

**LANNY CRISTINA BURLANDY-SOARES**

**AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO E DA  
PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS CITOTÓXICAS POR  
LINFÓCITOS (CD4<sup>+</sup> E CD8<sup>+</sup>) DO SANGUE PERIFÉRICO  
DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

**LANNY CRISTINA BURLANDY-SOARES**

**AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO E DA  
PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS CITOTÓXICAS POR  
LINFÓCITOS (CD4<sup>+</sup> E CD8<sup>+</sup>) DO SANGUE PERIFÉRICO  
DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

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  
Ciências Biomédicas

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA HELOÍSA SOUZA LIMA BLOTTA**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2008**

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

So11a Soares, Lanny Cristina Burlandy  
Avaliação da produção de moléculas citotóxicas por linfócitos (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose / Lanny Cristina Burlandy Soares. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Paracoccidiodomicose. 2. Células T. 3. Citometria de fluxo.  
4. Interleucina -15. I. Blotta, Maria Heloísa Souza Lima.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Evaluation of cytotoxic molecules production by peripheral blood lymphocytes (CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>) of patients with paracoccidiodomycosis**

**Keywords:** • Paracoccidiodomycosis  
• T cells  
• Flow Cytometry  
• Interleukin -15

**Titulação: Doutor em Ciências Médicas**

**Área de concentração: Ciências Médicas**

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta**

**Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares**

**Profa. Dra. Eva Burguer**

**Profa. Dra. Liana Verinaud**

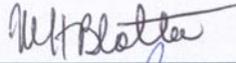
**Prof. Dr. Plínio Trabasso**

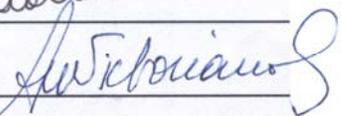
**Data da defesa: 29 - 02 - 2008**

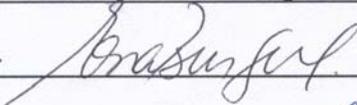
## Banca examinadora da tese de Doutorado

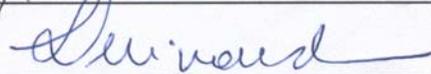
**Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maria Heloísa Souza Lima Blotta**

### Membros:

1. **Profa. Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta** – 

2. **Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares** – 

3. **Profa. Dra. Eva Burger** – 

4. **Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud** – 

5. **Prof. Dr. Plínio Trabasso** – 

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

**Data: 29/02/2008**

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).

À  
*minha família,*  
*Lineu,*  
*Lucas e*  
*Laura*  
*pelo apóio e*  
*compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

---

A Deus por me permitir chegar até aqui.

À Profa. Dra. Maria Heloísa Blotta, por me receber em seu laboratório, me dar à oportunidade de realizar este trabalho e por acreditar que eu seria capaz de atingir o objetivo e superar os desafios. Quero também agradecer sua amizade e disposição de me orientar em todas as circunstâncias. Sinceramente, muito obrigada.

A minha família, especialmente ao Lineu meu marido por seu apoio incondicional e aos meus filhos Lucas e Laura pelo carinho e compreensão, sem a ajuda de vocês esse trabalho não seria realidade.

Aos meus pais Jorge e Ednice pelo exemplo, inspiração e apoio irrestrito e aos meus irmãos George, Roger e Evelin pela torcida.

Aos meus sogros, familiares e amigos pela amizade sincera e por todo auxílio.

Ao Ronei, por sua importante contribuição neste projeto, pela ajuda constante e por repartir comigo seu conhecimento.

Aos meus amigos do laboratório Cláudia, Rômulo, Sara, Lizandra, Camila, Carolina, Márcia, Larissa, Fábio, Ana Lúcia, Fabiana e Maria Cristina por toda a ajuda e pelos momentos que repartimos.

A todos os indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção e aos pacientes com paracoccidiodomicose, que aceitaram participar da pesquisa e contribuíram de forma despretensiosa, na ajuda ao próximo.

À Dra Angélica Schreiber e a Luzia Lyra, que se tornou uma amiga, pela dedicação na manutenção das cepas.

Ao Prof. Dr. Anibal Vercesi, por permitir me permitir usar o citômetro e aos seus alunos pela ajuda amiga quando necessário.

A todos os professores da Pós-Graduação em Patologia Clínica, que contribuíram para meu crescimento científico, em especial ao Prof. Dr. Cláudio Rossi por sua disposição em me ajudar.

Aos membros da banca examinadora: Profs.(as) Drs.(as) Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, Eva Burger, Liana Verinaud e Plínio Trabasso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, e ao Conselho Nacional de Pesquisas, CNPq, pelo apoio financeiro.

