IL-5, mas não induziu a síntese exacerbada de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-12, que em outros modelos de infecção em animais IL-10 KO foram os grandes responsáveis pela exacerbada patologia tecidual (HUNTER et al., 1997; GAZZINELLI et al., 1996).

Realmente, nossos dados de histopatologia não demonstram patologia tecidual inflamatória exacerbada nos camundongos IL-10 KO. Assim, a ausência de IL-10 mostrou ser benéfica por reduzir drasticamente a carga fúngica e não causar dano tecidual concomitantemente.

Vale destacar que a análise histológica dos órgãos das duas linhagens neste tempo de infecção também revelou diferenças marcantes, pois nos camundongos KO houve ausência de granulomas nos pulmões e a presença do fungo foi muito rara. O pulmão evidenciou somente infiltração macrofágica e polimorfonuclear, e, além disso, não houve disseminação nem alteração morfológica dos outros órgãos. Em contraste, nos camundongos WT foi abundante a presença de granulomas e do fungo nos pulmões bem como nos demais órgãos analisados.

Assim, as lesões nos pulmões de animais WT parecem ter comprometido as funções deste órgão, enquanto que em camundongos IL-10 KO a redução microbiológica parece ter induzido a involução das lesões teciduais.

A análise fenotípica das células do pulmão de camundongos IL-10 KO ratifica os dados anteriores, pois verificamos neste tempo de infecção redução na frequência de células B, que justifica os baixos níveis de anticorpos. O aumento na frequência de neutrófilos confirma os dados histológicos, que pode contribuir na redução da carga fúngica no pulmão desses animais. Observamos também aumento de células T CD8⁺, que com sua atividade citotóxica podem contribuir também na eliminação do fungo. Além disso, houve redução na frequência de células T CD4⁺GITR⁺, indicando redução nas células T ativadas ou Treg. O aumento na frequência de células dendríticas é coerente com o elevado aumento de células T memória/efetora (fenótipo CD44^{high}CD62L^{low} ou ⁻). Assim, neste ponto da infecção, parece haver começado a desativação do sistema imune, porém as células dendríticas permaneceram como um elo para ativação das células T memória/efetora de padrão Th1.

Na 8ª semana de infecção o que mais sobressai é a elevada frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória/efetora (CD62L^{low} ou ⁻ CD44^{high}). Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos IL-10 KO infectados com *Histoplasma capsulatum*, que também apresentaram aumento na frequência de células T de memória (CD3⁺CD62L^{low}CD44^{high}IFN- γ ⁺) vinculada a uma eliminação acelerada deste fungo. Os autores propõem que este fenômeno seja resultado da elevada atividade biológica destas células e não da sua maior frequência, pois 49 dias após a exposição ao patógeno, ambas linhagens WT e IL-10 KO apresentaram o mesmo número de células de memória (DEEPE e GIBBONS, 2003). Acreditamos que o mesmo fenômeno deva ter ocorrido em nosso modelo.

A IL-10 é geralmente supressiva para células T CD4, mas para células T CD8 pode ser estimulatória ou supressiva dependendo da situação, como tipo de patógeno e do ambiente antigênico geral (BROOKS et al., 2010). Em nosso modelo, a IL-10 tem um efeito supressor nas células T CD8, pois na ausência de IL-10 ocorreu aumento dessa população.

Nossos resultados com 16 semanas de infecção foram muito semelhantes ao de 8 semanas. Houve aumento na diferença na carga fúngica, esta se tornou 44.000 vezes maior nos animais WT, e observamos também redução na imunidade humoral dos camundongos KO (isótipo IgG1 apresentou uma diminuição significativa). Em relação as citocinas, além da habitual redução da IL-5, notamos também redução da IL-2 no pulmão desses animais. Parece, então, que todos os indicadores de ativação do sistema imune apresentaram-se diminuídos em função da involução da infecção.

