

RONEI LUCIANO MAMONI

***CARACTERIZAÇÃO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE-
INFECÇÃO COMO A FORMA DE RESISTÊNCIA DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA - COMPARAÇÃO
COM AS FORMAS JUVENIL E ADULTA DA DOENÇA***

CAMPINAS

2005

RONEI LUCIANO MAMONI

***CARACTERIZAÇÃO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE-
INFECÇÃO COMO A FORMA DE RESISTÊNCIA DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA - COMPARAÇÃO
COM AS FORMAS JUVENIL E ADULTA DA DOENÇA***

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas para Obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências
Biomédicas.*

ORIENTADOR: MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA

CAMPINAS

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M311c Mamoni, Ronei Luciano
Caracterização da paracoccidioidomicose-infecção como a forma de resistência da paracoccidioidomicose humana - comparação com as formas juvenil e adulta da doença. / Ronei Luciano Mamoni. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Maria Heloisa Souza Lima Blotta
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Paracoccidioides brasiliensis. 2. Citocinas. 3. RNA. 4. Imunologia celular. I. Maria Heloisa Souza Lima Blotta. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientadora:

Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Membros:

1. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta

2. Dra. Maria Aparecida Shikanai-Yasuda

3. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich

4. Dra. Liana Verinaud

5. Dr. Plínio Trabasso

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22/02/2005

DEDICATÓRIA

*A minha querida mãe, Elza,
exemplo de vida e de amor incondicional.*

*Por todo o apoio e carinho.
Meu eterno amor e agradecimento.*

AGRADECIMENTOS

Durante a realização desse trabalho fui auxiliado de diversas formas e por diversas pessoas sem as quais muito pouco poderia ter sido feito.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Profa. Dra. Heloisa Blotta, por me receber em seu laboratório e dividir comigo seu entusiasmo com a Imunologia, por ter depositado em mim uma confiança que espero ter sido merecida, por ter acreditado e investido em meus potenciais e acima de tudo por ter se tornado uma grande amiga, sempre disposta a auxiliar em todas as situações. Muito, muito obrigado.

À minha família, em especial minha irmã Márcia pelo apoio indispensável com o qual sempre pude contar.

À Márcia (Marcitcha), Érika e Lisandra, queridas amigas por todo o auxílio, pelos momentos de descontração e desabafo, sem os quais tudo teria sido mais difícil.

Aos meus amigos de laboratório: Claudinha, Rômulo, Lanny e Priscila pela ajuda e pelo carinho sempre disponível e pela paciência com a qual enfrentaram o meu "mau humor".

A todos os pacientes com paracoccidiodomicose, e às pessoas com paracoccidiodomicose-infecção, que concordaram em participar desse trabalho por puro desprendimento e vontade de ajudar o próximo.

Aos funcionários do setor de Imunologia do Departamento de Patologia Clínica: Andréa Domênica, Valderez, Sandrinha, Cidinha, Angélica, Mariusa, Eni, Vitor, Alexandre, Márcia Luciméia, D. Janete, Odélia e a minha querida Elisete. Pela amizade, pelo apoio e pela torcida.

A Deus por ter me permitido chegar até aqui.

Também gostaria de fazer aqui, mais homenagem do que um agradecimento à Prof. Dra. Priscila Papaiordanou, grande médica e pesquisadora dedicada, exemplo de vida e de perseverança, que infelizmente não pode ver concluído este trabalho. Minha eterna admiração.

Às pessoas que me auxiliaram na parte técnica:

Ao Prof. Kenneth J. Gollob da UFMG por ter me recebido em seu laboratório, no qual pude aprender os princípios das técnicas utilizadas nesse trabalho.

Ao Prof. Anibal Vercesi, por disponibilizar o uso do citômetro de fluxo, e à aluna de pós-doutorado Cláudia pela ajuda dada nas primeiras análises.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

Enfim, esse trabalho marca o fim de um ciclo, no qual obtive mais do que conhecimento acadêmico, foram anos de minha vida nos quais pude aprender e reaprender o valor do trabalho e da verdadeira amizade. Gostaria de deixar aqui meu eterno agradecimento à todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte dessa etapa.

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência”

RUI BARBOSA

"The deeper our learning, the more conscious, specific and articulate will be our knowledge of what we do not know, our knowledge of our ignorance".

SIR KARL POPPER

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xxv</i>
SUMMARY	<i>xxix</i>
INTRODUÇÃO	<i>33</i>
OBJETIVOS	<i>57</i>
CASUÍSTICA E MÉTODOS	<i>61</i>
Casuística	<i>63</i>
Fluxograma para o processamento das amostras	<i>63</i>
Cultura de células de sangue total e células mononucleares do sangue periférico	<i>65</i>
Imunofluorescência com células do sangue total	<i>66</i>
Imunofluorescência para CMSP.....	<i>67</i>
Extração de RNA	<i>70</i>
Síntese de cDNA	<i>71</i>
Protocolo de PCR	<i>71</i>
Análise do produto do PCR	<i>74</i>
Análise estatística	<i>74</i>
RESULTADOS.....	<i>75</i>
DISCUSSÃO.....	<i>123</i>
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	<i>153</i>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	<i>157</i>
ANEXOS.....	<i>209</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
AS	Cadeia “anti-sense” do iniciador (“primer”)
BSA	Soroalbumina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CTL	Linfócito T citotóxico
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Desoxinucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
EP	Erro padrão
FA	Forma adulta da paracoccidiodomicose
FACS	“Fluorescence Activated Cell Sorter”
FJ	Forma juvenil da paracoccidiodomicose
FSC	“Forward Scatter”
gp27	Glicoproteína de 27 kilodaltons
gp43	Glicoproteína de 43 kilodaltons
gp70	Glicoproteína de 70 kilodaltons
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano - DR
HTT	Teste de hipersensibilidade do tipo tardio
kDA	kilodaltons
ICAM	Molécula de adesão intercelular

LISTA DE ABREVIATURAS

IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL-	Interleucina
IMF	Intensidade média de fluorescência
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP-10	Proteína induzida por Interferon-gama 10
LBA	Lavado bronco alveolar
LFA	Fator associado a leucócito
LPS	Lipopolissacarídeo
MBP	Proteína Básica Principal
MCP	Proteína quimioatrativa para monócitos
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
Mig	Monocina induzida por Interferon-gama
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
NK	Célula “Natural Killer”
NO	Oxido nítrico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-B-A	Salina tamponada com fosfato acrescida de BSA e azida sódica
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHA	Fitohemaglutinina

LISTA DE ABREVIATURAS

PKC	Proteína quinase C
PMA	“Phorbol Meristate Acetate”
PMN	Polimorfonuclear
PI	Paracoccidioidomicose-infecção
RANTES	Regulada por ativação, expressa e secretada por células T normais
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação de cadeia da polimerase associada à transcrição reversa
S	Cadeia “sense” do iniciador (“primer”).
SSC	“Side Scatter”
TA	Temperatura ambiente
Taq	DNA Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampão Tris-ácido bórico-EDTA
Tc1	Linfócito T citotóxico tipo 1
Tc2	Linfócito T citotóxico tipo 2
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TGF	Fator de transformação de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Unidades

Figura		PÁG.
1 -	Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para IFN- γ	77
2 -	Cinética da produção de RNAm para IFN- γ	78
3 -	Análise por citometria de fluxo da produção de IFN- γ	79
4 -	Análise por citometria de fluxo da produção de IFN- γ . Dot-Plot	80
5 -	Análise semi-quantitativa da expressão do RNAm para CXCL10	81
6 -	Cinética da produção de RNAm para CXCL10	82
7 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para CXCL9	83
8 -	Cinética da produção de RNAm para CXCL9	84
9 -	Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para IFN- γ e CXCL10 ou CXCL9	85
10 -	Análise por citometria de fluxo da produção de CXCL10 e CXCL9	86
11 -	Análise por citometria de fluxo da expressão de CXCR3	87
12 -	Análise por citometria de fluxo da expressão de CCR3	88
13 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para TNF- α	89
14 -	Cinética da produção de RNAm para TNF- α	90
15 -	Análise por citometria de fluxo da produção de TNF- α em linfócitos	92
16 -	Análise por citometria de fluxo da produção de TNF- α em monócitos ...	93
17 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para IL-2	94
18 -	Cinética da produção de RNAm para IL-2	95
19 -	Análise por citometria de fluxo da produção de IL-2	96
20 -	Análise por citometria de fluxo da produção de IL-2. “Dot-plot”	97

Figura		PÁG.
21 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para IL-4	98
22 -	Cinética da produção de RNAm para IL-4	99
23 -	Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para IFN- γ e IL-4	100
24 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para IL-5	101
25 -	Cinética da produção de RNAm para IL-5	102
26 -	Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para IL-4 e IL-5	103
27 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para IL-10	104
28 -	Cinética da produção de RNAm para IL-10	105
29 -	Análise por citometria de fluxo da produção de IL-10	106
30 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para TGF- β	107
31 -	Cinética da produção de RNAm para TGF- β	108
32 -	Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para TGF- β e IL-10 .	109
33 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para CXCL8	110
34 -	Cinética da produção de RNAm para CXCL8	111
35 -	Análise por citometria de fluxo da produção de CXCL8	112
36 -	Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para IL-6	113
37 -	Cinética da produção de RNAm para IL-6	114
38 -	Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para TNF- α e IL-6 ..	115
39 -	Análise por citometria de fluxo da produção de IL-12	116
40 -	Análise da expressão de CD80 e CD86	118
41 -	Análise da expressão de CD11a e CD54	120

Figura	PÁG.
42 - Análise da expressão de HLA-DR	121
43 - Representação esquemática da resposta imunológica que confere resistência à infecção pelo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	150
44 - Representação esquemática da resposta imunológica que confere suscetibilidade à infecção pelo <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	151
45 - Comparação entre a citometria de fluxo com sangue total e células mononucleares do sangue periférico	212
46 - Análise da expressão de CD69 em células estimuladas com PMA mais ionomicina por diferentes tempos	213
47 - Análise da expressão de IFN- γ após diferentes tempos de estímulo com PMA mais ionomicina	214
48 - Análise da expressão de CD4 após diferentes tempos de estímulo com PMA mais ionomicina	216
49 - Estimativa da produção de IFN- γ pela população T CD3 ⁺ CD4 ⁺ após diferentes tempos de estímulo com PMA mais ionomicina	217
50 - Determinação da porcentagem de células T CD3 ⁺ IFN- γ ⁺ com a utilização de “gates” diferenciais.....	218



Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) pode ser classificada em três grupos principais: PCM-infecção (PI); forma adulta (FA) e forma juvenil (FJ). O presente trabalho teve como objetivo comparar a resposta imunológica nesses diferentes grupos, por meio da análise da cinética da expressão do RNA mensageiro (RNAm) de citocinas e quimiocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β , TNF- α , CXCL8, CXCL9, CXCL10) por RT-PCR, e caracterizar fenotipicamente as células produtoras dessas citocinas por citometria de fluxo. Como resultado obtivemos que indivíduos do grupo PI expressam precocemente maior quantidade de RNAm para IFN- γ , TNF- α , CXCL9 e CXCL10, quando comparados aos pacientes com a FJ da PCM, e níveis similares de CXCL10 e IFN- γ e aumentados de CXCL9 e TNF- α quando comparados aos pacientes com a FA. A expressão do RNAm para citocinas Th2 (IL-4, IL-10, IL-5 e TGF- β), de maneira geral, foi maior e mais precoce em indivíduos com a FA ou FJ, quando comparados aos indivíduos do grupo PI. Em relação a expressão proteica, observamos que indivíduos do grupo PI apresentam um número maior de células produtoras de IFN- γ , TNF- α , IL-2, CXCL9 e CXCL10 quando comparados aos dois grupos de pacientes. A produção de IFN- γ foi observada principalmente em células CD3⁺CD8⁺, enquanto que IL-2 e TNF- α foram detectados principalmente em células CD3⁺CD4⁺. Em relação à expressão de moléculas de superfície, observamos que monócitos de indivíduos do grupo PI apresentam maior expressão de CD80 e menor expressão de CD86 e CD54, quando comparados aos indivíduos com a FA ou FJ, e maior expressão de HLA-DR e CD11a quando comparados aos indivíduos com a FJ da PCM. Nossos resultados indicam que a cinética diferencial de produção de RNAm para citocinas do tipo Th1 ou Th2 pelos grupos estudados pode direcionar a resposta imunológica após a infecção, originando as diferenças clínicas observadas.



Summary

Paracoccidioidomycosis (PCM) presents three major forms: PCM-infection (PI); adult form (AF) and juvenile form (JF). The aim of this study was to compare the immunological response in these groups through the analysis of the kinetics of mRNA expression of some cytokines and chemokines (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β , TNF- α , CXCL8, CXCL9 and CXCL10) by RT-PCR, as well as, to characterize the phenotype of the cytokines producing cells by flow cytometry. The results showed that PI individuals express earlier and higher levels of mRNA for IFN- γ , TNF- α , CXCL9 and CXCL10 when compared to JF patients and similar levels of CXCL10 and IFN- γ and higher levels of CXCL9 and TNF- α when compared to AF ones. On the other hand, the mRNA expression of Th2 cytokines (IL-4, IL-10, IL-5 and TGF- β) was higher and earlier in JF and AF groups when compared to PI individuals. In relation to protein expression, we observed that PI group presents a higher percentage of cells producing IFN- γ , TNF- α , IL-2, CXCL9 and CXCL10 when compared to both groups of patients. The production of IFN- γ was predominantly done by CD3⁺CD8⁺ T cells, whereas IL-2 and TNF- α production was higher in CD3⁺CD4⁺ cells. Monocytes of PI individuals also presented higher expression of CD80 and lower expression of CD86 and CD54 when compared to JF and AF patients, and higher expression of HLA-DR and CD11a only when compared to JF patients. These results indicate that the differential kinetic of mRNA expression of Th1 or Th2 cytokines observed in the different forms of PCM may modulate the immunological response resulting in the different outcomes observed in this disease.



Introdução

Dentre as micoses sistêmicas, a paracoccidioidomicose é a que apresenta maior importância em nosso meio. Sua incidência é restrita aos países da América Latina, sendo endêmica em algumas regiões do Brasil, onde representa um problema de saúde pública (FRANCO *et al.*, 1989; LONDERO e RAMOS, 1990; NEGRONI, 1993; WANKE e LONDERO, 1994; MCEWEN *et al.*, 1995; BLOTTA *et al.*, 1999). Uma vez que aproximadamente 85% dos casos ocorrem entre indivíduos com idade variando de 30 e 59 anos, portanto em fase economicamente ativa, o custo social e econômico é alto devido não só a doença em atividade, mas às seqüelas secundárias à infecção, que incapacitam o indivíduo para o trabalho (revisto por BRUMMER *et al.*, 1993; TOBON *et al.*, 2003).

O agente etiológico da paracoccidioidomicose é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, cujo habitat natural ainda não foi definido com precisão. Acredita-se que este seja um saprófita de solo ou plantas, sendo por esse motivo causa freqüente de doença em indivíduos que trabalham ou moram na zona rural e mais recentemente em áreas periurbanas (RESTREPO, 1985; BLOTTA *et al.*, 1999). O desmatamento acelerado e o revolvimento do solo para plantio aparentemente facilitam a contaminação humana e favorecem a formação de áreas endêmicas, onde se encontram adultos jovens infectados (GIMENEZ, 1998; FONSECA *et al.*, 1999).

A paracoccidioidomicose é caracteristicamente mais prevalente em regiões de clima úmido, com temperaturas médias de 17 a 24°C, alto índice pluviométrico, altitude média, solo ácido e vegetação densa, condições encontradas em florestas tropicais e subtropicais (RESTREPO, 1985; BRUMMER *et al.*, 1993). O longo período de latência da doença impede a determinação precisa do local onde esta foi adquirida, fato que levou

BORELLI (1972) a propor o termo “reservárea” para localizar o habitat natural do fungo, onde se adquire a infecção primária. O conceito de reservárea é distinto de área endêmica, que se refere ao local onde a micose é diagnosticada e onde se encontra a maioria dos doentes.

Algumas cepas de *P. brasiliensis* foram isoladas a partir de plantações de café ou de amostras de solo, reforçando a hipótese da aquisição da infecção durante atividades na agricultura (SILVA-VERGARA *et al.*, 1998), mas o uso indiscriminado e generalizado de fungicidas agrícolas pode dificultar ainda mais o isolamento do *P. brasiliensis* de seu ambiente natural (ONO, 2000). Outros estudos apontam o isolamento de *P. brasiliensis* a partir de substratos tão díspares como fezes de pingüim e ração animal, mas em geral esses achados foram raramente reproduzidos (FERREIRA *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 2000). Atualmente, tem-se dado atenção aos tatus, principalmente da espécie *Dasypus novemcinctus* para a determinação do nicho ecológico do *P. brasiliensis*, uma vez que diversos estudos descrevem o isolamento de várias cepas desse fungo a partir de tecidos de animais infectados (BAGAGLI *et al.*, 1998; VERGARA e MARTINEZ, 1998; TANAKA *et al.*, 2001; BAGAGLI *et al.*, 2003).

O *P. brasiliensis* se desenvolve na forma de micélio à temperatura ambiente, enquanto que a 35-37°C cresce sob a forma de leveduras apresentando parede celular refringente, e muitas vezes brotamentos laterais que lhe dão aspecto de “roda-de-leme”. Essa última característica é importante para o estabelecimento do diagnóstico por exame micológico direto em materiais clínicos (FRANCO *et al.*, 1989; BRUMMER *et al.*, 1993). O dimorfismo do *P. brasiliensis* aparentemente é dependente somente da temperatura, e se

relaciona à síntese diferencial de diversos componentes da parede celular do fungo (SAN-BLAS *et al.*, 1993; VENANCIO *et al.*, 2002).

As diversas cepas do *P. brasiliensis* variam quanto à virulência devido às diferenças entre os polissacarídeos da parede celular, além de enzimas que degradam compostos da matriz extracelular, ajudando o microrganismo a invadir os tecidos (SAN-BLAS e SAN-BLAS, 1977). A estrutura antigênica do *P. brasiliensis* é complexa e diferentes componentes exocelulares têm sido isolados. Dentre aqueles com maior utilidade diagnóstica estão as glicoproteínas de peso molecular de 27 kDa, 43 kDa e de 70 kDa, conhecidas como gp27, gp43 e gp70 (PUCCIA *et al.*, 1986; BLOTTA e CAMARGO, 1993; ORTIZ *et al.*, 1998; de MATTOS GROSSO *et al.*, 2003). A gp43 é o antígeno contra o qual a maior parte dos indivíduos com paracoccidioidomicose apresenta anticorpos específicos (BLOTTA e CAMARGO, 1993; TABORDA *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2000). O papel dessa proteína ainda não está determinado com precisão, mas a gp43 apresenta a capacidade de se ligar à laminina, componente da matriz extracelular, e aparentemente apresenta importância nos mecanismos de infecção das células do hospedeiro (LOPES *et al.*, 1994; GESZTESI *et al.*, 1996; HANNA *et al.*, 2000). Além disso, recentemente a gp43 foi descrita como um fator envolvido na evasão do fungo à resposta imunológica do hospedeiro, interferindo com a ativação dos macrófagos (FLÁVIA-POPI *et al.*, 2002).

O diagnóstico laboratorial definitivo da doença é obtido pelo isolamento do fungo por meio de cultura, pela análise anatomopatológica de biópsias ou pelo achado do fungo no exame micológico direto em materiais clínicos. Nestes exames o *P. brasiliensis* mostra morfologia variada, com brotamentos simples ou múltiplos (LACAZ *et al.*, 2002).

O isolamento do fungo pode ser feito através de cultura em meios específicos apresentando crescimento entre 7 a 10 dias quando incubados a 37°C, ou de 20 a 30 dias quando mantido à temperatura ambiente (MATTOS *et al.*, 1991).

Apesar de não ser utilizada para o diagnóstico inicial, a detecção de anticorpos específicos contra o fungo é de grande valia no seguimento terapêutico, tanto para avaliar a resposta ao tratamento, quanto para diagnosticar casos de recidiva. Neste caso, a elevação do título de anticorpos costuma preceder à piora clínica (TABORDA e CAMARGO, 1993; BLOTTA e CAMARGO, 1993). A detecção de anticorpos contra o *P. brasiliensis* pode ser realizada por diversas técnicas sorológicas: reação de fixação do complemento (BUENO *et al.*, 1997), imunodifusão dupla (CAMARGO *et al.*, 1988a), contraímuno eletroforese (CONTI-DIAS *et al.*, 1973; BUENO *et al.*, 1997), reação de hemaglutinação (TABORDA e CAMARGO, 1993), ELISA de captura (CAMARGO *et al.*, 1994) e Western blot (CAMARGO *et al.*, 1988b; BLOTTA e CAMARGO, 1993), entre outras.

A imunodifusão dupla é o teste sorológico mais utilizado devido a sua especificidade, baixo custo e facilidade de execução, empregando um antígeno bruto obtido de culturas de *P. brasiliensis* (CAMARGO *et al.*, 1988a; CAMARGO *et al.*, 2003). Apesar de sua alta especificidade (100%), esse teste apresenta uma sensibilidade que varia de 90 a 95% (BLOTTA e CAMARGO, 1993). Em um estudo recente realizado em nosso laboratório, demonstramos que os indivíduos que apresentam reações negativas nos testes de imunodifusão dupla produzem anticorpos predominantemente da classe IgG2, de baixa avidéz e dirigidos contra epítomos carboidratos (NEVES *et al.*, 2003).

Os testes enzimáticos (ELISA) para a detecção de anticorpos em geral são de fácil execução, mas via de regra apresentam especificidade inferior à observada na imunodifusão dupla, apresentando reatividade cruzada com soros de pacientes com outras patologias como histoplasmose, aspergilose, doença de Jorge Lobo e tuberculose (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1990; CAMARGO *et al.*, 1998). Por outro lado, a sensibilidade dos testes imunoenzimáticos é superior àquela observada na imunodifusão dupla (98 a 100%), além disso, estes testes permitem a diferenciação das classes de anticorpos produzidas (BUENO *et al.*, 1997; BAIDA *et al.*, 1999; JUVENALE *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2001), bem como a detecção de anticorpos em outros materiais biológicos como líquido cefalorraquidiano e lavado bronco alveolar (de ALMEIDA *et al.*, 2002; FORNAZIM *et al.*, 2003). A maior sensibilidade dessas técnicas, em parte, é devida à utilização de antígenos purificados, usados isoladamente ou então combinados (CAMARGO *et al.*, 1984; DIEZ *et al.*, 2003; de MATTOS GROSSO *et al.*, 2003).

Além da detecção de anticorpos, a técnica de ELISA também permite a detecção de antígenos circulantes no soro (GOMEZ *et al.*, 1997; MARQUES DA SILVA *et al.*, 2003; da SILVA *et al.*, 2004), na urina (SALINA *et al.*, 1998), no lavado bronco alveolar e no líquido cefalorraquidiano (MARQUES DA SILVA *et al.*, 2003), sendo utilizada para fins diagnósticos e verificação da eficácia terapêutica (FREITAS DA SILVA *et al.*, 1992; MARQUES DA SILVA *et al.*, 2003; da SILVA *et al.*, 2004). Aparentemente, a detecção de antígenos circulantes apresenta uma maior capacidade para a avaliação da resposta terapêutica em relação à detecção de anticorpos específicos, uma vez que os níveis de antígeno circulante correlacionam-se com a melhora clínica e/ou evidência de recidiva (MARQUES DA SILVA *et al.*, 2003; da SILVA *et al.*, 2004). Recentemente diversas

técnicas de biologia molecular têm sido descritas para o diagnóstico da paracoccidioidomicose, assim como a identificação do *P. brasiliensis* (GOMES *et al.*, 2000; NINO-VEGA *et al.*, 2000; SAN-BLAS *et al.*, 2002; SEMIGHINI *et al.*, 2002) e, apesar de em geral apresentarem alta especificidade e sensibilidade, o alto custo dessa nova tecnologia ainda inviabiliza sua utilização em larga escala para o diagnóstico, apresentando aplicação restrita à pesquisa científica (ELIAS COSTA *et al.*, 2000).

Ao lado dos testes laboratoriais, os testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) são de grande valor na realização de inquéritos epidemiológicos para avaliar a incidência da paracoccidioidomicose-infecção, indicando que o contato com o fungo é freqüente durante as duas primeiras décadas da vida (LONDERO e RAMOS, 1990; MANGIATERRA *et al.*, 1996; FAVA *et al.*, 1998; CERMENO *et al.*, 2004; KALMAR *et al.*, 2004). Estes testes são úteis também no diagnóstico e na avaliação do estado imunológico do paciente, uma vez que a reversão de um teste previamente negativo após a terapia é indicativa da restauração da resposta imunológica mediada por células, freqüentemente deprimida nos casos de paracoccidioidomicose (BRUMMER *et al.*, 1993; WANKE e LONDERO, 1994; SILVA-VERGARA, 1998). Atualmente, o antígeno mais indicado para as reações intradérmicas é a gp43 purificada do *P. brasiliensis*, que apresenta resposta mais específica àquela obtida com o antígeno polissacarídico de Fava-Neto, por ser mais específica (SARAIVA *et al.*, 1996; KALMAR *et al.*, 2004).

O tratamento da paracoccidioidomicose era inexistente até 1940, quando RIBEIRO introduziu o uso de sulfonamidas com bons resultados. Atualmente emprega-se com freqüência a combinação de duas drogas: a sulfametoxazol e o trimetoprim, por apresentar baixo custo, e ser disponível na rede pública; mas dependendo da resposta do

paciente, o tratamento pode ser feito com outras drogas como: cetoconazol, itraconazol ou anfotericina-B. O tratamento, independente da droga utilizada, é eficaz para a maioria dos casos, mas, como é de longa duração (mais de um ano), não são raros os episódios de recidiva da doença, devido ao uso irregular ou mesmo abandono da medicação (RESTREPO *et al.*, 1985; DILLON *et al.*, 1986; BARRAVIERA *et al.*, 1989; NARANJO *et al.*, 1990; RESTREPO, 1994; VILLA *et al.*, 2000; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2002). Ainda não existe um consenso sobre a melhor forma de tratamento para os casos de paracoccidioidomicose (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2002), mas estudos recentes onde foram analisados os níveis circulantes de antígeno no soro de pacientes, indicam que o tratamento com itraconazol pode ser mais eficiente em relação aos outros tratamentos, por necessitar de um período menor e resultar em um menor número de recidivas (MARQUES DA SILVA *et al.*, 2003; da SILVA *et al.*, 2004).

A via pela qual os indivíduos se infectam ainda não foi determinada com precisão, entretanto, várias evidências indicam que a infecção ocorre por meio da inalação de propágulos da forma miceliana do *P. brasiliensis* conhecidos como conídios, que são produzidos quando o fungo é submetido a condições de privação nutricional (BRUMMER *et al.*, 1993). Após deposição nos pulmões, os conídios se transformam em leveduras e podem ser fagocitados por macrófagos residentes. A partir de então as leveduras podem ser eliminadas por macrófagos ativados; se multiplicar ativamente causando a morte das células hospedeiras, com liberação de inúmeras leveduras que poderão então infectar novas células; ou então se manter em uma forma latente, que poderá se manifestar tardiamente (BRUMMER *et al.*, 1988; CANO *et al.*, 1992; BRUMMER *et al.*, 1993).

A paracoccidioidomicose é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino com idade variando de 30 a 50 anos (BRUMMER *et al.*, 1993). Acredita-se que o número reduzido de mulheres afetadas esteja relacionado a um efeito protetor promovido pelos hormônios femininos, uma vez que o 17- β -estradiol, *in vitro*, inibe a transição do *P. brasiliensis* da fase miceliana para leveduriforme, fator essencial para o estabelecimento da doença (RESTREPO *et al.*, 1984; STOVER *et al.*, 1986; SALAZAR *et al.*, 1988; ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

Grande parte dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue conter a infecção e não desenvolve a doença. Esse fato é evidenciado pela alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam teste cutâneo de HTT positivo para antígenos do fungo (WANKE e LONDERO, 1994; FAVA *et al.*, 1998; BETHLEM *et al.*, 1999; KALMAR *et al.*, 2004; CERMENO *et al.*, 2004). Essa condição, denominada paracoccidioidomicose-infecção é muito mais comum do que a paracoccidioidomicose-doença, embora não estejam estabelecidos os índices precisos dessa relação (WANKE e LONDERO, 1994). Alguns estudos mostram que o índice de infecção varia em diferentes populações dentro de áreas endêmicas (2 a 60% de positividade), com maior incidência em comunidades rurais (RESTREPO, 1985; CADAVID e RESTREPO, 1993).

Após seu estabelecimento, a doença se caracteriza por apresentar um largo espectro de manifestações clínicas agrupadas em 2 formas principais: a forma adulta ou crônica (FA), geralmente mais localizada e menos agressiva, e a forma juvenil ou aguda (FJ), mais grave e disseminada (MONTENEGRO, 1986). Em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de intervenção por meio de terapia

específica leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças (BENARD *et al.*, 1996; LACAZ *et al.*, 2002).

A forma juvenil ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos, representando menos de 10% da casuística geral da doença. A avaliação clínica desses pacientes evidencia a presença de adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção da medula óssea, simulando patologias linfoproliferativas (BENARD *et al.*, 1994; DEL NEGRO *et al.*, 1994; PEREIRA *et al.*, 2004). Nestes casos a evolução da doença é rápida, com febre, emagrecimento e comprometimento do sistema fagocítico-mononuclear (BENARD *et al.*, 1994; DEL NEGRO *et al.*, 1994; PEREIRA *et al.*, 2004).

A forma adulta ocorre em aproximadamente 90% dos pacientes, com progressão lenta e insidiosa, podendo apresentar sintomatologia leve, moderada ou grave, com lesões que variam desde ulceração oral isolada, até o envolvimento pulmonar difuso. Pode apresentar-se de forma localizada (unifocal), sendo o pulmão o órgão mais atingido, com múltiplas lesões em todo o trato respiratório e manifestações clínicas como tosse, expectoração e dispnéia. A forma crônica multifocal atinge mais de um órgão ou sistema, apresentando sintomas variados com lesões na mucosa oral, nasal, pele, linfonodos e em menor escala nas glândulas adrenais, intestinos e sistema nervoso central (FRANCO *et al.*, 1987; BRUMMER *et al.*, 1993).

Os primeiros estudos a respeito da resposta imunológica à infecção humana pelo *P. brasiliensis* evidenciaram a ocorrência da ativação policlonal de células B, que ocorre concomitante com a supressão da resposta imune celular, resultando na hipergamaglobulinemia observada nos pacientes (MUSATI *et al.*, 1976; MOK *et al.*, 1977;

RESTREPO *et al.*, 1978; ARANGO e YARZABAL, 1982; CHEQUER-BOU-HABIB *et al.*, 1989a). A supressão da resposta celular é tão mais evidente quanto mais grave e disseminada se apresentar a doença, sendo um fato indicativo de recuperação a reversão dessa resposta (BENARD *et al.*, 1995; BENARD *et al.*, 1996; BENARD *et al.*, 1997).

Alguns fatores de risco parecem estar associados à doença, como o tabagismo e etilismo (LONDERO e RAMOS, 1990; MARTINEZ e MOYA, 1992; dos SANTOS *et al.*, 2003), que atuam debilitando o organismo e interferindo com a resposta imunológica desenvolvida pelo indivíduo infectado. Dessa forma, o balanço entre a imunidade mediada por células e a resposta imunológica humoral parece ser crítica na determinação do desfecho da infecção pelo *P. brasiliensis*. Este equilíbrio é influenciado em grande parte pela ativação preferencial de subpopulações de linfócitos T CD4⁺, que são agrupados de acordo com o tipo de citocinas por eles produzidas. Assim, células T “helper” 1 (Th1) são caracterizadas pela produção de interleucina (IL)-2, interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e desempenham papel essencial na ativação de macrófagos e de linfócitos citotóxicos (CTLs); enquanto que células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10, participando principalmente da resposta imune humoral (MOSMANN *et al.*, 1986; ROMAGNANI, 1991; O’GARRA, 1996). A importância da ativação diferencial de células Th1 ou Th2 tem sido demonstrada em diversas infecções, inclusive na paracoccidiodomicose.

O desenvolvimento de modelos experimentais da infecção pelo *P. brasiliensis* permitiu compreender de forma mais clara a relação entre a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro e a forma por meio da qual a paracoccidiodomicose se manifesta (CALICH *et al.*, 1985a; CALICH *et al.*, 1987).

Camundongos suscetíveis (linhagem B10.A) apresentam resposta imune celular deprimida, evidenciada pela proliferação de linfócitos e testes de HTT diminuídas frente a estímulos com antígenos do fungo (TEIXEIRA *et al.*, 1987; CASTANEDA *et al.*, 1988). Além disso, apresentam produção aumentada de citocinas do tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-10 e o fator de transformação do crescimento-beta (TGF- β), e anticorpos das classes IgG1 e IgA (CANO *et al.*, 1995; CANO *et al.*, 1998; VAZ *et al.*, 1998; KASHINO *et al.*, 2000). Após a infecção, esses camundongos apresentam disseminação do fungo por todo organismo, evidenciando a sua incapacidade para o controle da mesma. Por outro lado, camundongos resistentes (linhagem A/Sn) apresentam resposta imunológica celular preservada, com proliferação de linfócitos e testes de HTT positivos e produção de citocinas do tipo Th1 como o IFN- γ e o TNF- α , assim como anticorpos da classe IgG2a (CANO *et al.*, 1995; CANO *et al.*, 1998; VAZ *et al.*, 1998; KASHINO *et al.*, 2000). Esses achados evidenciam a importância da resposta imune celular efetiva para o controle da paracoccidioidomicose, e encontram paralelo na doença humana.

Pacientes com a FJ da paracoccidioidomicose apresentam níveis séricos significativamente aumentados de IgG total, IgG4, IgE e IgA específicos para gp43 de *P. brasiliensis*, assim como elevado número de eosinófilos no sangue periférico (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992; BAIDA *et al.*, 1999; MAMONI *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002). Além disso, os níveis de IgE específica se correlacionam positivamente com os de IgG4 e IgA, e também com o grau de eosinofilia periférica (MAMONI *et al.*, 2002). Por outro lado, os pacientes com a FA apresentam resposta heterogênea, na qual o isotipo e concentração dos anticorpos produzidos variam de acordo com a gravidade com a qual a doença se manifesta. Assim, pacientes apresentando formas brandas, geralmente unifocais

da doença (acometimento de um único órgão), em geral, produzem altos níveis de IgG1 e IgG2 anti-*P. brasiliensis* e concentrações inferiores dos outros isotipos. Por outro lado, pacientes apresentando formas mais graves e disseminadas, como a FJ e FA multifocal da paracoccidiodomicose, produzem níveis elevados de IgG4 e IgE específicos (MAMONI *et al.*, 2002). Dessa forma, estes isotipos de imunoglobulinas (IgG4 e IgE) produzidas em resposta à infecção pelo *P. brasiliensis* poderiam ser considerados marcadores de gravidade da doença e deficiência da resposta imune protetora.

A mudança de classe de imunoglobulinas (“switch”) produzidas pelas células B durante a resposta imune é controlada por citocinas. De modo geral a produção de IgE e de IgG4 (IgG1 murina) é regulada pela IL-4 e IL-13, citocinas produzidas principalmente por células Th2 (SNAPPER *et al.*, 1988; KING e NUTMAN, 1993). O controle da síntese de IgA está associado principalmente a duas citocinas: o TGF- β e a IL-5 (SONODA *et al.*, 1989). Em camundongos, a secreção de IgG2a é influenciada diretamente pela presença de IFN- γ e IL-27 (citocina da família da IL-12 recentemente descrita) no ambiente onde se encontra o linfócito B (BOSSIE e VITETTA, 1991; HASBOLD *et al.*, 1999; YOSHIMOTO *et al.*, 2004). Dessa forma, as diferentes classes de anticorpos produzidas durante uma infecção podem ser tomadas como indicativos indiretos do tipo de citocina que predomina no organismo infectado.

Ao lado da alta produção de anticorpos, a eosinofilia periférica é outro achado comum em pacientes com a forma juvenil da paracoccidiodomicose (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2002; MAMONI *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2004). Eosinófilos desempenham papel importante nas infecções causadas por helmintos, e são caracteristicamente associados à resposta alérgica. WAGNER *et al.* (1998) analisando

cortes histológicos de biópsias de mucosa oral e pele de pacientes com paracoccidioidomicose observaram eosinófilos ao redor das células de *P. brasiliensis*. No mesmo estudo, foi observado também que os eosinófilos presentes no infiltrado inflamatório produziam e secretavam a MBP (proteína básica principal) encontrada associada às células fúngicas, indicando dessa forma, uma possível participação de eosinófilos e seus produtos na fisiopatologia da paracoccidioidomicose. Na infecção humana por *Coccidioides immitis*, a presença de eosinofilia periférica e microabcessos com grande número de eosinófilos foi relacionada à forma mais disseminada da doença e a um pior prognóstico (ECHOLS *et al.*, 1982). A ativação dos eosinófilos é controlada principalmente pela IL-5, que junto com a eotaxina atua na maturação e atração dessas células para o sítio de infecção (COLLINS *et al.*, 1995; MATTES e FOSTER, 2003; ZABEAU *et al.*, 2003). Estudos indicam que, em algumas situações, os eosinófilos podem produzir citocinas Th2 como a IL-4 e a IL-5, participando dessa forma na modulação da resposta inflamatória local (LAMKHIOUED *et al.*, 1996; WOERLY *et al.*, 1999; WILLIAMS, 2004).

Até recentemente, os dados relativos à resposta imunológica na paracoccidioidomicose humana se restringiam principalmente à comparação das duas formas clínicas principais e sua evolução frente ao tratamento (MOTA *et al.*, 1985; CHEQUER-BOU-HABIB *et al.*, 1989; FERREIRA DA CRUZ *et al.*, 1990; BAVA *et al.*, 1991; OLIVEIRA *et al.*, 1992; BLOTTA *et al.*, 1993; BENARD *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 1995; BENARD *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 1996; BENARD *et al.*, 1997; BAIDA *et al.*, 1999; KARHAWI *et al.*, 2000; BENARD *et al.*, 2001; FORNARI *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002), enquanto que a paracoccidioidomicose-infecção só era tratada em

estudos epidemiológicos com a realização de testes cutâneos de HTT utilizando antígenos derivados do *P. brasiliensis* (CAMPOS *et al.*, 1978; HAY *et al.*, 1987; DIOGENES *et al.*, 1990; COIMBRA JUNIOR *et al.*, 1994; RODRIGUES e RESENDE, 1996; FAVA *et al.*, 1998; CERMENO *et al.*, 2004; KALMAR *et al.*, 2004). Porém, em estudo recente, a resposta imunológica nesse grupo de indivíduos passou a ser estudada em nosso laboratório sob vários ângulos. Analisando a proliferação celular de indivíduos apresentando paracoccidioidomicose-doença e indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção, foi demonstrado que este último grupo apresentava além do teste cutâneo positivo, proliferação de linfócitos aumentada em resposta a antígenos extraídos do *P. brasiliensis*, produção diminuída de IL-10 e IL-4 e aumentada de IFN- γ , quando comparados a pacientes com a doença ativa (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Estes achados sugerem que os indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção apresentam um perfil de resposta imune protetora, visto que a IL-10 e a IL-4 são citocinas com ação inibitória sobre a resposta imune celular, estando a última diretamente relacionada à diferenciação das células Th2. Em contraposição o IFN- γ é a citocina que caracteriza a resposta Th1, com ação comprovada sobre ativação de macrófagos, células diretamente implicadas na destruição do fungo.

Em outras patologias como a esquistossomose e a filariose foram descritos indivíduos infectados que não desenvolvem a doença, denominados de normais endêmicos. Estes indivíduos apresentam anticorpos específicos no soro e resposta linfoproliferativa a antígenos dos parasitas, associados à produção de IFN- γ , originando uma resposta imunológica eficiente que impediria o desenvolvimento da doença (DAY, 1991; VIANA *et al.*, 1994; CORRÊA-OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Diversos estudos caracterizam a resposta apresentada por indivíduos com a forma juvenil da paracoccidioidomicose como predominantemente Th2, com produção aumentada de citocinas supressoras da resposta imune celular como a IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β e baixa produção de IFN- γ e TNF- α (BENARD *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Já os indivíduos com a FA da doença apresentam uma resposta mista, que depende em parte da gravidade e disseminação da doença, produzindo citocinas do tipo Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-2 e quantidades variáveis de IL-10 e IL-4 (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Todas essas evidências apontam para um papel essencial da produção de citocinas Th1 na resposta imune protetora e no controle da paracoccidioidomicose. Dentre elas o IFN- γ aparentemente desempenha papel central, atuando de diversas maneiras.

Macrófagos ativados pelo IFN- γ produzem compostos reativos com ação fungicida contra o *P. brasiliensis* como o óxido nítrico e o peróxido de hidrogênio (NATHAN *et al.*, 1983; BRUMMER e STEVENS, 1987; BRUMMER *et al.*, 1988; GONZALES *et al.*, 2000; CALVI *et al.*, 2003a; NEWORAL *et al.*, 2003). A administração de IFN- γ recombinante em camundongos infectados potencializa a fagocitose de leveduras de *P. brasiliensis*, impedindo o progresso da infecção (CANO *et al.*, 1992), enquanto a neutralização dessa citocina induz a exacerbação da infecção pulmonar, a disseminação fúngica precoce para outros órgãos, a diminuição de resposta de HTT e o aumento nos níveis de anticorpos IgG1 e IgG2b (CANO *et al.*, 1998; ARRUDA *et al.*, 2002). KARHAWI *et al.* (2000) demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose apresentam a produção de IFN- γ diminuída durante a

doença ativa, fato que pode ser revertido após o tratamento. O IFN- γ estimula a produção de IL-12 e outras citocinas inflamatórias como o TNF- α por células fagocíticas, participando de um mecanismo de retroalimentação positivo, amplificando a resposta inflamatória nas infecções, sendo considerado o principal ativador de macrófagos (NATHAN *et al.*, 1983; LAKE *et al.*, 1994; KULLBERG e ANAÏSSIE, 1998;).

O TNF- α é uma citocina produzida por monócitos/macrófagos ativados por IFN- γ e também por linfócitos Th1, e tem atividade citotóxica para células tumorais. A ação imunorreguladora do TNF- α é exercida através da ativação de polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos estimulados por IFN- γ , para os quais atua como um segundo sinal (RUDDLE, 1987). A detecção de níveis elevados de TNF- α no soro de pacientes com paracoccidiodomicose foi relatada por SILVA e FIGUEIREDO, 1991. O TNF- α aumenta a atividade fungicida de monócitos humanos estimulados com antígenos de parede celular do *P. brasiliensis* (ANJOS *et al.*, 2002) e de macrófagos de hamsters infectados (PARISE-FORTES *et al.*, 2000), limitando a disseminação fúngica.

A IL-12 é a principal citocina inflamatória produzida por células fagocíticas, linfócitos B e outras células apresentadoras de antígeno, modulando a resposta imune e fornecendo um elo importante entre a resposta imunológica inata e adaptativa (TRINCHIERI, 1994; GATELY *et al.*, 1998; FIESCHI e CASANOVA, 2003). Uma das atividades fisiológicas mais importantes dessa citocina é induzir a produção de IFN- γ por células T e NK (D' ANDREA *et al.*, 1992) e aumentar a atividade dessas células e de macrófagos, contra vários patógenos intracelulares (TRINCHIERI, 1994; COHEN e COHEN, 1996; GATELY *et al.*, 1998; FIESCHI e CASANOVA, 2003).

ROMANO *et al.* (2002) demonstraram que a adição de IL-12 em culturas de células mononucleares de pacientes com paracoccidioidomicose aumenta a produção de IFN- γ , e quando adicionado em culturas junto com anticorpos anti-IL-10, aumenta também a resposta linfoproliferativa frente a antígenos do fungo. Na paracoccidioidomicose murina, o efeito protetor da IL-12 está associado à diminuição dos níveis de citocinas do tipo Th2, como a IL-4 e a IL-10 (CALICH e KASHINO, 1998).

Células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção produzem pequenas quantidades de IL-10 e IL-4 em resposta a antígenos, quando comparadas às células de pacientes com paracoccidioidomicose-doença (OLIVEIRA *et al.*, 2002). A IL-10, uma citocina supressora que pode desempenhar uma série de atividades, foi inicialmente descrita com base em sua ação inibitória sobre a capacidade de apresentação de antígeno por macrófagos e células dendríticas (FIORENTINO *et al.*, 1991; MACATONIA *et al.*, 1993). A IL-10 apresenta importante função na inibição da produção de citocinas (tanto as Th1 quanto as Th2), de quimiocinas (KASAMA *et al.*, 1994) e da expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão (DING *et al.*, 1993; WILLEMS *et al.*, 1994), atuando dessa forma no controle da resposta imunológica. BENARD *et al.* (2001) analisando a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose ativa e após o tratamento, observaram que pacientes antes do tratamento produziam grandes quantidades de IL-10, sendo que após o tratamento efetivo a resposta de produção dessa citocina era bastante diminuída, indicando um possível papel deste mediador na supressão da resposta imunológica observada na doença.

Outro aspecto de grande importância para o desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva é a migração das células efetoras para os sítios de infecção. Para que os leucócitos deixem os vasos e migrem para o sítio inflamatório, citocinas e quimiocinas modulam a expressão de moléculas de adesão, envolvidas na marginação, adesão e posterior diapedese das células. A grande maioria das moléculas de adesão pode ser agrupada em duas famílias principais as integrinas e as selectinas (GONZALEZ-AMARO e SANCHEZ-MADRID, 1999), expressas tanto na superfície do endotélio vascular como na membrana dos leucócitos. Integrinas do tipo $\beta 2$, especialmente CD11a/CD18 (LFA-1) e CD54 (ICAM-1) são implicadas na migração de leucócitos, apresentação do antígeno, fagocitose e produção de derivados reativos de oxigênio. Expressão elevada de integrinas $\beta 2$ foi observada em leucócitos do sangue periférico de pacientes com sarcoidose e tuberculose (SHAKOOR e HAMBLIN, 1992; YASSIN e HAMBLIN, 1994). Macrófagos alveolares de pacientes com tuberculose expressam níveis elevados de CD11b/CD18, o que poderia estar relacionado a uma produção aumentada de produtos reativos de oxigênio (KUO *et al.*, 1996). A expressão das moléculas de adesão na superfície das células depende da estimulação por citocinas inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, e também pode ser induzida por alguns produtos bacterianos como o LPS (GONZALEZ-AMARO e SANCHEZ-MADRID, 1999).