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

A CAPES, pelo suporte financeiro durante meu doutorado.

A todos que contribuíram anonimamente e com isso sustentam o desenvolvimento da ciência em nosso país.

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xxix
<b>ABSTRACT</b> .....	xxxiii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	51
<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	55
Casuística.....	57
Soros.....	57
Teste de Hipersensibilidade do tipo tardio.....	57
Obtenção de células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i> .....	58
Estimulação de células para análise de grânulos citotóxicos e de citocinas por linfócitos por citometria de fluxo.....	58
Obtenção das células após estimulação.....	59
Imunofluorescência para citometria de fluxo – marcação intracitoplasmática e de superfície.....	59
ELISA - detecção de granulisinina.....	60
Análise estatística.....	61
<b>RESULTADOS</b> .....	63
Expressão constitutiva ( <i>ex-vivo</i> ) de CD45RO, CD45RA, CD69, e grânulos citotóxicos por linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> do sangue periférico.....	65

Expressão de CD69 e grânulos citotóxicos por linfócitos (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) do sangue periférico estimulados com leveduras viáveis de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (cepa Pb18 ou Pb265).....	73
Efeito da adição de IL-15 sobre a expressão de CD69 e grânulos citotóxicos em células do sangue periférico estimuladas com leveduras viáveis de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (cepa Pb18 ou Pb265).....	80
Expressão constitutiva do receptor para IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) em linfócitos (CD8 <sup>+</sup> e CD4 <sup>+</sup> ) do sangue periférico.....	99
Detecção de granulinsina sérica.....	101
<b>DISCUSSÃO</b> .....	103
<b>CONCLUSÃO</b> .....	115
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	119
<b>ANEXOS</b> .....	137
Artigo.....	145

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>BCG</b>	Bacilo Calmette Guerin
<b>BSA</b>	Soroalbumina humana
<b>CTL</b>	Linfócitos T citotóxicos
<b>Cy</b>	Cianoficoeretrina
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EP</b>	Erro padrão
<b>FA</b>	Forma adulta da paracoccidiodomicose
<b>FITC</b>	Isocianato de Fluoresceína
<b>FJ</b>	Forma juvenil da paracoccidiodomicose
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i>
<b>g</b>	Unidade de aceleração
<b>gp43</b>	Glicoproteína de 43 kilodaltons
<b>HTT</b>	Teste de Hipersensibilidade do tipo tardio
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMF</b>	Intensidade Média de Fluorescência
<b>kD</b>	Kilodaltons
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>LD<sub>50</sub></b>	Dose letal 50%
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>MIP</b>	Proteína indutora de monócitos

<b>NK</b>	Células <i>Natural Killer</i>
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PCM</b>	Paracoccidiodomicose
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PI</b>	Paracoccidiodomicose-infecção
<b>PPD</b>	Derivado purificado da proteína do bacilo da tuberculose
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>TGF</b>	Fator de transformação de crescimento
<b>Th1</b>	Linfócito T auxiliar tipo 1
<b>Th2</b>	Linfócito T auxiliar tipo 2
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral

## LISTA DE TABELAS

---

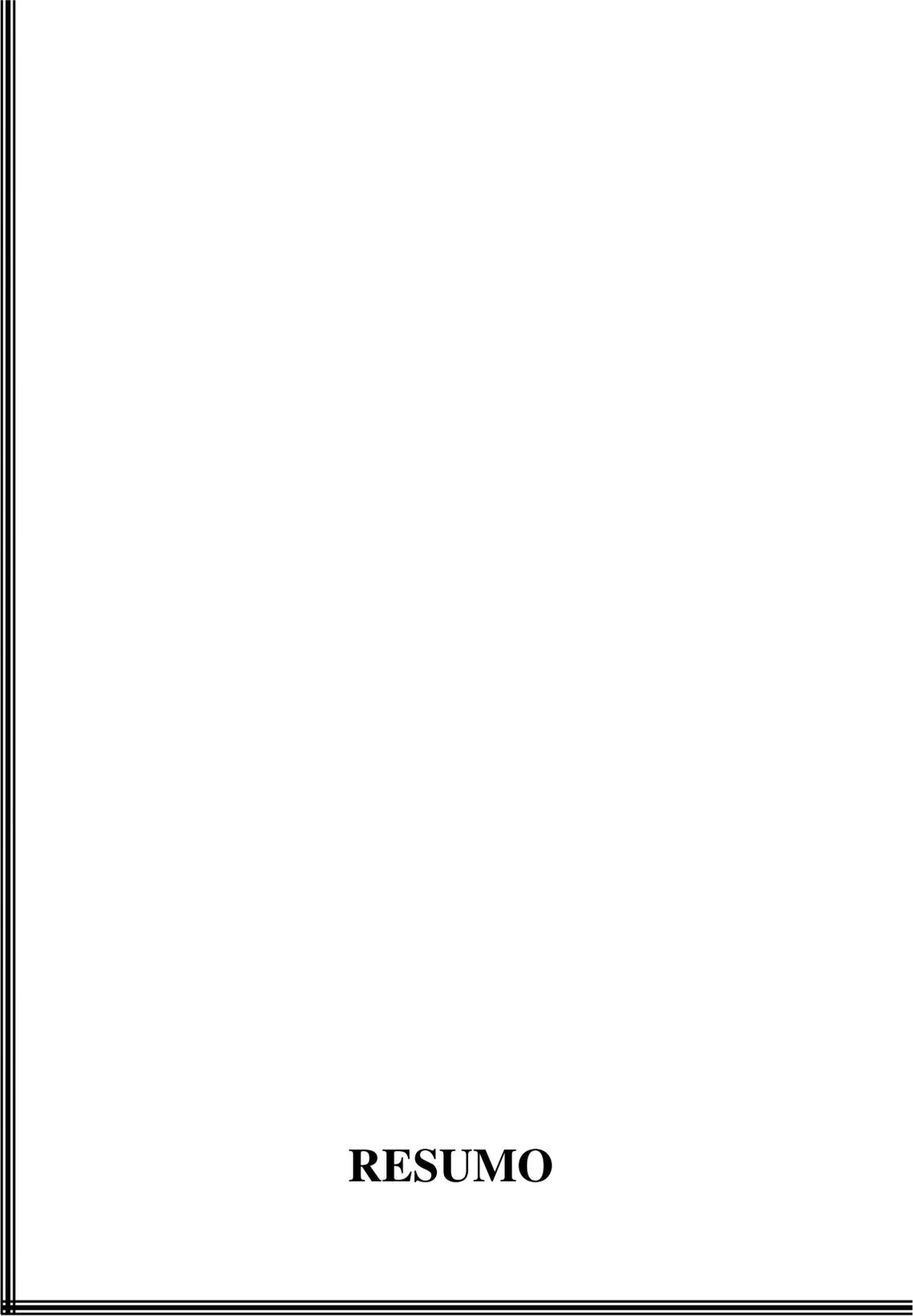
	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> Freqüência de linfócitos <i>ex-vivo</i> , positivos para granzima A, granzima B e perforina.....	72
<b>Tabela 2</b> Índice de aumento da freqüência de células CD69.....	83
<b>Tabela 3</b> Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência de CD69, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e adição de IL-15.....	84
<b>Tabela 4</b> Índice de aumento da freqüência de células granzima A.....	87
<b>Tabela 5</b> Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência de granzima A, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e adição de IL-15.....	89
<b>Tabela 6</b> Índice de aumento da freqüência de células granzima B.....	92
<b>Tabela 7</b> Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência de granzima B, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e adição de IL-15.....	94
<b>Tabela 8</b> Índice de aumento da freqüência de células perforina.....	97
<b>Tabela 9</b> Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência de perforina, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e adição de IL-15.....	98