Ainda em referência à alteração na produção de IL-5 em camundongos IL-10 KO há relatos de que na infecção com a bactéria *Clamydia trachomatis* a produção de IL-5 é comparável ao dos WT nos estágios iniciais da doença. Todavia, há diferença na produção de TGF- β em estágios posteriores, sendo que os camundongos KO mostraram níveis mais baixos de IL-5 (YANG et al., 1999). Estes autores especulam que a variação na produção de IL-5 pode refletir um efeito indireto mediado pela elevação persistente de IFN- γ e/ou outra citocina de padrão Th1 e que são inibitórias para o desenvolvimento de células Th2, devido a ausência da imunoregulação de IL-10 (YANG et al., 1999).

No nosso trabalho não observamos aumento de nenhuma citocina do tipo 1 nos homogenatos dos órgãos, porém houve uma consistente diminuição de IL-5. Talvez essa regulação mediada por maior síntese de citocinas pró-inflamatórias tenha ocorrido nos órgãos linfóides secundários e não se manifestou no sítio de infecção.

Na 23ª semana de infecção a redução da carga fúngica dos camundongos IL-10 KO manteve-se em relação aos camundongos WT. Verificamos que na análise fenotípica das células do pulmão de camundongos IL-10 KO ocorreu redução significativa nas populações de linfócitos T CD4⁺, neutrófilos, macrófagos e em células dendríticas. Este mesmo fenômeno aconteceu em relação às populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória/efetora. Esta diminuição geral nas populações justifica-se pela redução do patógeno frente à eficiência biológica funcional dessas células.

Avaliamos também a presença de células Treg em nosso modelo após 8 e 23 semanas de infecção e verificamos que apenas na 23ª semana houve uma redução de células Treg. Supomos que devido à ausência de IL-10 a frequência de células Treg tenham diminuído e que sem a presença destas células inibitórias a atividade efetora das células TCD4⁺ e TCD8⁺ tenham sido mais eficiente na eliminação do patógeno. Um trabalho recente corrobora com nosso dado, onde a expressão de FoxP3 em células T reg diminuiu pela neutralização de IL-10 com anticorpos anti-IL-10 em esplenócitos de camundongos C57Bl/6 (LIU et al., 2009), demonstrando o papel regulador da IL-10 em células Treg.

No ensaio de mortalidade, ocorreu uma alta e significativa sobrevivência de 90% dos camundongos IL-10 KO após 200 dias de infecção em relação aos 25% de sobrevivência dos camundongos WT, acompanhada de baixa carga fúngica nos pulmões, sendo que a carga fúngica foi praticamente nula em todos os órgãos de disseminação nos camundongos IL-10 KO sobreviventes. A infecção de camundongos IL-10 KO com *T. cruzi*, conforme relato de Hunter e colaboradores, resultou em morte precoce, após 10 a 13 dias de infecção associada a uma baixa parasitemia (HUNTER et al., 1997). Na infecção com *Toxoplasma gondii*, animais

IL-10 KO sucumbem com 2 semanas de infecção, sem evidências de aumento na proliferação do parasita, porém associada ao elevado grau de inflamação (GAZZINELLI et al., 1996). Em ambos os casos, o aumento da mortalidade foi associada a uma superprodução das citocinas IL-12 e IFN- γ ou IL-12 e TNF- α . Estes mediadores causam grande atividade inflamatória e lesão tecidual causando morte dos hospedeiros. Em contraste, na infecção com *Chlamydia trachomatis* este fenômeno não ocorre devido a uma baixa e transitória produção de IL-12 e TNF- α . (YANG et al., 1999) e este achado é muito mais próximo àquele observado em nosso modelo.

Nossos dados de mortalidade foram opostos aos modelos de infecção com *T. cruzi* ou *T. gondii* em termos de toxicidade aguda. Isto pode ser o reflexo de diferenças na patogênese natural entre os microorganismos utilizados e nos mecanismos de imunoregulação envolvidos na patogênese. Por exemplo, *T. gondii* possui superantígenos que podem estimular uma grande proliferação de células T, e a IL-10 tem papel fundamental na inibição da ativação desta célula por superantígenos. Em relação a *Chlamydia trachomatis*, não há evidências que tenha um superantígeno (YANG et al., 1999), e talvez o mesmo ocorra com o *P. brasiliensis*. Aliado a isso, a baixa carga fúngica decorrente de uma resposta imune eficiente, também justifica a elevada sobrevivência dos camundongos IL-10 KO.