Além da participação das moléculas de adesão, o recrutamento das células do sistema imune para o sítio de infecção é controlado por citocinas com propriedades quimiotáticas denominadas quimiocinas. Quimiocinas são citocinas que induzem a migração dirigida de subpopulações de leucócitos para os locais de inflamação. As quimiocinas são proteínas estruturalmente relacionadas ou homólogas e podem ser

subdivididas em 4 subfamílias: CXC (ou α) nas quais as duas primeiras cisteínas da molécula são separadas por um aminoácido, CC (ou β) nas quais as duas primeiras cisteínas são adjacentes, CX₃C (ou γ) com três aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas e C (ou δ) nas quais falta uma das cisteínas (ADAMS e LLOYD, 1997; ROLLINS, 1997; ROT e von ANDRIAN, 2004). As quimiocinas do tipo CXC que contém a sequência ácido glutâmico-leucina-arginina (denominadas de ERL), precedendo a sequência CXC, são quimiotáticas para neutrófilos (CXCL8 (IL-8), entre outras) e aquelas que não contém esta sequência atuam sobre linfócitos (CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10), entre outras).

A ação das quimiocinas se dá por meio de sua ligação a receptores específicos, presentes na superfície das células (LUSTER, 1998). A expressão diferencial desses receptores nas diversas fases da resposta imunológica é que irá controlar a migração dos leucócitos entre os diversos locais de atuação. Recentemente, foram descritos receptores de quimiocinas que são expressos preferencialmente em células Th1 (CXCR3) e Th2 (CCR3, CCR4 e CCR8), demonstrando a importância destas proteínas na migração de células específicas e no controle da resposta imune (SALLUSTO *et al.*, 1998b, SALLUSTO, 1999; SALLUSTO *et al.*, 2000). Em trabalho recente SOUTO *et al.* (2003) verificaram que células pulmonares e esplênicas de camundongos produzem diferentes quimiocinas durante a infecção por *P. brasiliensis*, com alta expressão de CXCR3 e CCR5, CCL5 (RANTES), CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10), sugerindo uma resposta protetora do tipo Th1. Em um trabalho realizado anteriormente onde foram comparados os níveis de CXCL8 (IL-8) no soro de pacientes com paracoccidiodomicose foi observado uma diminuição desta quimiocina no soro de pacientes com a FJ (MAMONI *et al.*, 2002).

Se as moléculas de adesão e quimiocinas promovem a migração de células para sítios inflamatórios, a expressão de moléculas do MHC classe II e moléculas co-estimulatórias como B7-1(CD80) e B7-2 (CD86), são essenciais para a apresentação de antígenos para os linfócitos T. Baixa expressão de moléculas do MHC classe II ou de moléculas co-estimulatórias na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs) pode prejudicar de forma importante o reconhecimento de antígenos e a resposta imunológica como um todo (CANTRELL *et al.*, 1996; MATULONIS *et al.*, 1996).

As citocinas imunorreguladoras que determinam o desenvolvimento da resposta Th1/Th2 modulam a expressão das moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). A IL-4 e a IL-10, características da resposta Th2 induzem a diminuição da expressão de B7-2, enquanto que o IFN- γ , citocina Th1, induz o aumento da expressão das moléculas B7-1/B7-2 e do MHC classe II. Por outro lado, o TNF- α suprime a expressão do B7-2, mas parece não alterar a expressão do B7-1 (CREERY *et al.*, 1996).

A maneira pela qual ocorre a apresentação de antígeno tem enorme repercussão sobre o tipo de resposta imunológica que será produzida. Alguns estudos indicam que o tipo de célula apresentadora de antígeno também pode ter influência na diferenciação do tipo de resposta imunológica que será desenvolvida. Dessa forma, macrófagos estimulariam clones de células T a secretar citocinas como IL-2 e IFN- γ , enquanto células B ativariam clones Th2, produtores de IL-4 e IL-10 (FIORENTINO *et al.*, 1991; GAJEWSKI *et al.*, 1991). ALMEIDA *et al.* (1998) e ALMEIDA e LOPES (2001) observaram que em camundongos resistentes, antígenos de *P. brasiliensis* são preferencialmente apresentados por macrófagos e células dendríticas, que pela secreção de

IL-12 estimulam a produção de citocinas Th1. Por outro lado, em animais suscetíveis a apresentação do antígeno via células B leva a uma forte ativação da subpopulação Th2.

Todos esses fatores evidenciam que a resposta imunológica desencadeada contra um patógeno é complexa e multifatorial. A melhor compreensão desse processo no desenvolvimento da doença, ou na resistência à ela, pode permitir intervenções terapêuticas mais efetivas, diminuindo custos com internações e reduzindo o tempo necessário para o tratamento.



Objetivos

OBJETIVO GERAL

- Comparar a cinética de expressão de RNA mensageiro, a expressão de citocinas, moléculas de adesão e moléculas relacionadas à apresentação de antígeno em células de indivíduos apresentando a Forma Adulta e Juvenil da PCM e indivíduos com PCM-infecção.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Comparar a expressão do RNA mensageiro (RNAm), por RT-PCR, para algumas citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α , TGF- β , IFN- γ) e quimiocinas (CXCL8 (IL-8), CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10)) por células de pacientes com as duas formas clínicas da PCM e indivíduos com PCM-infecção após diferentes tempos de estimulação com PHA, com a finalidade de determinar a cinética de produção desses mediadores.
- Comparar a produção dessas citocinas/quimiocinas nos diferentes grupos, visando confirmar a tradução do RNAm detectado e determinar o tipo celular responsável por essa produção, utilizando citometria de fluxo por meio de coloração intracitoplasmática e marcação de superfície (CD3, CD4, CD8, CD68).
- Determinar se há diferença na expressão de receptores de quimiocinas CXCR3 (receptor para CXCL10 (IP-10) e CXCL9 (Mig)) e CCR3 (receptor para CCL5 (RANTES) e CCL11 (eotaxina)), expressos em células Th1 e Th2 respectivamente.
- Determinar se existem diferenças quanto a expressão de moléculas de adesão (CD54 (ICAM-1) e CD11a (LFA-1)) e relacionadas à apresentação de antígeno (HLA-DR) e sinais coestimulatórios (CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2)) nas células dos indivíduos dos três grupos, também por citometria de fluxo.



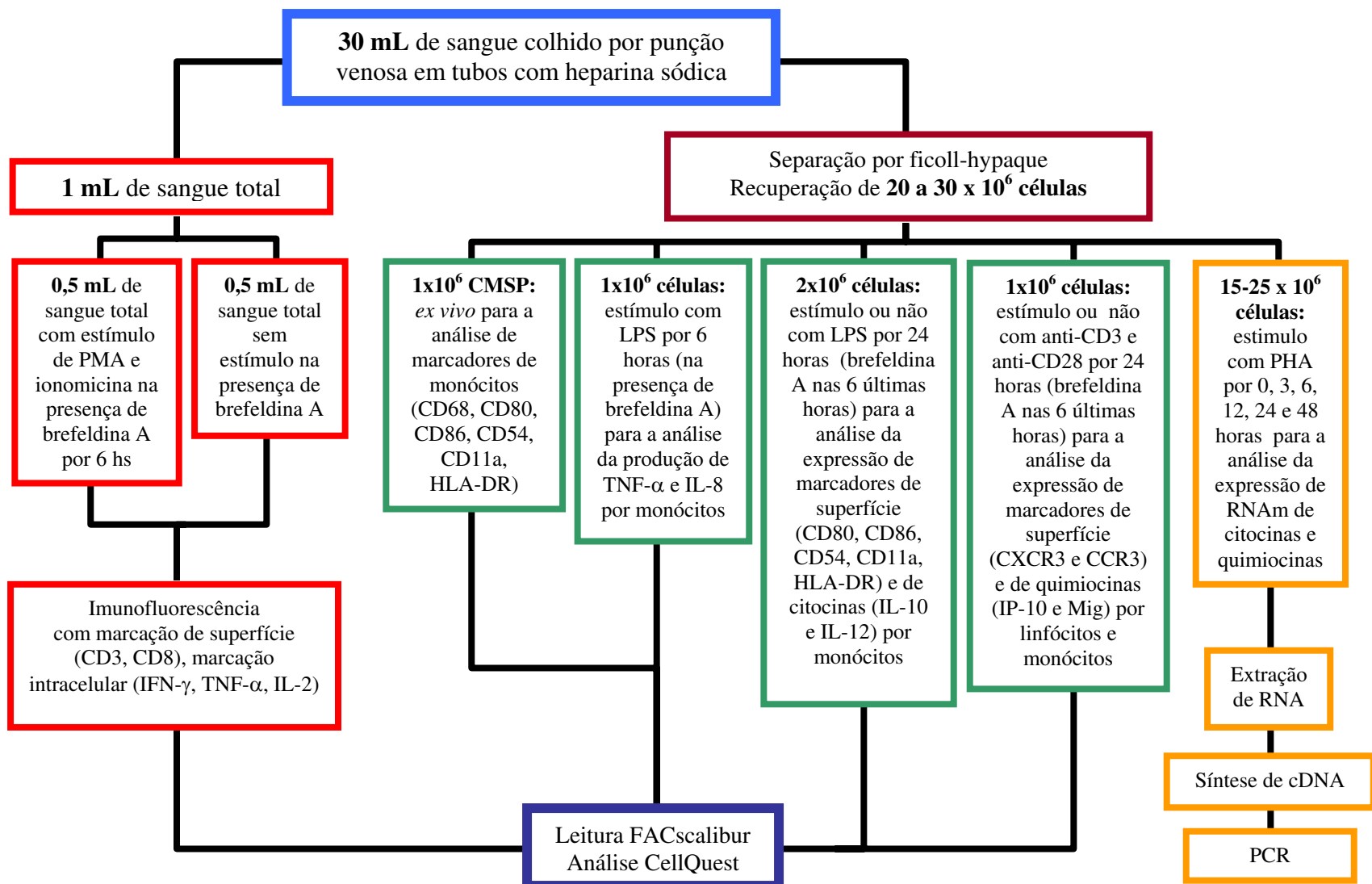
Casuística e Métodos

Casuística

Foram analisados 23 indivíduos apresentando infecção ativa pelo *P. brasiliensis* (sem tratamento ou no início do tratamento), atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP no ambulatório de Moléstias Infecciosas, sendo 15 pacientes com a FA (forma multifocal) e 8 com a FJ da paracoccidioidomicose. O diagnóstico de paracoccidioidomicose foi confirmado pelo exame histopatológico de biópsias de pele, mucosa ou linfonodos, ou por meio de exames diretos de raspados de lesão, aspirado de linfonodos ou escarro. Também foram analisados 15 indivíduos moradores de área endêmica caracterizados como paracoccidioidomicose-infecção pela realização de teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio positivo utilizando como antígeno a gp43 do *P. brasiliensis*, selecionados dentre indivíduos que haviam participado de estudo anterior (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Todos os indivíduos aceitaram participar do estudo mediante a assinatura do termo de consentimento pós-informação, aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Fluxograma para o processamento das amostras colhidas de pacientes com PCM-doença, indivíduos com PCM-infecção

Após a realização de diversos testes com diferentes tempos de incubação e diferentes estímulos (ver anexos), elaboramos um fluxograma para o processamento das amostras colhidas dos pacientes com paracoccidioidomicose-doença e indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção. Este fluxograma foi elaborado com o intuito de aproveitar ao máximo o material coletado, otimizando as condições para o estudo de cada um dos parâmetros.



Fluxograma para o processamento das amostras colhidas de pacientes com PCM-doença e indivíduos do grupo PCM-Infecção.

Cultura de células de sangue total e células mononucleares do sangue periférico

Foram coletados, por punção venosa, 30 mL de sangue em tubo contendo heparina sódica. A cultura utilizando sangue total foi feita com 0,5 mL de sangue misturado a 1 mL de meio RPMI suplementado (10% de soro humano AB inativado, 2% de L-glutamina [2mM] e gentamicina [5µg/mL]), estimulados ou não com PMA (phorbol meristate acetate – 50ng/mL) e ionóforo de cálcio (250 ng/mL) na presença de brefeldina A (1µg/mL), seguida de incubação por 6 horas a 37°C em estufa de CO₂ (5%). O restante do sangue foi separado, sobre gradiente de Ficoll-Hypaque, por centrifugação a 2300 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. As células mononucleares foram coletadas, contadas e a concentração acertada para 2x10⁶ células/mL em meio RPMI suplementado.

As células mononucleares utilizadas para citometria de fluxo ou para extração de RNA foram submetidas aos seguintes estímulos:

- Uma alíquota da suspensão celular (2 x 10⁶ células) foi mantida sem estímulo (*ex vivo*) em geladeira.
- Uma parte das células foi estimulada com LPS (10µg/mL) por 6 horas (1 x 10⁶ células) ou por 24 horas (2 x 10⁶ células), na presença de brefeldina A (1µg/mL) por 6 horas ou nas últimas 6 horas.
- Uma parte das células foi estimulada com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 (0,1µg/mL de cada) por 24 horas (2 x 10⁶ células) na presença de brefeldina A (1µg/mL) nas últimas 6 horas.

- O restante das células foi dividida em 6 alíquotas iguais, e estimuladas por 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10µg/mL) e utilizadas para extração de RNA.

Imunofluorescência com células do sangue total

Após a incubação as placas de cultura foram colocadas sobre gelo e mantidas em geladeira por 15 minutos e as cavidades lavadas diversas vezes com PBS-azida sódica [2mM] para a completa remoção das células aderentes (monócitos). As células foram transferidas para tubos tipo falcon e centrifugadas a 1250 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e foi adicionado 1 mL de tampão de lise de hemácias (FACS Lysing Solution – Becton & Dickinson), seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação as células foram centrifugadas novamente e o sobrenadante descartado (se necessário esse procedimento foi repetido para a completa remoção das hemácias). As células foram então ressuspensas em 1 mL de tampão PBS-BSA-azida sódica [2mM] (PBS-B-A) e contadas em hematocítômetro, sendo a concentração acertada para 10×10^7 células/mL em tampão PBS-B-A. Após esse procedimento, 20 µL da suspensão de células (aproximadamente 2×10^5 células) foram transferidos para placas de microtitulação (96 cavidades) contendo a mistura de anticorpos para marcação de superfície (tabela I) diluídos em 20 µL de PBS-B-A, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após a incubação, as placas foram centrifugadas (1250 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente), o sobrenadante descartado e foram adicionados 200 µL do tampão PBS-B-A e a placa novamente centrifugada. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas

(vortex) e foram adicionados 200 µL de formaldeído a 2% em PBS a cada cavidade, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente. Após nova centrifugação as células foram ressuspensas e foram adicionados 200 µL de tampão de permeabilização (PBS-BSA [0,1%]-Saponina [0,5%]) e a placa incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas, ressuspensas e transferidas para outra placa contendo a mistura de anticorpos para marcação intracitoplasmática (tabela I) diluídos em 20 µL de tampão de permeabilização, sendo em seguida submetidas à incubação em temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação foram adicionados a cada cavidade 150 µL de tampão de permeabilização e a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1250 rpm a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vortex) e foi adicionado 200 µL de tampão PBS-B-A. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 250 µL de formaldeído a 2% e transferidas para tubos de microtitulação e analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur – Beckton & Dickinson), por meio de software específico (CellQuest – Beckton & Dickinson). As leituras foram realizadas em um intervalo máximo de 24 horas e os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas e/ou intensidade média de fluorescência (IMF), para cada parâmetro analisado.

Imunofluorescência para CMSP.

Após cada período de incubação as placas de cultura foram colocadas sobre gelo e mantidas em geladeira por 15 minutos e as cavidades lavadas diversas vezes com PBS-azida sódica [2mM] para a completa remoção dos monócitos. Seguiu-se então uma

centrifugação a 1250 rpm por 10 minutos a 4°C. As células foram ressuspensas em 500 µL de soro humano AB para bloqueio de receptores de Ig nas células. A seguir as amostras foram então fixadas em 1 mL de formaldeído a 2% por 10 minutos à temperatura ambiente, novamente centrifugadas, e ressuspensas em 1 mL de tampão de lavagem. Seguiu-se nova centrifugação e em seguida as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de permeabilização, com incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas e o volume acertado para 300 µL com tampão de permeabilização. Foram então transferidos 20 µL dessa suspensão de células para uma placa de 96 cavidades com fundo em U para a realização da técnica de imunofluorescência. Foram acrescentados os anticorpos (de superfície, intracelular e controles de isotipo, descritos na tabela I), incubando-se por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 150 µL de tampão de permeabilização em cada cavidade e a placa foi centrifugada por 10 minutos a 4°C a 1250 rpm. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas e adicionado novamente 200 µL de tampão de lavagem, seguido de nova centrifugação. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em 250 µL de formaldeído a 2%. A leitura foi feita conforme descrito acima.

Tabela I – Anticorpos utilizados nas técnicas de imunofluorescência

Anticorpo	Fabricante	Isotipo	Fluorocromo	[] uso (μL / 10^6 céls.)
Anti-CD3	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	CyCh	2,5
Anti-CD4	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	FITC	4
Anti-CD4	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	CyCh	4
Anti-CD8	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	FITC	4
Anti-CD8	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	R-PE	4
Anti-CD11a (LFA-1)	Caltag	Mouse-IgG1	R-PE	2,5
Anti-CD14	BD - Pharmingen	Mouse-IgG2a	FITC	8
Anti-CD14	BD	Mouse-IgG2b	PerCP	8
Anti-CD54 (ICAM-1)	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	R-PE	4
Anti-CD68	Dako	Mouse-IgG1	FITC	8
Anti-CD80 (B7.1)	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	R-PE	4
Anti-CD86 (B7.2)	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	R-PE	4
Anti-CCR3	R&D Systems	Rat-IgG2a	FITC	8
Anti-CXCR3	R&D Systems	Mouse-IgG1	FITC	8
Anti-CXCL8 (IL-8)	BD - Pharmingen	Mouse-IgG2b	R-PE	10
Anti-CXCL9 (Mig)	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	R-PE	2,5
Anti-CXCL10 (IP-10)	BD - Pharmingen	Mouse-IgG2a	R-PE	2,5
Anti-HLA-DR	BD - Pharmingen	Mouse-IgG2b	R-PE	4
Anti-IL-2	BD - Pharmingen	Rat-IgG2a	R-PE	20
Anti-IL-10	BD - Pharmingen	Rat-IgG2a	R-PE	20
Anti-IL-12 (p40/p70)	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	R-PE	20
Anti-IFN- γ	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	R-PE	20
Anti-IFN- γ	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	FITC	2,5
Anti-TNF- α	BD - Pharmingen	Mouse-IgG1	R-PE	10

Extração de RNA

Após cada período de incubação as células foram coletadas e as cavidades da placa foram lavadas com PBS-azida sódica [0,2 mM], para a completa remoção dos monócitos. As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o “pellet” de células foi congelado (-80°C) imediatamente até o momento de uso.

No momento da extração, 500 µL de Trizol (Invitrogen) foram adicionados vagarosamente ao "pellet" de células sob agitação, procedendo-se a homogeneização até a completa dissolução do "pellet". Foi então adicionado 2 µL de glicogênio [20µg/µL] a cada tubo para atuar como carreador e 100 µL de clorofórmio, seguido de agitação (vortex) por 10 segundos. A solução foi então incubada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 15 minutos a 12000 g a 4°C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo e foi adicionado igual volume de isopropanol (± 250 µL). A solução foi agitada (vortex) por 10 segundos e incubada a -20°C por 45 minutos. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 12000 g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e foi adicionado 1 mL de etanol a 75%, sendo então centrifugadas novamente por 10 minutos a 12000 g à temperatura ambiente. O etanol foi removido e o "pellet" de RNA foi dissolvido em 30 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A quantidade de RNA foi estimada por meio da leitura das amostras em espectrofotômetro a 260 nm. A pureza do RNA obtido foi inferida pela razão entre as absorbâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, que deveria estar próxima de 2.

Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foram adicionados 17 µL do RNA diluído para conter 1 µg de RNA total por tubo, seguido da adição de 1,5 µL de oligo-dT₁₂₋₁₈ [500µg/mL]. A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e transferida rapidamente para gelo. A cada tubo foram adicionados 10 µL da seguinte mistura: 6 µL de tampão de síntese 5X; 1,5 µL de dNTP [10 mM]; 3 µL de DTT [0,1 M]; 1 µL de Superscript R/T II [200U/µL]. A solução foi misturada gentilmente e centrifugada rapidamente. Seguiu-se então uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de incubação a 40°C por 50 minutos. A atividade enzimática foi removida pela incubação das amostras a 90°C por 5 minutos, seguidos por incubação a 4°C por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas rapidamente sendo adicionado 1 µL de RNase H a cada tubo, e incubado a 37°C por 20 minutos para remover as cadeias remanescentes de RNA. O cDNA obtido foi estocado a -80°C até o momento do uso. (Todos os reagentes utilizados foram da marca Invitrogen).

Protocolo de PCR

Para o PCR foram utilizados os cDNAs obtidos anteriormente, sendo feito uma reação com volume final de 25 µL. Cada amostra de cDNA (5 µL) foi adicionada a tubos de 0,2 mL contendo 20 µL da seguinte mistura: 14,1 µL de água “MilliQ” autoclavada; 2,5 µL de tampão de PCR concentrado 10X; 0,5 µL de dNTP [10 mM]; 1 µL do primer sense; 1 µL do primer anti-sense (ver tabela II); 0,25 µL de Taq polimerase

(1,25 U / reação) e 0,75 μ L de $MgCl_2$ (1,5 mM / reação). Para o controle negativo foi utilizada água no lugar da amostra de cDNA. A mistura foi homogeneizada e os tubos foram transferidos para um termociclador (Mastercycler gradient – Eppendorf), onde foram submetidos a condições específicas para cada primer, descritas na tabela III. Após o término da reação as amostras foram mantidas a $-80^\circ C$ até o momento da análise.

Tabela II – Primers utilizados para a realização do PCR.

Primer	Cadeia	Seqüência (5' $\rightarrow$ 3')	Ref.
β -actina	S	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	1
	AS	GGTCTCAAACATGATCTGGG	
CXCL8 (IL-8)	S	CCAAGGAAAAGTGGGTGCAGAG	2
	AS	GGCACAGGGGAACAAGGACTTG	
CXCL9 (Mig)	S	CAGCAGATGTGAAGGAACTG	3
	AS	GCATGATGAAATTCAACTGG	
CXCL10 (IP-10)	S	CAGCCTCTGTGTGGTCCATCCTTG	3
	AS	TGATTTGCTGCCTTATCTTTCTGA	
IFN- γ	S	TTTAATGCAGGTCATTCAGATG	4
	AS	CTGGGATGCTCTTCGTCCTCGAAAC	
IL-2	S	AACAGTGCACCTACTTCAAG	1
	AS	GTTGAGATGATGCTTTGACA	
IL-4	S	ACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAA	4
	AS	TCTCATGATCGTCTTTAGCCTTTCC	
IL-5	S	TGCCTACGTGTATGCCATCCC	1
	AS	CTTGGCCCTCATTCTCACTGC	
IL-6	S	ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC	2
	AS	GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG	
IL-10	S	ATCCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA	4
	AS	TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA	
TGF- β	S	TGGGAAATTGAGGGCTTTCGCCT	5
	AS	GACCTGTGGTTGATAACGAAG	
TNF- α	S	TCTTCTGCCTGCTGCACTTTGG	6
	AS	ATCTCTCAGCTCCACGCCATTG	

S – sense; AS – anti-sense; Ref. - Referências: **1** – KANDA e WATANABE, 2001; **2** - GEORGANAS *et al.*, 2000; **3** – ROMAGNANI *et al.*, 2001; **4** – DUTRA *et al.*, 1997; **5** – FLACH *et al.*, 1998; **6** – MAYRINGER *et al.*, 2000.

Tabela III – Condições da PCR

Primer	Desnaturação Inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Ciclos
	Tempo (min)	Temp. (°C)	Tempo (s)	Temp. (°C)	Tempo (s)	Temp. (°C)	Tempo (s)	Temp. (°C)	
β-Actina	5	95	45	95	45	55	60	72	35
CXCL8 (IL-8)	5	94	60	94	60	60	60	72	25
CXCL9 (Mig)	5	95	45	95	45	57	60	72	35
CXCL10 (IP-10)	5	95	45	95	45	60	60	72	35
IFN-γ	5	92	45	92	45	55	60	72	35
IL-2	5	95	45	95	45	57	60	72	35
IL-4	5	92	45	92	45	55	60	72	40
IL-5	5	95	45	95	45	60	60	72	35
IL-6	5	94	60	94	60	58	60	72	25
IL-10	5	92	45	92	45	62	60	72	40
TGF-β	5	94	45	94	45	60	60	72	40
TNF-α	10	94	45	95	45	60	60	72	30

Análise do produto do PCR

As amostras obtidas no PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, em presença de brometo de etídio (1µg/mL). Antes da aplicação no gel as amostras foram adicionadas de 10% de seu volume de corante composto por glicerol e azul de bromofenol em tampão TBE. O gel foi carregado com 20 µL das amostras e de um padrão de tamanho, e a eletroforese feita sob voltagem constante de 75V por aproximadamente 1 hora. Após a eletroforese o gel foi analisado em equipamento de fotodocumentação (Kodak EDAS 290) com software apropriado (Kodak 1D 3.5). O tamanho do fragmento sintetizado e a intensidade da banda foram estimados, sendo a intensidade normalizada em relação à banda formada pelo cDNA de β -actina de cada amostra.

Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio de software SigmaStat v1.0 (Jandel Corporation). Os diversos grupos foram comparados por meio do teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni. A comparação entre os diversos tempos de estímulo foi feita por meio do teste ANOVA para medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni para amostras pareadas. A comparação entre grupos sem e com estímulo foi feita pelo teste de t pareado. A análise da correlação entre os diversos parâmetros foi realizada com o teste de Pearson. Foram considerados significantes valores de $p \leq 0,05$.



Resultados

Indivíduos do grupo PCM-Infecção expressam níveis mais precoces e mais elevados de RNAm para IFN- γ que indivíduos com PCM-doença.

Como mencionado anteriormente, a resistência à infecção causada pelo *P. brasiliensis* é relacionada à presença de células produtoras de citocinas Th1. A comparação do nível de expressão de RNAm para IFN- γ nos diferentes grupos demonstrou que indivíduos do grupo PI apresentavam valores estatisticamente superiores aos indivíduos com FJ durante quase todo o período (0, 3, 6, 12 e 24 horas), enquanto que em relação aos pacientes com a FA só houve diferença estatística em relação as células não estimuladas, sendo que com 3 e 6 horas os valores foram superiores, sem apresentar diferença estatística. Também foi observada diferença estatística entre os dois grupos de pacientes (FJ e FA) quanto à expressão do RNAm para esta citocina, sendo que os pacientes com a FA apresentaram níveis superiores nos tempos de 0, 3, 6 e 12 horas de estímulo (**figura 1**).

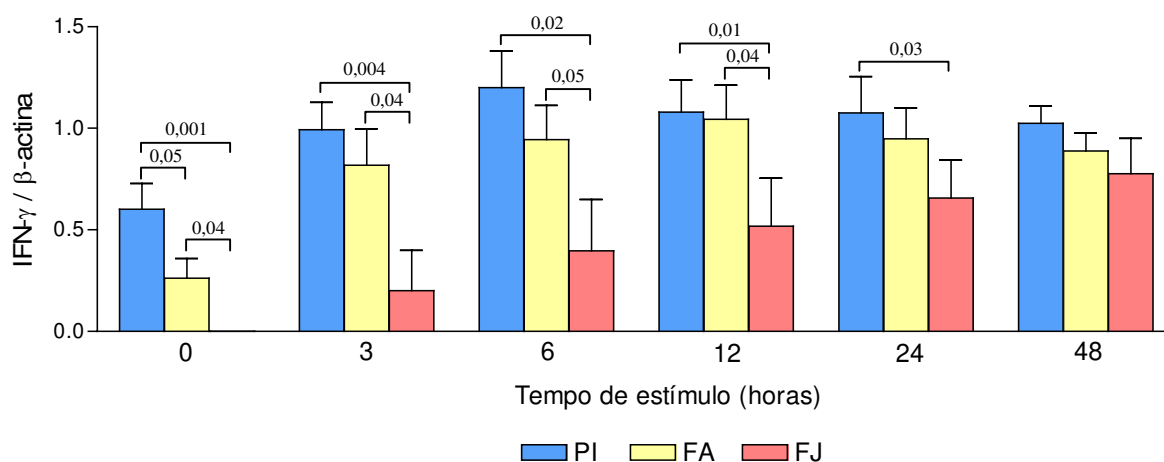


Figura 1 – Análise semi-quantitativa da expressão de RNAm para IFN- γ (IFN- γ / β -actina) por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes.

Analisando-se a cinética da produção do RNAm pelos diferentes grupos (melhor representada no gráfico de linhas) pudemos observar que a maioria dos indivíduos do grupo PI e grande parte dos pacientes com a FA expressavam o RNAm para IFN- γ em suas células mesmo sem estímulo (expressão constitutiva). Após a estimulação houve um aumento da expressão logo nas primeiras 3 horas, sendo que o nível de expressão alcançado manteve-se constante até o final do período estudado. Para os indivíduos com a FJ a expressão foi mais tardia e gradual, alcançando níveis comparáveis aos dois outros grupos somente após 48 horas de estímulo (**figura 2**).

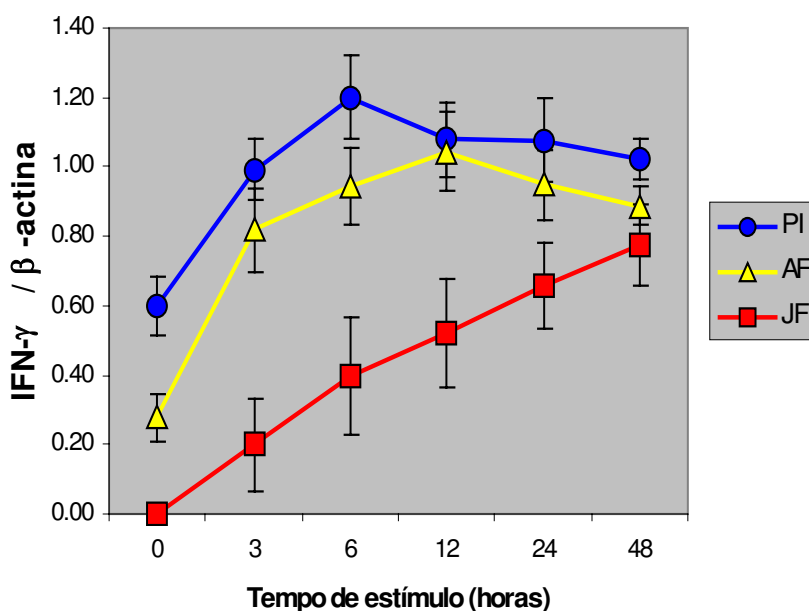


Figura 2 – Cinética da produção de RNAm para IFN- γ por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10 μ g/mL). Valores expressos como média $\pm$ EP (IFN- γ / β -actina).

Indivíduos do grupo PCM-infecção apresentam uma maior porcentagem de células produtoras de IFN- γ que pacientes com PCM-doença.

Não foi possível analisar a população de linfócitos CD4⁺ diretamente, uma vez que o estímulo utilizado (PMA + ionóforo de cálcio) induz a diminuição da expressão desse marcador, desse modo essa população foi inferida pela diferença entre a população CD3⁺citocina⁺ e a população CD3⁺CD8⁺citocina⁺ (ver anexos). Os resultados relativos à expressão do RNAm foram confirmados pela detecção do IFN- γ por citometria de fluxo. Observamos que uma maior porcentagem de células de indivíduos do grupo PI expressam IFN- γ após a estimulação em relação aos pacientes com a FJ ou a FA da PCM, tanto quando se analisou a expressão na população CD3⁺ como na população CD3⁺CD8⁺. A comparação entre as duas formas clínicas da PCM mostrou que há uma maior porcentagem, tanto de linfócitos T CD3⁺ quanto de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ ((CD3⁺)-CD8⁺), de pacientes com a FA positivos para IFN- γ quando comparados ao grupo de pacientes com a FJ (**figura 3**). É importante destacar a maior produção de IFN- γ por linfócitos T CD3⁺CD8⁺ em todos os indivíduos analisados.

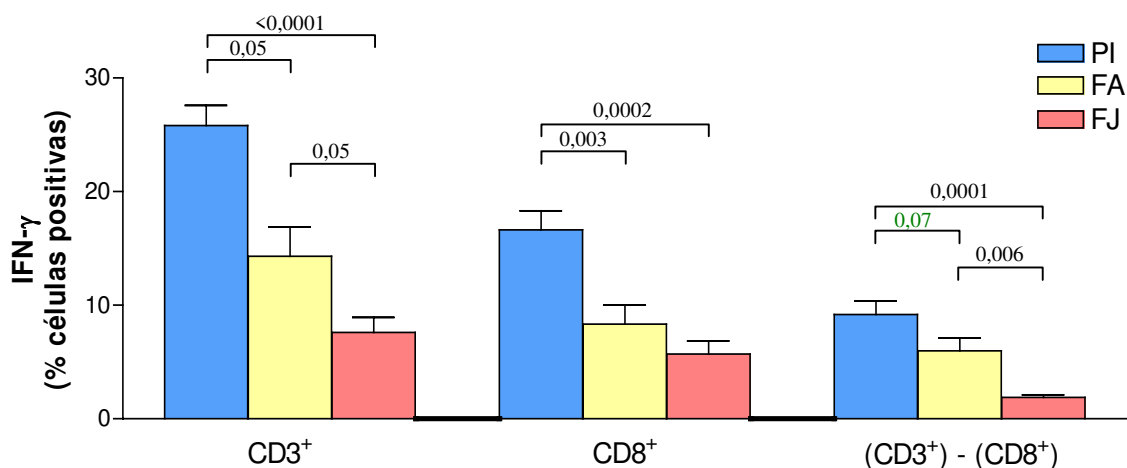


Figura 3 – Análise por citometria de fluxo da produção de IFN- γ por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI), forma adulta (FA) e juvenil (FJ) da PCM. Células do sangue total foram estimuladas com PMA (50ng/mL) e ionóforo de cálcio (250ng/mL) por 6 horas na presença de brefeldina A (1 μ g/mL). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos. Resultados expressos como média $\pm$ EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes.

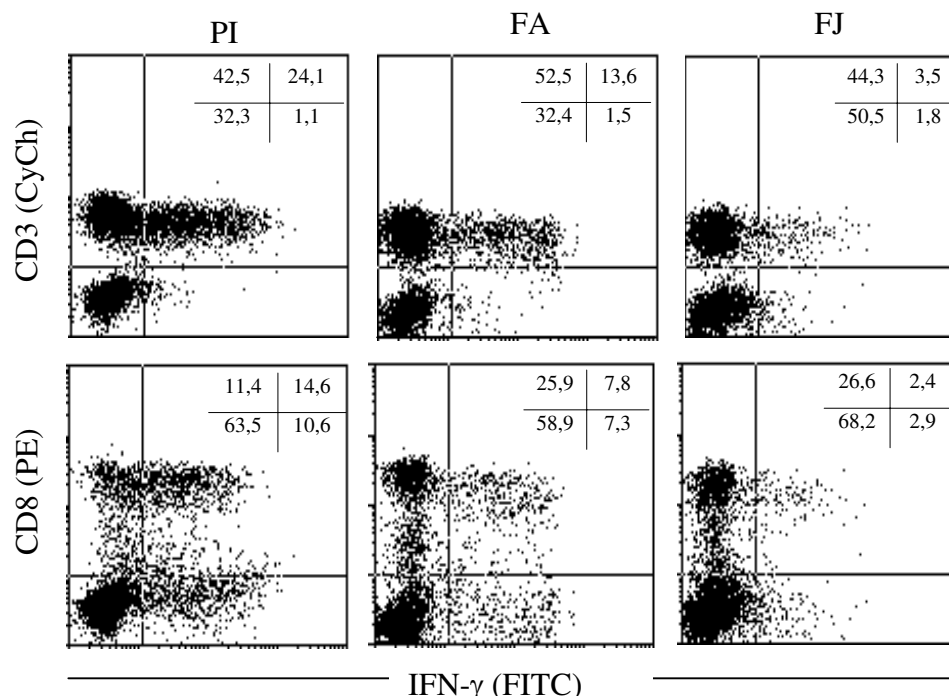


Figura 4 – Análise por citometria de fluxo da produção de IFN- γ por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI), forma adulta (FA) e forma juvenil (FJ) da PCM. “Dot-plots” representativos de cada um dos grupos analisados, os valores representam a porcentagem de células positivas em cada quadrante. A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos.

A expressão de RNAm para as quimiocinas induzidas por IFN- γ (CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10) apresentou-se diminuída nos pacientes com a FJ da PCM.

Como a produção de algumas quimiocinas é dependente da expressão de IFN- γ , decidimos analisar a expressão do RNAm para CXCL10 (IP-10) e CXCL9 (Mig). Observamos um aumento estatisticamente significativo na expressão de CXCL10 (IP-10) nos indivíduos do grupo PI e FA em relação aos pacientes com FJ após 3 e 48 horas de estímulo, embora houvesse uma tendência de maior produção nos tempos de 12 e 24 horas (figura 5).

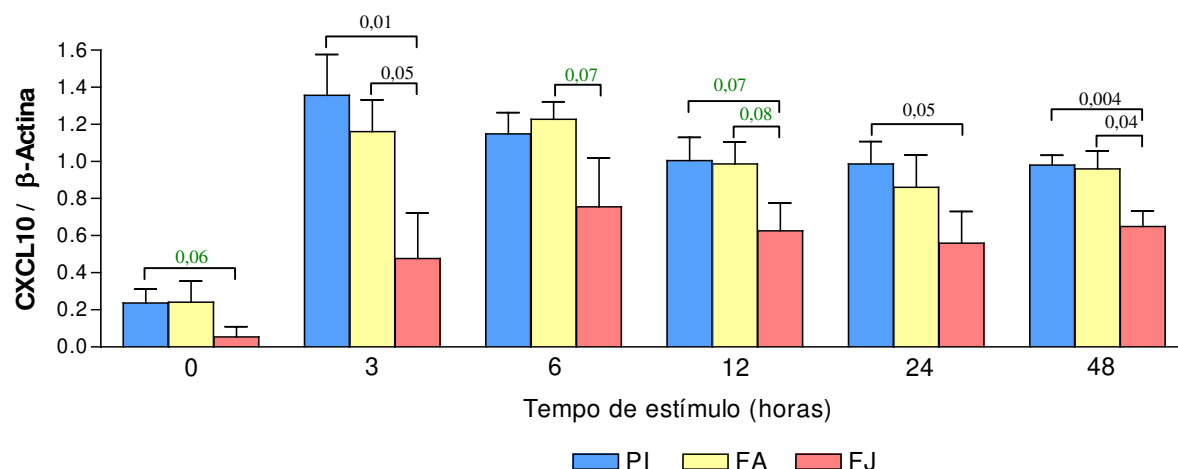


Figura 5 – Análise semi-quantitativa (CXCL10 / β -actina) da expressão de RNAm para CXCL10 (IP-10) por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de p estão expressos sobre os colchetes.

A cinética de expressão do RNAm para CXCL10 (IP-10) foi muito semelhante àquela observada para o IFN- γ . A maioria dos indivíduos do grupo PI e com a FA da PCM expressaram o RNAm para CXCL10 mesmo em células não estimuladas, com aumento significativo ($p < 0,05$) logo nas primeiras 3 horas, seguido de pequena queda, mas com expressão constante por todo o período estudado. Já os pacientes com a FJ apresentaram novamente expressão mais tardia. (**figura 6**).

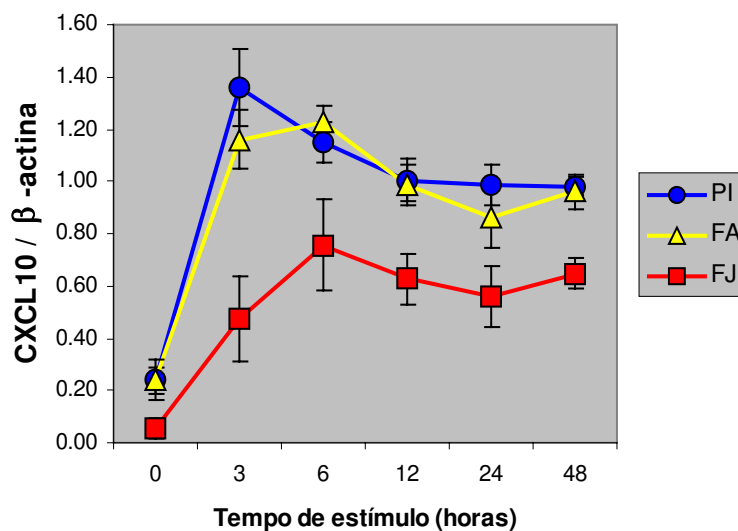


Figura 6 – Cinética da produção de RNAm para CXCL10 (IP-10) por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) e juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10µg/mL). Valores expressos como média $\pm$ EP (CXCL10 / β -actina).

Em relação à expressão de RNAm para CXCL9 (Mig) observamos uma maior produção nos indivíduos do grupo PI em relação aos dois grupos de pacientes (FA e FJ) somente após 24 horas do estímulo (**figura 7**).

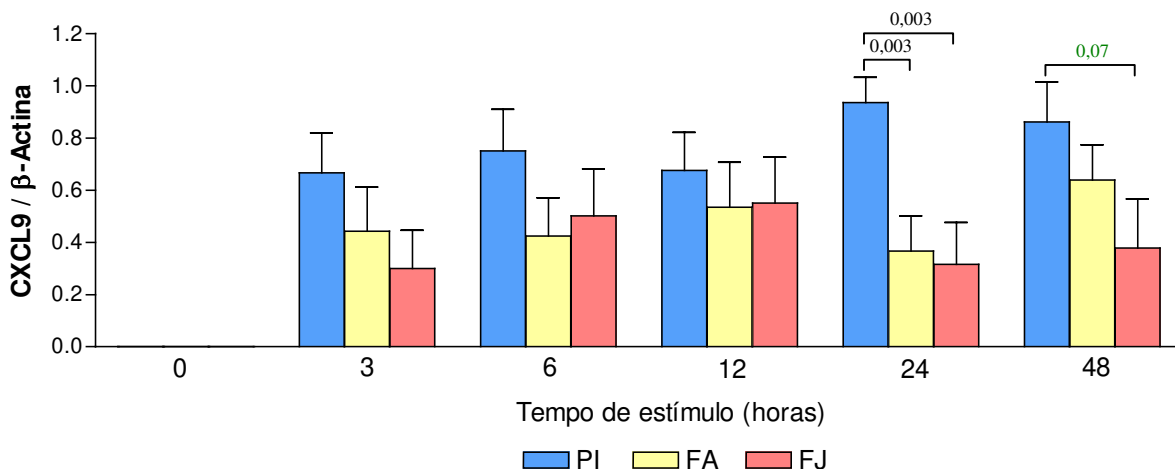


Figura 7 – Análise semi-quantitativa (CXCL9 / β -actina) da expressão de RNAm para CXCL9 (Mig) por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de p estão expressos sobre os colchetes.

A cinética de expressão do RNAm para CXCL9 (Mig) mostrou-se bastante heterogênea em todos os grupos estudados, com um padrão diferente daquele observado para CXCL10 (IP-10). De forma geral os indivíduos PI exibiram aumento da expressão deste RNAm logo após o estímulo inicial (3 horas) e manutenção de níveis constantes até o final do período estudado. Já os pacientes com PCM doença, tanto os com FA como os com FJ, apresentaram uma expressão mais tardia com aumento inicial e queda no final do período (**figura 8**).

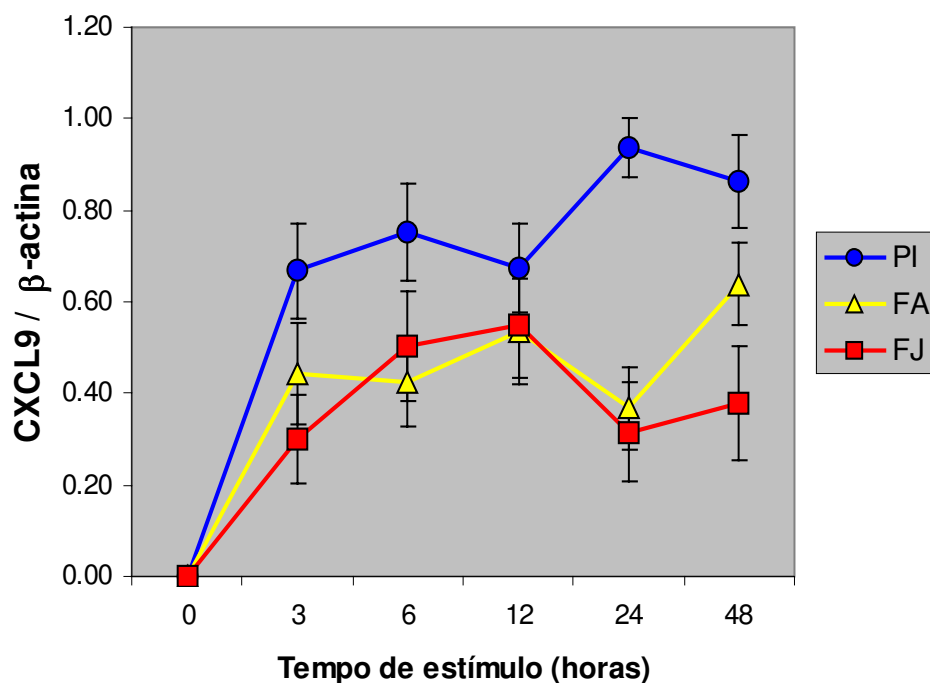


Figura 8 – Cinética da produção de RNAm para CXCL9 (Mig) por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10μg/mL). Valores expressos como média ± EP (CXCL9 / β-actina).

Apesar da cinética ser ligeiramente diferente, ficou clara a relação entre a expressão do RNAm para IFN-γ e a expressão do RNAm para CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10), confirmada estatisticamente (**figura 9 A e B**).