Em conjunto, o nosso trabalho demonstra que a IL-10 é citocina que exacerba a PCM e a sua ausência resulta no controle da infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis*. A ausência de IL-10 propicia a ativação precoce do sistema imune e isso pôde ser verificado por vários parâmetros: a síntese precoce de anticorpos, a maior reatividade no teste de HTT (uma reação mediada por linfócitos Th1; MOSMANN e COFFMAN, 1989) e uma maior expressão do marcador de ativação CD44 tanto em linfócitos TCD4⁺ como TCD8⁺ ativados e de memória. Um dado marcante por nós observado foi a maior eficiência dos macrófagos dos animais KO em relação à atividade fungicida, síntese de NO além de TNF- α e IFN- γ . Assim, além dos mecanismos precoces e eficientes da imunidade inata, animais IL-10 KO apresentaram mecanismos na imunidade adaptativa que garantiram a eliminação do fungo e o conseqüente controle da resposta imune. Não observamos excessiva ativação de processos pró-inflamatórios em função de uma resposta imune eficiente.

Nossos resultados claramente demonstram que a ausência de IL-10 exerce efeitos benéficos na PCM, pois proporciona o controle microbiológico sem que ocorram danos teciduais significativos devido à produção descontrolada de citocinas pró-inflamatórias. Assim, nossos dados sugerem que a regulação de IL-10 apresenta-se como mecanismo importante que deve ser buscado em futuras tentativas imuno-terapêuticas da PCM.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou os efeitos da IL-10 em momentos distintos da infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis* em camundongos geneticamente deficientes desta citocina.

A infecção *in vitro* sugere que na imunidade inata a IL-10 tem um importante papel regulador, sobretudo na ativação de macrófagos e talvez em células NKT. A elevada atividade fagocítica dos macrófagos aliada à alta produção de citocina pró-inflamatória (TNF- α), de NO e quimiocinas (MCP-1) geradas pelos macrófagos e de IFN- γ por células NKT ativadas, justifica a reduzida carga fúngica na ausência da IL-10.

A redução da carga fúngica decorrente da precoce resposta imune na infecção *in vivo* também sugere que a IL-10 regula negativamente a imunidade adquirida, pois a elevada frequência de células T, células T de ativada/memória, associada à reduzida frequência de células Treg, confirmam isto. Portanto, a deficiência de IL-10 confere um efeito benéfico e estes efeitos parecem estar associados à maior produção de IFN- γ e/ou TNF- α endógeno no curso da PCM. Além disso, pode-se sugerir a regulação da IL-10 na produção de citocinas de padrão Th2, observada através da marcante redução de IL-5, tanto na fase inicial como na mais tardia da infecção.

A geração de células memória/efetora foi maior em camundongos IL-10 KO e a ação protetora conferida por essas células parece ser decorrente de uma atividade biológica mais vigorosa que aquelas dos camundongos WT.

A inflamação induzida pelo fungo foi facilmente controlada, talvez pela baixa toxicidade do patógeno, que aliada principalmente à eficiente resposta decorrente da atividade celular envolvida, justifica a elevada sobrevivência dos camundongos IL-10 KO.

Em suma, a IL-10, na PCM, interfere negativamente com a imunidade protetora tanto nos fenômenos de imunidade inata quanto nos da adquirida e pode participar do mecanismo de escape do fungo contra a imunidade desenvolvida pelo hospedeiro.

REFERÊNCIAS*

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. IL-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 185-195, 2002.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; FRANCO, M. F.; CALICH, V. L. G. Dual role of IL-4 in pulmonary paracoccidioidomycosis: Endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1-8, 2004.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A. J. Imbalance of IL-12, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248-252, 2001.

BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia**, v. 5, p. 26-29, 1966.

BLASS, S. L.; PURÉ, E.; HUNTER, C. A. A role for CD44 in the production of IFN-gamma and immunopathology during infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 166, n. 9, p. 5726-32, 2001.

BLEASE, K.; KUNKEL, S. L.; HOGABOAM, C. M. Acute inhibition of nitric oxide exacerbates airway hyperresponsiveness, eosinophilia and C-C chemokine generation in a murine model of fungal asthma. **Inflamm. Res.**, v. 49, n. 6, p. 297-304, 2000.

BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURIANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell mediated immune responses. **J. Immunol.**, v. 162, p. 3056-3063, 1998.

BODGAN, C.; SCHLEICHER, U. Production of interferon- γ by myeloid cells – fact or fancy? **Trends Immunol.**, v. 27, n. 6, p. 282-290, 2006.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**

Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BROOKS, D. G.; WALSH, K. B.; ELSAESSER, H.; OLDSTONE, M. B. A. IL-10 directly suppresses CD4 but not CD8 T cell effector and memory responses following acute viral infection. **PNAS**, v. 107, n. 7, p. 3018-3023, 2010.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An Update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89-117, 1993.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. In vivo and in vitro activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. **J. Immunol.**, v. 140, n. 8, p. 2786-9, 1988.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 8, p. 2289-94, 1989.

BOYMAN, O.; LÉTOURNEAU, S.; KRIEG, C.; SPRENT, J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, p. 2088-2094, 2009.

BURGER, E.; VAZ, C. A. C.; SANO, A.; CALICH, V. G. C.; SINGER, VERMES, L. M.; XIDIEH, C. F.; KASHINO, S. S.; NISHIMURA, K., MIYAJI, M. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T-cell-dependent and T-cell independent components. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, p. 391-398, 1996.

BYRNE, S. N.; KNOX, M. C.; HALLIDAY G. M. TGF-beta is responsible for skin tumour infiltration by macrophages enabling the tumours to escape immune destruction. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 86, n. 1, p. 92-7, 2008.

CABRERA, P. V.; BLANCO, G.; ALANIZ, L.; GREZANIK, S.; GARCIA, M.; ALVAREZ, E.; HAJOS, S. E. CD44 and hyaluronic acid regulate in vivo iNOS expression and metalloproteinase activity in murine air-pouch inflammation. **Inflamm. Res.**, v. 53 n. 10, p. 556-66, 2004.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Brit. J. Exp. Path.**, v. 66, p. 585-594, 1985.

CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; SINGER-VERMES, L. M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 1919-1923, 1987.

CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 41-48, 2000.

CAMARGO, Z. P.; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G.; TRAVASSOS, L. R. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29 n. 1, p. 31-38, 1991.

CANO, L. E.; ARANGO, R.; SALAZAR, M. E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 161-168, 1992.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of interferon-gamma in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 800-806, 1998.

CANO L. E. **Paracoccidioimicose pulmonar experimental. Caracterização do modelo de infecção intratraqueal em camundongos resistentes e susceptíveis; participação do IFN- γ células T CD4⁺ e CD8⁺ na resistência ao fungo.** 1995. 100 p. Tese (Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; MENGEL, J. A.; XIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D. C.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Depletion of CD8 T cells in vivo impairs host defense of resistant and susceptible mice to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 353-359, 2000.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Pulmonary Paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice :relationship among progression of the infection bronchoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1777-1783, 1995.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 59, p. 363-373, 1973.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D. A. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated Paracoccidioidomycosis in mice. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1771-1777, 1988.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PERLMAN A. M. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, p. 351-358, 1988.