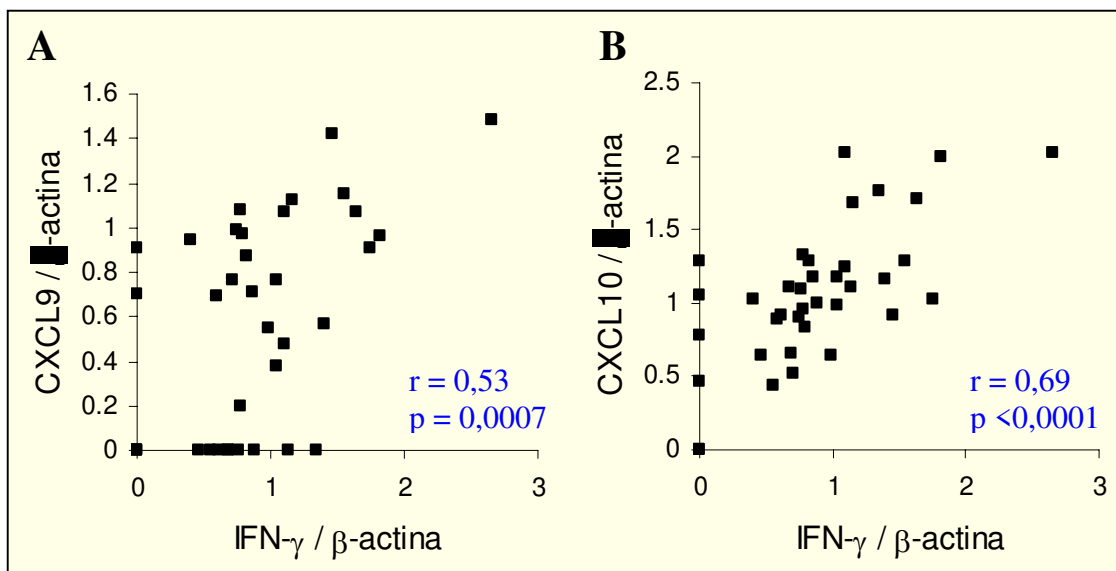


Figura 9 – Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para IFN- γ e CXCL9 (A) e CXCL10 (B), após 6 horas de estímulo com PHA (10 μ g/mL). Teste de correlação de Pearson, os valores de p e r são mostrados nos gráficos.

Indivíduos do grupo PCM-infecção apresentam maior porcentagem de linfócitos produtores das quimiocinas CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10).

A análise da região de linfócitos pela citometria de fluxo demonstrou que indivíduos do grupo PI apresentam uma maior porcentagem de células positivas para as duas quimiocinas induzidas pelo IFN- γ , CXCL10 (IP-10) e CXCL9 (Mig), quando comparados aos outros grupos. Em relação aos monócitos (CD68⁺), embora apresentem uma grande porcentagem de positividade, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Embora haja uma tendência dos indivíduos com a FJ da PCM apresentarem uma menor porcentagem de células produtoras destas quimiocinas (**figura 10**).

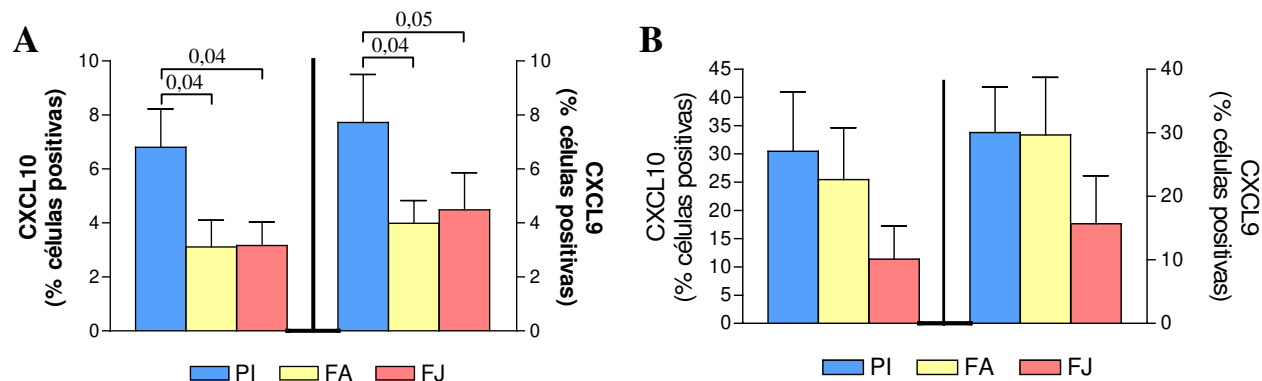


Figura 10 – Análise por citometria de fluxo da produção de IP-10 e Mig por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 (**A** - 0,1µg/mL cada) por 24 horas ou LPS (**B** - 10µg/mL) por 6 horas na presença de brefeldina A (1µg/mL). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos (**A**) ou monócitos (**B**). Resultados estão expressos como média $\pm$ EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de p estão expressos sobre os colchetes. **Note as diferenças de escala.**

Uma menor porcentagem de linfócitos de pacientes com ambas as formas clínicas da PCM expressam o receptor CXCR3, em relação aos indivíduos do grupo PCM-Infecção.

CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10) são quimiocinas que atuam sobre linfócitos Th1 atraindo-os para o sítio de infecção. Ambas sinalizam via um receptor comum, o CXCR3. A análise por citometria de fluxo da porcentagem de linfócitos (células CD3⁺) expressando o receptor de quimiocina CXCR3 demonstrou que, quando comparados ao grupo PI, indivíduos com ambas as formas clínicas da PCM apresentam menor quantidade de células positivas para esse marcador. Essa diferença foi observada tanto em

células sem estímulo como em células estimuladas por 24 horas com anti-CD3 mais anti-CD28 (**figura 11**).

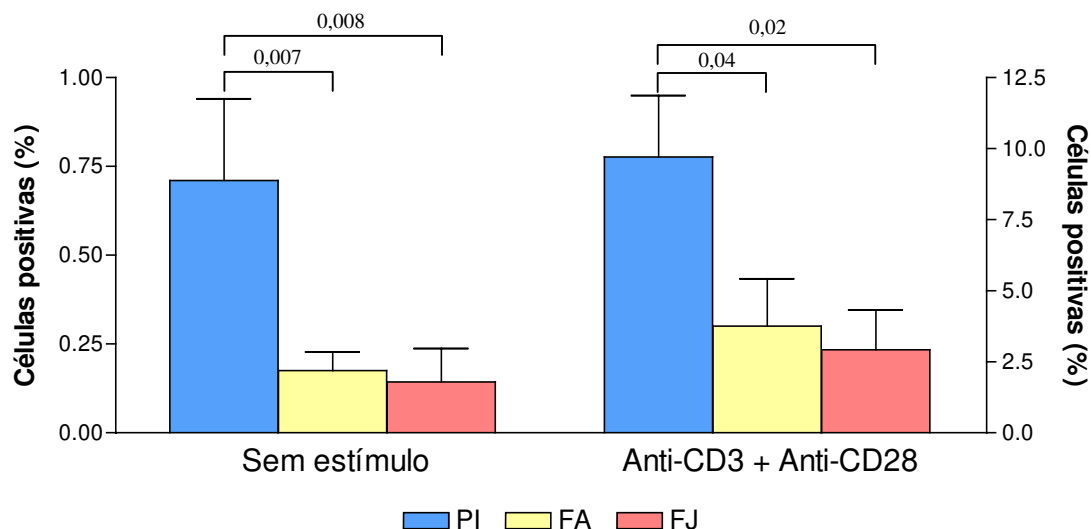


Figura 11 – Análise por citometria de fluxo da expressão de CXCR3 por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 (0,1µg/mL cada) por 24 horas. A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos. Resultados estão expressos como média $\pm$ EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de p estão expressos sobre os colchetes. **Note as diferenças de escala.**

Uma maior porcentagem de células de indivíduos com a FJ expressa o receptor CCR3 quando comparadas aos indivíduos com a FA da PCM.

Se as células Th1 expressam preferencialmente o receptor CXCR3, nas células Th2 o mesmo ocorre em relação ao CCR3, que atua como receptor da CCL11 (eotaxina) e da CCL5 (RANTES). Em nosso trabalho o número de células não estimuladas expressando o receptor CCR3 foi similar em todos os grupos analisados. Após o estímulo com anti-CD3 mais anti-CD28, houve um aumento do número de células positivas em todos os grupos havendo diferença estatística somente quando se comparou os pacientes com a FA e FJ da PCM (**figura 12**).

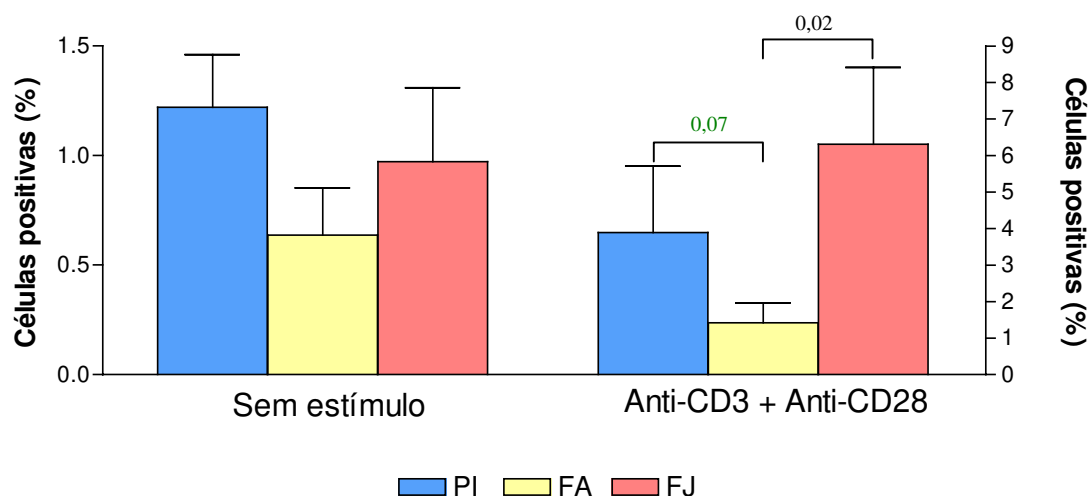


Figura 12 – Análise por citometria de fluxo da expressão de CCR3 por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 (0,1µg/mL cada) 24 horas. A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos. Resultados estão expressos como média ± EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes. **Note as diferenças de escala.**

Indivíduos do grupo PCM-Infecção expressam maior quantidade de RNAm para TNF- α que indivíduos com PCM-doença.

A comparação do nível de expressão de RNAm para TNF- α nos diferentes grupos estudados demonstrou que indivíduos do grupo PI apresentavam valores estatisticamente superiores aos indivíduos com FJ e FA da PCM nos períodos iniciais (0, 3 e 6 horas) (**figura 13**).

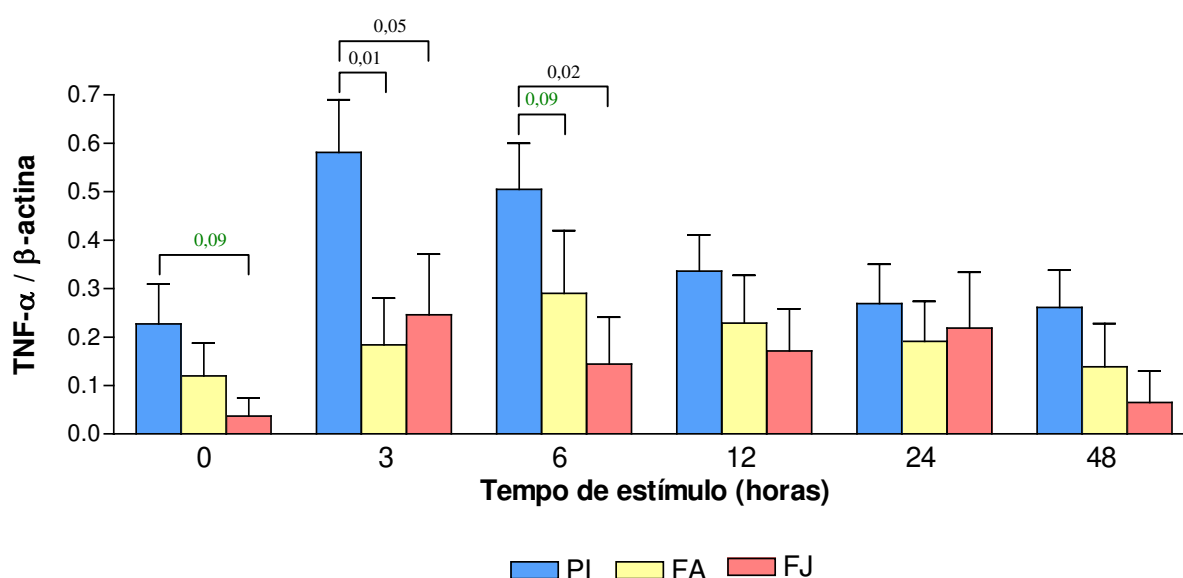


Figura 13 – Análise semi-quantitativa (TNF- α / β -actina) da expressão de RNAm para TNF- α por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de p estão expressos sobre os colchetes.

Analisando-se a cinética da produção do RNAm pelos diferentes grupos pudemos observar que o grupo de indivíduos do grupo PI expressa o RNAm para TNF- α em suas células, mesmo sem estímulo. Após a estimulação, esse grupo demonstrou um aumento bastante significativo na expressão do RNAm logo nas três primeiras horas, havendo em seguida uma queda. É interessante notar que níveis de expressão do RNAm nos grupos de pacientes com a FJ ou com a FA mesmo sofrendo aumento após estimulação alcançam níveis máximos comparáveis àquele observado nas células de indivíduos do grupo PI sem estímulo; e que ao final do período estudado, a expressão retorna aos níveis iniciais em todos os grupos, demonstrando o caráter transitório da expressão dessa citocina (figura 14).

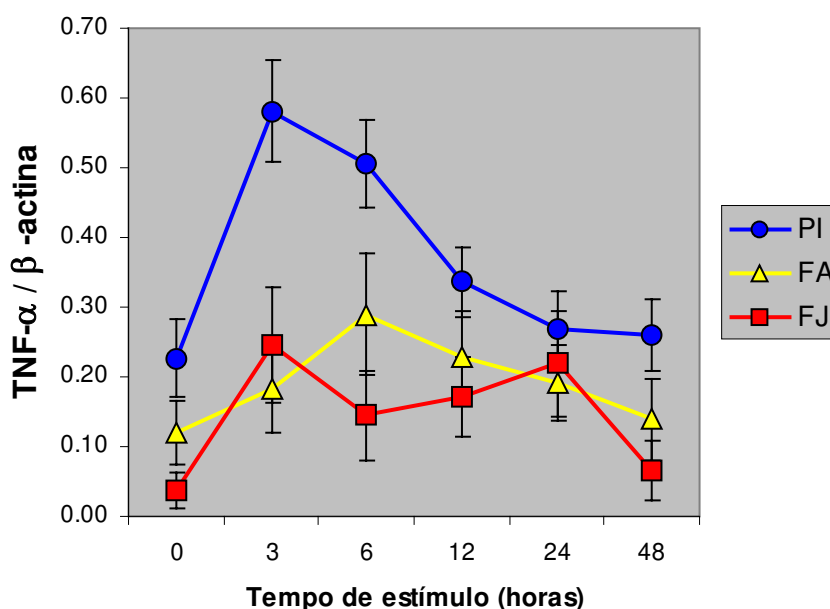


Figura 14 – Cinética da produção de RNAm para TNF- α por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10 μ g/mL). Valores expressos como média $\pm$ EP (TNF- α / β -actina).

Indivíduos do grupo PCM-infecção apresentam maior porcentagem de células produtoras de TNF- α que pacientes com PCM-doença.

De modo semelhante ao IFN- γ e refletindo a expressão do RNAm, a produção de TNF- α por linfócitos foi estatisticamente maior nos indivíduos do grupo PI dos que nos indivíduos com PCM-doença em ambas as formas clínicas, tanto em relação aos linfócitos totais (CD3⁺), quanto nas duas sub-populações (CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD4⁺). O grupo de pacientes com a FA também apresentou maior produção desta citocina quando comparado ao grupo de indivíduos com a FJ da PCM, tanto na população CD3⁺, quanto na população CD3⁺CD4⁺. Mas, de maneira diferente do IFN- γ , a produção nos 3 grupos estudados foi predominantemente observada em linfócitos CD3⁺CD4⁺ (**figura 15A e B**).

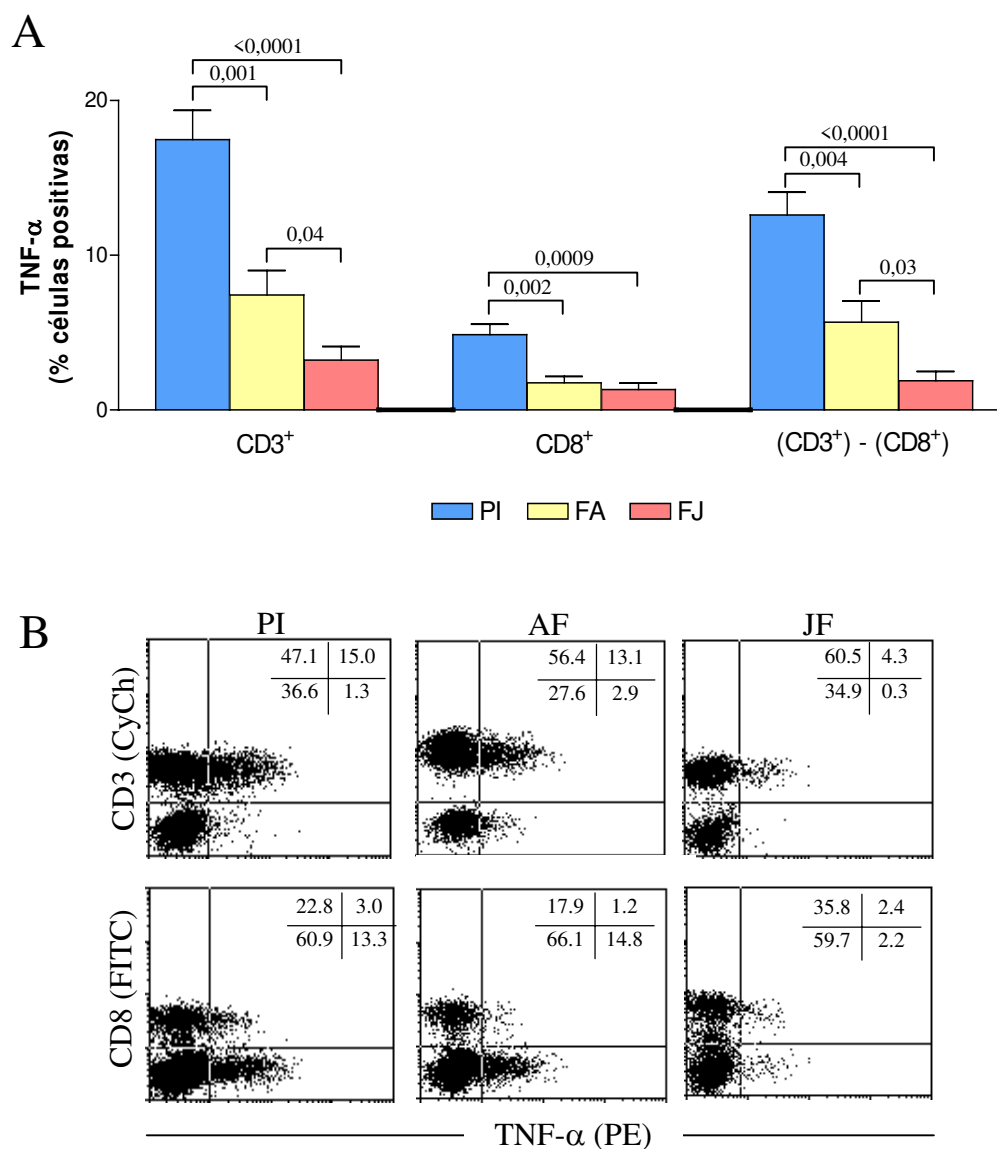


Figura 15 – Análise por citometria de fluxo da produção de TNF- α por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células do sangue total foram estimuladas com PMA (50ng/mL) e ionóforo de cálcio (250ng/mL) por 6 horas na presença de brefeldina A (1 μ g/mL). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos. **A** - Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes. **B** – “Dot-plots” representativos de cada um dos grupos analisados, os valores representam a porcentagem de células positivas em cada quadrante.

O TNF- α também é produzido por monócitos, dessa forma determinamos a sua produção por células estimuladas por LPS, e fizemos a análise da expressão dessa citocina por células (CD68⁺). Observamos que os indivíduos com FJ apresentavam níveis estatisticamente menores desta citocina quando comparados aos outros dois grupos, tanto em células não estimuladas como naquelas estimuladas com LPS (**figura 16**), não havendo diferença estatística entre os indivíduos do grupo PI e com a FA da PCM.

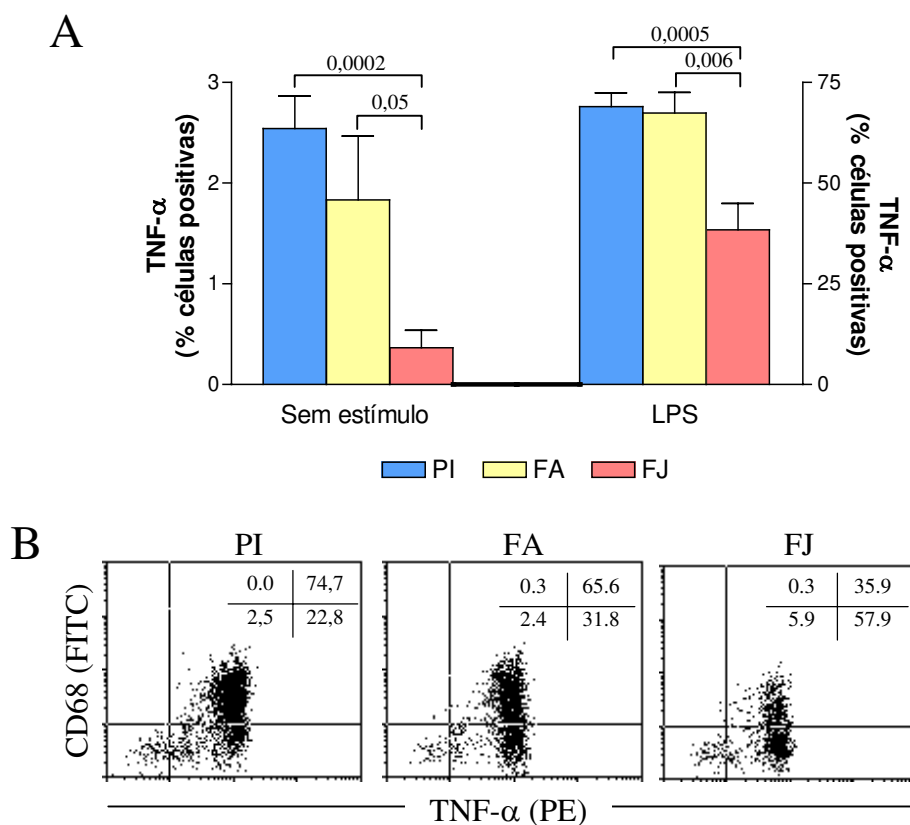


Figura 16 – Análise por citometria de fluxo da produção de TNF- α por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com LPS (10 μ g/mL) por 6 horas na presença de brefeldina A (1 μ g/mL). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de monócitos. **A** - Resultados estão expressos como média $\pm$ EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes. **B** – “Dot-plots” representativos de cada um dos grupos analisados, os valores representam a porcentagem de células positivas em cada quadrante. **Note as diferenças de escala.**

A expressão de RNAm para IL-2 foi indetectável na maioria dos indivíduos estudados, mas houve uma tendência de maior expressão em indivíduos do grupo PCM-infecção.

A expressão de RNAm para IL-2 foi detectada em apenas alguns indivíduos testados, e por esse motivo não foi possível obter diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Apesar disso, os indivíduos do grupo PI apresentaram uma tendência de maior expressão, quando comparados aos dois grupos de pacientes com PCM-doença (figura 17).

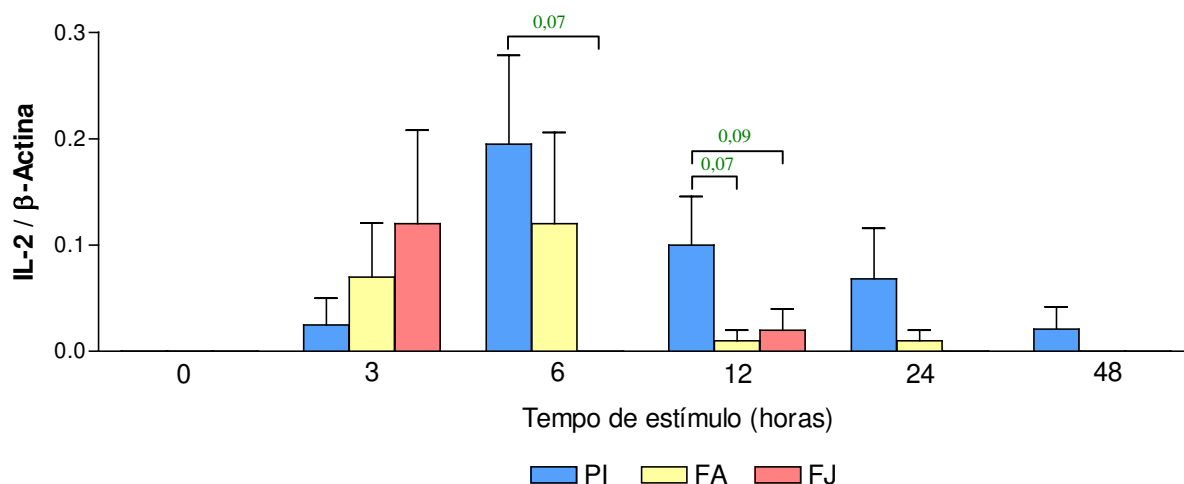


Figura 17 – Análise semiquantitativa (IL-2 / β-actina) da expressão de RNAm para IL-2 por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10µg/mL de PHA. Valores expressos como média ± erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes.

Embora não tenha sido observada a produção de RNAm para IL-2 na maioria dos indivíduos testados, a cinética de produção demonstrou que ocorre um pico no início da estimulação (entre 3 e 6 horas) e que a expressão é transitória (**figura 18**). Dos indivíduos que apresentaram níveis de RNAm detectáveis, aqueles do grupo PI mantiveram a expressão em mais de um tempo, enquanto que tanto os pacientes com a FA, quanto os com a FJ da PCM expressaram este RNA em apenas um dos períodos analisados (dados não mostrados).

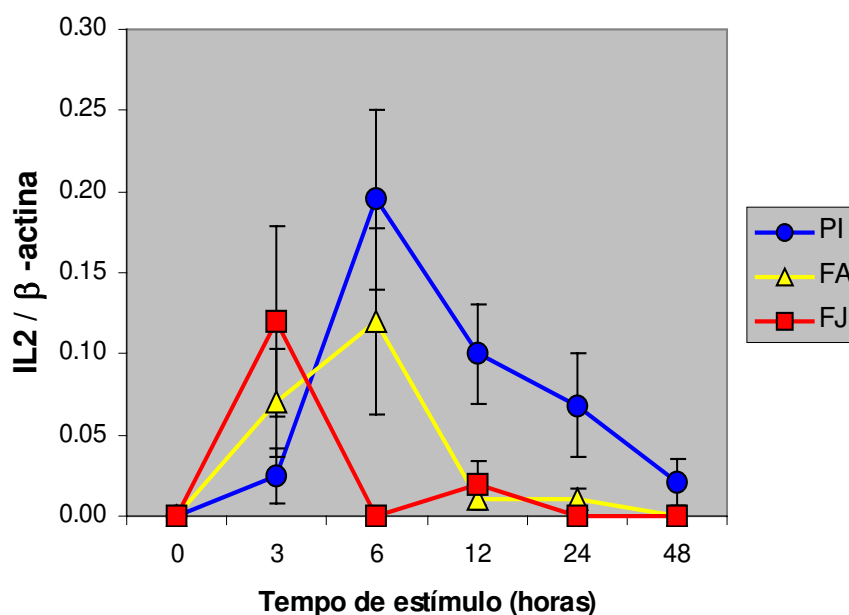


Figura 18 – Cinética da produção de RNAm para IL-2 por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10μg/mL). Valores expressos como média ± EP (IL-2 / β-actina).

Indivíduos do grupo PCM-infecção apresentam maior porcentagem de células produtoras de IL-2 que pacientes com PCM-doença e controles normais.

Embora não tenhamos observado diferenças estatísticas quanto à expressão do RNAm para IL-2, a produção dessa citocina foi estatisticamente maior em indivíduos do grupo PI, do que nos outros grupos estudados. A análise das diferentes populações de linfócitos mostrou que a produção desta citocina é feita predominantemente por linfócitos T CD4⁺. Os pacientes com a FA também apresentaram maior produção em comparação ao grupo com a FJ da PCM, tanto em relação às células CD3⁺, como em relação às células CD3⁺CD4⁺ (figura 19 e 20).

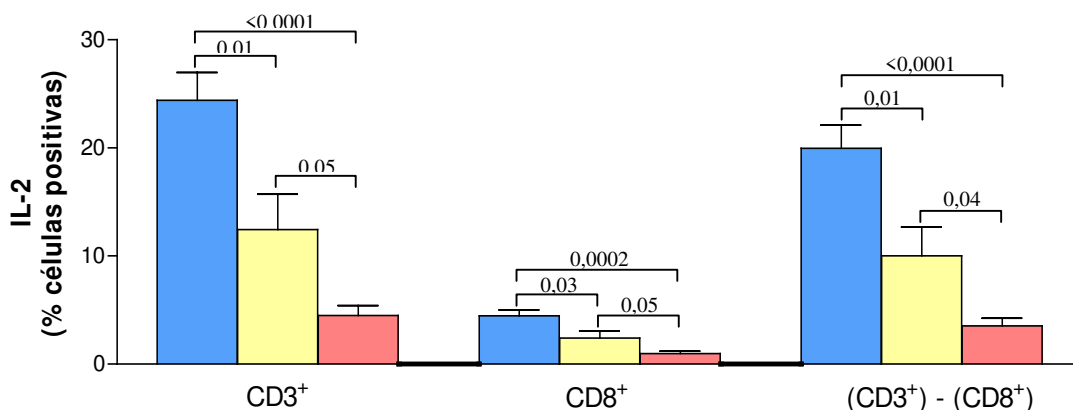


Figura 19 – Análise por citometria de fluxo da produção de IL-2 por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células do sangue total foram estimuladas com PMA (50ng/mL) e ionóforo de cálcio (250ng/mL) por 6 horas na presença de brefeldina A (1μg/mL). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos. Os resultados estão expressos como média ± EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes.

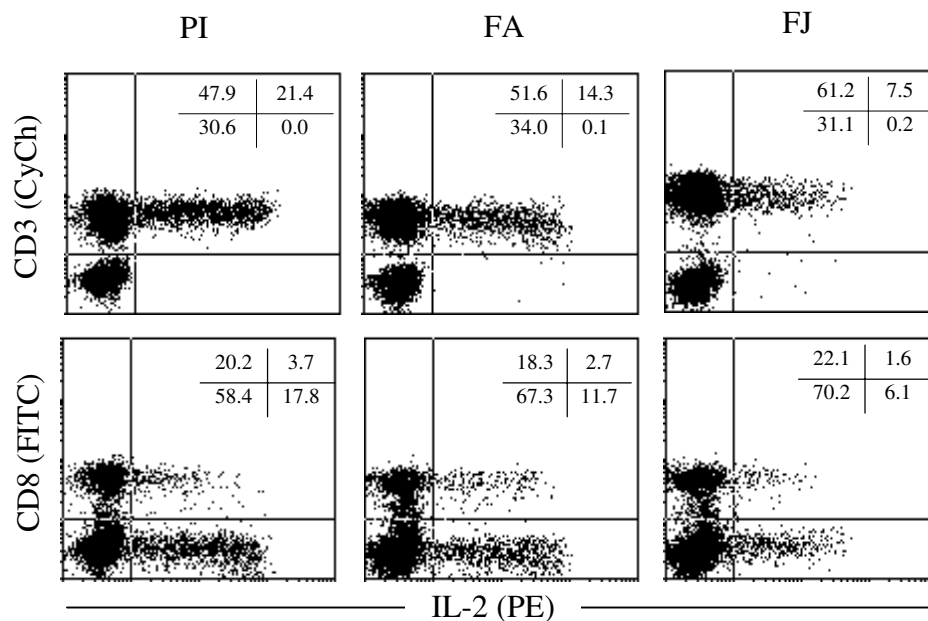


Figura 20 - Análise por citometria de fluxo da produção de IL-2 por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. “Dot-plots” representativos de cada um dos grupos analisados, os valores representam a porcentagem de células positivas em cada quadrante. A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos.

Pacientes com as formas adulta e juvenil da PCM expressam níveis mais elevados de RNAm para IL-4 do que indivíduos do grupo PCM-infecção

A expressão de RNAm para IL-4 mostrou-se significativamente maior nos pacientes com PCM-doença (FA e FJ) quando comparados aos indivíduos do grupo PI e controles normais em quase todos os tempos analisados (**figura 21**). Os pacientes com FJ apresentaram uma maior expressão de RNAm que os pacientes com a FA no tempo de 6, e uma tendência a maior produção após 48 horas de estímulo.

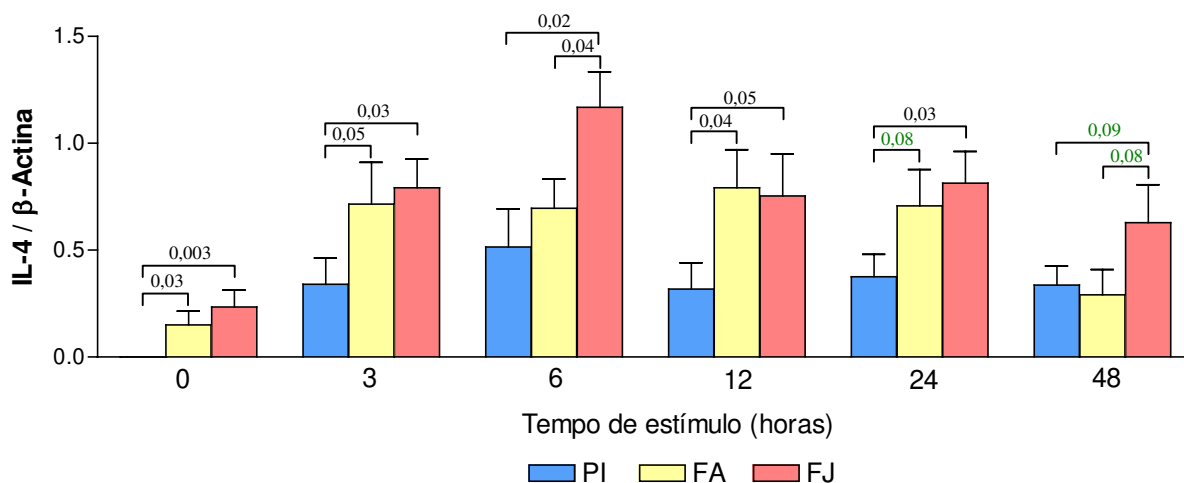


Figura 21 – Análise semiquantitativa (IL-4 / β -actina) da expressão de RNAm para IL-4 por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, valores de p expressos sobre os colchetes.

A cinética de expressão do RNA para IL-4 demonstrou que grande parte dos indivíduos com as duas formas clínicas da PCM apresentam níveis detectáveis desse RNAm em células não estimuladas, o que não aconteceu com indivíduos do grupo PI. Após a estimulação, ocorreu um grande aumento da expressão desse RNAm nas células dos indivíduos com as duas formas clínicas, notadamente na FJ, enquanto que a expressão nas células dos indivíduos do grupo PI alcançou níveis similares àqueles observados nas células não estimuladas dos pacientes (FJ e FA). Além disso, pudemos observar também que a expressão de elevados níveis de RNAm para IL-4 é transitória, uma vez que no final do período estudado houve uma tendência de retorno aos níveis iniciais (**figura 22**).

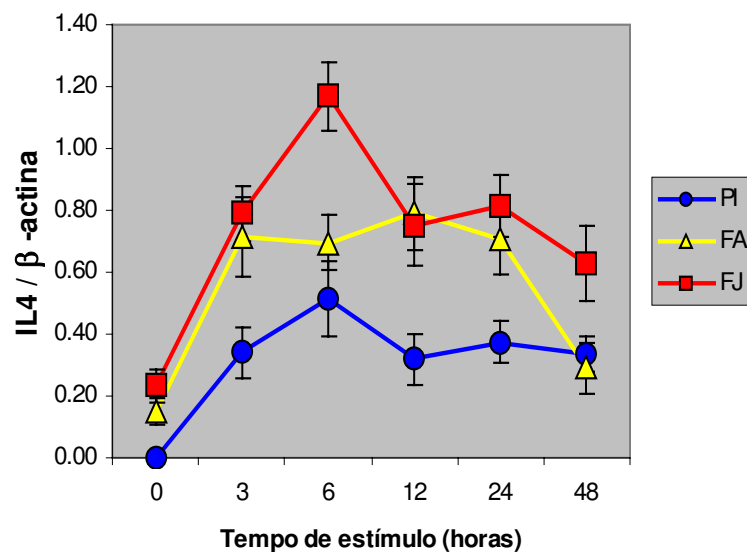


Figura 22 – Cinética da produção de RNAm para IL-4 por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10µg/mL). Valores expressos como média $\pm$ EP (IL-4 / β -actina).

Uma correlação negativa foi observada entre a expressão do RNAm para IFN- γ e IL-4, demonstrando o caráter antagônico dessas duas citocinas (**figura 23**).

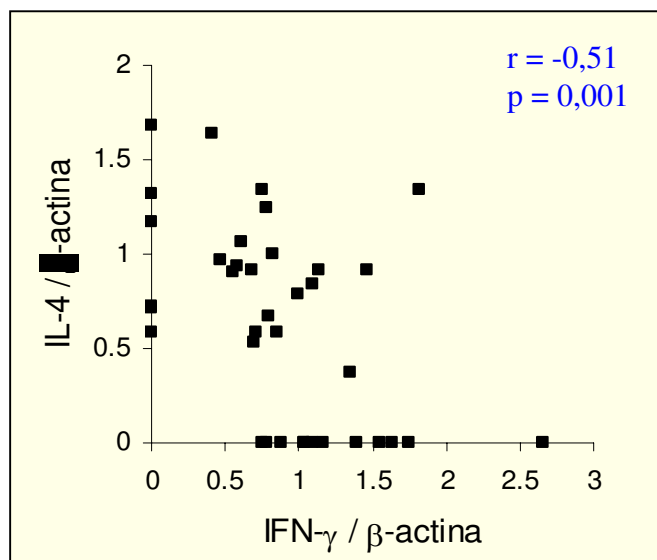


Figura 23 - Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para IFN- γ e IL-4, após 6 horas de estímulo com PHA (10 μ g/mL). Teste de correlação de Pearson, os valores de p e r são mostrados nos gráficos.

Pacientes com PCM-doença expressam maiores níveis de RNAm para IL-5 do que indivíduos do grupo PCM-infecção.

A expressão de RNAm para IL-5 foi estatisticamente maior nos pacientes com PCM-doença (FA e FJ) do que nos indivíduos do grupo PI em quase todos os tempos estudados (3, 6, 12 e 24 horas) (**figura 24**), não havendo diferenças significativas entre as duas formas clínicas da doença.

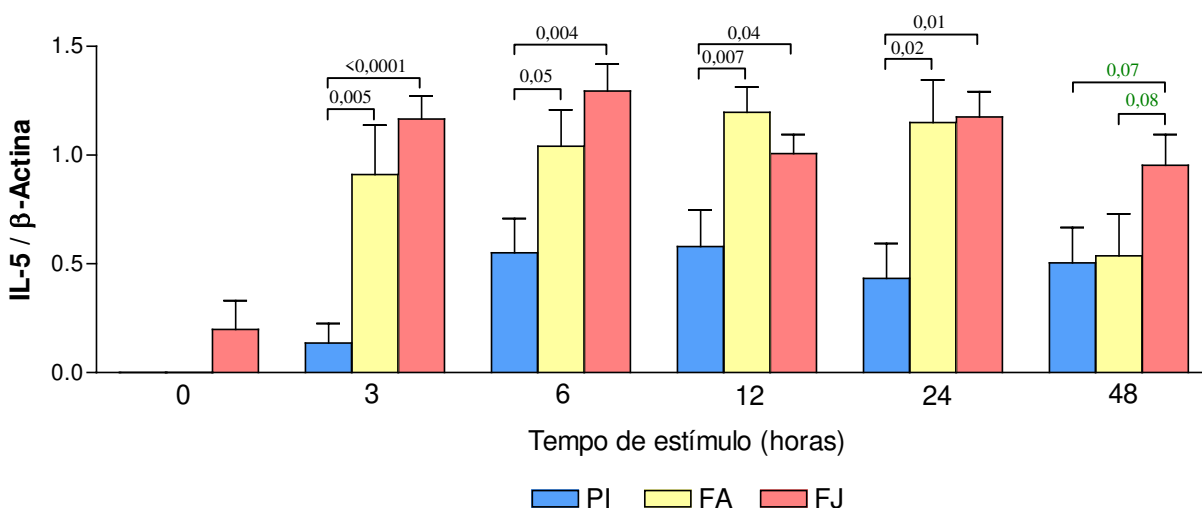


Figura 24 – Análise semi-quantitativa (IL-5 / β -actina) da expressão de RNAm para IL-5 por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de p estão expressos sobre os colchetes.

A análise da cinética de expressão do RNAm para IL-5 demonstrou um padrão muito semelhante àquele observado para IL-4, sendo que os dois grupos de pacientes apresentaram aumento bastante importante da expressão desse RNAm após o estímulo. No caso dos pacientes com a FA foi observada uma queda nos níveis de expressão após 48 horas, enquanto que pacientes com a FJ mantiveram níveis constantes. A expressão do RNA para IL-5 nas células dos indivíduos do grupo PI mostrou-se mais tardia, com níveis baixos de expressão durante todo o período estudado (**figura 25**).

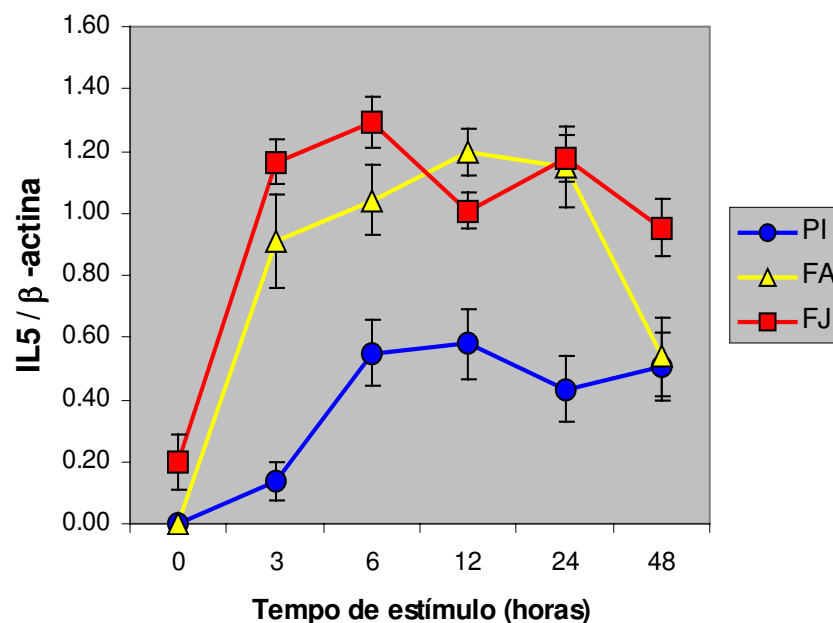


Figura 25 – Cinética da produção de RNAm para IL-5 por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10µg/mL). Valores expressos como média $\pm$ EP (IL-5 / β -actina).

Os níveis de expressão do RNAm para IL-4 e IL-5 mostraram forte correlação ($p < 0,0001$; $r = 0,75$), fato que poderia confirmar a presença efetiva de células Th2 nos pacientes com ambas as formas clínicas da doença (**figura 26**).

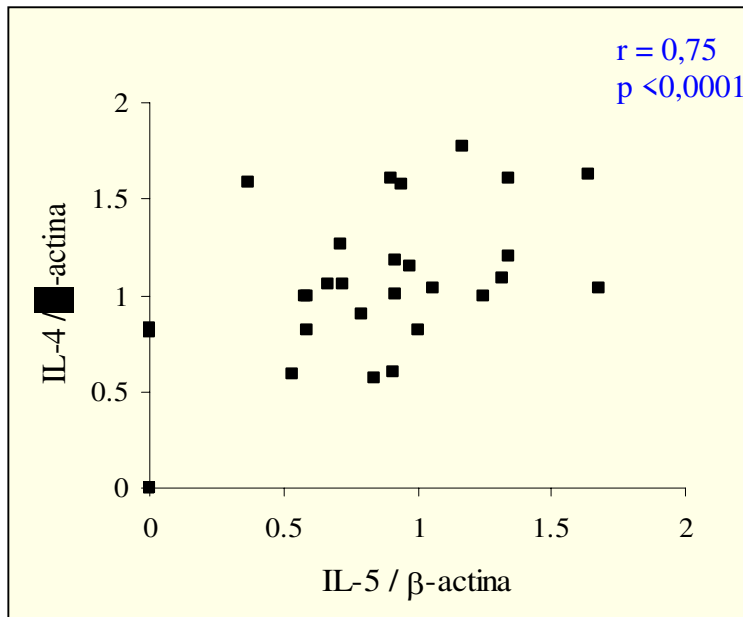


Figura 26 - Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para IL-4 e IL-5, após 6 horas de estímulo com PHA (10µg/mL). Teste de correlação de Pearson, os valores de p e r são mostrados nos gráficos.

Pacientes com ambas as formas clínicas da PCM apresentam níveis maiores de RNAm para IL-10.

A expressão de RNAm para IL-10 mostrou-se significativamente maior em pacientes com a FJ e a FA da PCM, do que nos indivíduos do grupo PI em quase todos os tempos estudados (6, 12, 24 e 48 horas). É interessante notar que os indivíduos do grupo PI mantiveram níveis de RNA bastante baixos durante todo o período estudado (**figura 27**).

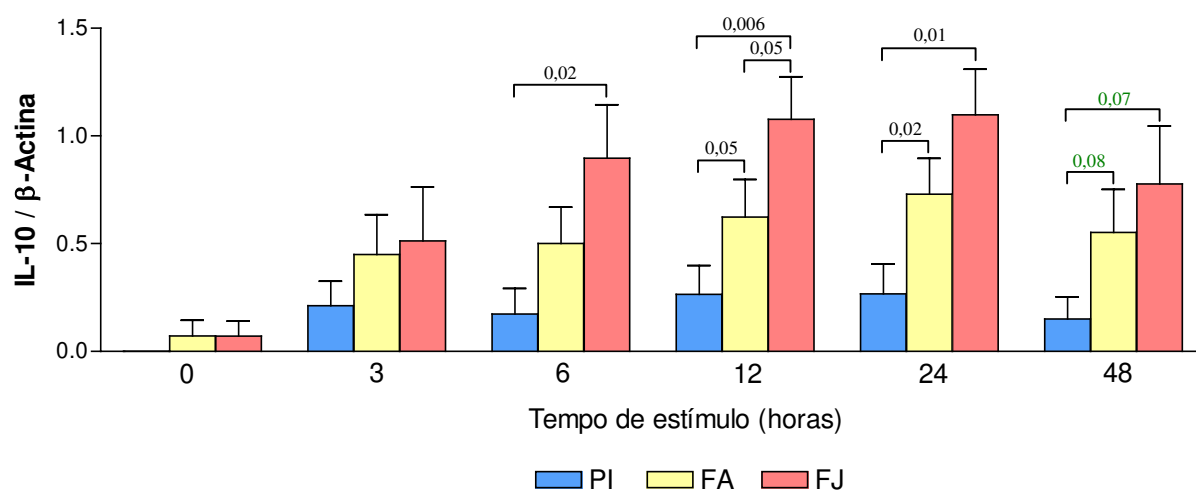


Figura 27 – Análise semi-quantitativa (IL-10 / β -actina) da expressão de RNAm para IL-10 por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes.

A cinética de expressão do RNAm para IL-10 mostrou que nos pacientes com PCM-doença (FA e FJ) ocorre síntese precoce e elevada desse RNAm, enquanto que nos indivíduos do grupo PI sua expressão é muito menor (**figura 28**). Além disso, alguns indivíduos do grupo PI não apresentaram expressão detectável em nenhum dos tempos estudados. Observamos também que a expressão do RNAm para IL-10 aumenta gradualmente nos pacientes com ambas as formas clínicas, atingindo o pico de expressão com 12 e 24 horas (FJ e FA respectivamente). É interessante notar que mesmo apresentando uma ligeira queda, os níveis de expressão do RNAm para IL-10 mantiveram-se bastante elevados nas células de pacientes de ambos os grupos (FA e FJ), mesmo 48 horas após o estímulo.

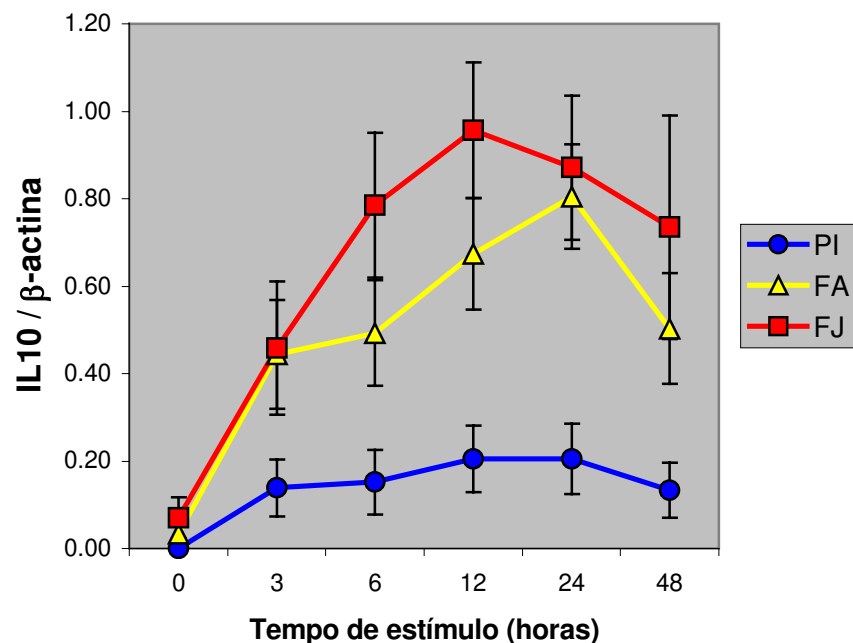


Figura 28 – Cinética da produção de RNAm para IL-10 por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10µg/mL). Valores expressos como média ± EP (IL-10 / β-actina).

Indivíduos com a forma adulta e a forma juvenil da PCM apresentam maior porcentagem de células produtoras de IL-10, do que indivíduos do grupo PCM-infecção.

A IL-10 pode ser produzida por linfócitos e monócitos. Os estímulos utilizados nesse trabalho, não possibilitaram a detecção dessa citocina em linfócitos. Entretanto, a análise da população de monócitos (CD68⁺) do sangue periférico de pacientes com PCM (FA e FJ) demonstrou porcentagens aumentadas de células positivas para IL-10 em relação aos indivíduos do grupo PI. Sem estímulo observamos uma maior porcentagem

de células positivas em indivíduos com a FA da PCM. Após o estímulo observamos um grande aumento de células positivas para IL-10 entre os pacientes com a FJ da PCM, que passaram a diferir significativamente dos outros grupos estudados (**figura 29**).

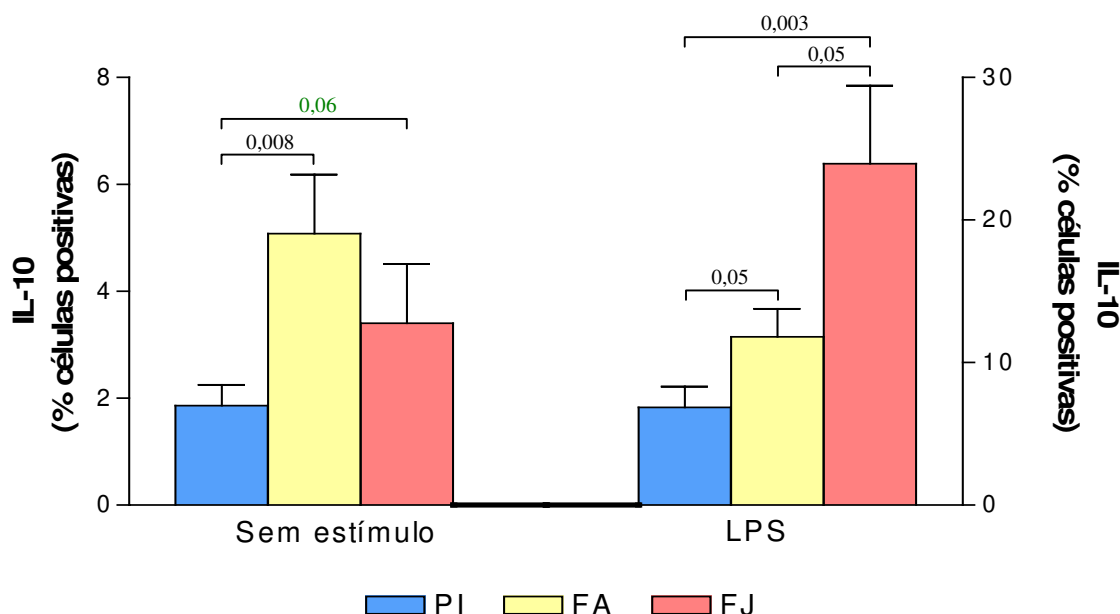


Figura 29 – Análise por citometria de fluxo da produção de IL-10 por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com LPS (10µg/mL) por 24 horas na presença de brefeldina A (1µg/mL). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de monócitos. Resultados estão expressos como média ± EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes. **Note as diferenças de escala.**

A expressão do RNAm para TGF- β foi maior e mais precoce nos indivíduos com as duas formas clínicas da PCM.

Ao lado da IL-10, o TGF- β 1 é uma citocina que apresenta grande importância na supressão da resposta imunológica e na suscetibilidade a uma série de infecções. Os níveis de RNAm para essa citocina produzidos inicialmente pelas células dos indivíduos com ambas as formas clínicas da PCM foram estatisticamente maiores do que aqueles observados nos indivíduos do grupo PI. Por outro lado, 6 horas após a estimulação os níveis de RNAm expressos por células dos indivíduos com a FJ da PCM foram maiores do que os observados nos outros dois grupos estudados (**figura 30**).

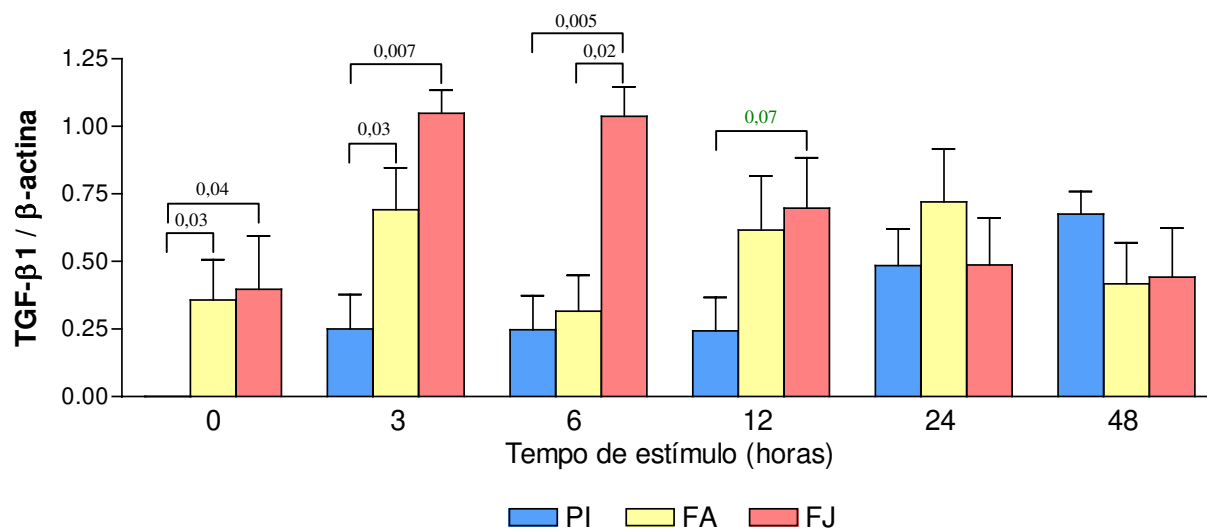


Figura 30 – Análise semi quantitativa (TGF- β 1 / β -actina) da expressão de RNAm para TGF- β por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de p estão expressos sobre os colchetes.

Quanto à cinética da expressão do RNAm para TGF- β 1, observamos que indivíduos com ambas as formas clínicas da PCM apresentam desde o início quantidades detectáveis do RNA para essa citocina. Em indivíduos com a FJ da PCM a expressão de RNAm para TGF- β 1 alcançou um pico a partir de 3 horas de estímulo, e voltou gradativamente aos níveis iniciais. Já os indivíduos com a FA, apresentaram expressão bimodal, com aumento (3 horas) seguido de queda (6 horas) e novo aumento (12 e 24 horas), retornando aos níveis iniciais após 48 horas de estímulo. De modo contrário, células não estimuladas de indivíduos do grupo PI não expressaram ou expressaram baixos níveis do RNAm para TGF- β 1, sendo que após o estímulo os níveis de expressão aumentaram gradativamente até o final do período estudado (**figura 31**).

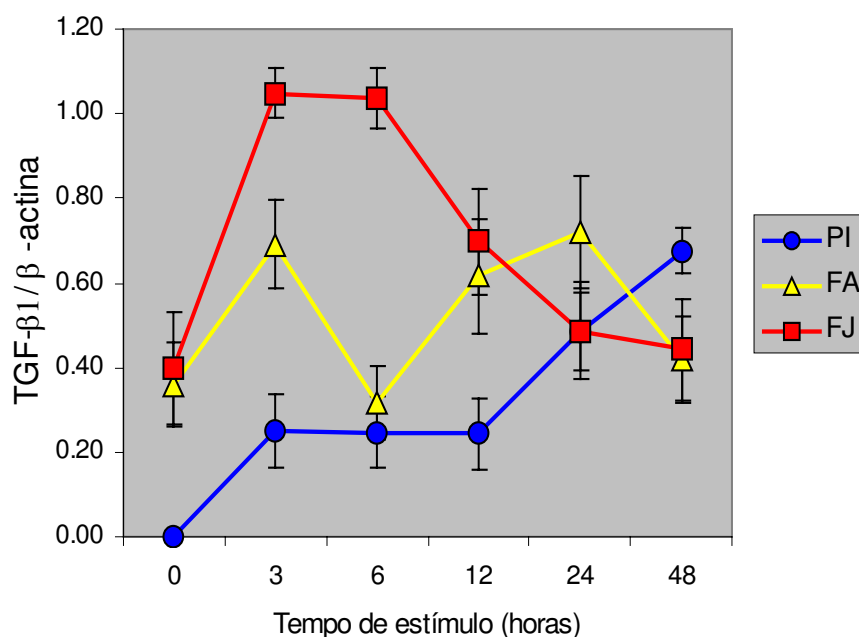


Figura 31 – Cinética da produção de RNAm para TGF- β por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10 μ g/mL). Valores expressos como média $\pm$ EP (TGF- β / β -actina).

Não foi possível determinar se a diferença na expressão do RNAm se reflete em produção diferencial do TGF- β 1, uma vez que não existe no mercado anticorpos monoclonais para detecção intracitoplasmática desta citocina por citometria de fluxo.

Os níveis de expressão do TGF- β 1 e de IL-10 se correlacionaram positivamente, indicando um papel conjunto dessas duas citocinas na suscetibilidade à infecção apresentada pelos pacientes coma FJ da PCM (**figura 32**).

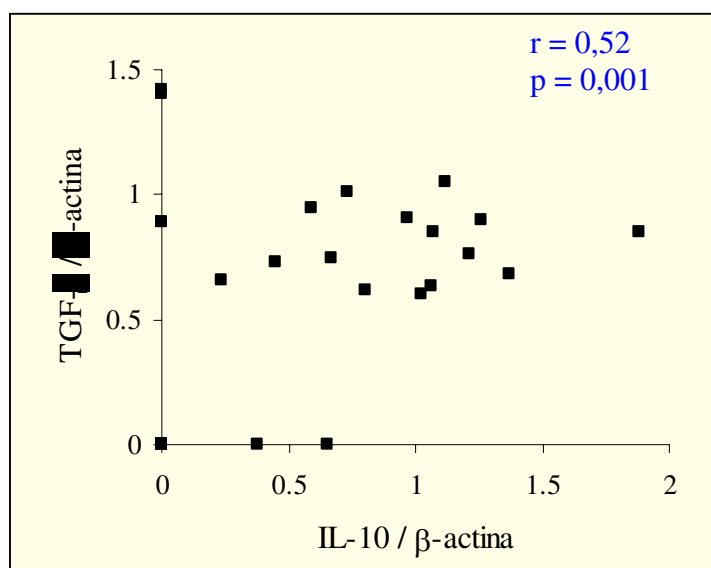


Figura 32 - Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para TGF- β 1 e IL-10, após 6 horas de estímulo com PHA (10 μ g/mL). Teste de correlação de Pearson, os valores de p e r são mostrados nos gráficos.

Pacientes com a FA da PCM expressam maior quantidade de RNAm para CXCL8 (IL-8) quando comparados aos outros grupos estudados.

A CXCL8 (IL-8) é uma quimiocina que apresenta importante função na resposta inflamatória, atuando na atração de neutrófilos para o sítio de infecção. No

presente estudo observamos que a expressão do RNAm para CXCL8 (IL-8) foi maior nas células dos indivíduos com a FA da PCM em relação aos outros grupos estudados. Esta diferença foi detectada apenas em relação às células não estimuladas e nos tempos de 3 e 6 horas após estímulo (**figura 33**).

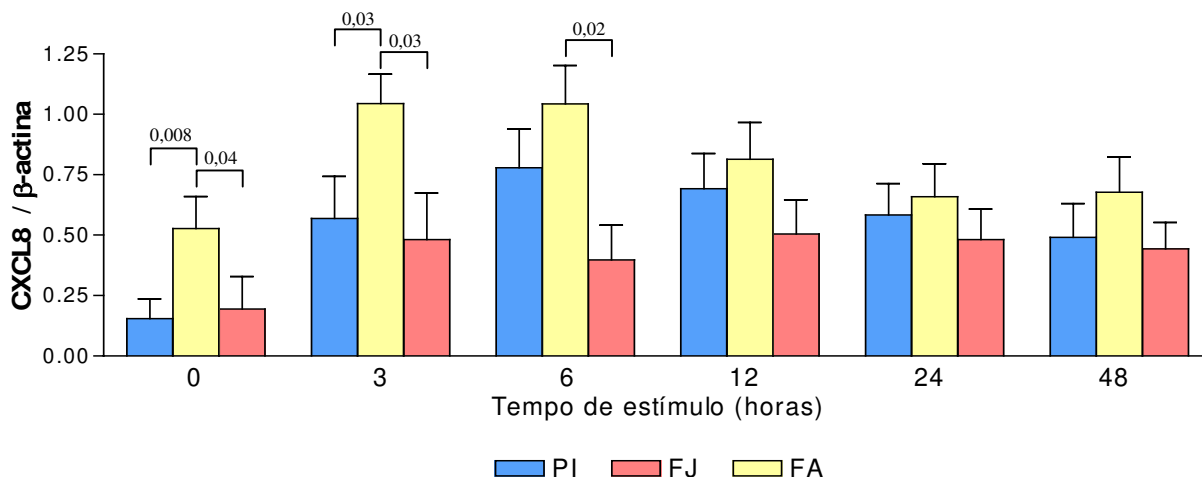


Figura 33 – Análise semi-quantitativa (CXCL8 / β -actina) da expressão de RNAm para CXCL8 (IL-8) por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes.

Em relação à cinética de expressão do RNAm para CXCL8 (IL-8), com exceção dos indivíduos com a FA nos quais se observou aumento expressivo inicialmente seguido de queda gradual, os demais grupos apresentam expressão constante durante todo o período analisado (**figura 34**).

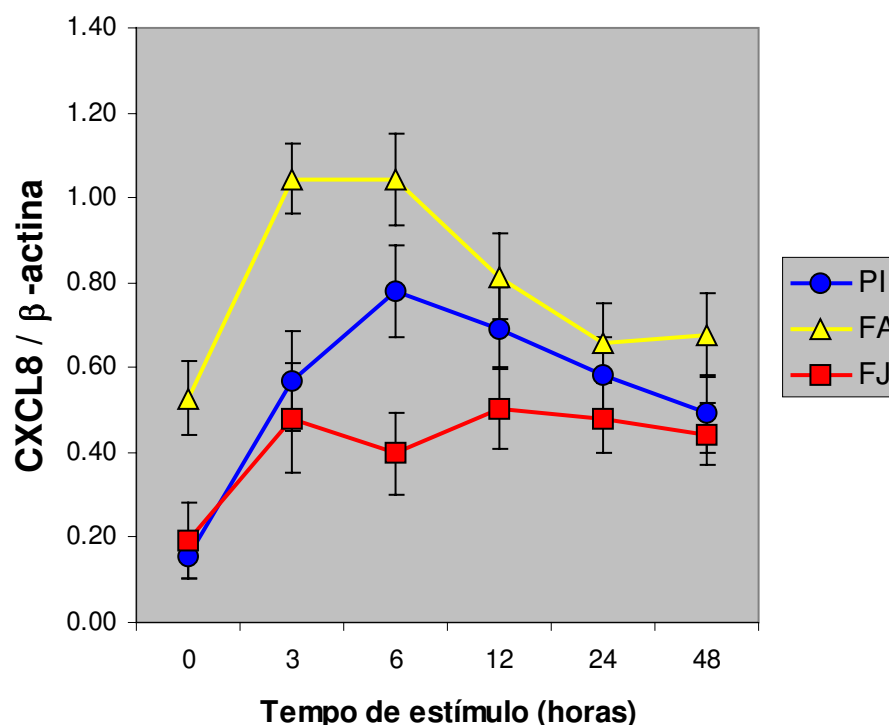


Figura 34 – Cinética da produção de RNAm para CXCL8 (IL-8) por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10µg/mL). Valores expressos como média ± EP (IL-8 / β-actina).

Indivíduos com a forma adulta da PCM apresentam maior porcentagem de células produtoras de CXCL8 (IL-8).

A análise por citometria de fluxo da produção de CXCL8 (IL-8) confirmou os achados da expressão do RNAm, ficando claro que há uma maior porcentagem de monócitos (CD68⁺) de pacientes com a FA da PCM positivos para CXCL8 (IL-8), quando comparados aos outros grupos estudados. Após o estímulo com LPS, todos os grupos

apresentaram um grande aumento na porcentagem de células positivas para esta quimiocina, não havendo diferenças estatísticas entre eles (**figura 35**).

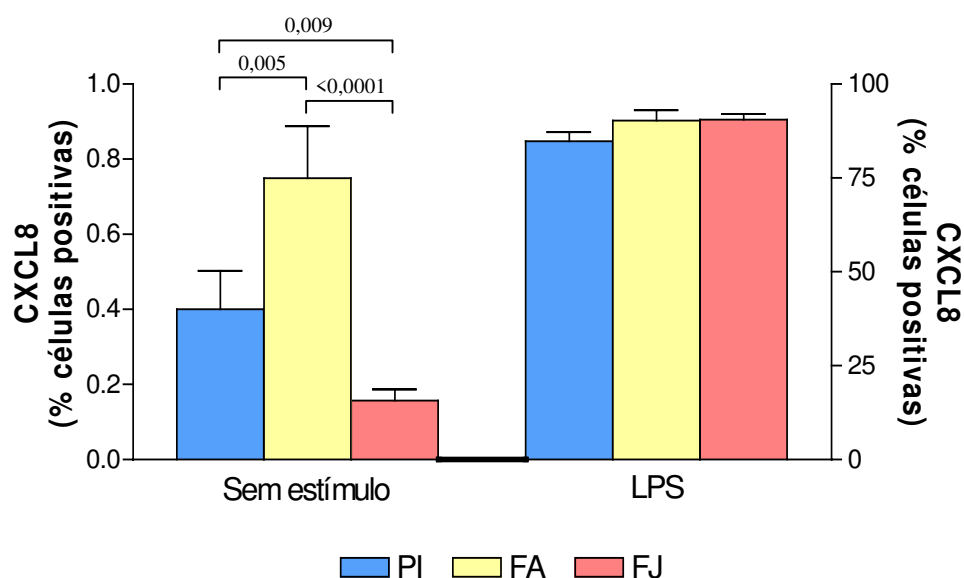


Figura 35 – Análise por citometria de fluxo da produção de IL-8 por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com LPS (10µg/mL) por 6 horas na presença de brefeldina A (1µg/mL). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de monócitos. Resultados estão expressos como média ± EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes. **Note as diferenças de escala.**

Não houve diferenças significativas entre os grupos analisados em relação à expressão do RNAm para IL-6.

O nível de RNAm para IL-6 expresso em células de indivíduos dos diferentes grupos analisados não diferiu estatisticamente em nenhum dos tempos estudados.

Entretanto pode-se observar uma tendência de menor expressão desse RNAm em células de indivíduos com a FJ da PCM (**figura 36**).

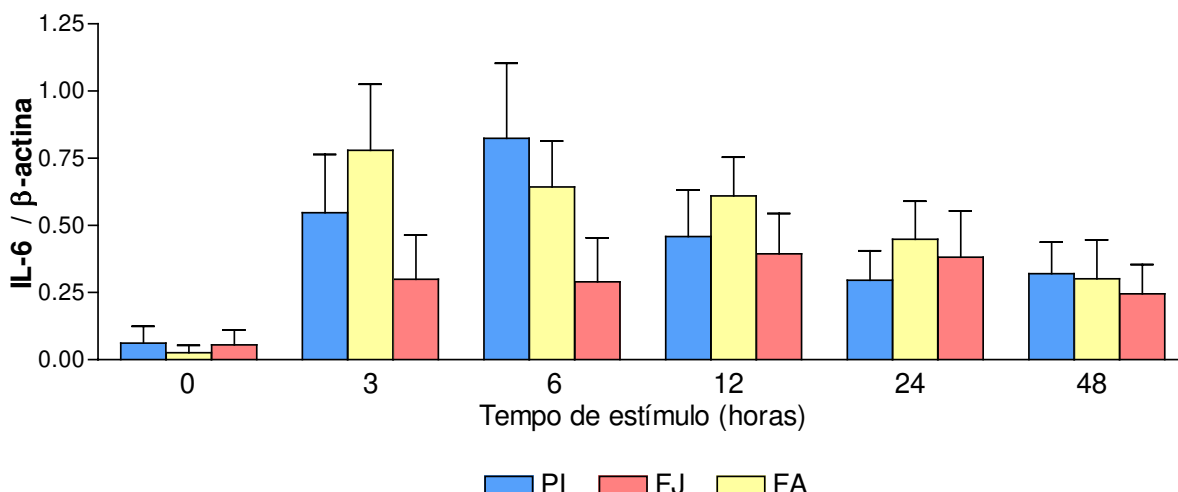


Figura 36 – Análise semi-quantitativa (IL-6 / β -actina) da expressão de RNAm para IL-6 por células de indivíduos do grupo PCM-Infecção (PI) e pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da doença. Foram utilizadas células sem estímulo (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com 10 μ g/mL de PHA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (EP). Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Sem diferença estatística.

Embora não tenha havido diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados em relação à quantidade de RNAm para IL-6 expresso pelas células após a estimulação, a análise da cinética da expressão mostra algumas diferenças. Tanto o grupo de pacientes com a FA, como o de indivíduos do grupo PI apresentaram aumento inicial de expressão bastante evidente, com pico entre 3 e 6 horas de estímulo, seguido de queda gradativa. Por outro lado, em pacientes com a FJ da PCM foi observada uma menor elevação no nível de expressão, que se manteve praticamente constante durante todo o período analisado (**figura 37**).

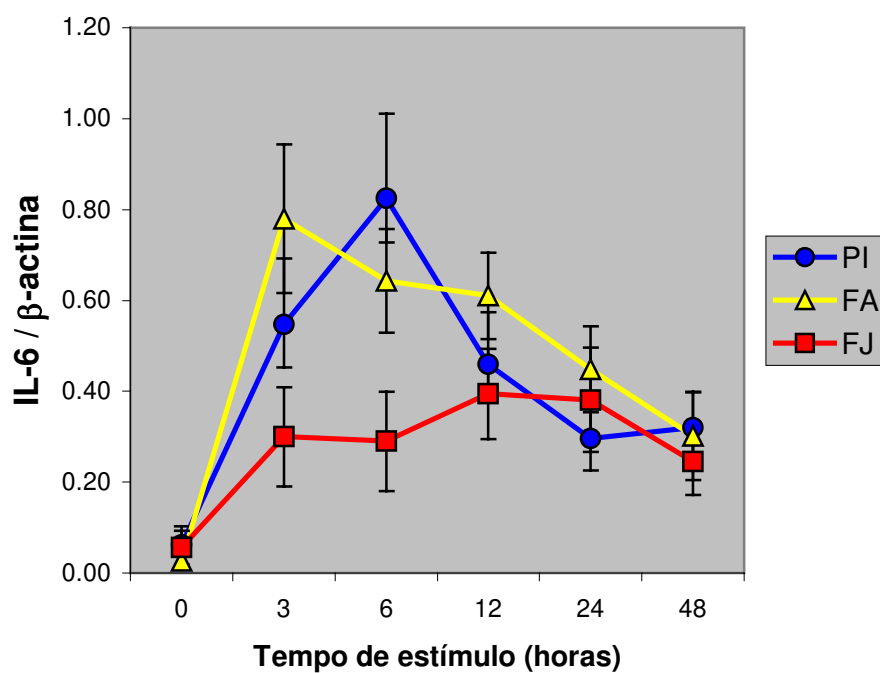


Figura 37 – Cinética da produção de RNAm para IL-6 por células de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e pacientes com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM, não estimuladas (0) ou estimuladas por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10μg/mL). Valores expressos como média ± EP (IL-6 / β-actina).

Nos grupos estudados observou-se uma correlação positiva entre a expressão do RNAm para IL-6 e para o TNF-α (**figura 38**).

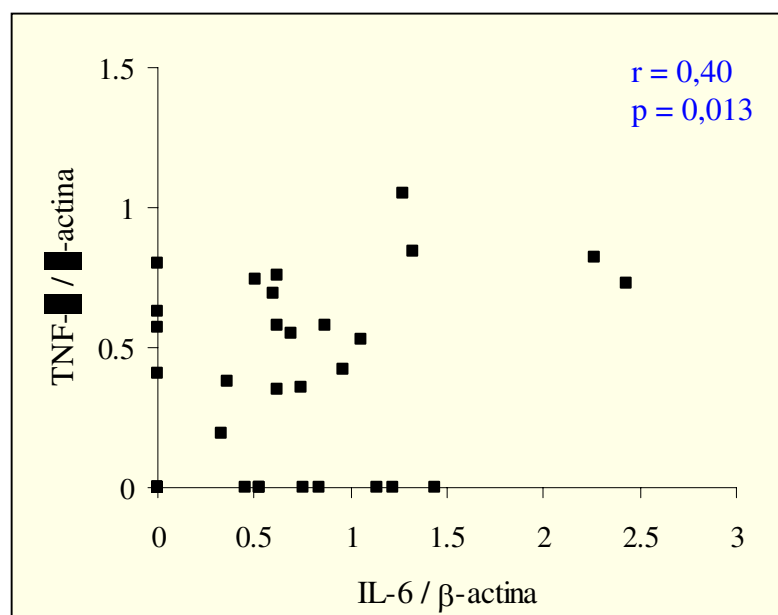


Figura 38 - Correlação entre os níveis de expressão do RNAm para TNF- α e IL-6, após 6 horas de estímulo com PHA (10 μ g/mL). Teste de correlação de Pearson, os valores de p e r são mostrados nos gráficos.

Níveis significativos de IL-12 foram produzidos somente por indivíduos do grupo com a forma adulta da PCM.

A principal citocina estimuladora da produção de IFN- γ pelos linfócitos Th1 é a IL-12, produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas. Neste estudo não foi possível determinar a expressão do RNAm para essa citocina nas amostras de células obtidas. Entretanto, verificamos por meio da citometria de fluxo que a produção de IL-12 por monócitos (células CD68⁺) só foi detectada em níveis significantes em indivíduos com a FA da PCM, tanto em células não estimuladas como naquelas estimuladas com LPS (figura 39).

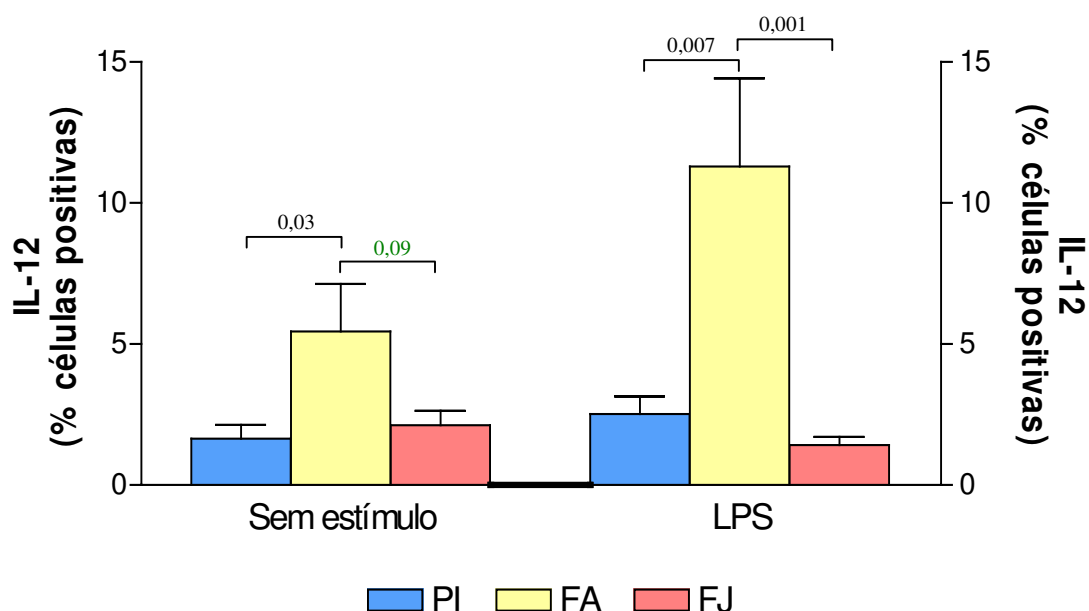


Figura 39 – Análise por citometria de fluxo da produção de IL-12 (p40p70) por células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com LPS (10µg/mL) por 24 horas na presença de brefeldina A (1µg/mL). A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de monócitos. Resultados estão expressos como média $\pm$ EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, valores de p estão expressos sobre os colchetes.

Ao lado da produção de citocinas foi nosso objetivo também determinar se havia diferenças na expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos em monócitos/macrófagos.

Monócitos de indivíduos do grupo PCM-infecção apresentam maior positividade para CD80 e menor positividade para CD86 após estimulação com LPS.

As moléculas envolvidas nos processo de co-estimulação CD80 (B7.1) e CD86 (B7.2) foram analisadas tanto em relação à porcentagem de células positivas, quanto em relação à intensidade média de fluorescência (IMF), que se relaciona ao número de moléculas presente na superfície de cada célula.

Em relação ao número de células positivas para CD80, observamos que na ausência de estimulação os pacientes do grupo com a FA da PCM apresentaram valores significativamente maiores do que aqueles observados no grupo PI (**figura 40 A / esquerda**). Depois de estimuladas com LPS por 24 horas ocorreu um aumento significativo na expressão dessa molécula em todos os grupos analisados, sendo que os indivíduos do grupo PI apresentaram valores significativamente maiores do que os observados nos outros dois grupos (**figura 40 A / direita**). Em relação à intensidade média de fluorescência (IMF), os indivíduos apresentando doença (FJ e FA) mostraram níveis menores do que aqueles observados no grupo PI (**figura 40 B / esquerda**), na ausência de estimulação. Após o estímulo os níveis de expressão se igualaram para todos os grupos analisados (**figura 40 B / direita**).

Já em relação à porcentagem de células positivas para CD86 (B7.2), observamos que tanto na ausência de estimulação, como após estimulação com LPS havia uma porcentagem maior de células positivas para esta molécula no grupo de pacientes com a FA ou a FJ, quando comparados aos indivíduos do grupo PI (**figura 40 C**). Em relação à intensidade média de fluorescência (IMF) não houve diferenças significativas em nenhuma das situações analisadas (**figura 40 D**). É interessante notar que a porcentagem de células

positivas para este marcador, no grupo PI diminuiu significativamente ($p < 0,05$) após a estimulação com LPS, o mesmo não acontecendo com os dois grupos de pacientes ($p > 0,05$). Em relação ao IMF houve aumento significativo em todos os grupos analisados.

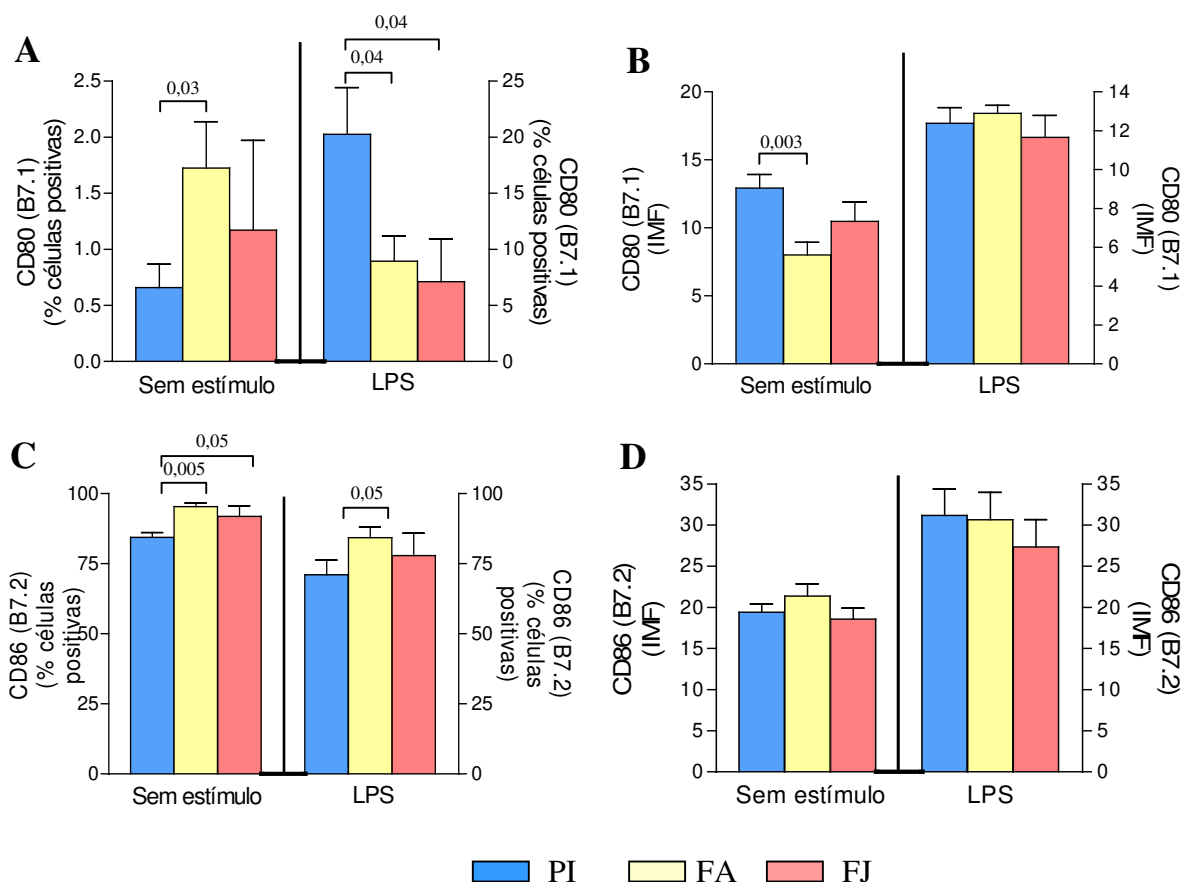


Figura 40 – Análise da porcentagem de células positivas para CD80 (A) e CD86 (C) e da intensidade média de fluorescência para estes marcadores (B e D respectivamente) em células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com LPS (10 μ g/mL) por 24 horas. A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de monócitos. Resultados estão expressos como média $\pm$ EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de p estão expressos sobre os colchetes. **Note as diferenças de escala.**

Monócitos de indivíduos do grupo PCM-infecção apresentam maior expressão de moléculas CD11a do que indivíduos com a FJ da PCM. Pacientes com ambas as formas da PCM apresentam porcentagem maior de células positivas para CD54 do que indivíduos PI.

Monócitos de indivíduos do grupo PI apresentaram maior expressão (IMF) de moléculas de CD11a em sua superfície do que os pacientes com ambas as formas da doença (**figura 41 B / esquerda**). É interessante notar que tanto o número de células positivas quanto a IMF para esta molécula diminuiu nos grupos estudados após a estimulação (**figura 41 A-B / direita**).

Em relação à expressão do CD54, observamos que os indivíduos dos dois grupos de pacientes (FA e FJ) apresentaram maior positividade para esta molécula do que indivíduos do grupo PI (**figura 41 C / esquerda**). Após o estímulo todos os grupos analisados apresentaram níveis comparáveis de células positivas para esta integrina (**figura 41 C / direita**). Em relação à IMF não houve diferenças significantes nas comparações realizadas, mas observamos uma tendência dos indivíduos com a FA apresentarem níveis maiores do que os outros grupos em células não estimuladas (**figura 41 D / esquerda**).

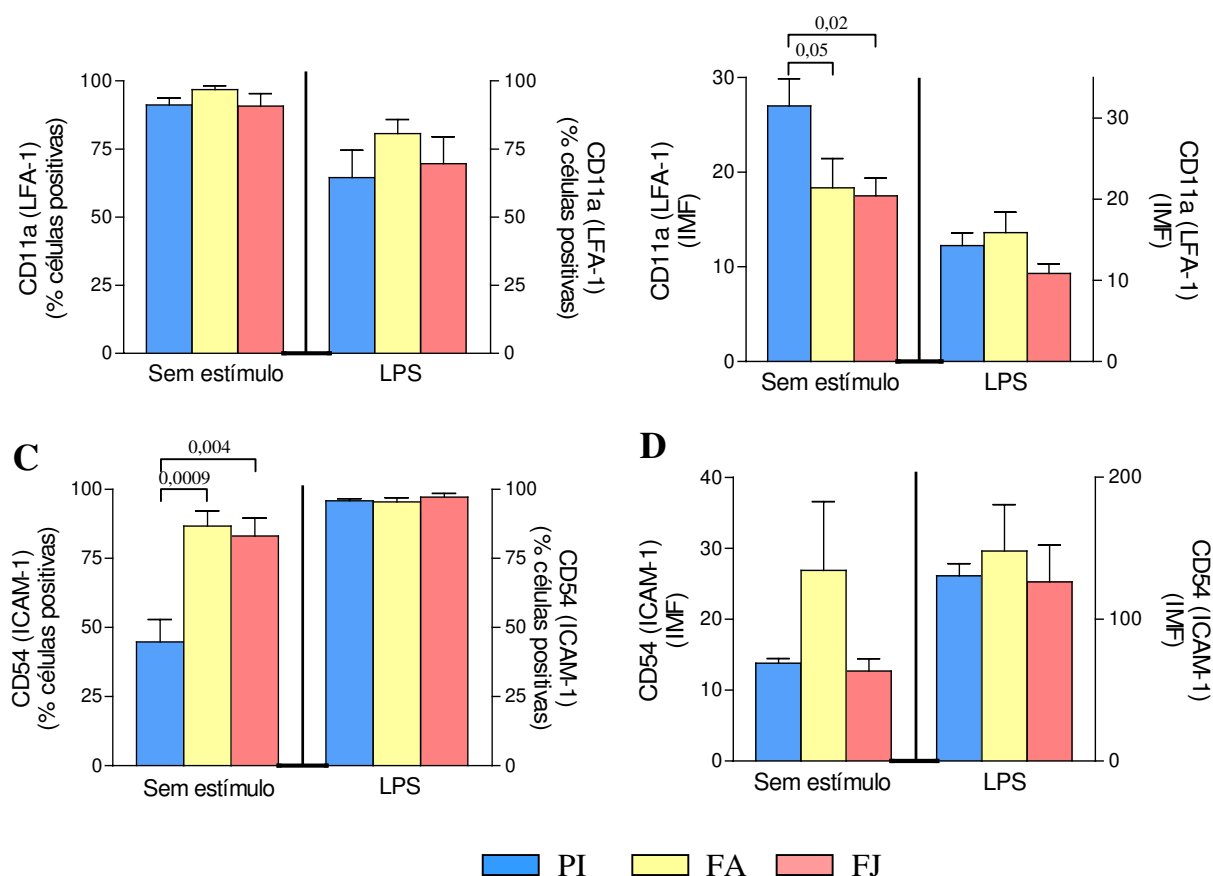


Figura 41 – Análise da porcentagem de células positivas para CD11a (**A**) e CD54 (**C**) e da intensidade média de fluorescência para estes marcadores (**B** e **D** respectivamente) em células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com LPS (10µg/mL) por 24 horas. A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de monócitos. Resultados estão expressos como média $\pm$ EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes. **Note as diferenças de escala.**

Monócitos de indivíduos do grupo PCM-infecção apresentam porcentagem aumentada de células positivas para HLA-DR em relação aos pacientes com a FJ da PCM.

A análise da porcentagem de células positivas para a molécula HLA-DR mostrou que células de indivíduos do grupo PI após o estímulo apresentaram níveis mais elevados desta molécula quando comparados aos pacientes apresentando a FJ da PCM. Em relação ao IMF não houve diferenças significantes entre os grupos analisados (**figura 42 A e B**).

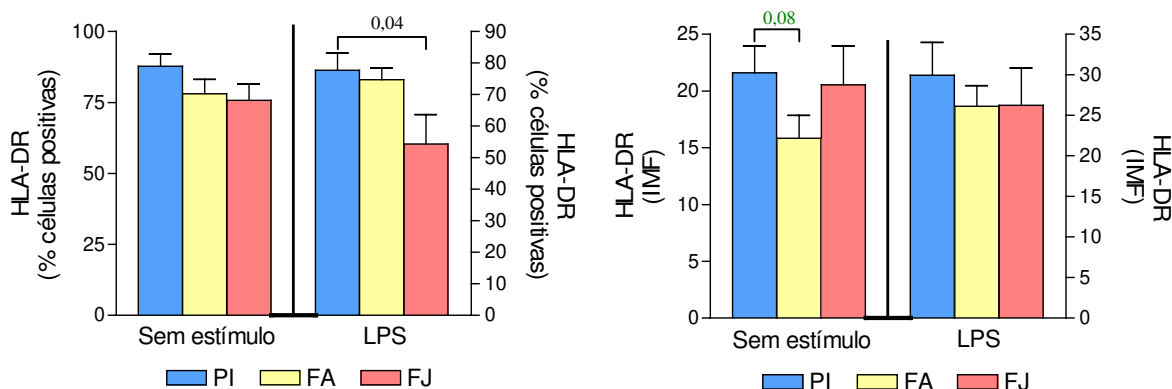


Figura 42 – Análise da porcentagem de células positivas (**A**) e da intensidade média de fluorescência (**B**) para HLA-DR em células de sangue periférico de indivíduos do grupo PCM-infecção (PI) e com a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM. Células mononucleares do sangue periférico sem estímulo ou estimuladas com LPS (10µg/mL) por 24 horas. A região analisada foi determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de monócitos. Resultados estão expressos como média ± EP. Teste estatístico ANOVA com pós-teste de Bonferroni, os valores de *p* estão expressos sobre os colchetes.