- CAVASSANI, K. A.; CAMPANELLI, A. P.; MOREIRA, A. P.; VANCIM, J. O.; VITALI, L. H.; MAMEDE, R. C.; MARTINEZ, R.; SILVA, J. S. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **J. Immunol.**, v. 177, n. 9, p. 5811-5818, 2006.
- CHEN, J.; LIU, X. S. Development and function of IL-10 IFN- γ -secreting CD4⁺ T cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 86, p. 1-5, 2009.
- CICHY, J.; PURÉ, E. The liberation of CD44. **J. Cell. Biol.**, v. 161, n. 5, p. 839-43, 2003.
- COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **J. Immunol.**, v. 180, p. 571-5777, 2008.
- CUNHA, F. Q.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y.; EHLERS, S. ORME, I. M. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 182, p. 1155, 1992.
- DEEPE, G. S. J.; GIBBONS, R. S. Protective and memory immunity to *Histoplasma capsulatum* in the absence of IL-10. . **J. Immunol.**, v. 171, p. 5353-5362, 2003.
- DEEPE, G. S. J.; ROMANI, L.; CALICH, V. L. G.; HUFFNAGLE, G.; ARRUDA, C.; MOLINARI-MADLUM, E. E. I. W.; PERFECT, J. R. Knockout mice as experimental models of virulence. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 87-98, 2000.
- DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A.; SIQUEIRA, A. M. General Clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: M. FRANCO, C.S.; LACAZ, A.; RESTREPO MORENO, G.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 225-232.
- DEL SERO, G.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; D'OSTIANI, C. F; MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; MOSCI, P.; KOPF, M.; ROMANI, L. Antifungal type 1 responses are up regulated in IL-10-deficient mice. **Microbes Infect.**, v.1, n. 14, p. 1169-1180, 1999.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.
- FAQUIM-MAURO, E. L.; COFFMAN, R. L.; ABRAHAMSOHN, I. A.; MACEDO, M. S. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 163, n. 7, p. 3572-3576, 1999.

FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre fixação do complemento na blastomicose sul-americana com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp. São Paulo**, v. 18, p. 197-254, 1955.

FAVA NETTO, C.; VEGAS, V. S.; SCIANNAMÉA, I. M.; GUARNIERI, E. D. B. Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *P. brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 11, p. 177-181, 1969.

FAZIOLI, R. A.; SINGER-VERMES, L. M.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; CALICH, V. L. G. Delayed-type hypersensitivity response in an isogenic murine model of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 126, p.137-146, 1994.

FLESCHE, I. E.; BARSIG, J.; KAUFMANN, S. H. Differential chemokine response of murine macrophages stimulated with cytokines and infected with *Listeria monocytogenes*. **Int. Immunol.**, v. 10, n. 6, p. 757-765, 1998.

FONTENOT, J. D.; RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.**, v.6, p. 331-337, 2005.

FORNARI, M. C.; BAVA, A. J.; GUEREÑO, M. T.; BERARDI, V. E.; SILAF, R.; NEGRONI, R.; DIEZ, R. A. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 1036-1038, 2001.

FRANCO, M. F. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25: p. 5-18, 1987.

FRANCO, M. F.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; RESKALLAH-IWASSO, M. T.; MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Baillières Clin. Trop. Méd. Comum.**, v. 4, p. 185-220, 1989.

GAVIN, M. A.; RASMUSSEN, J. P.; FONTENOT, J. D.; VASTA, V.; MANGANIELLO, V. C.; BEAVO, J. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. **Nature**, v. 445, p. 771-775, 2007.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KÜHN, R.; MÜLLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **J. Immunol.**, v. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

GONZALES, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of interferon-gamma activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2546-2552, 2000.

HATANO, Y.; TANIUCHI, S.; MASUDA, M.; TSUJI, S.; ITO, T.; HASUI, M.; KOBAYASHI, Y.; KANEKO, K. Phagocytosis of heat-killed *Staphylococcus aureus* by eosinophils: comparison with neutrophils. **APMIS**, v. 117, p. 115-123, 2009.

HEDRICH, C. M.; BREAM, J. H. Cell type-specific of IL-10 expression in inflammation and disease. **Immunol. Res.**, v. 47, p 185-206. , 2010.