Discussão

Ao lado da ativação policlonal de linfócitos B e da conseqüente alta produção de anticorpos, uma das características mais marcantes da resposta imunológica na paracoccidiodomicose humana é a imunossupressão da resposta mediada por células observada nos pacientes apresentando a forma ativa da doença. É evidente a correlação entre o grau de imunossupressão e a gravidade da doença, sendo a resposta restaurada com o tratamento e cura do indivíduo (MUSATTI *et al.*, 1976; MOK *et al.*, 1977; MOTA *et al.*, 1985; SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992; BENARD *et al.*, 1997; BENARD *et al.*, 2001).

Pacientes com a FJ da paracoccidiodomicose, em geral mais grave e disseminada, apresentam caracteristicamente alta produção de anticorpos específicos, principalmente das classes IgG4, IgE e IgA, testes de HTT negativos quando são utilizados antígenos do fungo, assim como uma diminuição da resposta proliferativa de linfócitos e produção, *in vitro*, de citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10. Por outro lado, na FA da doença observa-se uma resposta heterogênea, que depende da gravidade da mesma. Assim os indivíduos apresentando lesões multifocais (em mais de um órgão) em geral apresentam produção de anticorpos semelhante à observada na FJ, assim como menor positividade nos testes de HTT e menor resposta de proliferação de linfócitos a antígenos específicos; enquanto que aqueles que apresentam lesões localizadas em um só órgão apresentam produção de anticorpos das classes IgG1 e resposta proliferativa e de HTT mais preservadas e produção de citocinas Th1 como IFN- γ e TNF- α . (BAVA *et al.*, 1991; BLOTTA *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 1995; BUENO *et al.*, 1997; MARTINS *et al.*, 1997; BAIDA *et al.*, 1999; KARHAWI *et al.*, 2000; BISELI *et al.*, 2001; JUVENALE *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Além de manifestar-se sob diferentes formas clínicas, a paracoccidioidomicose pode ocorrer na forma de infecção assintomática em indivíduos que moram em regiões endêmicas e entram em contato com o fungo, mas não desenvolvem a doença. Essa condição é denominada paracoccidioidomicose-infecção e caracteriza-se pelo teste de HTT positivo a antígenos do fungo. Indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção apresentam uma vigorosa resposta imune celular caracterizada pela produção elevada de citocinas Th1 como IFN- γ e TNF- α (OLIVEIRA *et al.*, 2002), assim como uma intensa resposta de proliferação de linfócitos a antígenos derivados do fungo (OLIVEIRA *et al.*, 2002; BENARD *et al.*, 2005).

Essas e outras evidências demonstram que a resposta imunológica efetiva para o controle da infecção pelo *P. brasiliensis*, assim como de outras infecções fúngicas sistêmicas é mediada por células, com a participação efetiva de macrófagos ativados (CALICH *et al.*, 1998; NEWMAN, 1999; KOGUCHI e KAWAKAMI, 2002). A ativação dos macrófagos por sua vez, depende da participação de linfócitos produtores de citocinas que caracterizam a resposta imunológica denominada de T helper 1 (Th1). Dentre essas destacam-se o IFN- γ , o TNF- α e a IL-2 (MOSMANN *et al.*, 1986; MA *et al.*, 2003). Por outro lado, a suscetibilidade à infecção está relacionada à produção de citocinas denominadas Th2, que apresentam como principal função a estimulação da resposta imunológica humoral e supressão da resposta imunológica mediada por células. Dentre as citocinas que exercem essas funções pode-se destacar a IL-4 e a IL-10 (MOSMANN *et al.*, 1986; SNAPPER *et al.*, 1988; PESTKA *et al.*, 2004).

Resultados anteriores descritos por nosso grupo de pesquisa basearam-se na análise, por meio da técnica de ELISA, da produção de citocinas em sobrenadantes de

cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos do *P. brasiliensis*. No presente estudo, utilizamos outras metodologias visando obter mais informações a respeito do processo de produção desses mediadores. Dessa forma, a técnica de RT-PCR foi escolhida para o acompanhamento da cinética da produção do RNAm para diversas citocinas e quimiocinas, com o intuito de determinar se havia diferenças quantitativas e temporais na expressão do RNAm nos grupos estudados. A detecção da produção de citocinas na forma de proteína, por sua vez, foi feita por citometria de fluxo, técnica que permite, além da quantificação, a determinação do tipo de célula produtora, gerando assim informações mais precisas do que a técnica de ELISA.

Como não obtivemos resultados satisfatórios com a estimulação das células com antígeno específico (dados não mostrados), optamos por utilizar estímulos como PHA, PMA mais ionomicina (ionóforo de cálcio), LPS e anti-CD3 mais anti-CD28, que apesar de serem inespecíficos demonstram a capacidade de resposta das células e dessa forma possibilitam determinar o “status” imunológico dos indivíduos analisados. A PHA é uma lectina derivada de leguminosa (*Phaseolus vulgaris*) com atuação mitogênica sobre linfócitos. O PMA (phorbol meristate acetate) é um potente agente indutor da ativação celular com ação direta sobre a proteína C quinase (PKC), sendo dessa forma um potente estímulo para transcrição gênica. A utilização do ionóforo de cálcio potencializa a ação do PMA por meio da elevação dos níveis de cálcio intracelular, agindo dessa forma em diversas vias de sinalização. O LPS, lipopolissacarídeo derivado da parede de bactérias Gram-negativas, atua como um potente indutor da ativação de monócitos/macrófagos, pela ligação com o seu receptor (CD14 / TLR2). Já o estímulo com anti-CD3 mais anti-CD28, tem como objetivo simular a apresentação de antígeno para os linfócitos, na qual o anti-

CD3 simularia o primeiro sinal (MHC mais antígeno) e o anti-CD28 o segundo sinal (dado pelas moléculas co-estimulatórias CD80 ou CD86) (JANEWAY *et al.*, 2004a). A escolha de cada um dos estímulos foi baseada em uma série de experimentos (detalhada nos anexos) que mostraram a melhor condição para a análise de cada um dos parâmetros.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram a confirmação dos achados anteriores, bem como uma melhor definição do tipo de resposta imune presente nas diferentes formas clínicas da paracoccidiodomicose e na paracoccidiodomicose-infecção. Desse modo, observamos que os indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção apresentam uma tendência a responder a estímulos por meio do aumento rápido e precoce da síntese de RNAm para as citocinas do tipo Th1, enquanto que indivíduos com a FJ da paracoccidiodomicose se caracterizam por uma resposta predominantemente Th2.

O IFN- γ é caracteristicamente produzido por células Th1 (MOSMANN *et al.*, 1986) e desempenha um papel importante na ativação da resposta imune mediada por células, participando ativamente na resistência à infecção pelo *P. brasiliensis* (GONZALES *et al.*, 2000; KASHINO *et al.*, 2000; BENARD *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002). No presente trabalho foi notável a presença do RNAm para essa citocina em células não estimuladas na maioria dos indivíduos apresentando paracoccidiodomicose-infecção e em alguns pacientes com a FA da paracoccidiodomicose, enquanto que nenhum paciente com a FJ apresentou níveis detectáveis desse RNA em suas células na ausência de estímulo. As células do grupo de pacientes com a FJ apresentaram, após o estímulo um aumento gradual de expressão, enquanto que pacientes com a FA e indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção apresentaram uma elevação rápida dos níveis de RNAm para IFN- γ .

A expressão diferencial do RNAm para IFN- γ nos grupos estudados foi confirmada pela técnica de citometria de fluxo, que mostrou uma maior porcentagem de células produtoras nos indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção tanto em relação aos pacientes com a FJ, quanto em relação àqueles com a FA, que por sua vez apresentaram produção aumentada em relação aos pacientes com a FJ. A fenotipagem das células produtoras de IFN- γ demonstrou que os linfócitos T CD8⁺ contribuem com a maior parte da produção desta citocina. A importância das células T CD8⁺ na resposta imunológica à infecção pelo *P. brasiliensis* foi recentemente demonstrada no modelo experimental, que evidenciou a participação dessas células no controle da infecção. A depleção dos linfócitos T CD8⁺ resultou na disseminação da doença e no aumento da gravidade da mesma em camundongos resistentes e mais evidentemente nos camundongos suscetíveis (CANO *et al.*, 2000). Pacientes com paracoccidioidomicose apresentam uma diminuição da relação CD4/CD8 no sangue periférico, fato que poderia refletir um aumento do número de células T CD8⁺ (BAVA *et al.*, 1991). FORNAZIM *et al.* (2003) demonstraram que no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com paracoccidioidomicose ocorre um aumento do número das células T CD8⁺. É importante ressaltar que esses indivíduos apresentavam infecção restrita aos pulmões e aumento da produção de CCL3 (MIP-1 α), uma quimiocina produzida por macrófagos e também por células T CD8⁺ (COOK *et al.*, 1999), que desempenha importante papel na atração diferencial dessas células para o sítio da infecção (SCHALL *et al.*, 1993).

Os linfócitos T CD8⁺ que produzem IFN- γ e TNF- α são denominados Tc1, enquanto que aqueles que produzem IL-4 são denominados Tc2 (MAGGI *et al.*, 1994; WOODLAND e DUTTON, 2003). A diferenciação dessas populações celulares segue,

aparentemente, os mesmos princípios que regem a diferenciação de células T CD4⁺ em Th1 e Th2, assim na presença de IL-12 os linfócitos T CD8⁺ se diferenciam em Tc1, enquanto que na presença de IL-4 ocorre a diferenciação das células Tc2 (NOBLE *et al.*, 1995; SEDER e GROS, 1995; VILLACRES e BERGMANN, 1999; CHANG *et al.*, 2004). Assim como as células T CD4⁺, as células T CD8⁺ produtoras de citocinas desempenham papel importante na proteção contra diversos patógenos. A produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ parece ser essencial para o controle de infecções causadas por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Leishmania spp.* e *Cryptococcus neoformans*, principalmente por meio da ativação das células infectadas (LALVANI *et al.*, 1998; LAMPE *et al.*, 1998; TASCON *et al.*, 1998; FENG *et al.*, 1999; SHAMS *et al.*, 2001; STENGER, 2001; SERBINA e FLYNN, 2001; SERBINA *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002; TSAGOZIS *et al.*, 2003; HERATH *et al.*, 2003; COLMENARES *et al.*, 2003). Na infecção experimental por *Histoplasma capsulatum* a utilização de camundongos deficientes em perforina aumenta a suscetibilidade ao fungo, enquanto que a depleção de células T CD8⁺ tem um efeito adicional sobre a mortalidade. Esses achados indicam que as células T CD8⁺ são importantes para a contenção do *H. capsulatum* tanto por meio de mecanismos citotóxicos, como por mecanismos independentes dessa via, provavelmente pela produção de citocinas (ZHOU *et al.*, 2001). A participação das células T CD8⁺ produtoras de citocinas, principalmente o IFN- γ , também parece ser importante em outras patologias como na doença de Chagas (TARLETON, 1990; KUMAR e TARLETON, 1998) e na infecção por *Pneumocystis* (MCALLISTER *et al.*, 2004).

Na paracoccidiodomicose o IFN- γ atua por meio da ativação de macrófagos, aumentando o seu metabolismo oxidativo, gerando assim intermediários

reativos de oxigênio, como o H_2O_2 (CALVI *et al.*, 2003 a e b), e de nitrogênio, principalmente o NO (óxido nítrico) (GONZALES *et al.*, 2000; AKTAN, 2004), favorecendo a destruição do *P. brasiliensis* (BRUMMER *et al.*, 1988). Dessa forma a participação de macrófagos ativados é essencial para a resistência à infecção (KASHINO *et al.*, 1995). SOUTO *et al.* (2000) observaram que camundongos deficientes em IFN- γ apresentam uma maior suscetibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis*, com uma menor produção de NO, quando comparados aos camundongos do tipo selvagem. Além disso os camundongos deficientes em IFN- γ têm uma menor capacidade de produzir TNF- α . Em camundongos, a produção de NO pode estar relacionada tanto à suscetibilidade quanto à resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*, sendo que a produção de quantidades elevadas desse mediador se relaciona à supressão da resposta imunológica observada nos camundongos suscetíveis, enquanto que níveis intermediários estariam relacionados à resistência (BOCCA *et al.*, 1998; BOCCA *et al.*, 1999; GONZALES *et al.*, 2000; DINIZ *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2002). NEWORAL *et al.* (2003) analisando a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela produção de NO, observaram que biópsias de pacientes com a FJ da paracoccidioidomicose apresentavam maior positividade para essa enzima, o que poderia indicar um possível papel da alta produção de NO na supressão da resposta imunológica e conseqüentemente a maior suscetibilidade à infecção. Apesar desses achados, ainda não existe consenso sobre a importância do NO na doença humana, sendo aparentemente mais importante a produção de reativos intermediários de oxigênio como o H_2O_2 (CALVI *et al.*, 2003 a e b).

A análise da expressão de RNAm para as quimiocinas CXCL10 (IP-10) e CXCL9 (Mig), que são induzidas por IFN- γ , mostrou maiores níveis nos indivíduos com

paracoccidioidomicose-infecção e com a FA da doença em relação a FJ. A cinética de expressão do RNAm para CXCL10 (IP-10) foi semelhante ao IFN- γ , mais tardia na forma juvenil. Também ficou evidente a interdependência da expressão das quimiocinas CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10) em relação ao IFN- γ , havendo forte correlação entre a expressão do IFN- γ e a expressão do RNAm para as duas quimiocinas. Tanto CXCL10 (IP-10) como CXCL9 (Mig) são potencialmente quimiotáticos para linfócitos T ativados. Ambas quimiocinas sinalizam via receptor comum, CXCR3, expresso por células T de memória (CD45RO⁺), preferencialmente do tipo Th1 e por células NK, mas não por monócitos ou neutrófilos (LIAO *et al.*, 1995; LOETSCHER *et al.*, 1996; FARBER, 1997; SALLUSTO *et al.*, 1998a; SALLUSTO, 1999; ROMAGNANI *et al.*, 2001). Na paracoccidioidomicose experimental altos níveis de CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1), CXCL10 (IP-10) e CXCL9 (Mig) em associação com infiltrado mononuclear foram detectados nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis* (SOUTO *et al.*, 2003), indicando um papel importante da produção local dessas quimiocinas no controle da infecção. No presente estudo, verificamos que, além das quimiocinas CXCL10 (IP-10) e CXCL9 (Mig), a expressão do receptor CXCR3 em linfócitos, mesmo em células não estimuladas, também se mostrou mais elevada no grupo com paracoccidioidomicose-infecção constituindo outra evidência da dominância da resposta Th1 nestes indivíduos.

A expressão dos receptores de quimiocinas em células Th1 e Th2 é importante para a migração dessas células para os locais onde irão desempenhar suas funções efectoras. Enquanto que o CXCR3 é característico de células Th1, diversos estudos apontam uma série de receptores que seriam característicos de células Th2 como o CCR4, CCR2 e CCR3 (SALLUSTO *et al.*, 1997; BONECCHI *et al.*, 1998; SALLUSTO *et al.*,

1998a e b; SALLUSTO, 1999). SALLUSTO *et al.* (1997) estudando a expressão de receptores de quimiocinas em clones de células produtoras de citocinas Th1 e Th2 concluíram que somente o CCR3 representaria um marcador das células Th2, uma vez que a presença desse receptor se correlaciona diretamente com a produção de IL-4, e que o CCR4 apesar de ser expresso em células Th2 não é um marcador seletivo, pois também é expresso em células que não produzem a IL-4. No presente estudo, não pudemos observar diferenças significantes quanto à expressão do CCR3 nas células não estimuladas, entretanto, após o estímulo ficou patente a maior expressão desse receptor em linfócitos de pacientes com a FJ, sendo esta mais uma evidência da predominância da resposta Th2 nesses indivíduos.

Nesse trabalho ficou clara a capacidade dos indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção expressarem precocemente quantidades elevadas do RNAm para TNF- α , ao lado de uma maior porcentagem de células positivas para essa citocina tanto em linfócitos como em monócitos. Esse mediador tem importante função na resposta inflamatória e atua juntamente com o IFN- γ na ativação da resposta imune celular, principalmente no que diz respeito a ativação de macrófagos (XING *et al.*, 2000). Alguns estudos têm demonstrado a participação do TNF- α na resposta ao *P. brasiliensis* (SILVA e FIGUEIREDO, 1991; FIGUEIREDO *et al.*, 1993; NEWORAL *et al.*, 2003), associando-o à resistência à infecção. A produção de TNF- α por monócitos de pacientes (FA ou FJ) estimulados com LPS aparentemente é deprimida, uma vez que apresentam menor produção quando comparada aos níveis apresentados por indivíduos controle (PERAÇOLI *et al.*, 2003). Macrófagos de camundongos suscetíveis estimulados com antígenos de *P. brasiliensis* produzem somente pequenas quantidades de TNF- α , enquanto que as células

de camundongos resistentes produzem grandes quantidades dessa citocina (CALICH e KASHINO, 1998). Outra evidência da importância dessa citocina é o fato de camundongos deficientes para o receptor do TNF- α serem mais suscetíveis à infecção, quando comparados aos camundongos selvagens (SOUTO *et al.*, 2000).

O TNF- α também é associado à resistência em outras patologias. HERRING *et al.* (2002) analisando o efeito da neutralização do TNF- α na fase inicial (aférente) da infecção experimental por *Cryptococcus neoformans*, observaram que havia uma diminuição significativa da produção de IL-12 e conseqüentemente da produção de IFN- γ , induzidos normalmente pela infecção. Na histoplasmose experimental, o bloqueio do TNF- α *in vivo* aumenta a gravidade da doença, elevando a taxa de mortalidade (ALLEENDOERFER e DEEPE JR, 1998). Indivíduos resistentes à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, também produzem quantidades elevadas de TNF- α (BRITO *et al.*, 2000). SAUNDERS *et al.* (2004) observaram que a secreção de TNF- α é de extrema importância para a contenção da tuberculose no modelo experimental, e que tanto os linfócitos quanto os monócitos participam na produção dessa citocina.

O TNF- α parece ser indispensável para a formação de granulomas, estruturas formadas por reação inflamatória tipicamente Th1. Os granulomas representam uma tentativa do sistema imunológico em conter a infecção, impedindo a sua disseminação. Dessa forma a manutenção de granulomas íntegros é imprescindível em algumas doenças como a tuberculose (KAUFMANN, 2001; NORTH e JUNG, 2004). Na paracoccidioidomicose, as diferentes formas clínicas da doença apresentam granulomas com características distintas. Na FA em geral são bem organizados e compactos formados por células gigantes e células epitelióides, envoltos por linfócitos. Por outro lado, na FJ os

granulomas têm estrutura frouxa e apresentam freqüentemente infiltrados de eosinófilos (FRANCO, 1987; WAGNER *et al.*, 1998; NEWORAL *et al.*, 2003). DINIZ *et al.* (2001) demonstraram que a formação de granulomas *in vitro*, induzidos por partículas recobertas com antígeno do *P. brasiliensis*, é dependente da presença de TNF- α , de IFN- γ e de NO. Outra evidência da participação do TNF- α na estruturação dos granulomas e na contenção de algumas doenças, reside no fato de que a terapia de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide, com agentes biológicos bloqueadores de TNF- α aumenta a suscetibilidade à infecções como histoplasmose (WOOD *et al.*, 2003) e tuberculose (DUNLOP, 2004; WINTHROP e SIEGEL, 2004).

Apesar de não ter sido possível detectar diferenças significantes quanto à expressão do RNAm para IL-2 nos diferentes grupos, quando analisamos a produção de citocinas pudemos inferir que os indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção apresentam uma maior porcentagem de células CD4⁺IL-2⁺. A IL-2 é uma citocina produzida por linfócitos T, em especial Th1, e que atua como um fator de crescimento para linfócitos, sendo essencial para a expansão de linfócitos específicos, assim como para a sua sobrevivência (WALDMANN, 1993; GOMEZ *et al.*, 1998). A IL-2 também tem uma participação importante na resposta de hipersensibilidade do tipo tardio (WALDMANN, 1993; GOMEZ *et al.*, 1998). Indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção apresentam resposta de proliferação de linfócitos a antígenos do *P. brasiliensis* bastante aumentada quando comparados aos indivíduos apresentando paracoccidiodomicose-doença, sendo que a resposta proliferativa se correlaciona com a intensidade da reação de HTT, achados que indicam a participação da IL-2 nessas reações (OLIVEIRA *et al.*, 2002). No modelo experimental da paracoccidiodomicose, a produção aumentada de IL-2 foi associada à

resistência à infecção (CALICH e KASHINO, 1998). BENARD *et al.* (2001) demonstraram que a maior produção de IL-2 se correlaciona à melhora ou cura dos pacientes, assim como com a produção de IFN- γ . Em nosso estudo foi possível determinar que a IL-2 foi produzida basicamente por linfócitos T CD3⁺CD4⁺, confirmando o importante papel dessas células na modulação da resposta imunológica. Este achado também corrobora a predominância da resposta do tipo Th1 no grupo de indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção, que fica ainda mais evidente quando analisamos a cinética de expressão do RNAm para IL-4, IL-10 e IL-5 (citocinas características da resposta Th2).

A cinética de expressão de IL-4 pelos diversos grupos analisados, mostrou que os pacientes com paracoccidioidomicose-doença (FA e FJ) expressam precocemente grandes quantidades do RNAm para esta citocina, o que não ocorre com o grupo paracoccidioidomicose-infecção. Embora não tenhamos conseguido detectar IL-4 por meio da técnica de citometria de fluxo, em trabalho anterior demonstramos que células de indivíduos com a FJ e a FA da paracoccidioidomicose apresentam maior produção de IL-4 após estimulação com antígenos do fungo (OLIVEIRA *et al.*, 2002). A IL-4 é a citocina que caracteriza a resposta Th2 (MOSMANN *et al.*, 1986), tem importante função na inibição da resposta Th1 (OSWALD *et al.*, 1992) e atua na resposta humoral, principalmente induzindo a produção de anticorpos das classes IgG4 e IgE (SNAPPER *et al.*, 1988), caracteristicamente produzidos nas formas mais graves da paracoccidioidomicose (BAIDA *et al.*, 1999; MAMONI *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002). Camundongos suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* (B10.A) produzem quantidades elevadas de IL-4, ao lado de outras citocinas Th2 como IL-5, IL-10 e TGF- β (CALICH e KASHINO, 1998; KASHINO *et al.*, 2000). Recentemente PINA *et al.* (2004)

demonstraram que camundongos C57BL/6 deficientes na produção de IL-4 são mais resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis*, demonstrando que a deficiência dessa citocina leva a um aumento da produção de IFN- γ , e diminuição da carga fúngica nos pulmões dos camundongos, associado a uma diminuição da produção de IL-5 e IL-10. Paradoxalmente, camundongos da linhagem B.10, quando tratados com anti-IL-4, apresentaram um aumento da carga fúngica nos pulmões após a infecção, sem alteração aparente da produção de citocinas; enquanto que camundongos C57BL/6 recebendo o mesmo tratamento apresentaram o mesmo fenótipo dos camundongos deficientes em IL-4 (ARRUDA *et al.*, 2004). Esses dados indicam que a IL-4 pode desempenhar um papel protetor ou de suscetibilidade na resposta ao *P. brasiliensis*, dependendo de fatores genéticos do hospedeiro.

Diversos modelos experimentais têm demonstrado o papel da IL-4 na suscetibilidade a infecções. Na criptococose, a infecção de camundongos deficientes para IL-4 resultou em um aumento da sobrevivência dos animais em relação aos camundongos selvagens (DECKEN *et al.*, 1998), fato também observado quando se neutraliza essa citocina por meio de anticorpos. A presença da IL-4 parece interferir na produção de IL-12 e IL-18 e conseqüentemente diminui a produção de IFN- γ (KAWAKAMI *et al.*, 1999). GILDEA *et al.* (2003) demonstraram que camundongos transgênicos para IL-4, e que portanto produzem quantidades elevadas dessa citocina, apresentavam uma maior carga fúngica nos pulmões quando infectados pelo *H. capsulatum*, mas que o aumento na produção de IL-4 não interferiu com a produção de citocinas como o IFN- γ e o TNF- α .

Na infecção experimental pelo fungo *Coccidioides immitis* o tratamento de linhagens de camundongos resistentes e suscetíveis com IL-4 recombinante não alterou o

fenótipo desses animais, enquanto que a administração de anti-IL-4 resultou em um aumento da resistência (MAGEE e COX, 1995). FIERER *et al.* (1998), utilizando camundongos deficientes para IL-4 e IL-10, demonstraram que as duas citocinas eram importantes na determinação da suscetibilidade à infecção, mas que, no entanto a ausência de IL-10 apresentaria maior importância. Esses achados indicam que a IL-4 não atua isoladamente, mas em consonância com outras citocinas supressoras para a determinação da suscetibilidade a determinados patógenos (FIERER *et al.*, 1998). Em concordância, PADIGEL *et al.* (2003) demonstraram que na leishmaniose a neutralização conjunta de IL-4 e IL-10 apresentam efeito superior na resistência à infecção do que quando a IL-4 e IL-10 foram neutralizadas separadamente.

Um fato interessante observado no presente trabalho foi a baixa expressão do RNAm para IL-10 em células de indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção durante todo o período estudado. Por outro lado, células de pacientes com a doença, em especial a FJ, respondem rapidamente à estimulação apresentando níveis elevados de expressão com pico em 12 horas. A produção de IL-10 pelos linfócitos não foi detectada pela metodologia aplicada, mas em monócitos verificamos que a maior expressão do RNAm se refletiu na maior produção da proteína em células de pacientes com a FA ou FJ. Em estudo anterior realizado em nosso laboratório (OLIVEIRA *et al.*, 2002) já havíamos observado a produção de baixos níveis de IL-10 pelas células de indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção, após o estímulo com antígenos do fungo. Esses dados indicam que a IL-10 desempenha na doença humana um papel bastante importante na suscetibilidade e na resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*, da mesma forma que ocorre no modelo experimental (CALICH e KASHINO, 1998).

A IL-10 é uma citocina com potente ação inibitória da resposta imune celular (BOGDAN *et al.*, 1991; GAZZINELLI *et al.*, 1992; OSWALD *et al.*, 1992; PETSKA *et al.*, 2004). Camundongos suscetíveis (B10.A) apresentam produção elevada de IL-10 (CALICH e KASHINO, 1998; CANO *et al.*, 1998; de ALMEIDA *et al.*, 1998; KASHINO *et al.*, 2000; GODOY *et al.*, 2003), associada à produção de IL-4 (PINA *et al.*, 2004). BENARD *et al.* (2001) observaram que pacientes com a doença ativa produziam grandes quantidades de IL-10, fato revertido após a cura efetiva da doença; e que a maior parte dessa citocina era produzida por células aderentes (monócitos), fato comprovado em nosso estudo. Além disso, ROMANO *et al.* (2002) verificaram que a neutralização da IL-10, *in vitro*, era capaz de reverter a supressão da resposta proliferativa de células de pacientes com a doença ativa.

Camundongos deficientes na produção de IL-10 apresentam resistência aumentada a uma série de infecções como aquelas causadas por *C. neoformans* (MURRAY e YOUNG, 1999; JACOBS *et al.*, 2000), *C. immitis* (FIERER *et al.*, 1998), *Aspergillus fumigatus* (CLEMONS *et al.*, 2000); *Leishmania sp.* (PADIGEL *et al.*, 2003) e *Schistosoma mansoni* (MALAQUIAS *et al.*, 1997), por meio do aumento da produção de IL-12 e IFN- γ . Na esquistossomose humana a resistência à infecção também está associada a produção de IFN- γ e TNF- α , e a adição de IL-10 recombinante em culturas inibe a resposta proliferativa a antígenos específicos (BRITO *et al.*, 2000), enquanto que o bloqueio de IL-10 aumenta a proliferação e aumenta a capacidade da formação de granulomas, assim como a produção de IFN- γ (CORREA-OLIVEIRA *et al.*, 1998). Camundongos transgênicos para IL-10 apresentam maior suscetibilidade à tuberculose e são mais propensos a desenvolverem uma infecção crônica, achados relacionados à baixa

produção de TNF- α e IL-12 (TURNER *et al.*, 2002). Na tuberculose humana é importante salientar que pacientes apresentando doença em graus mais avançados produzem maiores quantidades de IL-10. Além disso, a IL-10 parece interferir na capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺, por meio da alteração da capacidade de processamento alternativo de antígenos, o qual possibilita a apresentação de antígenos extracelulares por meio do MHC de classe I (de la BARRERA *et al.*, 2004).

Ao lado da IL-10, o TGF- β 1 é uma das citocinas que apresenta maior atividade supressora da resposta imunológica. O TGF- β 1 é uma citocina pleiotrópica com importantes funções no desenvolvimento embrionário, no reparo tecidual e no controle da resposta imunológica (CLARK e COKER, 1998; REED, 1999; FITZPATRICK, 1999; GORELIK e FALVELL, 2002). No presente trabalho pudemos observar que pacientes com paracoccidiodomicose (FA e FJ) apresentam expressão elevada do RNAm para o TGF- β 1, notadamente os indivíduos com a FJ da doença. Um achado interessante foi a correlação entre a expressão do RNAm para TGF- β 1 e a expressão do RNAm para IL-10, mostrando que essas duas citocinas poderiam participar de conjuntamente na inibição da resposta apresentada pelos pacientes com a FJ da paracoccidiodomicose. No modelo experimental foi demonstrado que macrófagos derivados de camundongos da linhagem suscetível (B10.A) quando estimulados *in vitro* produzem grandes quantidade de TGF- β (CALICH e KASHINO, 1998). Em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório encontramos evidências da participação do TGF- β 1 na resposta de suscetibilidade à infecção humana pelo *P. brasiliensis*, uma vez que pacientes com a FJ da paracoccidiodomicose apresentam níveis séricos aumentados dessa citocina quando comparados aos pacientes com a FA unifocal (MAMONI *et al.*, 2002). Adicionalmente, a análise da expressão local dessa

citocina em cortes histológicos, também demonstrou a presença de grande número de células expressando TGF- β 1 em linfonodos de pacientes com a FJ (NEWORAL *et al.*, 2003).

Na criptococcose murina a expressão aumentada do RNAm do TGF- β em relação a expressão de citocinas Th1 (TNF- α e IL-12p40) foi associada à infecção mais grave e letal (KAWAKAMI *et al.*, 1997). O TGF- β 1 também tem uma importante participação na leishmaniose, sendo considerado um mecanismo de escape desse parasita (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; BARRAL *et al.*, 1993; WILSON *et al.*, 1998; RODRIGUES JÚNIOR *et al.*, 1998; GANTT *et al.*, 2003; WILSON *et al.*, 2002). O TGF- β parece ter um papel inibidor sobre a produção de NO, essencial para que os macrófagos possam exercer função microbida (NASCIMENTO *et al.*, 2002). GONZALEZ *et al.*, (2000) demonstraram a ação inibitória do TGF- β sobre a produção de iNOS induzida por IFN- γ e TNF- α em macrófagos de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, fato que resultou na disseminação do fungo.

Neste trabalho também constatamos a expressão aumentada do RNAm para a IL-5 em células de pacientes com as duas formas clínicas da paracoccidioidomicose, principalmente naqueles com a FJ, nos quais os níveis de expressão se mantiveram elevados por um período mais longo. A IL-5 também é produzida por linfócitos Th2 e tem importante função na maturação e atração de eosinófilos (MATTES e FOSTER, 2003; ZABEAU *et al.*, 2003). Assim uma maior expressão desta citocina poderia explicar, em parte, a eosinofilia periférica observada e descrita por diversos autores em pacientes com a FJ da paracoccidioidomicose (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2002; MAMONI *et al.*, 2002). Estes resultados são compatíveis com os descritos para

camundongos suscetíveis infectados por *P. brasiliensis*, que apresentam eosinofilia medular e esplênica concomitante à alta produção de IL-5 (CALICH e KASHINO, 1998; CANO *et al.*, 1998; KASHINO *et al.*, 2000). A IL-5 aumentada também foi correlacionada à eosinofilia periférica na histoplasmose (SÁ-NUNES *et al.*, 2004). Um outro fato que indica a ligação da produção de IL-5 com a resposta Th2 no presente estudo foi a forte correlação observada entre a expressão do RNAm para IL-5 e IL-4. CHEN *et al.* (2004) demonstraram que a IL-4 além de ter papel essencial na diferenciação da resposta Th2, também atua na expansão de eosinófilos produtores de citocinas. SHINKAI *et al.* (2002) verificaram que as células produtoras de IL-4, apesar de não serem necessárias para a geração de eosinófilos produtores de IL-4, são importantes para a manutenção das mesmas. Dessa forma, os eosinófilos podem também participar da modulação da resposta imunológica produzindo citocinas Th2 como IL-4 e IL-5 (LAMKHIOUED *et al.*, 1995; LAMKHIOUED *et al.*, 1996; WOERLY *et al.*, 1999; WILLIAMS, 2004). Um outro estudo recente publicado por HERRING *et al.* (2002) mostra que na criptococcose o bloqueio do TNF- α nas fases iniciais da infecção se relaciona ao aumento do número de eosinófilos e de IgE no sangue periférico, assim como acarreta uma diminuição da resposta de HTT. Dessa forma, o fato dos pacientes com a FJ apresentarem baixa produção de TNF- α , associado à produção de IL-4 e IL-5, poderia estar relacionado ao aumento do número de eosinófilos e IgE específica observado anteriormente nos mesmos (MAMONI *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002.)

É interessante notar o caráter misto da resposta apresentada pelos indivíduos com a FA da PCM, que são capazes de produzir tanto citocinas Th1 como IFN- γ e TNF- α , como citocinas Th2 como a IL-4 e a IL-10. Este grupo de pacientes também se caracterizou

por apresentar número elevado de células produtoras de CXCL8 (IL-8) e de IL-12 quando comparados aos outros grupos. A IL-12 é produzida principalmente por macrófagos ativados e tem como principal função a indução da produção de IFN- γ (GATELY *et al.*, 1998; FIESCHI e CASANOVA, 2003). Na paracoccidioidomicose experimental, uma maior produção de IL-12 foi encontrada em camundongos resistentes, evidenciando a sua importância para a diferenciação da resposta protetora Th1 (CALICH e KASHINO, 1998; ARRUDA *et al.*, 2002). A importância da IL-12 na paracoccidioidomicose humana foi demonstrada por ROMANO *et al.* (2002) que conseguiram reverter a supressão da resposta imunológica celular observada em pacientes com a doença ativa, pela adição de IL-12 em culturas de células. Para outras micoses sistêmicas como a criptococose e a coccidioidomicose também foi demonstrado um papel protetor da IL-12 (ZHOU *et al.*, 1995; MAGEE e COX, 1996; DECKEN *et al.*, 1998). Tendo em vista todos esses fatos, esperávamos encontrar maiores níveis dessa citocina em indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção, entretanto, esta hipótese não se confirmou, sendo que somente os monócitos de pacientes com a FA da paracoccidioidomicose é que apresentaram produção aumentada dessa citocina. Esses achados em relação a IL-12 já haviam sido observados preliminarmente em nosso laboratório (OLIVEIRA *et al.*, 2002), quando demonstramos a produção aumentada de IL-12 em resposta a antígenos do fungo nos pacientes com a FA. A produção aumentada de IL-12 pelos pacientes com a FA poderia explicar a produção elevada de IFN- γ nesse grupo, mesmo na presença de citocinas que teoricamente estariam inibindo a sua produção.

Quanto à CXCL8 (IL-8), quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para locais de inflamação, observamos maior expressão do RNAm e da proteína

intracitoplasmática por células de pacientes com a forma adulta da doença, em comparação com a forma juvenil e com o grupo com paracoccidioidomicose-infecção. PERAÇOLI *et al.* (2003) descreveram que monócitos de pacientes estimulados *in vitro* são capazes de produzir quantidades aumentadas dessa quimiocina em comparação a controles saudáveis, indicando um possível estado de pré-ativação das células dos pacientes. Em estudo anterior, também havíamos observado diferenças nos níveis séricos dessa quimiocina entre as duas formas clínicas da paracoccidioidomicose, sendo que os pacientes com a FJ apresentavam níveis menores do que aqueles observados na FA (MAMONI *et al.*, 2002). A maior produção dessa quimiocina por pacientes com a FA no local da infecção poderia explicar o número elevado de neutrófilos encontrados no lavado bronco alveolar de alguns pacientes apresentando essa forma clínica (FORNAZIM *et al.*, 2003), assim como a presença de abscessos compostos por estas células encontradas em biópsias desse grupo de pacientes (NEWORAL *et al.*, 2003). CALICH *et al.* (1985b) observaram que a inoculação de *P. brasiliensis* no peritônio de camundongos suscetíveis estimulava a liberação de um fator protéico, responsável pela atração de neutrófilos para o sítio de infecção, sendo que esse fator apresenta as características posteriormente descritas para a CXCL8 (IL-8). Os neutrófilos são células que participam da resposta imunológica inata, e na paracoccidioidomicose aparentemente apresentam função protetora, uma vez que são capazes de fagocitar e destruir a células do *P. brasiliensis*, apesar de não serem suficientes para conter a infecção (BRUMMER, 1989; GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1989; MELONI-BRUNERI *et al.*, 1996).

A análise da expressão do RNAm para IL-6 mostrou uma tendência de menor produção nos pacientes com a forma juvenil da doença. Embora seja considerada

uma citocina Th2, a produção de IL-6 tem sido associada a uma resposta imune protetora na infecção experimental por *M. tuberculosis* (LADEL *et al.*, 1997). Na coccidioidomicose experimental a infecção de camundongos resistentes e suscetíveis resulta na expressão diferencial de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- α , sendo que camundongos resistentes à infecção apresentam níveis elevados de produção dessas citocinas (COX e MAGEE, 1995). ANGELI *et al.* (2001) demonstraram que a deficiência na produção de IL-6 na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* aumenta a mobilização de eosinófilos na medula óssea dos camundongos, devido a um aumento da produção de IL-5 e eotaxina. Dessa forma, a expressão diminuída do RNAm para IL-6 nos pacientes com a FJ poderia ser outro fator relacionado ao aumento de eosinófilos periféricos presentes nesses indivíduos. Por outro lado, na criptococcose a IL-6 apresenta um papel na suscetibilidade, contribuindo para a inibição da transcrição de genes que respondem ao IFN- γ (NAGABHUSHANAM *et al.*, 2003). No presente trabalho foi observada uma correlação positiva entre os níveis de expressão do RNAm para a IL-6 e para o TNF- α , o que poderia indicar uma participação conjunta da IL-6 na resposta inflamatória protetora.

Ao lado das diferenças observadas quanto à expressão de citocinas e quimiocinas (RNAm e proteína), avaliamos a expressão de moléculas de superfície importantes no processo de apresentação de antígeno e conseqüentemente na iniciação da resposta imune adquirida. A apresentação de antígenos ocorre de maneira diferencial para células T CD4⁺ e T CD8⁺, enquanto linfócitos T CD4⁺ reconhecem antígenos apresentados juntamente com moléculas de MHC de classe II (expressos em células denominadas de apresentadoras de antígeno profissionais - APCs), os linfócitos T CD8⁺ os reconhecem quando apresentados acoplados a moléculas de MHC de classe I (expressos em

praticamente todas as células nucleadas) (JANEWAY *et al.*, 2004b). A ligação do complexo antígeno-MHC com o receptor da célula T (TCR) promove o chamado primeiro sinal que isoladamente leva a célula a entrar em anergia ao invés de ativá-la. Para que ocorra a ativação completa da célula são necessários outros estímulos dentre os quais o mais bem caracterizado é a ligação entre CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) presente na APC e CD28 presente no linfócito T, sendo essa ligação denominada de segundo sinal (JANEWAY *et al.*, 2004c).

A participação das APCs profissionais (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) é importante também para a diferenciação da resposta imunológica desenvolvida posteriormente. Em geral são as APCs que irão influenciar a diferenciação dos linfócitos T em Th1 ou Th2, por meio da produção de citocinas como a IL-12, IL-18, e também pela expressão das moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86). Na paracoccidiodomicose experimental a suscetibilidade à infecção foi relacionada à apresentação de antígenos pelos linfócitos B, enquanto que camundongos resistentes fazem a apresentação de antígenos principalmente por meio de macrófagos e células dendríticas, sendo que estas últimas apresentam disfunção nos camundongos suscetíveis (de ALMEIDA *et al.*, 1998; de ALMEIDA e LOPES, 2001; FERREIRA *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2004).

Diferenças importantes foram detectadas principalmente no que diz respeito à expressão de CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) nas células dos indivíduos estudados. Pudemos observar que em indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção a estimulação dos monócitos levou a um aumento na expressão de CD80 e a uma diminuição significativa da expressão de CD86. FORNAZIM *et al.* (2003) demonstraram que macrófagos do lavado

bronco alveolar de pacientes com a FA apresentam expressão aumentada de CD86 em relação aos monócitos do sangue periférico, indicando o estado de ativação dessas células. Recentemente BOZZI *et al.* (2004) demonstraram que a expressão de CD86 e CD28 na superfície de APCs e linfócitos T aumenta com o tratamento. Diversos estudos indicam que a co-estimulação de células por meio destas duas moléculas pode ser importante para o desenvolvimento posterior de uma resposta Th1 ou Th2 (CREERY *et al.*, 1996; MOSER, 2001). A expressão de CD80 tem sido relacionada a um predomínio da resposta Th1 e à ativação de células CD8⁺ (MAURI e PICHLER, 1996; LANG *et al.*, 2002), enquanto que a co-estimulação via CD86 seria importante para a produção de IL-4 e, por conseguinte para o desenvolvimento da resposta Th2 (BROWN *et al.*, 1996; RANGER *et al.*, 1996; LANG *et al.*, 2002; RUTKOWSKI *et al.*, 2003). Apesar dessas evidências o papel das moléculas co-estimulatórias no desenvolvimento da resposta Th1 e Th2 ainda é bastante controverso, uma vez que nem sempre existe uma associação clara entre essas moléculas e o desenvolvimento de um tipo preferencial de resposta (SANSOM *et al.*, 2003). MOSER *et al.* (2001) demonstraram que na criptococcose experimental, mais importante do que o tipo de molécula co-estimulatória é o tipo de célula apresentadora de antígeno que determina o fenótipo do linfócito T. Assim, a co-estimulação por meio do CD86 apresentado na superfície de macrófagos favorece o desenvolvimento de resposta Th2, enquanto que a mesma molécula na superfície de células dendríticas dirige a diferenciação para Th1.

Também pudemos observar que os monócitos não estimulados de indivíduos com as duas formas clínicas da doença apresentam uma expressão aumentada de CD54 (ICAM-1), em relação aos indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção. GOEBELER *et al.* (1993) demonstraram que a expressão de algumas moléculas de adesão é aumentada

na superfície das células após a ativação. O fato dos monócitos de pacientes apresentarem uma maior expressão dessas moléculas de adesão poderia, dessa forma, indicar um estado de “pré-ativação” dessas células, resultante do processo infeccioso ativo presente no organismo. Apesar de não havermos encontrado diferença significativa entre os grupos em relação à porcentagem de células expressando LFA-1 (CD11a) em sua superfície, a análise da intensidade de fluorescência demonstrou uma expressão maior dessa molécula em células de indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção. Além de atuar na migração celular, o LFA-1 assim como outras moléculas de adesão, tem função preponderante durante a fase de apresentação de antígenos para os linfócitos T, sendo responsável pela manutenção do contato intercelular (MIYAMOTO *et al.*, 2003). Desse modo uma maior expressão dessa molécula em monócitos de indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção poderia facilitar esse processo, aumentando a capacidade de apresentação de antígenos por essas células.

Ao lado da expressão aumentada de moléculas de adesão, pudemos observar que os monócitos de pacientes com a FJ da paracoccidiodomicose apresentam uma diminuição significativa da expressão da molécula de HLA-DR (MHC de classe II) em sua superfície quando comparados aos monócitos de indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção. Como mencionado anteriormente, as moléculas de MHC de classe II são essenciais para a apresentação de antígeno para os linfócitos T CD4⁺ (JANEWAY *et al.*, 2004c) e a diminuição de sua expressão poderia estar relacionada a menor capacidade de proliferação e de resposta dos linfócitos T CD4⁺ a antígenos específicos observada nesses pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2002). REZENDE *et al.* (1998) demonstraram que imunocomplexos circulantes obtidos de pacientes com esquistossomose são capazes de induzir a diminuição

da expressão do MHC de classe II na superfície de linfócitos B in vitro, o que poderia prejudicar o mecanismo de apresentação de antígenos do parasita. Na paracoccidioidomicose a presença de complexos antígeno-anticorpo circulantes em pacientes apresentando as formas mais graves da doença foi associada à deficiência da resposta imune celular (CHEQUER-BOU-HABIB *et al.*, 1989b; CHEQUER-BOU-HABIB *et al.*, 1992).

Em conclusão os resultados mostraram que uma produção precoce de altos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-2, bem como das quimiocinas CXCL9 (Mig), CXCL10 (IP-10) e seu receptor CXCR3 caracterizam o padrão Th1 de resposta imune detectado nos indivíduos com PCM-infecção. Ao contrário produção transitória de baixos níveis de TNF- α e IFN- γ associados à expressão de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β marcam a resposta dos indivíduos com a forma juvenil da PCM. Merece destaque a produção de níveis basais de IL-10 nos indivíduos com PCM-infecção, que de certa forma deve permitir o desenvolvimento de uma resposta Th1 eficiente, garantindo proteção ao hospedeiro.

Tomando como base esses resultados, o tipo de resposta imunológica que confere resistência ou suscetibilidade à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* pode ser esquematizada nas figuras 43 e 44 respectivamente.

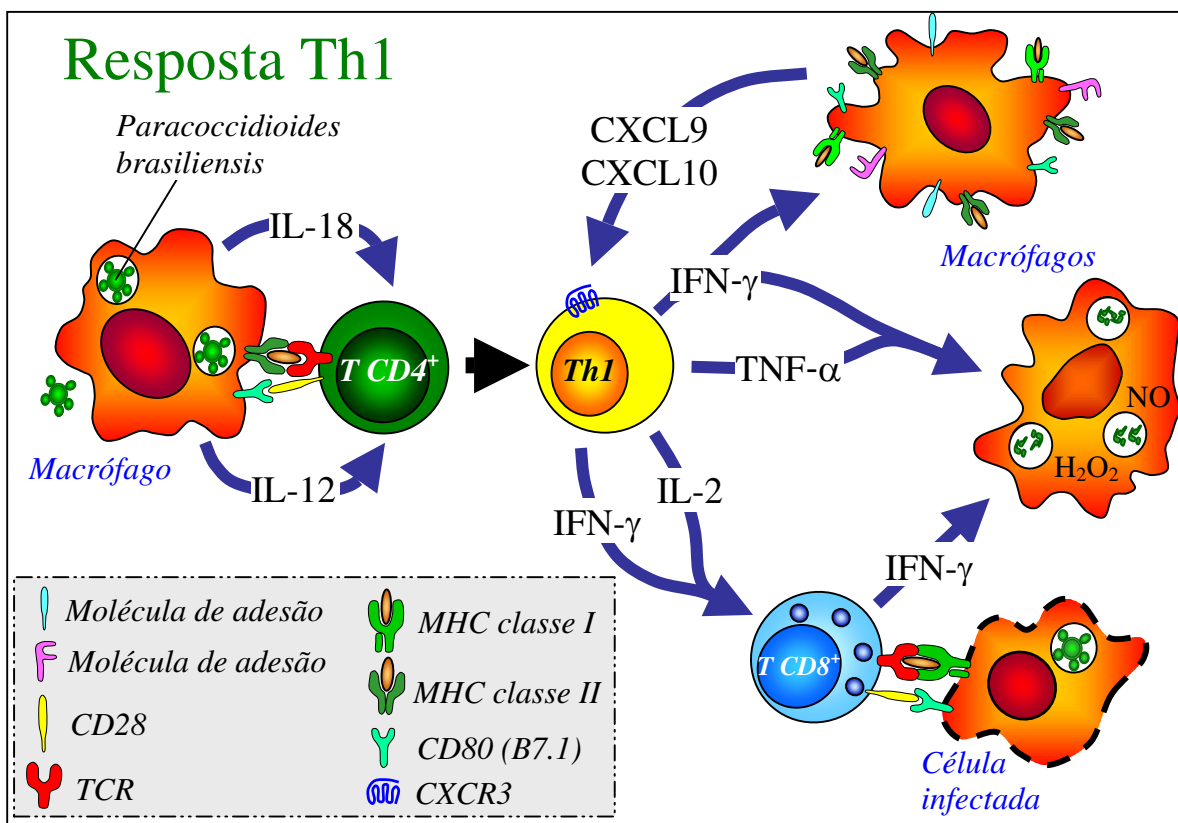


Figura 43 – Representação esquemática da resposta imunológica que confere resistência à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Após a infecção, macrófagos ou células dendríticas apresentariam antígenos do fungo para linfócitos T $CD4^+$ produzindo IL-12 e IL-18, tendo como molécula co-estimulatória o CD80, e dessa forma dirigindo a diferenciação dos linfócitos para T “helper” 1 ($Th1$). Esses linfócitos por sua vez produziram IFN- γ que aumentaria a expressão de moléculas co-estimulatórias, de adesão e de apresentação de antígeno nos macrófagos, tornando-os mais eficientes na apresentação de antígenos. A produção de IFN- γ induziria a secreção de quimiocinas como a CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10) que atrairiam outras células $Th1$ (que apresentam o receptor para quimiocinas CXCR3). O IFN- γ também poderia atuar em conjunto com o TNF- α na ativação do metabolismo oxidativo de macrófagos aumentando a produção de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e NO (óxido nítrico), importantes para a destruição do fungo. A secreção de IFN- γ e IL-2 pelos linfócitos $Th1$ também agiria na ativação de linfócitos T $CD8^+$ que por sua vez representariam uma importante fonte de IFN- γ , além de serem responsáveis pela destruição de células infectadas liberando leveduras para serem destruídas por macrófagos ativados.

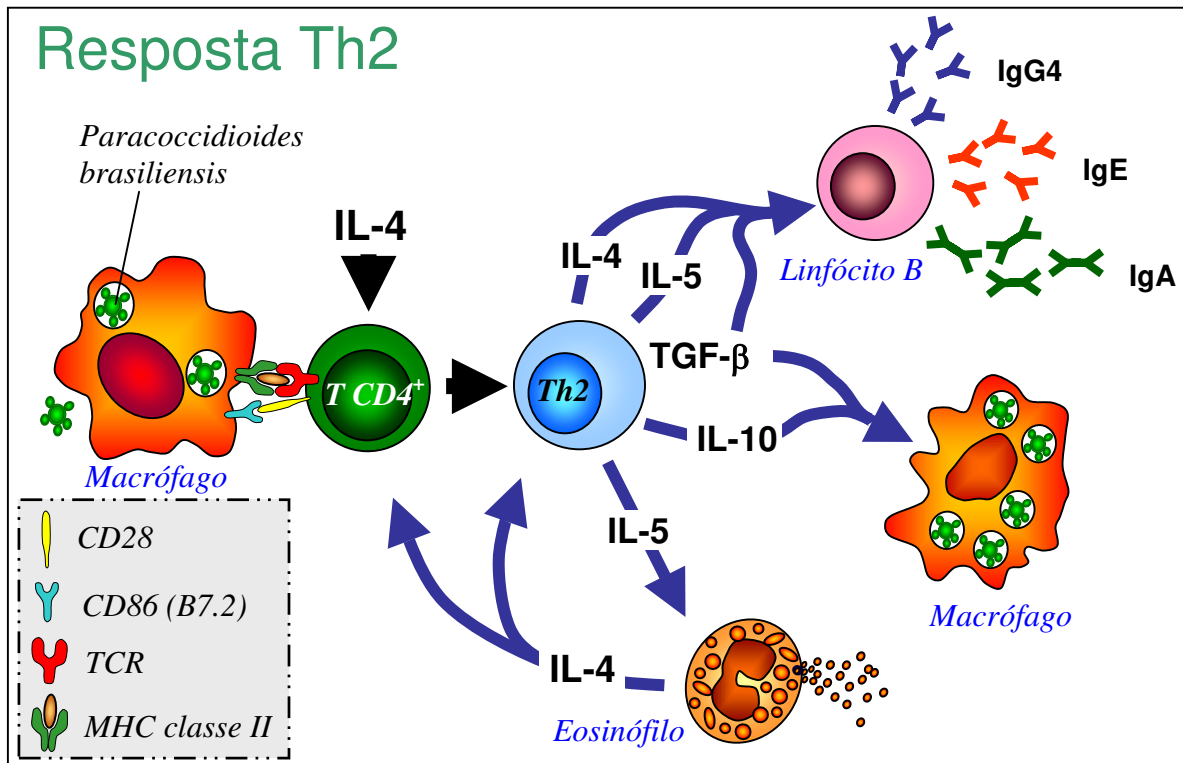


Figura 44 – Representação esquemática da resposta imunológica que confere suscetibilidade à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Após a infecção, macrófagos ou células dendríticas apresentariam antígenos do fungo para linfócitos T CD4⁺ na presença de IL-4, tendo como molécula co-estimulatória o CD86, dessa forma dirigindo a diferenciação dos linfócitos para T “helper” 2 (Th2). Esses linfócitos por sua vez produziram IL-4, IL-5 e TGF-β que atuaram sobre os linfócitos B aumentando a produção de anticorpos, influenciando a mudança de classes. Os linfócitos Th2 também produziram IL-10 que em conjunto com o TGF-β induziria a desativação dos macrófagos, diminuindo a capacidade fungicida dessas células, propiciando dessa forma a multiplicação e disseminação do *Paracoccidioides brasiliensis*. A produção de IL-5 também apresentaria papel na mobilização de eosinófilos na medula óssea, sendo responsável pela eosinofilia periférica e tecidual observada nas formas mais graves da paracoccidioidomicose. Os eosinófilos por sua vez contribuiriam para a manutenção da resposta Th2, por meio da produção de IL-4.



Considerações Finais e Conclusões

Neste trabalho pudemos observar que a cinética da expressão do RNA mensageiro para citocinas e quimiocinas mostrou diferenças significativas entre os grupos estudados. Indivíduos do grupo PCM-infecção apresentaram expressão maior e mais precoce de citocinas Th1 como IFN- γ e TNF- α , e de quimiocinas induzidas pelo IFN- γ (CXCL9 e CXCL10). Já a expressão do RNA mensageiro para citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β) foi maior e mais precoce nos dois grupos de pacientes, com uma tendência a maior expressão nos indivíduos com a FJ da doença. A capacidade de desenvolver uma pronta e intensa resposta Th1 exibida pelo grupo PCM-infecção poderia ser responsável pelo teste de HTT positivo ao antígeno do fungo, que caracteriza este grupo, e pela resistência à infecção. Em contrapartida, a suscetibilidade à doença poderia ser relacionada, em diferentes graus, à maior expressão de citocinas Th2.

A expressão protéica, de forma geral, confirmou os achados das análises do RNAm. Assim, nos indivíduos do grupo PCM-infecção foi detectado maior número de células expressando IFN- γ , TNF- α , CXCL9, CXCL10 e CXCR3, do que em pacientes com as duas formas da doença. A produção de IFN- γ foi observada principalmente em células T CD8⁺, enquanto que TNF- α e IL-2 foram detectados majoritariamente em células T CD4⁺. A detecção de um número elevado de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ nos indivíduos do grupo PCM-Infecção aponta para um importante papel desempenhado por esta população celular na determinação do fenótipo de resistência à doença.

Os pacientes com a FA apresentaram um padrão misto de resposta, com expressão elevada tanto do RNAm para citocinas Th1 (IFN- γ e IP-10), como Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), ocorrendo o mesmo para a expressão protéica das citocinas. A resposta heterogênea exibida

por este grupo de pacientes já havia sido observada anteriormente e relaciona-se ao amplo espectro de manifestações clínicas desta forma da doença.

A expressão de moléculas de adesão também foi diferente nos grupos estudados. Células de indivíduos com PCM-Infecção apresentaram maior expressão de CD80 (B7.1), CD11a (LFA-1) e HLA-DR, moléculas associadas à apresentação de antígeno e indução preferencial da resposta Th1 (CD80). Por outro lado, pacientes com ambas as formas clínicas da PCM apresentaram expressão aumentada de CD86 (B7.2) e CD54 (ICAM-1).

Em conjunto os resultados demonstraram que diferenças temporais e quantitativas na expressão do RNAm de citocinas e de moléculas de superfície envolvidas na apresentação de antígeno e co-estimulação, que privilegiam a resposta Th1 ou Th2, têm impacto na determinação da resistência ou suscetibilidade à infecção humana pelo *P. brasiliensis*.



Referências Bibliográficas



Anexos

Determinação do tipo de preparação celular a ser utilizada para citometria de fluxo.

A técnica de citometria de fluxo permite que se utilize o sangue total sem prévia separação ou então as células mononucleares separadas por meio da centrifugação sobre Ficoll-Hypaque (CMSP). A comparação entre as técnicas de imunofluorescência utilizando células do sangue total e CMSP demonstrou que cada uma delas apresenta certas vantagens. A técnica utilizando sangue periférico requer pequeno volume de sangue e menores quantidades de anticorpos, quando comparado à técnica com CMSP. Por outro lado, conforme pode ser observado na **figura 45**, a técnica com CMSP possibilita uma melhor definição da população de monócitos (uma vez que os granulócitos são eliminados no processo de separação) possibilitando a análise dessa população de forma mais precisa.

Dessa forma determinamos que, quando possível, a análise da população de linfócitos seria feita por meio da técnica com sangue total e a análise da população de monócitos feita com separação prévia das células em gradiente de ficoll-hypaque (ver organograma em material e métodos).

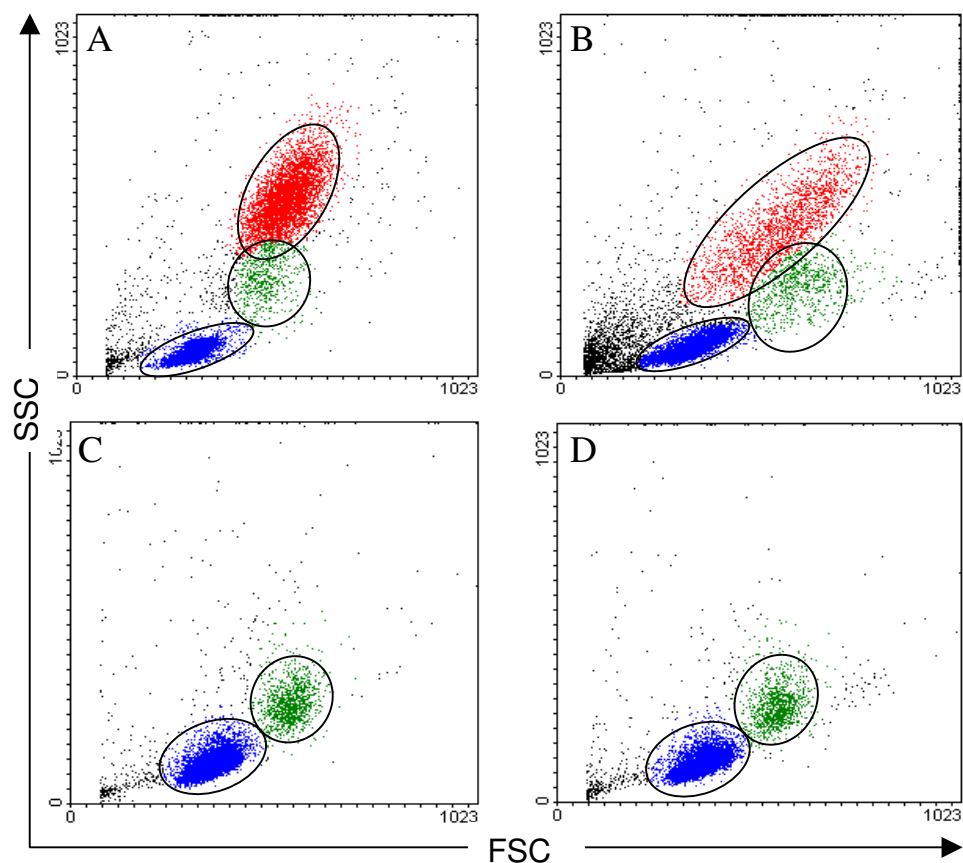


Figura 45 – “Dot-plot” representativo da distribuição de células por tamanho (FSC – Forward Scatter) e granulosidade (SSC – Side Scatter). **A)** Células do sangue total sem estímulo; **B)** células do sangue total estimuladas com PMA e ionóforo de cálcio por 6 horas; **C)** CMSP separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, sem estímulo; **D)** CMSP estimuladas com PMA e ionóforo de cálcio. **Populações celulares:** azul - linfócitos, verde – monócitos, e vermelho - granulócitos.

Determinação do tempo de estímulo com PMA e ionóforo de cálcio.

Para a determinação do tempo de estímulo com PMA e ionóforo de cálcio, amostras de sangue total de pacientes ou CMSP foram estimuladas por 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas com 50 ng/mL de PMA ou 250 ng/mL de ionóforo de cálcio. As células foram então

analisadas quanto a expressão de marcadores de superfície (CD69, CD3, CD4 e CD8), bem como quanto a produção de IFN- γ . Após cada período de incubação as células foram coletadas e procedeu-se a imunofluorescência conforme descrito em material e métodos.

A marcação das células com anti-CD69 (marcador de ativação celular de linfócitos), mostrou que após 2 horas de estímulo aproximadamente 60% dos linfócitos passaram a expressar esta molécula em sua superfície, evidenciando a eficiência deste estímulo na ativação celular. Não houve alteração significativa nesta porcentagem nos períodos subsequentes. Por outro lado, a análise da intensidade média de fluorescência (IMF) demonstrou que a expressão desta molécula aumenta no decorrer do tempo, estabilizando-se aproximadamente após 10 horas de estímulo (**figura 46**).

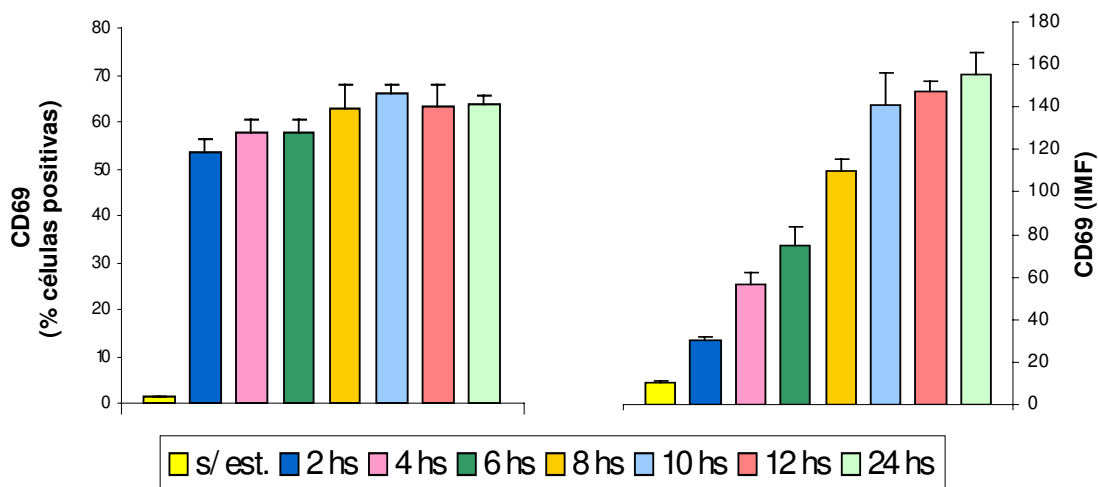


Figura 46 – Porcentagem de células positivas (esquerda) e intensidade média de fluorescência (direita) para o marcador de ativação celular CD69, em linfócitos sem estímulo (s/ est.) ou estimulados com PMA (50ng/mL) e ionóforo de cálcio (250ng/mL) por 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas. Anti-CD69 (FITC) 0,5 μ L / reação. Resultados expressos como média / desvio padrão de cinco experimentos.

A variação do tempo de estímulo com PMA e ionóforo de cálcio também teve influência sobre a produção de citocinas. Na **figura 47A** e **47B** pode-se observar a produção de IFN- γ por linfócitos marcados com anti-CD3 ou anti-CD8 em diferentes tempos.

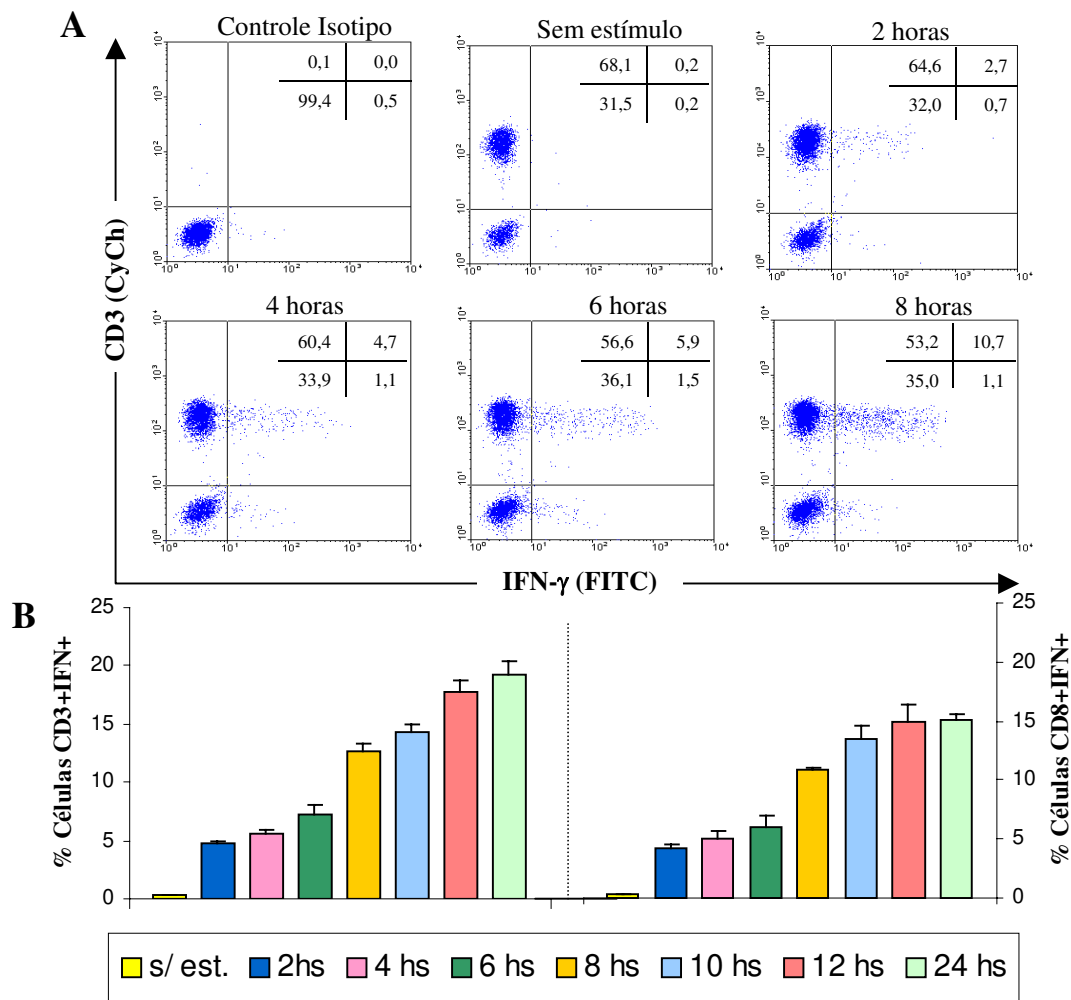


Figura 47 – **A)** “Dot-plots” representativos da marcação de células do sangue total com IFN- γ conjugado a FITC e CD3 conjugado a Cy-Chrome após 2, 4, 6 e 8 horas de estímulo com PMA e ionóforo de cálcio (os números representam a porcentagem de células positivas no quadrante). **B)** Produção de IFN- γ por linfócitos CD3 $^{+}$ e CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$, sem estímulo (s/ est.) ou estimulados com PMA (50ng/mL) e ionóforo de cálcio (250ng/mL) por 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão.

Conforme pode-se observar na figura anterior o estímulo com PMA e ionóforo de cálcio é extremamente eficiente na ativação das células para a produção de IFN- γ . É interessante notar que a produção de IFN- γ por células CD8⁺ representa uma grande porcentagem da produção total (**figura 47 B**).

Após a análise dos resultados obtidos com a marcação de superfície com anti-CD69 (marcador de ativação) e da produção de IFN- γ , decidimos estabelecer que o tempo de estímulo com PMA e ionóforo de cálcio a ser utilizado seria de 6 horas. Nota-se que após aproximadamente 10 horas de estímulo tanto a produção de IFN- γ por células CD3⁺ e CD3⁺CD8⁺, como a expressão de CD69 se aproxima de seu máximo (platô). Desse modo a análise dos parâmetros com 6 horas permite uma melhor visualização de possíveis diferenças entre os indivíduos a serem analisados, uma vez que este intervalo de tempo representa o início da fase exponencial, tanto da expressão de CD69 como da produção de IFN- γ , e por conseguinte dos outros parâmetros analisados.

Análise da população CD4⁺ em células estimuladas com PMA mais ionomicina

Durante a padronização da marcação de linfócitos com anti-CD4 observamos que esta molécula desaparece progressivamente da superfície das células quando estas são estimuladas com PMA mais ionóforo de cálcio, à medida que permanecem em cultura (**figura 48A**). O mesmo não acontece com a molécula CD3 e nem tampouco com CD8, expressas de forma estável ao longo do tempo (**figura 48B**).

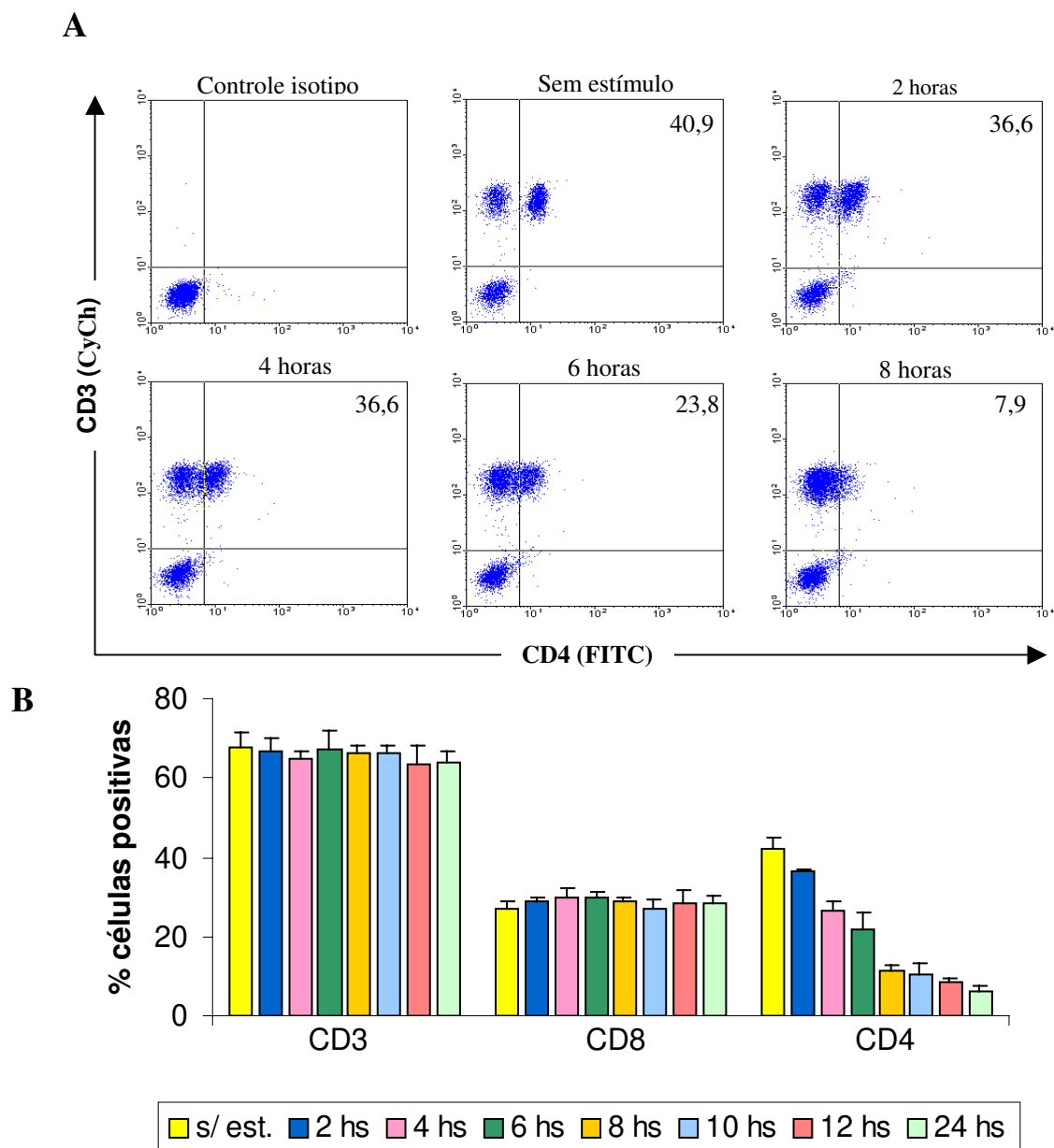


Figura 48 – A “Dot-plots” representativos da marcação de células do sangue total com anti-CD3 conjugado a Cy-Chrome e anti-CD4 conjugado a FITC após 2, 4, 6 e 8 horas de estímulo com PMA e ionóforo de cálcio (os números representam a porcentagem de células positivas no quadrante). **B**) Porcentagem de células positivas para marcação com anti-CD3 (Cy-Chrome), anti-CD8 (PE) e anti-CD4 (FITC) na região de linfócitos, sem estímulo (s/ est.) ou estimulados com PMA e ionóforo de cálcio por 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão de cinco experimentos.

Desta forma a detecção de citocinas em células T CD4⁺ fica prejudicada, uma vez que no tempo ideal para a detecção dessas substâncias, o marcador CD4 já apresenta uma diminuição significativa. Este problema foi descrito por outros pesquisadores (RICHIE *et al.*, 1988; ANDERSON e COLECLOUGH, 1993), que observaram que após o estímulo de células com PMA ocorre a internalização do CD4 pela célula. Dessa forma, a avaliação da produção de citocinas por células T CD4⁺ foi inferida por meio de “gates” diferenciais durante a análise dos resultados de cada experimento, por meio da subtração da população CD3⁺CD8⁺Citocina⁺ da população CD3⁺Citocina⁺ (**figura 49 e 50**).

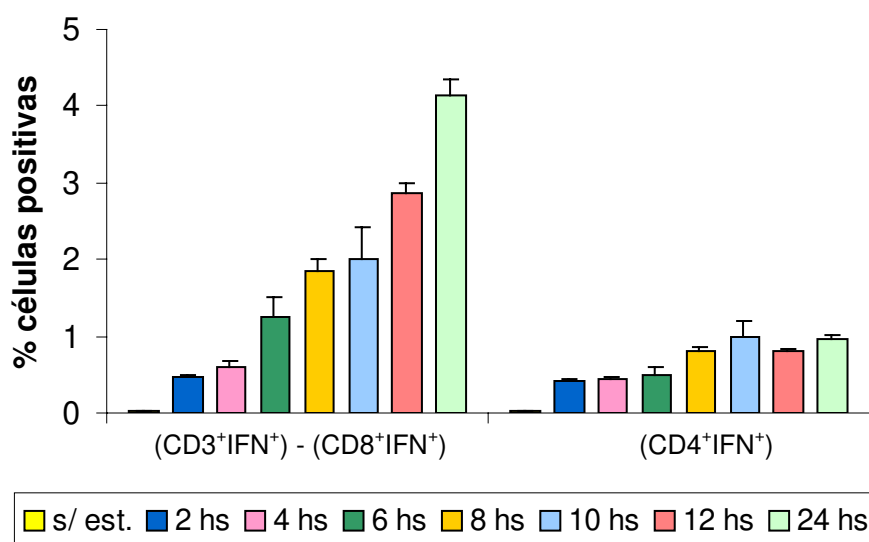


Figura 49 – Esquerda: Estimativa da produção de IFN-γ por células CD4⁺ estimuladas com PMA e Ionóforo de cálcio por meio da análise da expressão em células CD3⁺ e células CD3⁺CD8⁺. A estimativa foi feita subtraindo-se a porcentagem de células CD3⁺CD8⁺IFN⁺ da porcentagem de células CD3⁺IFN⁺. **Direita:** porcentagem de células CD4⁺IFN⁺ visualizadas diretamente. Note que a impossibilidade de delimitar a população CD4⁺ interfere no resultado.

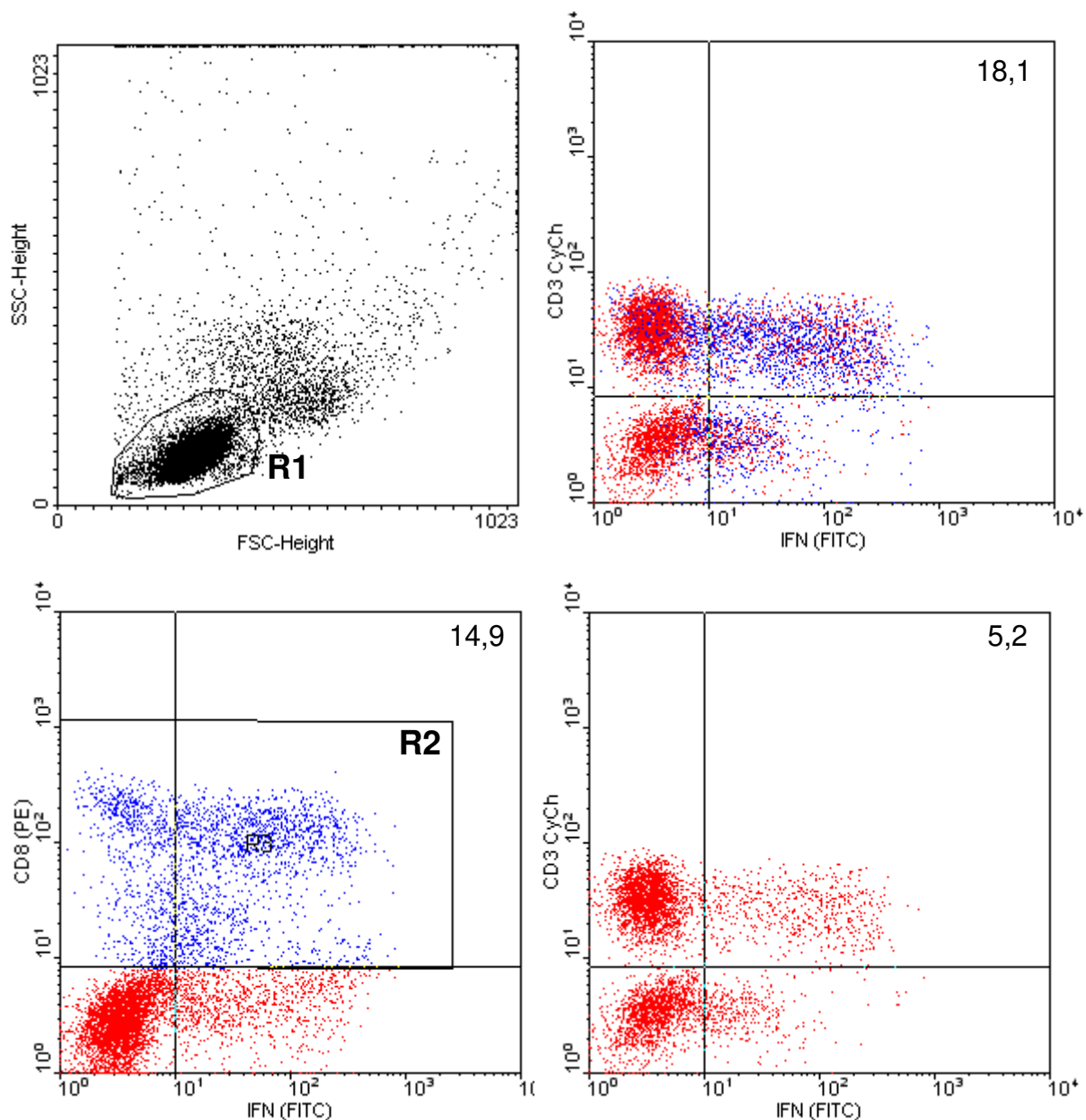


Figura 50 – Determinação da porcentagem de células T $CD4^+IFN-\gamma^+$ com a utilização de “gates” diferenciais **A)** Distribuição das células por tamanho (FSC) e complexidade (SSC), no qual foi feito o “gate” R1 delimitando a população de linfócitos. **B)** “Dot-plot” utilizado para a determinação da população $CD3^+$ e $IFN-\gamma^+$. **C)** “Dot-plot” utilizado para a determinação da população $CD8^+$ e $IFN-\gamma^+$, o qual foi utilizado para a determinação da população $CD8^+$ (“gate” R2). **D)** “Dot-plot” representando a população $CD3^+$ (da qual foi subtraída a população selecionada em R2), que foi utilizada para estimar a população $CD4^+$. Os números representam a porcentagem de células positivas no quadrante. Em azul a população $CD8^+$ delimitada por R2.

ARTIGO I

Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease

Running title: mRNA profile in paracoccidioidomycosis

Mamoni, RL & Blotta, MHSL*

Department of Clinical Pathology, State University of Campinas (UNICAMP) Medical School,
Campinas, SP, Brazil

*Correspondence to Maria Heloisa S. L. Blotta, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. Tel/Fax: +55 19 3289 9434

e-mail: heblotta@fcm.unicamp.br

ABSTRACT

The human infection with *P. brasiliensis* may result in three major outcomes: paracoccidioidomycosis-infection (PI), which is observed in healthy carriers living in endemic areas, adult form (AF) and juvenile form (JF) of PCM. The aim of this study was to compare the immunological response among these groups. The expression of multiple cytokines, including IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β 1 and IL-6, and chemokines CXCL8, CXCL9 and CXCL10 was evaluated by RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells unstimulated or following PHA stimulation for 3, 6, 12, 24 and 48h. The results showed that PI individuals expressed earlier and higher levels of mRNA of IFN- γ , TNF- α , CXCL9 and CXCL10 when compared to JF patients. In relation to AF patients, the PI group presented similar levels of CXCL10 and IFN- γ and higher levels of CXCL9. On the other hand, mRNA expression of Th2 cytokines (IL-4, IL-10, IL-5 and TGF- β 1) was higher and earlier in JF and AF groups, when compared to PI individuals. At some time intervals it was possible to differentiate JF from AF, mainly in relation to IL-4 and TGF- β 1 mRNA, expressed in higher levels in the JF patients. The distinct patterns of expression of cytokines and chemokines support their important role determining the different outcomes observed in this disease.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a fungus that undergoes thermal dimorphism, developing as mycelium at room temperature and as yeast like cells at 37°C (6). The disease is endemic in Latin America mainly in Brazil, Argentina, Venezuela and Colombia and most prevalent among low-income population, particularly in rural areas (5).

The natural route of infection is the inhalation of fungal particles, which usually leads to an asymptomatic infection. The disease presents a wide range of clinical and immunological manifestations, varying from benign and localized to severe and disseminated forms. According to current classification PCM may be divided into three major groups: the asymptomatic infection observed in healthy individuals who live in endemic areas and present a positive delayed-type hypersensitivity (DTH) test (PCM-infection [PI]) and two clinical forms of the disease, denominated juvenile (JF) and adult form (AF). The JF equally affects young patients of both sexes and is characterized by systemic lymph node involvement, hepatosplenomegaly and bone marrow dysfunction, resembling a lymphoproliferative disease. The AF almost always affects adult males and its clinical presentation is very heterogeneous, ranging from isolated lesions in the respiratory tract (mild or benign forms) to widely disseminated forms (6, 20).

Effective defense against *P. brasiliensis* depends strictly upon Th1 cells and acquired resistance is governed by T cell- and macrophage-activating cytokines. Among them, TNF- α and IFN- γ play particularly prominent roles (4, 8, 26, 54). Several studies on the immune responses developed by patients with polar forms of PCM demonstrated that the benign forms of the disease were associated with the production of low levels of antibodies and positive DTH

reactions, whereas the severe disseminated (JF and multifocal AF) forms were associated with high levels of antibodies and anergy in DTH reactions (6). More recent studies have shown that in both experimental and human PCM the resistance or the development of a mild form of the disease has been associated with a Th1-biased immune response, whereas a Th2 pattern has been associated with susceptibility and most severe disease (2, 4, 9, 27).

When compared to patients with the mild form of the disease, patients presenting the more disseminated infection produce higher levels of type 2 cytokines (interleukin-4 [IL-4], IL-5, IL-10, and transforming growth factor) and antibodies (immunoglobulin E [IgE], IgG4, and IgA) in addition to eosinophilia and impaired secretion of gamma interferon (IFN- γ) (3, 33, 34, 44). On the other hand, PI individuals present a typical Th1 pattern of cytokines with production of IFN- γ and TNF- α and basal levels of IL-4, IL-5 and IL-10 (44).

No consensus exists regarding the determinants of a Th1 or Th2 response in PCM. The development of Th1 and Th2 response appears to depend on the type of cytokine encountered in the milieu in which the differentiation process occurs. A Th1 cell will be generated in presence of IL-12, whereas a Th2 cell will be generated in IL-4 rich environment (21, 39, 40, 55). Several factors may contribute to this process. These include both host and pathogen genetic background, virulence and the load of fungi in the organism (6, 15, 48) and environmental factors influencing the immune response of the host such as alcoholism, tobacco smoking and malnutrition (12, 35).

Since the rate of cytokine production during an immune response may determine the outcome of the infection, in this study we compared the kinetics of several cytokines and chemokines mRNA expression among three groups: individuals presenting PCM-infection,

patients with AF and patients diagnosed with the JF of PCM. We found a polarized response with early and high expression of Th1 cytokines in PI individuals, whereas JF patients showed a predominance of Th2 cytokines mRNA. On the other hand, a mixed pattern of Th1 and Th2 cytokines mRNA was detected in AF patients, confirming the heterogeneous characteristic this clinical form.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The sample consisted of 38 subjects: 23 patients with newly diagnosed PCM and 15 healthy paracoccidioidin-reactive (PI) individuals living in an endemic area for PCM (Campinas, SP, Brazil). The diagnosis of PCM was established by fungus detection in clinical specimens and serology (immunodiffusion test). The patients were grouped according to clinical form: 8 with the juvenile acute form (JF) and 15 with the chronic adult form (AF) of the disease. This research was approved by the Medical School Ethics Committee of State University of Campinas (UNICAMP) and informed consent was obtained from each participant.

RNA extraction and cDNA synthesis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized venous blood by centrifugation over Ficoll-hypaque gradient (Amersham Biosciences, Upsala, Sweden), washed twice with cold PBS and resuspended in RPMI 1640 medium (Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) supplemented with 2mM-Glutamine (Sigma, St. Louis, USA),

gentamicin (5µg/mL - Sigma) and 10% heat inactivated human AB serum, at a concentration of 2×10^6 cells/mL. The cells were cultured in 24 wells plates (Costar, Cambridge, MA, USA) and stimulated with PHA (10µg/ml – Sigma) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours at 37°C in presence of 5% CO₂ or immediately frozen for later *ex vivo* mRNA analysis. After each incubation period the cells were harvested and stored at –70°C until RNA extraction. Freshly isolated or *in vitro* stimulated PBMC were resuspended in TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) and 2 µg of glycogen (carrier) was added to each tube. After addition of chloroform, samples were centrifuged and the aqueous phase was collected. RNA was precipitated with isopropanol, washed twice with ethanol, resuspended in DEPC-treated water and the RNA concentration was determined by optical density. One µg of RNA from each sample underwent reverse transcription using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Co.) and oligo(dT) 12-18 (Invitrogen Co.). After incubation at 90°C for 5 min, 2.6 units of Ribonuclease H were added to each tube, in order to eliminate any RNA-cDNA strands. The cDNA were stored at -70°C until amplification.

Polymerase chain reaction (PCR) and quantification of products

PCR was performed using specific primer-pairs, flanking each gene of interest. Primer sequences were based on previously published papers (13, 18, 22, 25, 37, 49) and were designed to span intron/exon junctions, allowing specific amplification of cDNA and preventing the amplification of genomic DNA (Table I). Amplification of sequences was carried out in a Mastercycler Gradient System (Eppendorf, Hamburg, Germany) using the following reaction conditions: 95°C melting for 45s, annealing for 45s (see Table I for temperature) and 72°C extension for 1 min. The number of amplification cycles varied from 25 to 40 and was

established by individual titration for each cytokine/chemokine to give linear amplification (data not shown). Amplicons were resolved by 1% agarose gel electrophoresis and photographed using a photo documentation apparatus (Kodak Edas 290 – Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) under UV light with ethidium bromide staining. The intensity of each band formed was estimated using the Kodak 1D 3.5 software (Eastman Kodak Company). Expression of β -actin was evaluated in parallel and used for proper normalization of each sample loads in analytic runs.

Statistical analysis: The results were analyzed by SigmaStat v1.0 software (Jandel Co). The differences among the groups were analyzed using the ANOVA test and Bonferroni's post-test. Comparisons among different time intervals following stimuli were made using the ANOVA test for repeated measures with Bonferroni's post-test. The relationship between the parameters was analyzed by Spearman correlation test. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

mRNA for Th1 cytokines was high in PI group.

We first examined constitutive and induced IFN- γ mRNA expression by cultured PBMC. The constitutive IFN- γ mRNA expression was higher in PI individuals than in AF group. PBMC from JF patients did not express IFN- γ mRNA constitutively. There was a significant increase in the IFN- γ message following PBMC stimulation with PHA among PI and AF groups. The maximum accumulation occurred within 6 hours, followed by stable levels until the end of

the period studied. In contrast the JF group presented significant lower levels of IFN- γ mRNA expression during the entire period, except at 48 hours, when the levels were similar across all three groups (figure 1A).

At 3 and 6 hours after the stimulus, the levels of TNF- α mRNA expression were higher in the PI group when compared to the other groups. After that period the expression returned to basal levels. Interestingly, the maximal expression of TNF- α mRNA among AF and JF groups corresponded to basal levels expressed by the cells of the PI individuals (figure 1B).

mRNA expression of chemokines CXCL10 and CXCL9 was elevated in PI group and positively correlated with IFN- γ mRNA production.

It is well known that IFN- γ is a potent inducer of chemokines CXCL10 and CXCL9 by macrophages (14). We next determined whether CXCL10 and CXCL9 mRNA expression was up-regulated in PBMC among PI individuals. CXCL10 mRNA expression was comparable in PI and AF groups during the entire period, while the JF group presented a delayed and low pattern of expression (figure 2A). In relation to CXCL9, the mRNA expression was comparable in all groups studied until 24 hours after the PHA stimulus. After that, the PI group presented a higher level of expression (figure 2B).

A positive correlation was observed between the expression of the mRNA for IFN- γ , CXCL10 and CXCL9 (figure 2C and 2D).

Elevated IL-4 and IL-5 mRNA expression was detected in JF and AF patients

Considering that there was a down regulation of Th1 cytokines and chemokines in PCM patients in relation to PI individuals, we decided to analyse the expression of Th2 cytokines. Interleukin 4 is the main cytokine of the Th2 response, and presents an important role in the development of the humoral immune response. The IL-4 mRNA was highly expressed in cells from JF and AF patients at least until 24h after PHA stimulation. In JF patients the maximum level of expression occurred at 6 hours post-stimulus, with subsequent decline to basal levels at 48 hours. In relation to AF patients after the increase observed at 3 hours, the levels remained constant until the end of the period studied (figure 3A). Interestingly, there was a negative correlation between IL-4 and IFN- γ mRNA expression, confirming the antagonistic role of these cytokines (figure 3B).

IL-5 mRNA expression was similar to IL-4, with JF and AF patients presenting higher levels throughout the entire time period as compared to PI group (figure 3C). IL-5 plays an important role in eosinophil maturation and activation and, in addition to IL-4, it is important to the production of antibodies. The strong correlation between IL-4 and IL-5 mRNA expression corroborates the notion that these two cytokines share similar regulatory mechanism (figure 3D).

IL-10 and TGF- β 1 mRNA expression is higher in JF patients

IL-10 and TGF- β 1 are pleiotropic cytokines whose major role in immune response is to modulate the suppression of response. These cytokines suppress both Th1 and Th2 responses, but in PCM they are correlated with impairment of the cellular immune response. The highest

levels of IL-10 mRNA expression were observed in PBMC among JF patients followed by AF patients. Of interest was the fact that the PI group presented only basal levels of IL-10 mRNA expression during the whole period (figure 4A).