HUFFNAGLE, G. B.; STRIETER, R. M.; STANDIFORD, T. J.; MCDONALD, R. A.; BURDICK, M. D.; KUNKEL, S. L.; TOEWS, G. B. The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4⁺ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **J. Immunol.**, v. 155, n. 10, p.4790-4797, 1995.

HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRÜNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F. G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3311-3316, 1997.

IKEDA, T.; SATO, K.; KUWADA, N.; MATSUMURA, T.; YAMASHITA, T.; KIMURA, F.; HATAKE, K.; IKEDA, K.; MOTOYOSHI, K. Interleukin-10 differently regulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression depending on the environment in a human monoblastic cell line, UG3. **J. Leukoc. Biol.**, v. 72, n. 6, p.1198-1205, 2002.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G. cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623, 1998.

KASHINO, S. S.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L. M. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, p. 173-178, 1985.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CALFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. **J. Interf. Cyt. Res.**, v. 20, p. 89-97, 2000.

KAWAKAMI, K.; KINJO, Y.; UEZU, K.; SATOMI, Y.; MIYAGI, K.; KOGUCHI, Y.; NAKAYAMA, T.; TANIGUCHI, M.; SAITO, A. Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V α 14 NKT cells lungs and their roles in Th1 response and host defense in Cryptococcal infection. **J. Immunol.**, v.167, p. 6525-6532, 2001.

KÜHN, R.; LÖHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MÜLLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-274, 1993.

KUROKAWA, C. S.; ARAUJO JR., J. P.; SOARES, A. M. V. C.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged *in vitro* with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiol. Immunol.**, v. 51, n. 4, p. 421-428, 2007.

LEES, J. R.; FARBER, D. L. Generation, persistence and plasticity of Cd4 T-cell memories. **Immunology**, 2010. In press.

LIANG, J.; JIANG, D.; GRIFFITH, J.; YU, S.; FAN, J.; ZHAO, X.; BUCALA, R.; NOBLE, P.W. CD44 is a negative regulator of acute pulmonary inflammation and lipopolysaccharide-TLR signaling in mouse macrophages. **J. Immunol.**, v. 178, n. 4, p. 2469-2475, 2007.

LINDELL, D. M.; MOORE, T. A.; MCDONALD, R. A.; TOEWS, G. B.; HUFFNAGLE, G. B. Distinct compartmentalization of CD4⁺T-cell effector function versus proliferative capacity during pulmonary cryptococcosis. **Am. J. Pathol.**, v. 168, p. 847-855, 2006.

LIU, T.; SOONG, L.; LIU, G.; KONIG, R.; CHORA, A. K. CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4⁺T_{reg} cells. **Biol. Direct**, v. 40, n. 4, 1-13, 2009.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; CALICH, V. L. G. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J. Immunol.**, v. 183, p. 1279-1290, 2009.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M. ARAUJO, E. F.; LEITE, K. R. M., CALICH, V. L. G. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 3, p. 1078-1088, 2010.

LUTZ, A. Uma micose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **Bras-Med.**, v. 22, p. 121-124, 1908.

MATSUZAKI, G.; UMEMURA, M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. **Microbiol Immunol.**, v. 51, n. 12, p.1139-1147, 2007.

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 219-233, 2008.

MENDES-GIANNINI, M. J. L.; CAMARGO, M. E.; LACAZ, C. S.; FERREIRA, A. W. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.20, p. 103-108, 1984.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DEL NEGRO, G. B.; SIQUEIRA, A. M. Serodiagnosis, In: FRANCO, M.; LACAZ, S.C.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1984. p. 345-363.

MITTRUCKER, H. W.; KAUFMANN, S. H. E. R Regulatory T cells and infection: suppression revisited. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 306-312, 2004.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; NEGRO, G.D. (Ed.) **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Florida: CCR Press, 1994.

MOREIRA, A. P.; CAVASSANI, K. A.; MASSAFERA TRISTÃO, F. S.; CAMPANELLI, A. P.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. CCR5-Dependent Regulatory T Cell Migration Mediates Fungal Survival and Severe Immunosuppression. **J. Immunol.**, v. 180, n. 5, p. 3049-3056, 2008.

MOREIRA, A. P.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, A. M. V. C. Interleukin-10 but not transforming growth factor beta inhibits murine activated macrophages *Paracoccidioides brasiliensis* killing: Effect on H₂O₂ and NO production. **Cell. Immunol.**, v. 263, p. 196-203, 2010.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MÜHL, H.; PFEILSCHIFTER, J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, n. 9, p. 1247-1255, 2003.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L. G.; RODRIGUES, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essencial for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NEWORAL, E. P. M.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R. L.; NORONHA, I. L.; BLOTTA, M. H. S. L. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 21, p.1-8, 2003.

NOCENTINI, G.; RONCHETTI, S.; CUZZOCREA, S.; RICCARDI, C. GITR/GITRL: More than an effector T cell co-stimulatory system. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 1165-1169, 2007.

O'GARRA, A.; BARRAT, F. J.; CASTRO, A. G.; VICARI, A.; HAWLOWICZ, C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunol. Rev.**, v. 223, p. 114-131, 2008.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat. Med.**, v. 10, p. 801-805, 2004.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 6, p.425-428, 2007.

OJDANA, D.; SAFIEJKO, K.; LIPSKA, A.; RADZIOW, P.; DADAN, J.; TRYNISZEWSKA, E. Effector and memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the chronic infection process. **Folia Histochem Cytobiol.**, v. 46, n. 4, 413-417, 2008.

OKUMA, T.; TERASAKI, Y.; SAKASHITA, N.; KAIKITA, K.; KOBAYASHI, H.; HAYASAKI, T.; KUZIEL, W. A.; BABA, H.; TAKEYA, M. MCP-1/CCR2 signalling pathway regulates hyperoxia-induced acute lung injury via nitric oxide production. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 87, n. 6, p. 475-483, 2006.

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAORDANOU, P. M. O.; BLOTTA, M. H. S. L. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 139-144, 2002.

OMATA, N.; YASUTOMI, M.; YAMADA, A.; IWASAKI, H.; MAYUMI, M.; OHSHIMA Y. Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. **J. Immunol.**, v. 169, n. 9, p. 4861-4866, 2002.

PERAÇOLI, M. T. S.; KUROKAWA, C. S.; CALVI, S. A.; RINALDO, P. M.; PEREIRA, P. C. M.; MARQUES, S. A.; SOARES, A. M. V. C. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 413-418, 2003.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; SARKAR, D.; WALTER, M. R.; SHI, Y.; FISHER, P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 929-79, 2004.

PINA, A.; BERNARDINO, S. CALICH, V. L. G. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, p. 1088-1099, 2008.

PINA, A.; VALENTE FERREIRA, R. C.; VAZ, C. A. C.; MOLINARI-MADLUM, E. E. I. W.; KELLER, A. C.; CALICH, V. L. G. Absence of IL-4 determines a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2369-2378, 2004.

PRESSER, K.; SCHWINGE, D.; WEGMANN, M.; HUBER, S.; SCHMITT, S.; QUAAS, A. MAXEINER, J. H.; FINOTTO, S.; LOHSE, A. W.; BLESSING, M. Coexpression of TGF-beta I and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity. **J. Immunol.**, v. 181, p. 7751-7758, 2008.

PURÉ, E.; CUFF, C. A. A crucial role for CD44 in inflammation. **Trends Mol. Med.**, v.7, n. 5, p. 213-221, 2001.

RESTREPO, A. Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts In: MCGINNIS M. R. (Ed.). **Current Topics in Medical Mycology**. New York: Springer Verlag, 1988. p. 239-275.

RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. **J. Clin. Microb.**, v. 12, p. 279-281, 1980.