The expression of TGF- β 1mRNA was highest in JF patients, presenting the maximum level of production at 6 hours post-stimulus, followed by gradual decrease until basal levels at 48h. PBMC from AF patients showed a different pattern of TGF- β 1mRNA expression, with a bimodal production peaking at 3h, returning to basal levels at 6 hours, followed by a new increase with maximum accumulation at 24 hours after the stimulus (figure 4B). The expression of the mRNA for TGF- β 1 and IL-10 correlated positively, indicating a possible synergistic effect between them (figure 4C).

The expression of CXCL8 mRNA was highest in AF group, while there are no statistical differences in relation to expression of IL-6 mRNA.

The AF group presented significantly higher levels of CXCL8 mRNA expression in comparison to JF patients. However, CXCL8 mRNA expression among AF did not differ significantly from that of PI (figure 5A).

The expression of IL-6 mRNA did not differ significantly among any groups at any time studied, although a tendency towards a lower expression was observed in JF patients (figure 5B). IL-6 is a cytokine traditionally linked to a Th2 response, but with known proinflammatory properties. The positive correlation between the expression of IL-6 and TNF- α mRNA expression confirmed this association with the inflammatory response (figure 5C).

DISCUSSION

Findings from several studies have shown that the effective immune response against *P. brasiliensis* is dependent on the presence of macrophages activated by Th1 cytokines as IFN- γ and TNF- α . Similarly, susceptibility has been shown to be associated with the production of Th2 cytokines, which have a suppressive action upon the cellular immune response (2, 4, 7, 44, 54).

Our previous studies showed that the immune response of JF patients are characterized by a predominant Th2 profile; presenting high levels of IL-4, IL-5 and IL-10 (44) and high levels of IgG4, IgE and IgA specific antibodies (3, 33, 44). Moreover, JF patients exhibited an impaired lymphoproliferative and DTH response against *P. brasiliensis* antigens. On the other hand, PI individuals presented vigorous lymphoproliferative and DTH responses; in vitro production of Th1 cytokines as IFN- γ and TNF- α and low levels of IL-10 and IL-4 (44).

IFN- γ is the cytokine that characterizes the Th1 pattern (40). Its main function is to activate macrophages and cytotoxic T cells that have a critical role in controlling PCM (4, 23, 26, 28). The higher expression of chemokines CXCL10 and CXCL9-mRNA corroborates the production of IFN- γ by cells in PI individuals. CXCL10 and CXCL9 are IFN- γ inducible and very effectively attract activated T lymphocytes (14, 30, 31). Both chemokines signal through a common receptor, CXCR3, expressed by memory (CD45RO⁺) T cells, preferentially of the Th1 subset, and by natural killer cells, but not by monocytes or neutrophils (31). In experimental PCM high levels of CCL5, CCL2, CXCL10 and CXCL9 simultaneously with mononuclear cell infiltration were detected in the lungs of mice infected with *P. brasiliensis* (61). IFN- γ modulates the expression of chemokine and chemokine receptors and determines the cells that infiltrate the

lungs of *P. brasiliensis*-infected mice (53). Elevated levels of CCL3 are found in lungs of patients with pulmonary PCM, associated with a high percentage of CD8⁺ T cells(19). Moreover, chemokine and chemokine receptors play an important role in granulomatous inflammatory reactions. In PCM, TNF- α has also been implicated in the formation of the compact granuloma accounting for the resistance to infection (16, 43, 51). In the present study, TNF- α mRNA was expressed in high levels only in cells from PI individuals. In addition to its role in the inflammatory process, TNF- α acts synergistically with IFN- γ in the activation of the cellular immune response (61).

The expression of the mRNA of IL-4, IL-10 and IL-5, cytokines that characterizes the Th2 type of immune response, was observed predominantly in patients with PCM-disease, particularly those presenting the JF. IL-4 inhibits the Th1 response (45) and participates in humoral immune response promoting IgG4 and IgE antibody switch (52). Recently Pina et al. (47) showed that IL-4 knockout mice are more resistant to *P. brasiliensis* infection than wild type mice, since they were able to control the dissemination of the fungi for a extended period of time.

In the present study the analysis of mRNA kinetic expression demonstrated that JF and AF patients are more likely to produce IL-4 mRNA in response to PHA stimulus. As IL-4 is essential to Th2 differentiation, the early production of this cytokine may contribute to the Th2 pattern observed in JF patients.

IL-10, first recognized for the ability to inhibit activation and effector function of T cells, monocytes, and macrophages, is a multifunctional cytokine with diverse effects on most hemopoietic cell types (45, 46). The principal function of IL-10 is to limit and ultimately terminate inflammatory responses (46). In a previous study we showed that PI individuals

produced only basal levels of IL-10 in response to *P. brasiliensis* antigen (44), probably reflecting the low expression of the mRNA for this cytokine. On the other hand, JF and AF patients expressed high levels of IL-10 mRNA, as well as TGF- β 1 mRNA, another mediator with inhibitory action on the cellular immune response.

The role of TGF- β 1 has been implicated in the susceptibility to other infections such as leishmaniasis, leprosy, HIV, and tuberculosis (17, 29, 56, 59). In previous studies we detected elevated levels of TGF- β 1, both local and systemic in JF patients, suggesting a role for this cytokine in the suppression of immune response (33, 43). Both IL-10 and TGF- β 1 are important mediators of the inhibition of nitric oxide (NO) diminishing the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS), an enzyme induced by IFN- γ and TNF- α (1). NO has a fungicidal role in *P. brasiliensis* in mice, although its role in human infection is unknown (11, 42, 43).

In this study the expression of IL-5 mRNA was also high in patients with PCM-disease. Among JF group, this high level of expression was maintained for the entire 48h period, while in the AF group it dropped after 24h. IL-5 is a Th2 cytokine with an important role in the maturation and stimulation of eosinophils (36, 60). High expression of IL-5 in JF patients may explain the peripheral eosinophilia associated with active disease observed in this group (33, 50, 58).

An interesting finding was the mixed pattern of Th1 and Th2 cytokines mRNA expression detected in AF patients. These data are in accordance with previous findings from which we concluded that the AF represents the intermediate pattern of immune response in PCM.

AF patients presented the highest levels of CXCL8 mRNA expression as compared to the other groups. CXCL8 contains a conserved tripeptide motif glutamic acid–leucine–arginine (ELR) at the N-terminal of the protein, that enable it to attract neutrophils (32, 41, 57). Neutrophils participate in the inflammatory response to *P. brasiliensis* through the release of oxygen-derived products and endogenous peroxidase localized in cytoplasmic granules. These processes lead to killing of both ingested and extracellular *P. brasiliensis* yeast cells (24, 38). In a previous study we showed that AF patients presented higher serum levels of CXCL8 than JF patients (33). Furthermore neutrophilic abscess are a common finding in oral mucosa lesions of AF patients (43).

Although there were no significant differences in the expression of IL-6 mRNA among the groups studied, we observed a tendency to a lower expression in JF group. IL-6 is traditionally considered as a Th2 cytokine, with an important function in the inflammatory reaction (10). However, in experimental tuberculosis IL-6 has a protective function since IL-6 deficient mice are prone to develop lethal infection.

The findings of this study showed for the first time the kinetics of cytokine mRNA expression in different forms of human PCM. We observed that the PI individuals responded to PHA stimulus with early and high Th1 cytokine and chemokine mRNA expression, as IFN- γ , TNF- α , CXCL10 and CXCL9. On the other hand, JF patients presented a different profile, with the expression of high levels of Th2 cytokines mRNA as IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- β 1. Since the differentiation of T cells is dependent, among other factors, on the cytokine present in the milieu where the immune response takes place, these findings suggest that the differential

patterns of both kinetics and quantity of production of mRNA expression may significantly influence the outcome of PCM infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to K. J. Gollob for the assistance in RT-PCR methodology. This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grants 01/00332-6 and 02/05608-0.

REFERENCES

1. **Aktan, F.** 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* **75**:639-53.
2. **Arruda, C., M. F. Franco, S. S. Kashino, F. R. Nascimento, A. Fazioli Rdos, C. A. Vaz, M. Russo, and V. L. Calich.** 2002. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol* **103**:185-95.
3. **Baida, H., P. J. Biselli, M. Juvenale, G. M. Del Negro, M. J. Mendes-Giannini, A. J. Duarte, and G. Benard.** 1999. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* **1**:273-8.

4. **Benard, G., C. C. Romano, C. R. Cacere, M. Juvenale, M. J. Mendes-Giannini, and A. J. Duarte.** 2001. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* **13**:248-52.
5. **Blotta, M. H., R. L. Mamoni, S. J. Oliveira, S. A. Nouer, P. M. Papaiordanou, A. Goveia, and Z. P. Camargo.** 1999. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* **61**:390-4.
6. **Brummer, E., E. Castaneda, and A. Restrepo.** 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* **6**:89-117.
7. **Calich, V. L., C. A. Vaz, and E. Burger.** 1998. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol* **149**:407-17; discussion 499-500.
8. **Calvi, S. A., M. T. Peracoli, R. P. Mendes, J. Marcondes-Machado, D. Fecchio, S. A. Marques, and A. M. Soares.** 2003. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. *Microbes Infect* **5**:107-13.
9. **Cano, L. E., S. S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C. F. Xidieh, L. M. Singer-Vermes, C. A. Vaz, E. Burger, and V. L. Calich.** 1998. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* **66**:800-6.
10. **Diehl, S., and M. Rincon.** 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* **39**:531-6.

11. **Diniz, S. N., P. S. Cisalpino, A. T. Freire, D. N. Silva-Teixeira, C. Contigli, V. Rodrigues Junior, and A. M. Goes.** 2001. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum Immunol* **62**:799-808.
12. **dos Santos, W. A., B. M. da Silva, E. D. Passos, E. Zandonade, and A. Falqueto.** 2003. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad Saude Publica* **19**:245-53.
13. **Dutra, W. O., R. Correa-Oliveira, D. Dunne, L. F. Cecchini, L. Fraga, M. Roberts, A. M. Soares-Silveira, M. Webster, H. Yssel, and K. J. Gollob.** 2002. Polarized Th2 like cells, in the absence of Th0 cells, are responsible for lymphocyte produced IL-4 in high IgE-producer schistosomiasis patients. *BMC Immunol* **3**:8.
14. **Farber, J. M.** 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* **61**:246-57.
15. **Ferreira, K. S., J. D. Lopes, and S. R. Almeida.** 2003. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. *Scand J Immunol* **58**:290-7.
16. **Figueiredo, F., L. M. Alves, and C. L. Silva.** 1993. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol* **93**:189-94.
17. **Fitzpatrick, D. R., and H. Bielefeldt-Ohmann.** 1999. Transforming growth factor beta in infectious disease: always there for the host and the pathogen. *Trends Microbiol* **7**:232-6.

18. **Flach, R., N. Speidel, S. Flohe, J. Borgermann, I. G. Dresen, J. Erhard, and F. U. Schade.** 1998. Analysis of intragraft cytokine expression during early reperfusion after liver transplantation using semi-quantitative RT-PCR. *Cytokine* **10**:445-51.
19. **Fornazim, M. C., A. Balthazar, R. Quagliato, Jr., R. L. Mamoni, C. Garcia, and M. H. Blotta.** 2003. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J* **22**:895-9.
20. **Franco, M., M. R. Montenegro, R. P. Mendes, S. A. Marques, N. L. Dillon, and N. G. Mota.** 1987. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* **20**:129-32.
21. **Gately, M. K., L. M. Renzetti, J. Magram, A. S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D. H. Presky.** 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**:495-521.
22. **Georganas, C., H. Liu, H. Perlman, A. Hoffmann, B. Thimmapaya, and R. M. Pope.** 2000. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J Immunol* **165**:7199-206.
23. **Gonzalez, A., W. de Gregori, D. Velez, A. Restrepo, and L. E. Cano.** 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* **68**:2546-52.
24. **Gonzalez, A., J. H. Sahaza, B. L. Ortiz, A. Restrepo, and L. E. Cano.** 2003. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Med Mycol* **41**:391-9.

25. **Kanda, N., and S. Watanabe.** 2001. Gangliosides GD1b, GT1b, and GQ1b enhance IL-2 and IFN-gamma production and suppress IL-4 and IL-5 production in phytohemagglutinin-stimulated human T cells. *J Immunol* **166**:72-80.
26. **Karhawi, A. S., A. L. Colombo, and R. Salomao.** 2000. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med Mycol* **38**:225-9.
27. **Kashino, S. S., R. A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L. H. Meloni-Bruneri, C. A. Vaz, E. Burger, L. M. Singer, and V. L. Calich.** 2000. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. *J Interferon Cytokine Res* **20**:89-97.
28. **Kashino, S. S., A. Fazioli Rdos, M. Moscardi-Bacchi, M. Franco, L. M. Singer-Vermes, E. Burger, and V. L. Calich.** 1995. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* **130**:131-40.
29. **Kiszewski, C. A., E. Becerril, J. Baquera, L. D. Aguilar, and R. Hernandez-Pando.** 2003. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand J Immunol* **57**:279-85.
30. **Liao, F., R. L. Rabin, J. R. Yannelli, L. G. Koniaris, P. Vanguri, and J. M. Farber.** 1995. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* **182**:1301-14.

31. **Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser.** 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* **184**:963-9.
32. **Lyons, M. J., T. Yoshimura, and D. N. McMurray.** 2004. Interleukin (IL)-8 (CXCL8) induces cytokine expression and superoxide formation by guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **84**:283-92.
33. **Mamoni, R. L., S. A. Nouer, S. J. Oliveira, C. C. Musatti, C. L. Rossi, Z. P. Camargo, and M. H. Blotta.** 2002. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* **40**:153-9.
34. **Mamoni, R. L., C. L. Rossi, Z. P. Camargo, and M. H. Blotta.** 2001. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* **65**:237-41.
35. **Martinez, R., and M. J. Moya.** 1992. [The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism]. *Rev Saude Publica* **26**:12-6.
36. **Mattes, J., and P. S. Foster.** 2003. Regulation of eosinophil migration and Th2 cell function by IL-5 and eotaxin. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2**:169-74.
37. **Mayringer, I., M. Reindl, and T. Berger.** 2000. A critical comparison of frequently used methods for the analysis of tumor necrosis factor-alpha expression by human immune cells. *J Immunol Methods* **235**:33-40.

38. **Meloni-Bruneri, L. H., A. Campa, D. S. Abdalla, V. L. Calich, H. L. Lenzi, and E. Burger.** 1996. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J Leukoc Biol* **59**:526-33.
39. **Moser, M.** 2001. Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells in vivo. *Immunobiology* **204**:551-7.
40. **Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman.** 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**:2348-57.
41. **Mukaida, N., and K. Matsushima.** 1992. Regulation of IL-8 production and the characteristics of the receptors for IL-8. *Cytokines* **4**:41-53.
42. **Nascimento, F. R., V. L. Calich, D. Rodriguez, and M. Russo.** 2002. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* **168**:4593-600.
43. **Neworal, E. P., A. Altemani, R. L. Mamoni, I. L. Noronha, and M. H. Blotta.** 2003. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine* **21**:234-41.
44. **Oliveira, S. J., R. L. Mamoni, C. C. Musatti, P. M. Papaioordanou, and M. H. Blotta.** 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* **4**:139-44.

45. **Oswald, I. P., R. T. Gazzinelli, A. Sher, and S. L. James.** 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J Immunol* **148**:3578-82.
46. **Pestka, S., C. D. Krause, D. Sarkar, M. R. Walter, Y. Shi, and P. B. Fisher.** 2004. Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors. *Annu Rev Immunol* **22**:929-979.
47. **Pina, A., R. C. Valente-Ferreira, E. E. Molinari-Madlum, C. A. Vaz, A. C. Keller, and V. L. Calich.** 2004. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. *Infect Immun* **72**:2369-78.
48. **Restrepo, A.** 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* **23**:323-34.
49. **Romagnani, P., F. Annunziato, E. Lazzeri, L. Cosmi, C. Beltrame, L. Lasagni, G. Galli, M. Francalanci, R. Manetti, F. Marra, V. Vanini, E. Maggi, and S. Romagnani.** 2001. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCRgammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood* **97**:601-7.
50. **Shikanai-Yasuda, M. A., Y. Higaki, D. E. Uip, N. S. Mori, G. Del Negro, N. T. Melo, R. U. Hutzler, and V. Amato Neto.** 1992. [Bone marrow involvement and eosinophilia in paracoccidioidomycosis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **34**:85-90.
51. **Silva, C. L., and F. Figueiredo.** 1991. Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. *J Infect Dis* **164**:1033-4.

52. **Snapper, C. M., F. D. Finkelman, and W. E. Paul.** 1988. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* **167**:183-96.
53. **Souto, J. T., J. C. Aliberti, A. P. Campanelli, M. C. Livonesi, C. M. Maffei, B. R. Ferreira, L. R. Travassos, R. Martinez, M. A. Rossi, and J. S. Silva.** 2003. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol* **163**:583-90.
54. **Souto, J. T., F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M. A. Rossi, and J. S. Silva.** 2000. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* **156**:1811-20.
55. **Trinchieri, G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**:133-46.
56. **Tsai, W. C., J. J. Tsai, C. J. Chen, J. H. Yen, T. T. Ou, and H. W. Liu.** 2002. Monocyte-derived cytokine--IL-12, TGF-beta 1 and TNF-alpha in patients with tuberculosis. *Kaohsiung J Med Sci* **18**:17-22.
57. **van Eeden, S. F., and T. Terashima.** 2000. Interleukin 8 (IL-8) and the release of leukocytes from the bone marrow. *Leuk Lymphoma* **37**:259-71.
58. **Wagner, J. M., M. Franco, G. M. Kephart, and G. J. Gleich.** 1998. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. *Am J Trop Med Hyg* **59**:66-72.

59. **Wiercinska-Drapalo, A., R. Flisiak, J. Jaroszewicz, and D. Prokopowicz.** 2004. Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. *Viral Immunol* **17**:109-13.
60. **Williams, T. J.** 2004. The eosinophil enigma. *J Clin Invest* **113**:507-9.
61. **Xing, Z., A. Zganiacz, and M. Santosuosso.** 2000. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *J Leukoc Biol* **68**:897-902.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1 – Semi-quantitative analysis of IFN- γ (A) and TNF- α (B) mRNA expression (IFN- γ or TNF- α / β -actin). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with PHA (10 μ g/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. PI = PCM-infection, AF = adult form, JF = juvenile form of PCM. Statistics – ANOVA test. A) * p<0,05 – JF in relation to AF and PI; # p<0,05 – JF in relation to PI. B) # p<0,05 – PI in relation to JF; * p<0,05 – PI in relation to AF and JF.

Figure 2 - Semi-quantitative analysis of CXCL10 (IP-10) (A) and CXCL9 (Mig) (B) mRNA expression (CXCL10 (IP-10) or CXCL9 (Mig) / β -actin - mean $\pm$ SE). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with PHA (10 μ g/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. PI = PCM-infection, AF = adult form, JF = juvenile form of PCM. Statistics – ANOVA test. A) * $p < 0.05$ – JF in relation to AF and PI. B) * $p < 0.05$ – PI in relation to JF and AF. Correlation between the levels of mRNA expression for IFN- γ and CXCL10 (IP-10) (C) and for IFN- γ and CXCL9 (Mig) (D) after 6 hours of stimulus with PHA (10 μ g/mL). Statistics Pearson correlation test.

Figure 3 - Semi-quantitative analysis of IL-4 (A) and IL-5 (C) mRNA expression (IL-4 or IL-5 / β -actin – mean $\pm$ SE). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with PHA (10 μ g/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. PI = PCM-infection, AF = adult form, JF = juvenile form of PCM. Statistics – ANOVA test. A) * $p < 0.05$ – JF and AF in relation to PI; # $p < 0.05$ – JF in relation to PI. C) * $p < 0.05$ – JF and AF in relation to PI. Correlation between the levels of mRNA expression for IFN- γ and IL-4 (B) and for IL-4 and IL-5 (D) after 6 hours of stimulus with PHA (10 μ g/mL). Statistics Pearson correlation test.

Figure 4 - Semi-quantitative analysis of IL-10 (A) and TGF- β 1 (B) mRNA expression (IL-10 or TGF- β 1 / β -actin – mean $\pm$ SE). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with PHA (10 μ g/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. PI = PCM-infection, AF = adult form, JF = juvenile form of PCM. Statistics – ANOVA test. A) * $p < 0.05$ – JF and AF in relation to PI B) * $p < 0.05$ – JF and AF in relation to PI; # $p < 0.05$ – JF in relation to AF and PI. Correlation between the levels of mRNA expression for IL-10 and TGF- β 1 (C) after 6 hours of stimulus with PHA (10 μ g/mL). Statistics Pearson correlation test.

Figure 5 - Semi-quantitative analysis of CXCL8 (IL-8) (A) and IL-6 (B) mRNA expression (CXCL8 (IL-8) or IL-6 / β -actin – mean $\pm$ SE). Comparative kinetic mRNA expression in cells unstimulated (0) or stimulated with PHA (10 μ g/mL) for 3, 6, 12, 24 and 48 hours. PI = PCM-infection, AF = adult form, JF = juvenile form of PCM. Statistics – ANOVA test. A) * $p < 0.05$ – AF in relation to JF and PI; # $p < 0.05$ – AF in relation to JF. Correlation between the levels of mRNA expression for IL-6 and TNF- α (C) after 6 hours of stimulus with PHA (10 μ g/mL). Statistics Pearson correlation test.

Table I – Primer sequences and PCR conditions

Gene	Sequence (5' → 3')	Annealing (°C)	Number of Cycles	Ref.
β-Actin	GGGTCAGAAGGATTCCTATG GGTCTCAAACATGATCTGGG	55	35	25
IL4	ACTCTGTGCACCGAGTTGACCGTAA TCTCATGATCGTCTTTAGCCTTTCC	55	40	13
IL5	TGCCTACGTGTATGCCATCCC CTTGGCCCTCATTCTCACTGC	60	35	25
IL6	ATGAACCTCCTTCTCCACAAGCGC GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG	58	25	22
IL8	CCAAGGAAAACCTGGGTGCAGAG GGC ACA GGG GAA CAA GGA CTT G	60	25	22
IL10	ATCCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA	62	40	13
IFN-γ	TTTAATGCAGGTCATTTCAGATG CTGGGATGCTCTTCGTCCTCGAAAC	55	35	13
CXCL10	CAGCCTCTGTGTGGTCCATCCTTG TGATTTGCTGCCTTATCTTTCTGA	60	35	49
CXCL9	CAGCAGATGTGAAGGAACTG GCATGATGAAATTCAACTGG	57	35	49
TGF-β1	TGGGAAATTGAGGGCTTTTCGCCT GACCTGTGGTTGATAACGAAG	60	40	18
TNF-α	TCTTCTGCCTGCTGCACTTTGG ATCTCTCAGCTCCACGCCATTG	60	30	37

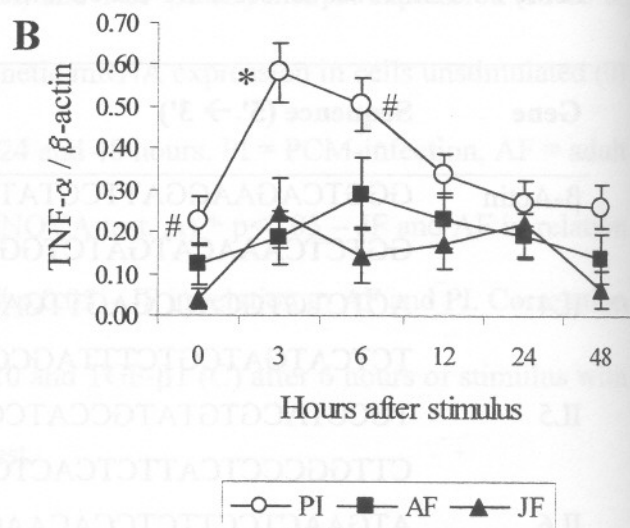
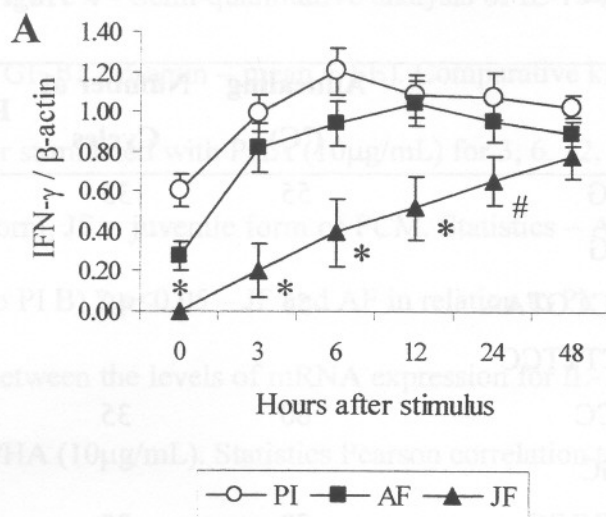


Figure 1

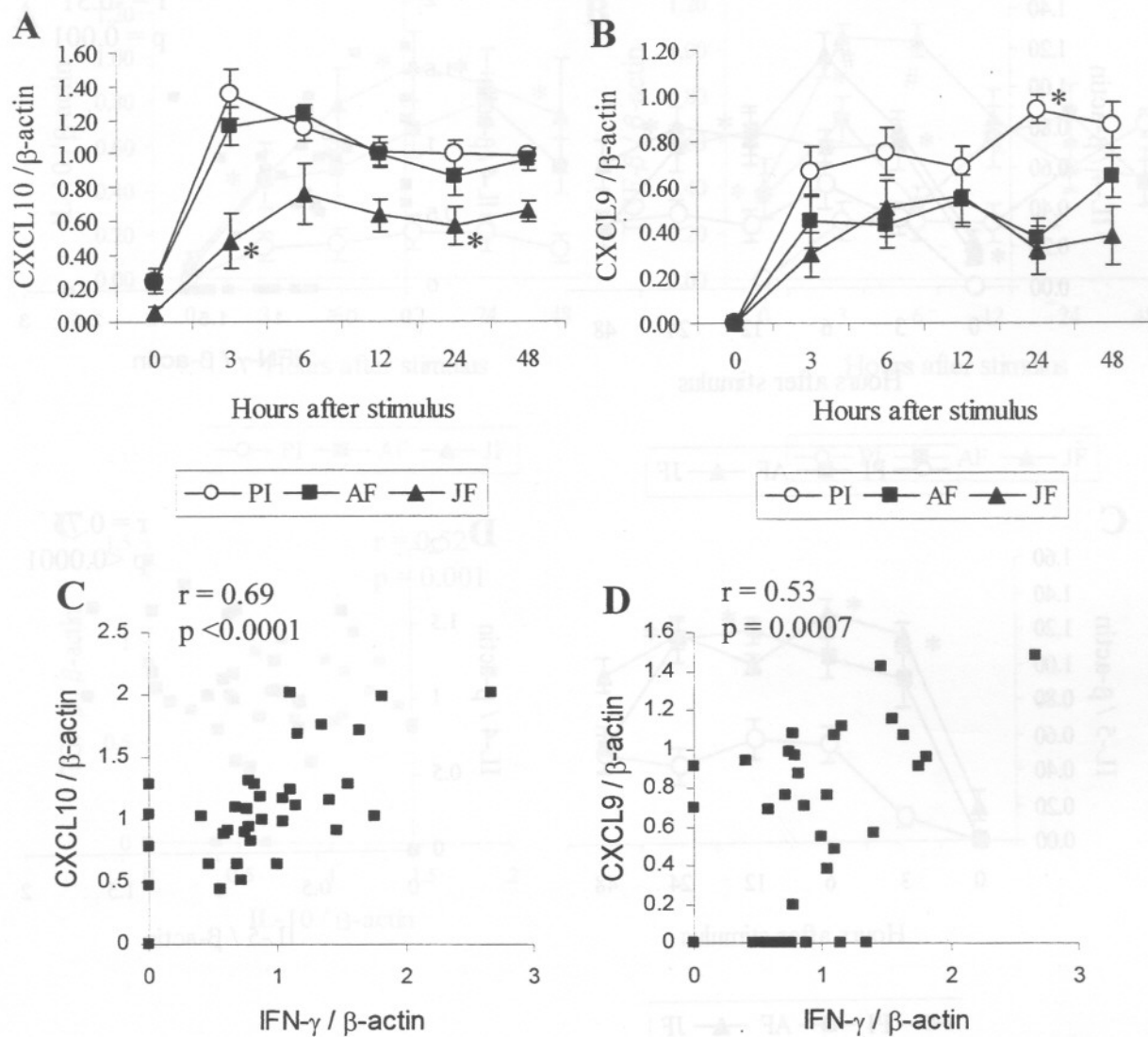


Figure 2

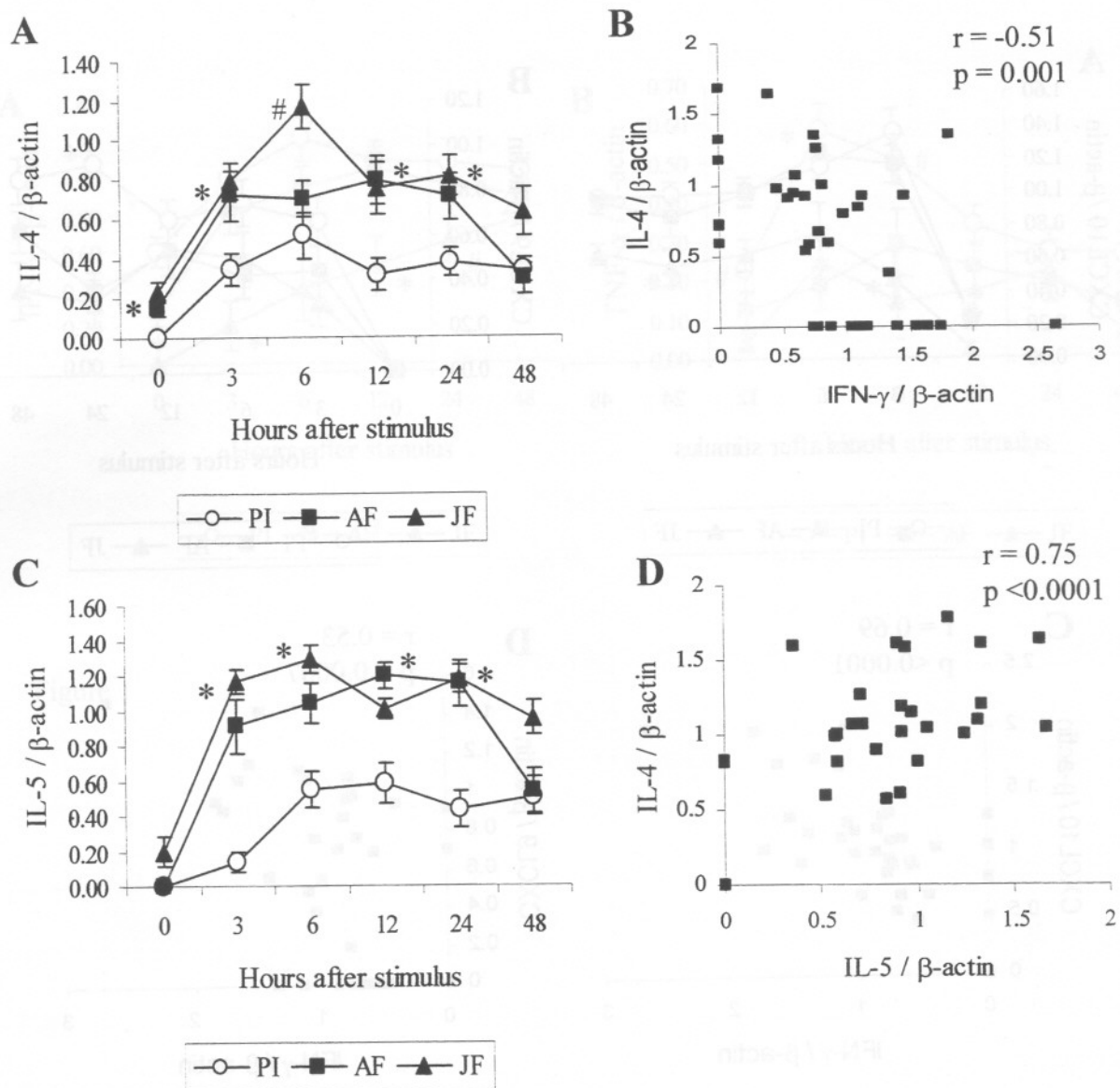


Figure 3

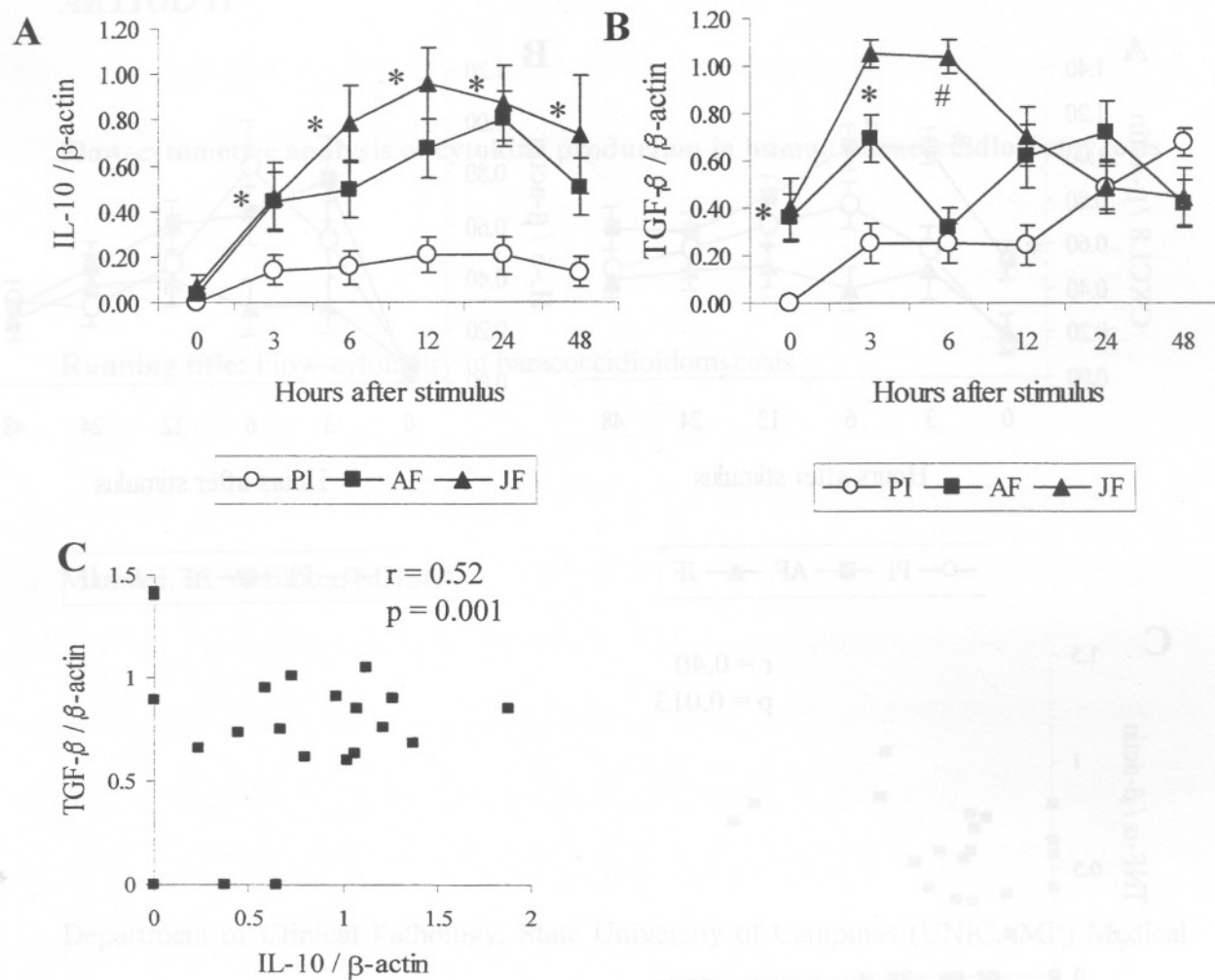


Figure 4

*Correspondence to Maria Heloisa S. L. Blotta, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. Tel/Fax: +55 19 3289 9434
e-mail: hebblotta@fcm.unicamp.br

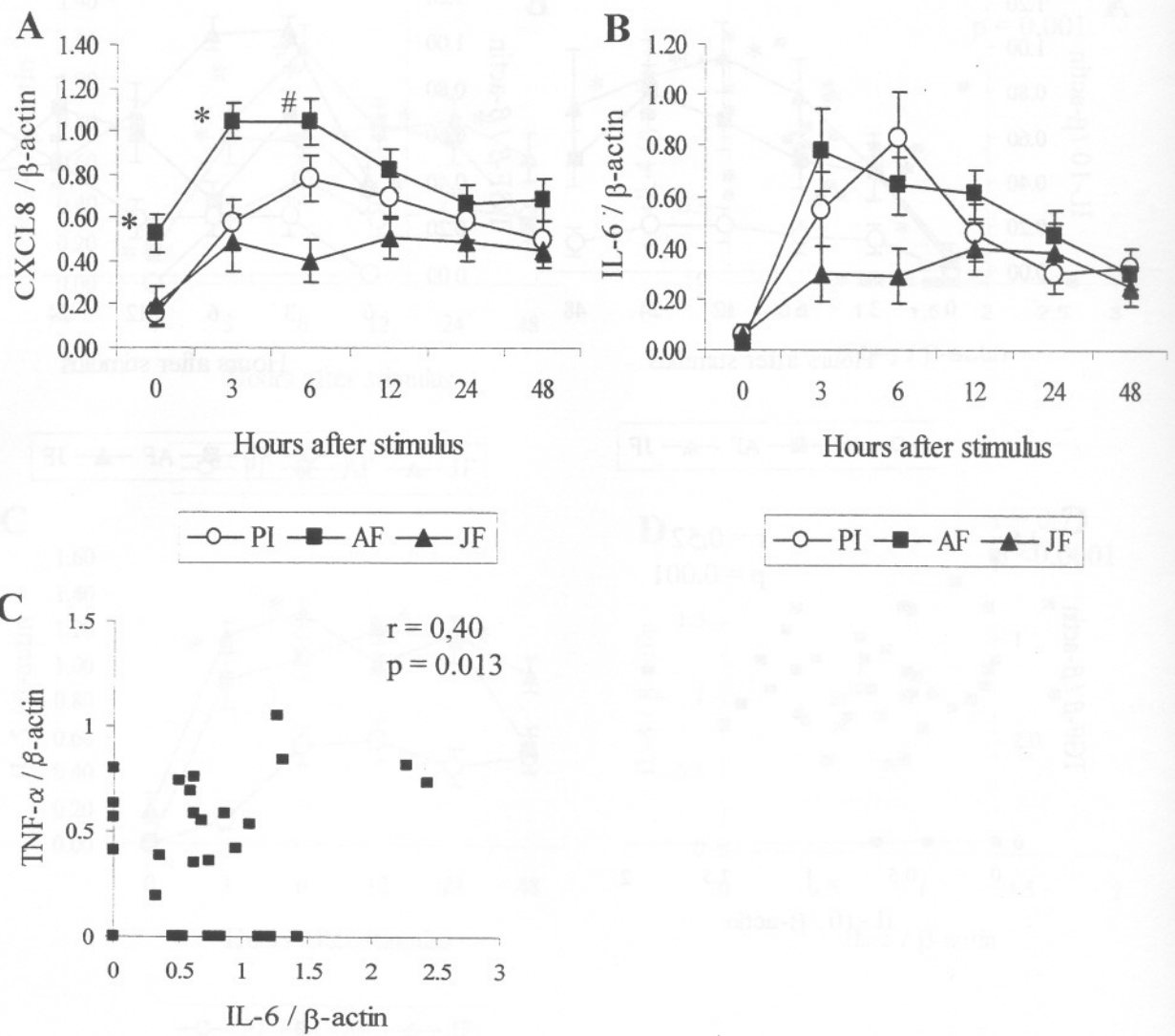


Figure 5

ARTIGO II

Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis

Running title: Flow-cytometry in paracoccidioidomycosis

Mamoni, RL & Blotta, MHSL*

Department of Clinical Pathology, State University of Campinas (UNICAMP) Medical School, Campinas, SP, Brazil

*Correspondence to Maria Heloisa S. L. Blotta, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. Tel/Fax: +55 19 3289 9434
e-mail: heblotta@fcm.unicamp.br

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis restricted to Latin America with high incidence in Brazil. The human infection with *Paracoccidioides brasiliensis* may result in three major outcomes: paracoccidioidomycosis-infection (PI), which is observed in healthy carriers living in endemic areas, adult form (AF) and juvenile form (JF) of PCM.). In this study we proposed to examine intracellular expression of IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-10, IL-12, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients with JF and AF of the disease, as well as of PI group stimulated with PMA plus ionomycin, LPS or anti-CD3 plus anti-CD28, by flow cytometry. The results showed that PI individuals presents a higher percentage of cells producing IFN- γ , TNF- α , IL-2, CXCL9 and CXCL10 when compared to both groups of patients. The production of IFN- γ was predominantly done by CD3⁺CD8⁺ T cells, whereas IL-2 and TNF- α production was higher in CD3⁺CD4⁺ cells. Monocytes of PI individuals also presented higher expression of CD80 and lower expression of CD86 when compared to JF and AF patients, and higher expression of HLA-DR only when compared to JF patients. These results indicate that the differential expression of Th1 or Th2 cytokines observed in the different forms of PCM may modulate the immunological response resulting in the different outcomes observed in this disease.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis restrict to Latin America, most prevalent in rural areas among low-income individuals. This disease is caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a fungus that undergoes thermal dimorphism, developing as mycelium at room temperature and as yeast like cells at 37°C (BRUMMER *et al.*, 1993). The infection probably occurs by the inhalation of fungal particles, which usually leads to an asymptomatic infection (BRUMMER *et al.*, 1993).

PCM presents a broad range of clinical and immunological manifestations, varying from benign and localized to severe and disseminated forms. According to current classification PCM may be divided in three major groups: the asymptomatic infection observed in healthy individuals who live in endemic areas and are positive to paracoccidioidin cutaneous test (PCM-infection [PI]) and two clinical forms of the disease, denominated adult (AF) and juvenile form (JF). The AF almost always affects adult males, who show a high frequency of pulmonary, skin and visceral involvement, whereas the JF equally affects young patients of both sexes and is characterized by systemic lymph node involvement, hepatosplenomegaly and bone marrow dysfunction (FRANCO *et al.*, 1987).

Since Mosmann *et al.* in the 1980s described the existence of two classes of T helper cells that produced different types of cytokines, there was a change in the manner by which the immunological response against infectious diseases is analyzed. The predominance of Th1 cytokines as IFN- γ , IL-2 and TNF- α results in strong cell-mediated immune responses and macrophage activation. On the other hand, Th2

cytokines as IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- β are effective to activate the humoral response but inhibit macrophage activation (MOSMANN *et al.*, 1986; ROMAGNANI, 1991).

Several studies on the immune responses developed by patients with PCM demonstrated that the mild forms of the disease (unifocal AF) were associated with production of low levels of antibodies and positive delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions, whereas the severe disseminated forms (JF or multifocal AF) were associated with high levels of antibodies and anergy in DTH reactions (BENARD *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Recent studies have demonstrated that effective defense against *P. brasiliensis* depends strictly upon Th1 cells and acquired resistance is governed by T cell- and macrophage-activating cytokines, whereas a Th2 pattern has been associated with susceptibility and more severe disease (BENARD *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002). Patients presenting the disseminated forms of disease produce higher levels of type 2 cytokines (IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- β 1) and antibodies (IgE, IgG4, and IgA) in addition to eosinophilia and impaired IFN- γ secretion (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1992; BAIDA *et al.*, 1999; MAMONI *et al.*, 2001; MAMONI *et al.*, 2002, OLIVEIRA *et al.*, 2002). On the other hand, PI individuals present a typical Th1 pattern of cytokines with production of IFN- γ and TNF- α and basal levels of IL-4, IL-5 and IL-10 (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Among the cytokines which are associated to the resistance to PCM, TNF- α and IFN- γ play prominent functions, predominantly activating the oxidative burst in macrophages and maintaining the structural architecture of granuloma (CANO *et al.*, 1998; KARHAWI *et al.*, 2000; ARRUDA *et al.*, 2002; ANJOS *et al.*, 2002). In addition, these cytokines are important to stimulate antigen presenting cells to up regulate the

expression of molecules as the major histocompatibility complex (MHC) of class I and II and the co-stimulatory molecules CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) (CREERY *et al.*, 1996; CANTRELL *et al.*, 1996; MATULONIS *et al.*, 1996).

Several factors may contribute to the development of a Th1 or a Th2 response against an infection, but there is no consensus about this subject in PCM. Host and pathogen genetic background, virulence and the load of fungi in the organism (BRUMMER *et al.*, 1993; FERREIRA *et al.*, 2003), as well as environmental factors influencing the immune response of the host as alcoholism, tobacco smoking and malnutrition are candidates to be considered (LONDERO e RAMOS, 1990; MARTINEZ e MOYA, 1992; dos SANTOS *et al.*, 2003). The development of Th1 and Th2 response depends on the type of cytokine encountered in the milieu in which the differentiation process occurs. A Th1 cell will be generated in presence of IL-12, whereas a Th2 cell will be generated in IL-4 rich environment (MOSMANN *et al.*, 1986; O’GARRA, 1996).

In this study we analyzed by flow-cytometry, the production of several cytokines and chemokines in cells obtained from individuals presenting PCM-infection or PCM-disease (AF or the JF), in response to non-specific stimuli. We found that PI individuals exhibit higher numbers of CD8⁺IFN- γ ⁺, CD4⁺IL-2⁺/TNF- α ⁺ as well as CD3⁺CXCL9⁺/CXCL10⁺/CXCR3⁺ as compared to AF and JF patients. In addition, a very low number of cells expressing IL-10 were detected showing that the resistance to disease observed in PI individuals may be associated to the capacity to mount a predominant Th1 response.

Material and Methods

Subjects

The sample consisted of 38 subjects: 23 patients with newly diagnosed PCM and 15 healthy paracoccidioidin-reactive (PI) individuals living in an endemic area for PCM (Campinas, SP, Brazil). The diagnosis of PCM was established by fungus detection in clinical specimens and serology (immunodiffusion test). The patients were grouped according to clinical form: 8 with the juvenile acute form (JF) and 15 with the chronic adult form (AF) of the disease. This research was approved by the Medical School Ethics Committee of State University of Campinas (UNICAMP) and informed consent was obtained from each participant.

Determination of protein production by flow cytometry.

The production of cytokines and chemokines was determined by intracellular staining using a flow-cytometric technique. Whole blood samples and PBMC obtained by centrifugation of whole blood upon ficoll-hypaque gradient (Amersham Biosciences) were used. The cells were stimulated according to several protocols to obtain the best results for each parameter analyzed. Whole blood samples were stimulated by 6 hours with PMA (50ng/mL – Sigma, St. Louis, USA) plus ionomycin (250ng/mL - Sigma). PBMC were stimulated by 6 or 24 hours with LPS (10µg/mL - Sigma), or with antibodies anti-CD3 plus anti-CD28 (1µg/ml each – R&D Systems, Minneapolis, USA) by 24 hours. All samples were incubated in the last 6 hours with Brefeldin A (1µg/mL - Sigma). Before being submitted to the staining techniques,

the samples of whole blood cells were incubated with FACS Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) by 10 min at room temperature for the lyses of the erythrocytes. For the staining of superficial molecules, the cells were resuspended at 1×10^7 cells/mL in wash buffer (PBS-sodium azide(2mM)-BSA (1%)) and 20 μ L of this suspension was added in 96 wells plates containing the mixture of monoclonal antibodies (anti-CD3 labeled with CyChrome; anti-CD8 labeled with FITC or PE; anti-CD4 and anti-CD68 labeled with FITC; anti-CD80 and anti-CD86 labeled with PE, all from BD Biosciences, and anti-CXCR3 labeled with FITC, from R&D Systems) or the respective isotype controls and the cells were incubated by 30 min at room temperature. The cells were washed with the wash buffer and permeabilized with a solution of saponin (0,5%) for 10 min at room temperature and incubated with the monoclonal antibodies against the intracellular molecules for 30 min at room temperature (anti-IFN- γ labeled with FITC or PE; anti-TNF- α , anti-IL2, anti-CXCL8, anti-IL10 and anti-IL12 labeled with PE, all from BD Biosciences, and anti-CXCL9 and anti-CXCL10 labeled with FITC both from R&D Systems). After the incubation the cells were washed once with the permeabilization buffer and once with the wash buffer and fixed again with 250 μ L of a 2% paraformaldehyde solution. FITC, PE and CyCh labeled control antibodies, as well as control-unstimulated cells, were also included in all experiments. Samples were analyzed with a FACScalibur using the CellQuest software (BD Biosciences) with selection of the lymphocyte and monocyte/macrophage regions (gates). In all cases at least 10 000 gated events were acquired.

Statistical analyses:

The results were analyzed by SigmaStat v1.0 software (Jandel Co). The differences among the groups were analyzed with the ANOVA test. The differences between stimuli were compared with the *t* test for paired samples. Data were considered significant when a *p* value equal or less than 0,05 was obtained.

Results

Production of Th1 cytokines was higher in PI individuals than in AF or JR patients.

For the analysis of the production of cytokines in lymphocytes the cells from individuals of the PI, AF, and JF group were stimulated for 6 hours with PMA plus Ionomycin in presence of Brefeldin A, to induce the production and storage of the cytokines by cells. As PMA has a down regulatory effect in the CD4 expression in cells (ANDERSON e COLECLOUGH, 1993), the determination of this population was obtained by differential gating in flow cytometer, subtracting the CD3⁺CD8⁺ cells from CD3⁺ population. The cell population obtained after this procedure was referred as CD3⁺CD4⁺ cells.

We observed that individuals from PI group presented a higher percentage of cells producing IFN- γ when compared to the AF or JF group, and also that AF patients produced more IFN- γ when compared to JF patients (Figure 1). Of interest, is the fact that the majority of IFN- γ expression was observed in CD3⁺CD8⁺ cells, pointing to an important role of this subset in IFN- γ production.

As lymphocytes from PI individuals present a higher proliferative response to *P. brasiliensis* antigen (OLIVEIRA *et al.*, 2002), when compared to AF or JF patients,

we next examined IL-2 production. We observed, such as for IFN- γ , that the percentage of cells expressing IL-2 was highest in PI group, but contrasting with IFN- γ production, the expression of IL-2 was predominantly in CD3⁺CD4⁺ cells (figure 2).

Besides IFN- γ , TNF- α presents a key role in resistance to PCM, both in granuloma formation and in macrophage activation. Several cell types including lymphocytes and monocytes are able to produce TNF- α . A higher percentage of TNF⁺CD4⁺ cells was detected in PI individuals in relation to AF or JF patients (figure 3B). However similar percentages of TNF⁺CD68⁺ were detected in PI and AF group in both unstimulated and LPS stimulated cells (figure 3C).

Cells from PI, AF and JF groups differentially produce CXC chemokines.

It is well known that IFN- γ is a potent inducer of chemokines CXCL10 and CXCL9 by macrophages (LIAO *et al.*, 1995). We next determined whether CXCL9 and CXCL10 production was up regulated in PBMC among PI individuals. For this set of experiments PBMC were cultured in the presence of anti-CD3 plus anti-CD28 monoclonal antibodies, for 24 hours, in the presence of brefeldina A in the last 6 hours.

We observed that such as for TNF- α , there were differences in the expression of CXCL9 and CXCL10 according to the cells examined. In accordance to the data of IFN- γ , the percentage of CD3⁺CD4⁺ cells producing these chemokines were higher in PI group than in both AF and JF patients. On the other hand, the production of CXCL9 and CXCL10 in monocytes was significantly higher in PI and AF group than in JF patients (figure 4A and B).

CXCL9 and CXCL10 share the same receptor, CXCR3, expressed predominantly in Th1 lymphocytes. The analysis of expression of this receptor in PBMC from the individuals studied showed that CD3⁺ cell from PI group presented higher amounts of cells expressing this receptor in both unstimulated or stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 cells (figure 4C), confirming the data obtained with the chemokines analysis.

In a previous paper we observed a lower production of CXCL8 in sera from JF patients when compared to AF ones (MAMONI *et al.*, 2002). In the present study the analysis of production of this chemokine, confirmed this data, but surprisingly the expression of this chemokine was higher also in comparison to PI individuals (Figure 4D).

Monocytes from AF patients presented high production of both IL-12 and IL-10.

As the cytokines present in the milieu where the cells differentiate are important to subsequent development of a Th1 or a Th2 cytokine, we next aimed to examine the production of IL-12 and IL-4 for the cells of the different groups studied. Unfortunately was impossible to detect IL-4 by flow cytometry in this study, so we decided to analyze the production of another cytokine whose presence may down regulate the Th1 response, the IL-10.

Both IL-10 and IL-12 are produced preferentially by monocytes (CD68⁺ cells), so to examine these cytokines we stimulated the PBMC from individuals with LPS for 24 hours, in presence of brefeldina A in the last 6 hours. We expected to encounter a high production of IL-12 in PI group, since the production of IFN- γ was highest in this

group, but surprisingly the AF patients presented higher production of this cytokine in both unstimulated and LPS stimulated monocytes (CD68⁺ cells), when compared to PI or JF group (figure 5A). In relation to IL-10 production, there was a high production of this suppressive cytokine in both the forms of PCM (AF and JF), mainly in JF group (figure 5B).

There were a differential expression of the co-stimulatory molecules in cells from PI, AF and JF individuals

To the development of an effective immunological response is essential the participation of the antigen presenting cells (APC), as providing the “first” signal through the MHC-antigen complex, as furnishing the “second” signal through co-stimulatory molecules. The most important co-stimulatory molecules known are CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2). To address this aspect of immunological response in human PCM, we analyzed the expression of HLA-DR (MHC of class II), CD80 and CD86 in monocytes of PI, AF and JF individuals.

We found that the expression of CD80 and CD86 was differentially controlled in the cells of the individuals studied. CD80 molecules were higher in monocytes of AF patients in relation to PI individuals when analyzing the unstimulated cells, but after stimulation with LPS for 6 hours, there are a huge induction of this molecule in PI group (figure 6A). On the other hand, CD86 was expressed in higher levels in both AF and JF group when compared to PI group in both unstimulated and LPS stimulated monocytes (CD68⁺ cells) (figure 6B).

In relation to expression of HLA-DR, in despite of the high expression of this molecule in all the groups studied, there were a significantly higher percentage of cells expressing this molecule in PI group in unstimulated cells, when compared to the expression in the cells from AF ou JF groups (figure 6C).

Discussion

Intracellular detection of cytokines by flow cytometry has been used in several studies, however, to our knowledge, no report concerning to this kind of analysis has been done in human PCM.

In this study we showed that PI individuals are able to produce high amounts of Th1 cytokines, as IFN- γ , following stimulation. IFN- γ is the main macrophage-activating cytokine which initiates and/or drive the Th1 cell response and direct the assembly of tissue granuloma in addition to TNF- α . The analysis of the expression of surface markers, showed that the cells expressing IFN- γ were mainly CD3⁺CD8⁺. The importance the CD8 subset in response to *P. brasiliensis* infection was recently showed in the experimental model, in which the depletion of CD8⁺ T lymphocytes resulted in the enhancement of the severity and dissemination of the disease, in both susceptible and resistant mice (CANO *et al.*, 2000). A diminished CD4/CD8 ratio was observed in peripheral blood of patients with PCM associated to (BAVA *et al.*, 1991). Moreover, patients presenting pulmonary PCM showed high number of CD8⁺ T cells in bronchoalveolar lavage (BAL), which correlated positively with the production of CCL3 (FORNAZIM *et al.*, 2003), a chemokine known to promote

chemotaxis of lymphocytes, selectively recruiting CD8⁺ T cells (SCHALL *et al.*, 1993; COOK *et al.*, 1999).

IFN- γ producing CD8⁺ T cells are described as having a critical role in several in diseases caused by *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi*, *Pneumocystis* and *Histoplasma capsulatum* (LALVANI *et al.*, 1998; LAMPE *et al.*, 1998; TASCON *et al.*, 1998; SERBINA *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002; HERATH *et al.*, 2003; COLMENARES *et al.*, 2003). CD8⁺ T lymphocytes that produced cytokines as IFN- γ and TNF- α are called Tc1 and those that produced IL-4 are called Tc2. The differentiation process of these cells apparently follow the same mechanisms as for CD4⁺ T cells. So the presence of IL-12 or IL-4 in the milieu in which the cells differentiate to determine the pattern of Tc1 or Tc2 respectively (NOBLE *et al.*, 1995; SEDER e GROS, 1995; VILLACRES e BERGMANN, 1999; CHANG *et al.*, 2004).

Besides the IFN- γ production, we found that cells from PI group presented higher expression of IL-2, when compared to the both clinical forms of PCM, and the production of this cytokine had been found mainly in CD4⁺ cells. In a previous study we showed that PI individuals presented a huge proliferative response against *P. brasiliensis* antigen (OLIVEIRA *et al.*, 2002), so the high production of IL-2 by lymphocytes of PI group may explain these data.

The higher expression of chemokine CXCL10 and CXCL9 corroborates the production of IFN- γ by cells in PI individuals. CXCL10 and CXCL9 are IFN- γ inducible and very effectively attract activated T lymphocytes (LIAO *et al.*, 1995). Both chemokines signal through a common receptor, CXCR3, expressed by memory (CD45RO⁺) T cells, preferentially of the Th1 subset, and by natural killer cells, but not by

monocytes or neutrophils (LIAO *et al.*, 1995; LOETSCHER *et al.*, 1996; FARBER, 1997; SALLUSTO *et al.*, 1998; SALLUSTO *et al.*, 1999; ROMAGNANI *et al.*, 2001). In accordance CCR3 was expressed in higher levels in T cells from PI group than JF or AF patients. SOUTO *et al.* (2003) showed that IFN- γ modulates the expression of chemokine and chemokine receptors and determines the cells that infiltrate the lungs of mice infected with *P. brasiliensis*. In this model, mice presented high production of CCL5, CCL2, CXCL10 and CXCL9, simultaneously with mononuclear cell infiltration in the lungs.

Chemokine and chemokine receptors, in addition to IFN- γ and TNF- α , play an important role in granulomatous inflammatory reactions. In PCM, TNF- α has also been implicated in the formation of the compact granuloma accounting for the resistance to infection (KAUFMANN, 2001; DINIZ *et al.*, 2001). Besides its role in the inflammatory process, TNF- α acts synergistically with IFN- γ in the activation of the cellular immune response (XING *et al.*, 2000). In the present study, TNF- α was expressed at different levels according to the cellular population analyzed. The production of TNF- α by CD3⁺ cells was predominant in PI group, while in CD68⁺ cells (monocytes) the production in AF group was similar to that observed in PI group in both unstimulated or LPS stimulated cells.

The cells from AF patients also presented the highest levels of CXCL8 expression as compared to the other groups. CXCL8 contains a conserved tripeptide motif glutamic acid–leucine–arginine (ELR) at the N-terminal of the protein, that enable it to attract neutrophils (ROLLINS, 1997). Neutrophils participate in the inflammatory response to *P. brasiliensis* through the release of oxygen-derived products and

endogenous peroxidase localized in cytoplasmic granules. These processes lead to killing of both ingested and extracellular *P. brasiliensis* yeast cells (BRUMMER, 1989; GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1989; MELONI-BRUNERI *et al.*, 1996). In a previous study we showed that AF patients presented higher serum levels of CXCL8 than JF patients (MAMONI *et al.*, 2002). Furthermore neutrophilic abscesses are a common finding in oral mucosa lesions of AF patients (NEWORAL *et al.*, 2003).

Another interesting finding of this study was the higher production of IL-12 by monocytes of AF patients when compared to the others groups. IL-12 is the principal inducer of IFN- γ production (FIESCHI e CASANOVA, 2003), and for that reason we expected that it would be produced in high levels by cells from PI individuals. However the increased production of IL-12 by patients with the AF, perhaps may explain the production of IFN- γ by this group despite that presence of Th2 cytokines.

IL-10, first recognized for the ability to inhibit activation and effector function of T cells, monocytes, and macrophages, is a multifunctional cytokine with diverse effects on most hemopoietic cell types (PETSKA *et al.*, 2004). IL-10 is thought to promote intracellular infection by disabling Th1 cell-type response and/or deactivating infected tissue macrophages. The major function of IL-10 is to limit and ultimately terminate inflammatory responses (PETSKA *et al.*, 2004). IL-10 is an important mediator of the inhibition of nitric oxide (NO) diminishing the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS), an enzyme induced by IFN- γ and TNF- α (PETSKA *et al.*, 2004). Although its role in human infection is unknown, NO has a fungicidal role in *P. brasiliensis* infection in mice (BOCCA *et al.*, 1998; GONZALES *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2002). In this study we found that monocytes (CD68⁺

cells) from both AF and JF of PCM presented higher levels of expression of this cytokine, whereas PI group present basal levels of expression. These results confirm our previous data, in which cells from AF or JF patients stimulated in vitro with *P. brasiliensis* antigen produced higher levels of IL-10 when compared to PI individuals (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

The expression of the surface markers CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) and HLA-DR (MHC class II), also presented differences among the groups studied. We observed that after stimulus there was a great number of cells from PI group expressing CD80 when compared to AF or JF groups. On the other hand, the number of cells expressing CD80 in this group diminished significantly in this group. The expression of HLA-DR in cells of PI group was higher in both unstimulated or LPS stimulated cells when compared to JF group. Several studies showed that the co-stimulation of cells through CD80 or CD86 may be important to the development of a Th1 or a Th2 response (CREERY *et al.*, 1996; MOSER, 2001). The expression of CD80 has been associated to a predominant Th1 response with the activation of CD8⁺ cells (MAURI e PICHLER, 1996; LANG *et al.*, 2002), while the co-stimulation through CD86 would be involved in the production of IL-4, hence in the Th2 response (BROWN *et al.*, 1996; RANGER *et al.*, 1996; LANG *et al.*, 2002). Th2 cytokines as IL-4 and IL-10 induce the downregulation of CD86, while IFN- γ increase the expression of both CD80 and CD86, as well as of the HLA-DR. On the other hand TNF- α suppress the expression of CD86, but not interfere with the expression of CD80 (DINARELLO, 2000; OPAL e DE PALO, 2000).

Since the differentiation of T cells is dependent, among other factors, on the cytokine present in the milieu where the immune response takes place, the co-

stimulatory molecules involved in the antigen presentation and the chemokines involved in differential homing of cells, these findings suggest that the differential patterns of production of cytokines and chemokines observed in this study may significantly influence the outcome of PCM infection.

Acknowledgements

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grants 01/00332-6 and 02/05608-0.

Legends to the figures

Figure 1 – IFN- γ production by PBMC from PCM-infection (PI), adult (AF) or juvenile form of PCM (JF) after stimulation with PMA (50ng/mL) plus ionomycin (250ng/mL) for 6 hours in presence of brefeldin A (1 μ g/mL). **A)** Representative dot-plots of CD3⁺ or CD8⁺ cells expressing IFN- γ . Percentage of positive cells for the respective quadrants are indicated in each plot. **B)** Percentage of CD3⁺IFN- γ ⁺, CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺ and (CD3⁺IFN- γ ⁺) minus (CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺) cells from PCM-infection (PI), adult (AF) or juvenile form (JF) of PCM stimulated with PMA plus ionomycin. The cells were gated in lymphocyte region according to their SSC and FSC characteristics. The bars represent the mean plus SE. Statistics: ANOVA test, * p<0.05.

Figure 2 – IL-2 production by PBMC from PCM-infection (PI), adult (AF) or juvenile form of PCM (JF) after stimulation with PMA (50ng/mL) plus ionomycin (250ng/mL) for 6 hours in presence of brefeldin A (1µg/mL). **A)** Representative dot-plots of CD3⁺ or CD8⁺ cells expressing IL-2. Percentage of positive cells for the respective quadrants are indicated in each plot. **B)** Percentage of CD3⁺IL-2⁺, CD3⁺CD8⁺IL-2⁺ and (CD3⁺IL-2⁺) minus (CD3⁺CD8⁺IL-2⁺) cells from PCM-infection (PI), adult (AF) or juvenile form (JF) of PCM stimulated with PMA plus ionomycin. The cells were gated in lymphocyte region according to their SSC and FSC characteristics. The bars represent the mean plus SE. Statistics: ANOVA test, * p<0.05.

Figure 3 – TNF-α production by PBMC from PCM-infection (PI), adult (AF) or juvenile form of PCM (JF) after stimulation with PMA (50ng/mL) plus ionomycin (250ng/mL) or LPS (10µg/mL) for 6 hours in presence of brefeldin A (1µg/mL). **A)** Representative dot-plots of CD3⁺, CD8⁺ or CD68⁺ cells expressing TNF-α. Percentage of positive cells for the respective quadrants are indicated in each plot. **B)** Percentage of CD3⁺TNF-α⁺, CD3⁺CD8⁺TNF-α⁺ and (CD3⁺TNF-α⁺) minus (CD3⁺CD8⁺TNF-α⁺) cells from PCM-infection (PI), adult (AF) or juvenile form (JF) of PCM stimulated with PMA plus ionomycin. **C)** Percentage of CD68⁺TNF-α⁺ unstimulated or stimulated with LPS. The cells were gated in lymphocyte or monocyte region according to their SSC and FSC characteristics. The bars represent the mean plus SE. Statistics: ANOVA test, * p<0.05. Note the different scales.

Figure 4 – Expression of chemokines (CXCL9, CXCL10 and CXCL8) and CXCR3 in lymphocytes (CD3⁺ cells) or monocytes (CD68⁺ cells) from individuals presenting PCM-infection (PI) and the adult (AF) or the juvenile form (JF) of PCM. Percentage of CD3⁺ or CD68⁺ cells expressing CXCL9 (**A**) or CXCL10 (**B**) after stimulation with anti-CD3 plus anti-CD28 monoclonal antibodies (1µg/mL of each for 24 hours) in presence of brefeldin A (1µg/mL) in the last 6 hours. **C**) Expression of the chemokine receptor CXCR3 in lymphocytes (CD3⁺) unstimulated or stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 for 24 hours. **D**) Percentage of monocytes (CD68⁺ cells) positive for CXCL8, unstimulated or stimulated with LPS for 6 hours. The cells were gated in lymphocyte or monocyte region according to their SSC and FSC characteristics. The bars represent the mean plus SE. Statistics: ANOVA test, * p<0.05. Note the different scales.

Figure 5 – Expression of IL-12 and IL-10 in monocytes (CD68⁺ cells) from individuals presenting PCM-infection (PI) and the adult (AF) or the juvenile form (JF) of PCM. Percentage of CD68⁺ cells expressing IL-12 (**A**) or IL-10 (**B**) after stimulation with LPS (10µg/mL) for 24 hours in presence of brefeldin A (1µg/mL) in the last 6 hours. The cells were gated in monocyte region according to their SSC and FSC characteristics. The bars represent the mean plus SE. Statistics: ANOVA test, * p<0.05. Note the different scales.

Figure 6 – Expression of CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) and HLA-DR in monocytes (CD68⁺ cells) from individuals presenting PCM-infection (PI) and the adult (AF) or the juvenile form (JF) of PCM. Percentage of CD68⁺ cells expressing CD80 (**A**), CD86 (**B**) and HLA-DR (**C**) in cells unstimulated or after stimulation with LPS (10µg/mL) for 24 hours. The cells were gated in monocyte region according to their SSC and FSC characteristics. The bars represent the mean plus SE. Statistics: ANOVA test, * p<0.05. Note the different scales.

References

- ANDERSON, S. J.; COLECLOUGH, C. Regulation of CD4 and CD8 expression on mouse T cells: active removal from the cell surface by two mechanisms. **J Immunol**, 151(10): 5123-34, 1993.
- ANJOS, A. R.; CALVI, S. A; FERRACINI, R.; PERAÇOLI, M. T.; SILVA, C. L.; SOARES, A. M. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. **Med Mycol**, 40: 377-82, 2002.
- ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. *et al.* Interleukin 12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin Immunol**, 103:185-95, 2002.

BAIDA, H.; BISELLI, P. J.; JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J.; *et al.* Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect**, 1(4): 273-8, 1999.

BAVA, A. J.; MISTCHENKO, A. S.; PALACIOS, M. F.; ESTEVEZ, M. E.; TIRABOSCHI, N. I.; SEM, L.; NEGRONI, R.; DIEZ, R. A. Lymphocyte subpopulation and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. **Microbiol Immunol**, 35: 167-74, 1991.

BENARD, G.; ROMANO, C. C.; CACERE, C. R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, 13 (4): 248-52, 2001.

BOCCA, A. L.; HAYASHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURLANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; *et al.* Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J Immunol**, 161(6): 3056-63, 1998.

BROWN, J. A.; TITUS, R. G.; NABAVI, N.; GLIMCHER, L. H. Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response. **J Infect Dis**, 174(6): 1303-8, 1996.

BRUMMER, E. The role of neutrophils and macrophages in host resistance to systemic fungal infections. **Immunol Ser**, 47: 273-89, 1989.

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

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M. *et al.* Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, 66: 800-6, 1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; COSTA, T. A.; MENGEL, J. O.; XIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; *et al.* Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**, 68(1): 352-9, 2000.

CANTRELL, D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. **Ann Rev Immunol**, 14:259-74, 1996.

CHANG, J.; CHO, J. H; LEE, S. W.; CHOI, S. Y.; HÁ, S. J.; SUNG, Y. C. IL-12 priming during in vitro antigenic stimulation changes properties of CD8 T cells and increases generation of effector and memory cells. **J Immunol**, 172: 2818-26, 2004.

COLMENARES, M.; KIMA, P. E.; SAMOFF, E.; SOONG, L.; MCMAHON-PRATT, D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. **Infect Immun**, 71(6): 3172-82, 2003.

COOK, D. N.; SMITHIES, O.; STRIETER, R. M.; FRELINGER, J. A; SERODY, J. S. CD8+ T cells are a biologically relevant source of macrophage inflammatory protein-1 α in vivo. **J Immunol**, 162:5423-8, 1999.

CREERY, W. D.; DIAZ-MITOMA, F.; FILION, L.; KUMAR, A. Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. **Eur J Immunol**, 26(6): 1273-7, 1996.

DINIZ, S.N.; CISALPINO, P.S.; FREIRE, A.T.; SILVA-TEIXEIRA, D.N.; CONTIGLI, C.; RODRIGUES JUNIOR, V.; et al. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Hum Immunol**, 62(8): 799-808, 2001.

FARBER, J. M. MIG and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **J Leukoc Biol**, 61(3): 246-57, 1997.

FERREIRA, K. S.; LOPES, J. D.; ALMEIDA, S. R. Regulation of T helper cell differentiation in vivo by gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* provided by different antigen-presenting cells. **Scand J Immunol**, 58(3): 290-7, 2003.

FIESCHI, C.; CASANOVA, J. L. The role of interleukin-12 in human infectious diseases: only a faint signature. **Eur J Immunol**, 33(6): 1461-4, 2003.

FORNAZIM, M. C.; BALTHAZAR, A.; QUAGLIATO, R.; MAMONI, R. L.; GARCIA, C.; BLOTTA, M. H. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. **Eur Respir J**, 22: 895-9, 2003.

FRANCO, M. F.; MONTENEGRO, M. R. G.; MENDES, R. P.; MARCOS, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, 20: 129-32, 1987.

GOIHMAN-YAHR, M.; ROTHENBERG, A.; BRETANA, A.; ISTURIZ, G.; ROSQUETE, R.; AVILA-MILLAN, E.; *et al.* Digestion of killed *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. **Mycopathologia**, 106(1): 53-8, 1989.

GONZALEZ, A.; de GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infect Immun**, 68(5): 2546-52, 2000.

HERATH, S.; KROPF, P.; MULLER, I. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. **Parasite Immunol**, 25(11-12): 559-67, 2003.

KARHAWI, A. S.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med Mycol**, 38: 225-9, 2000.

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, 1(1): 20-30, 2001.

LALVANI, A.; BROOKS, R.; WILKINSON, R. J.; MALIN, A. S.; PATHAN, A. A.; ANDERSEN, P.; DOCKRELL, H.; PASVOL, G.; HILL, A. V. S. Human cytolytic and interferon-gamma-secreting CD8⁺ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95: 270-5, 1998.

LAMPE, M. F.; WILSON, C. B. BEVAN, M. J.; STARNABACH, M.N. Gamma-interferon production by cytotoxic T lymphocytes is required for resolution of *Chlamydia trachomatis* infection. **Infect Immun**, 66: 5457-61, 1998.

LANG, T. J.; NGUYEN, P.; PEACH, R.; GAUSE, W. C.; VIA, C. S. *In vivo* CD86 blockade inhibits CD4⁺ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8⁺ T cell activation and CTL effector function. **J Immunol**, 168(8): 3786-92, 2002.

LIAO, F.; RABIN, R. L.; YANNELLI, J. R.; KONIARIS, L. G.; VANGURI, P.; FARBER, J. M. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. **J Exp Med**, 182(5): 1301-14, 1995.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Paracoccidioidomicose: estudo clínico-micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **J Pneumol**, 16: 129-32, 1990.

MA, L. L.; SPURRELL, J. C.; WANG, J. F.; NEELY, G. G.; EPELMAN, S.; KRENSKY, A. M.; *et al.* CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. **J Immunol**, 169(10): 5787-95, 2002.

MAMONI, R. L.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P.; BLOTTA, M. H. S. L. A capture ELISA assay to detect specific IgE in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, 65: 237-41, 2001.

MAMONI, R. L.; NOUER, S. A.; OLIVEIRA, S. J.; MUSATTI, C. C.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P. *et al.* Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, 40: 153-9, 2002.

MARTINEZ, R.; MOYA, M. J. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. **Rev Saúde Pública**, 26: 12-6, 1992.

MATULONIS, V.; DOSIOU, C.; FREEMAN, G.; LAMONT, C.; MAUCH, P.; NADLER, L. M.; GRIFFIN, J. D. B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct. **J. Immunol**, 156(3): 1126-31, 1996.

MAURI, D.; PICHLER, W. J. Involvement of CD80 in the generation of CD4+ cytotoxic T cells. **Immunol Res**, 15(2): 126-40, 1996.

MELONI-BRUNERI, L. H.; CAMPA, A.; ABDALLA, D. S.; CALICH, V. L.; LENZI, H. L.; BURGER, E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J Leukoc Biol**, 59(4): 526-33, 1996.

MOSER, M. Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells in vivo. **Immunobiology**, 204(5): 551-7, 2001.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, 136(7): 2348-57, 1986.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J Immunol**, 168(9): 4593-600, 2002.

NEWORAL, E. P. M.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R. L.; NORONHA, I. L.; BLOTTA, M. H. S. L. Immunocytochemical localization of cytokines and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, 21: 234-40, 2003.

NOBLE, A.; MACARY, P. A.; KEMESY, D. M. IFN- γ and IL-4 regulate the growth and differentiation of CD8⁺ T cells into subpopulations with distinct cytokine profiles. **J immunol**, 155: 2928-37, 1995.

O'GARRA, A. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. **Chem Immunol**, 63: 1-13, 1996.

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAIORDANOU, P. M.; BLOTTA, M. H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect**, 4(2): 139-44, 2002.

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**, 22: 929-79, 2004.

RANGER, A. M.; DAS, M. P.; KUCHROO, V. K.; GLIMCHER, L. H. B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells. **Int Immunol**, 8(10): 1549-60, 1996.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, 90(3): 909-28, 1997.

ROMAGNANI, S. Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. **Immunol. Today** 12: 256-7, 1991.

ROMAGNANI, P.; ANNUNZIATO, F.; LAZZERI, E.; COSMI, L.; BELTRAME, C.; LASAGNI, L.; *et al.* Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCRgammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. **Blood**, 97(3): 601-7, 2001.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunol Today**, 19(12): 568-74, 1998.

SALLUSTO, F.; PALERMO, B.; HOY, A.; LANZAVECCHIA, A. The role of chemokine receptors in directing traffic of naive, type 1 and type 2 T cells. **Curr Top Microbiol Immunol**, 246:123-9, 1999.

dos SANTOS, W. A.; da SILVA, B. M.; PASSOS, E. D.; ZANDONADE, E.; FALQUETO, A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espirito Santo, Brazil. **Cad Saude Publica**, 19(1): 245-53, 2003.

SCHALL, T. J.; BACON, K.; CAMP, R. D. R.; KASPARI, J. W.; GOEDDEL, D. V. Human macrophage inflammatory protein- α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes. **J. Exp. Med.** 177: 182, 1993.

SEDER, R. A.; LE GROS, G. G. The functional role of CD8⁺ T helper type 2 cells. **J Exp Med**, 181: 5-7, 1995.

SERBINA, N. V.; LAZAREVIC, V.; FLYNN, J. L. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, 167(12): 6991-7000, 2001.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; HIGAKI, Y.; UIP, D. E.; MORI, N. S.; DEL NEGRO, G.; MELO, N. T.; HUTZLER, R. U.; AMATO-NETO, V. Bone marrow involvement and eosinophilia in paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 34(2): 85-90, 1992.

TASCON, R. E.; STAVROPOULOS, E.; LUKACS, K. V.; COLSTON, M. J. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8⁺ T cells requires the production of gamma interferon. **Infect Immun**, 66(2): 830-4, 1998.

VILLACRES, M. C.; BERGMANN, C. C. Enhanced cytotoxic T cell activity in IL-4-deficient mice. **J Immunol**, 162: 2663-70, 1999.

XING, Z.; ZGANIACZ, A.; SANTOSUOSSO, M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. **J Leukoc Biol**, 68(6): 897-902, 2000.

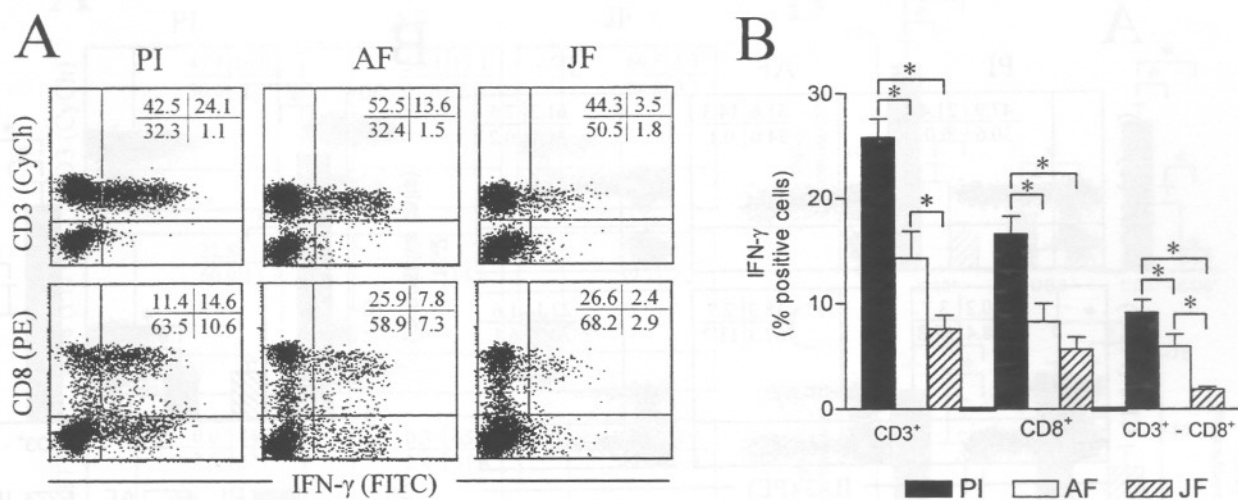


Figure 1

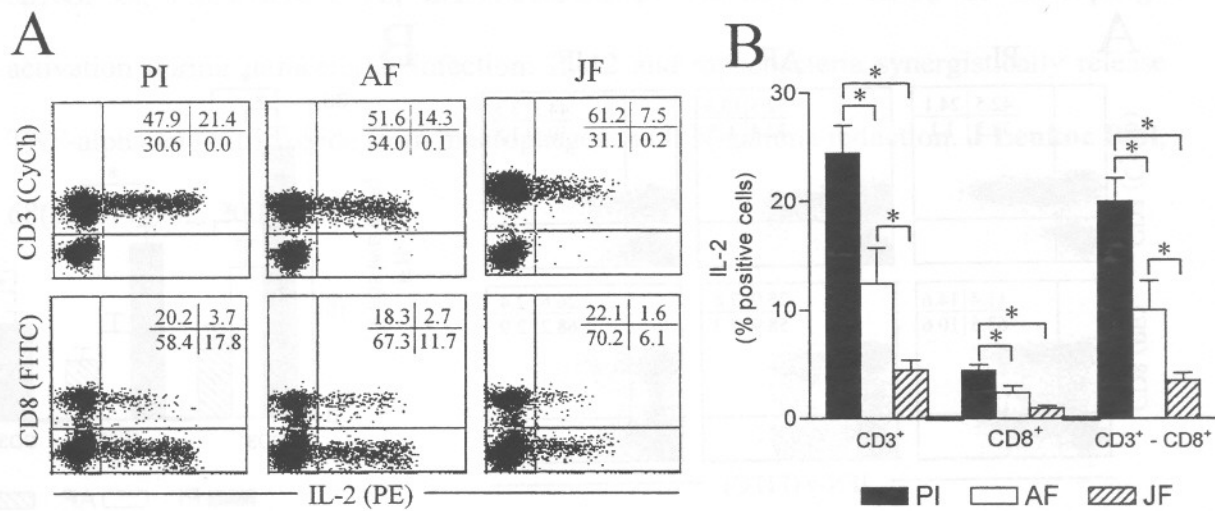


Figure2

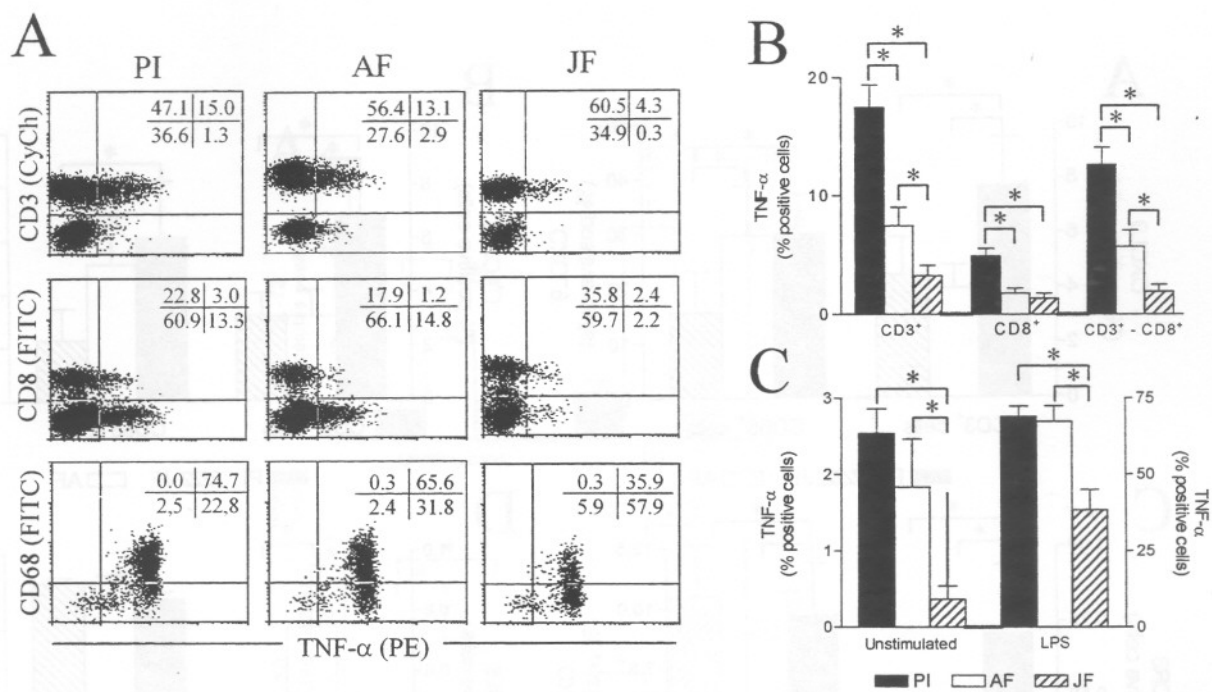


Figure3

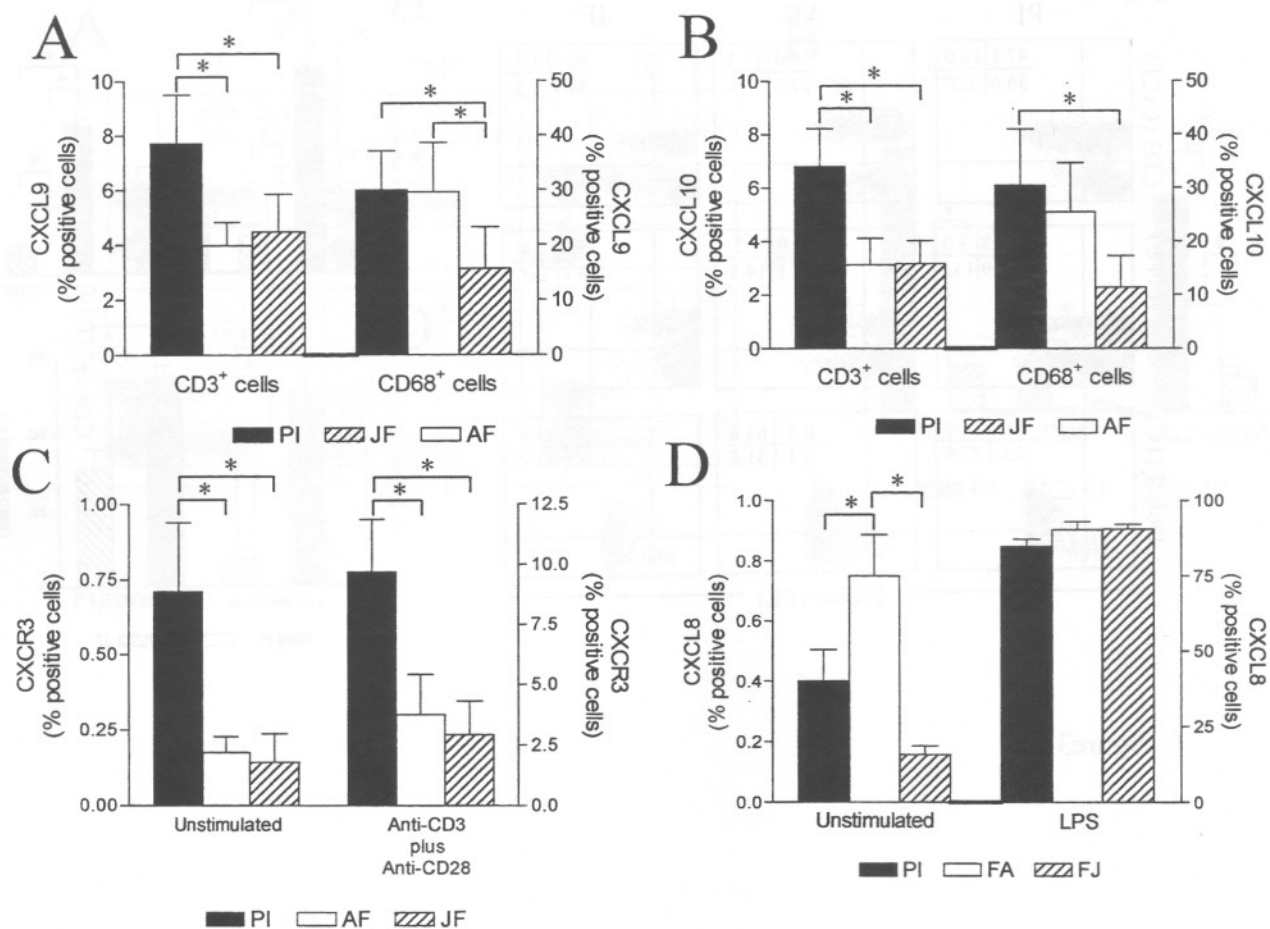


Figure 4

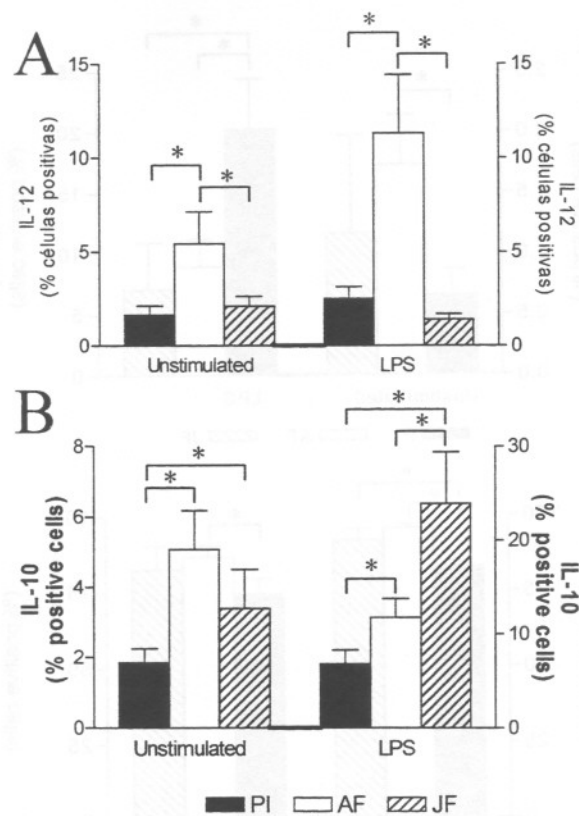


Figure 5

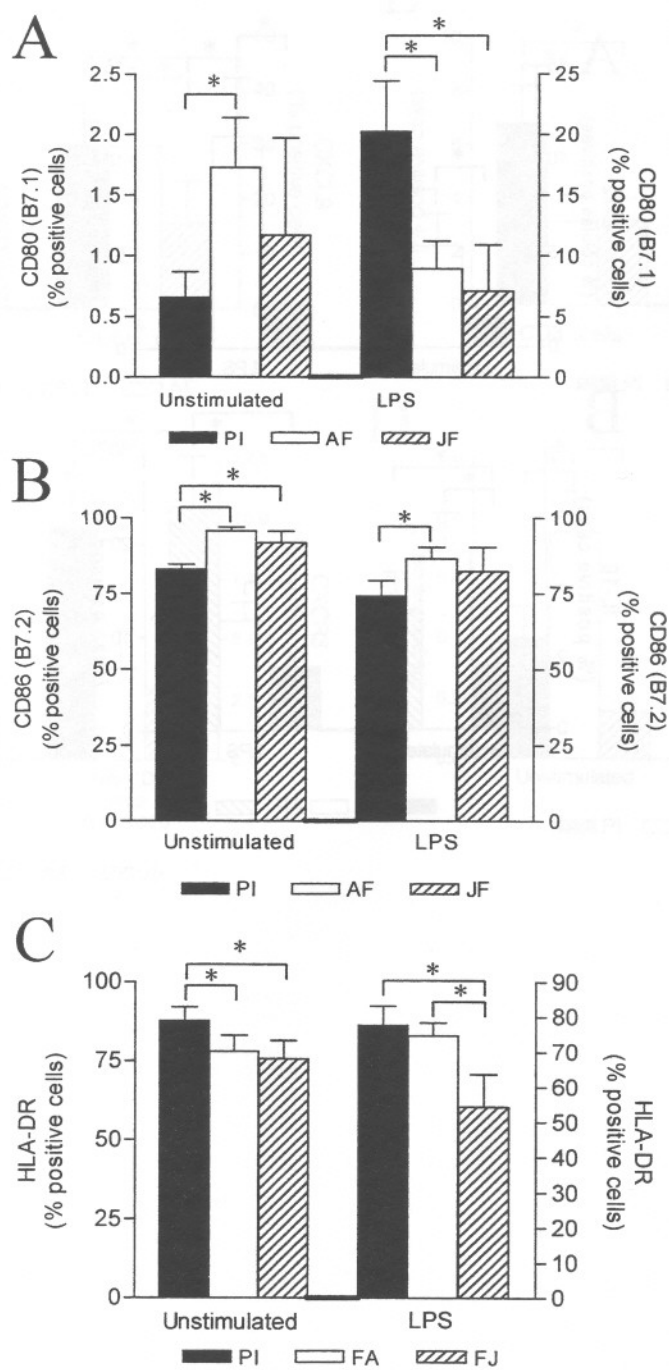


Figure 6