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

- ROMAGNANI, S. Regulation of the T cell response. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 36, p. 1357-1366, 2006.
- ROMANI, L.; PUC CETTI, P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. **Trends Microbiol.**, v. 14, n. 4, p. 183-189, 2006.
- ROMANI, L.; ZELANTE, T.; DE LUCA, A.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P. IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi. **J Immunol.**, v. 180, p. 5157-5162, 2008.
- ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v. 18, p. 149-157, 2002.
- RONCAROLO, M. G.; GREGORI S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. Rev.**, v. 212, p.28-50, 2006.
- RUBTSOV, Y. P.; RASMUSSEN, J. P.; CHI, E. Y.; FONTENOT, J.; CASTELLI, L.; YE, X.; TREUTING, P.; SIEWE, L.; ROERS, A.; HENDERSON, W. R. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. **Immunity**, v. 28, p. 546-558, 2008.
- SAKAGUCHI, S.; SETOGUCHI, H.; YAGI, H.; NOMURA, T. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 305, p. 51-66, 2006.
- SCHLEICHER, U.; HESSE, A.; BODGAN, C. Minute numbers of contaminant CD8⁺ T cells or CD11b⁺CD11c⁺NK cells are the source of IFN- γ in IL-12/IL-18-stimulated mouse macrophage populations. **Blood**, v. 105, p. 1319-1328, 2005.
- SELLON, R. K.; TONKONOGY, S.; SCHULTZ, M.; DIELEMAN, L. A.; GRENTHER, W.; BALISH, E.; RENNICK, D. M.; SARTOR, R. B. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 11, p. 5224-5231, 1998.
- SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FREITAS-MENDES-GIANNINI, M. J. S.; CALICH, V. L. G. Evaluation of pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 27, p. 71-82, 1989.

SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M. C.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, n. 3, p. 261-164, 1992.

SNAPPER, C. M.; MOND, J. J. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. **Immunol Today.**, v. 14, n. 1, p. 15-17, 1993.

SOUTO, J. F.; FIGUEIREDO, F., FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determines resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p. 1811-1820, 2000.

SPELLBERG, B.; EDWARDS J. J. Type 1/ Type 2 immunity in infectious diseases. **Clin. Inf. Dis.**, v. 32, p. 76-102, 2001.

STOCKINGER, B.; BOURGEOIS, C.; KASSOTIS, G. CD4⁺ memory T cell: functional differentiation and homeostasis. **Immunol. Rev.**, v. 211, p. 39-48, 2006.

STUMPO, R.; KAUER, M.; MARTIN, S.; KOLB, H. IL-10 induces gene expression in macrophages: partial overlap with IL-5 but not with IL-4 induced genes. **Cytokine**, v. 24, n. 1-2, p. 46-56, 2003.

TEDER, P.; VANDIVIER, R. W.; JIANG, D.; LIANG, J.; COHN, L.; PURÉ, E.; HENSON, P. M.; NOBLE, P. W. Resolution of lung inflammation by CD44. **Science**, v. 296, n. 5565, p. 155-8, 2002.

THOMPSON, C.; POWRIE, F. Regulatory T cells. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 4, p. 408-414, 2004.

VASAN, S.; TSUJI, M. A double-edged sword: The role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. **Semin. Immunology**, v. 22, p. 87-96, 2010.

VAZ, C. A.; SINGER-VERMES, L. M.; CALICH, V. L. G. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, p. 971-977, 1998.

VAZ, C. A.; SINGER-VERMES, L. M.; CALICH, V. L. G. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 6, p. 971-977, 1998.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 114-130, 2006.

WOODLAND, D. L.; KOHLMEIER, J. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 153-161, 2009.

YANG, X.; GARTNER, J.; ZHU, L.; WANG, S.; BRUNHAM, R. C. IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following *Chlamydia trachomatis* lung infection **J Immunol.**, v. 162, n. 2, p. 1010-1017, 1999.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 454-465, 2007.

ZELANTE, T.; DE LUCA, A.; BONIFAZI, P.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; BELLADONNA, M.L.; VACCA, C.; CONTE, C.; MOSCI, P.; BISTONI, F.; PUCCETTI, P.; KASTELEIN, R.A.; KOPF, M.; ROMANI, L. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 10, p. 2695-2706, 2007.

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](#)