## LISTA DE FIGURAS

---

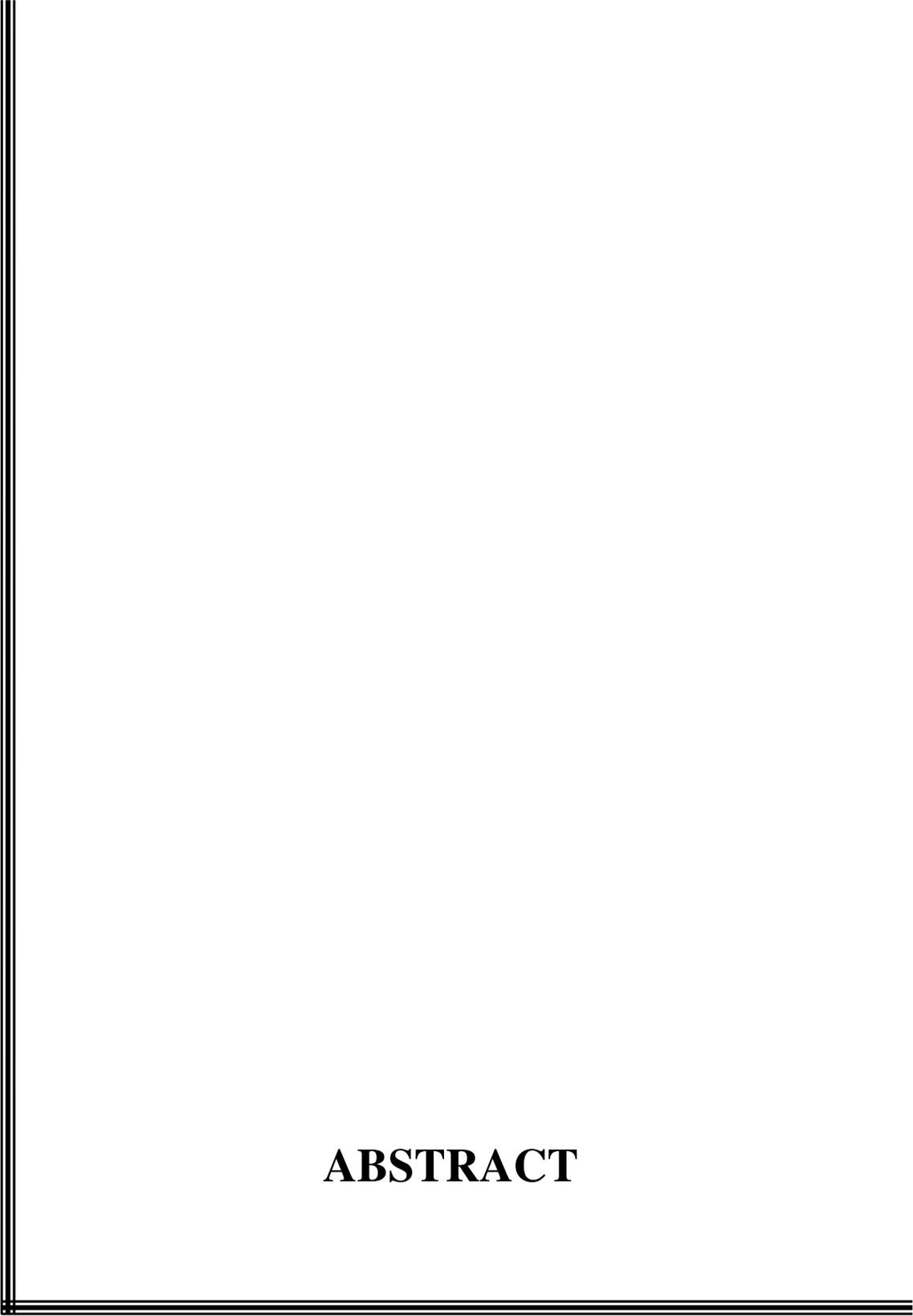
	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Análise por citometria de fluxo da expressão ex-vivo de CD45RA e CD45RO.....	66
<b>Figura 2</b> Análise por citometria de fluxo da expressão ex-vivo de CD69.....	67
<b>Figura 3</b> Análise por citometria de fluxo da expressão ex-vivo de granzima A e granzima B.....	69
<b>Figura 4</b> Análise por citometria de fluxo da expressão ex-vivo de perforina.....	71
<b>Figura 5</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de CD69, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> .....	74
<b>Figura 6</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de granzima A, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> .....	76
<b>Figura 7</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de granzima B, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> .....	77
<b>Figura 8</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de perforina, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> .....	79
<b>Figura 9</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de CD69, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e adição de IL-15.....	81
<b>Figura 10</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de granzima A, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e adição de IL-15.....	86
<b>Figura 11</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de granzima B, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e adição de IL-15.....	91
<b>Figura 12</b> Análise por citometria de fluxo da expressão de perforina, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e adição de IL-15.....	96

<b>Figura 13</b>	Análise por citometria de fluxo da expressão ex-vivo do IL-15R $\alpha$ .....	100
<b>Figura 14</b>	Quantificação sérica de granulicina.....	101
<b>Figura 15</b>	Quantificação sérica de granulicina antes e após tratamento.....	102
<b>Figura 16</b>	Análise por citometria de fluxo da expressão de CD69, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e reestímulo com PMA e ionomicina.....	140
<b>Figura 17</b>	Análise por citometria de fluxo da expressão de granzima A, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e reestímulo com PMA e ionomicina.....	142
<b>Figura 18</b>	Análise por citometria de fluxo da expressão de granzima B, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e reestímulo com PMA e ionomicina.....	143
<b>Figura 19</b>	Análise por citometria de fluxo da expressão de perforina, após estímulo com o <i>P. brasiliensis</i> e reestímulo com PMA e ionomicina.....	144



# **RESUMO**

Em doenças causadas por microorganismos intracelulares como a tuberculose, criptococose e listeriose foi demonstrado que as células T CD8<sup>+</sup> contribuem de forma relevante para o controle da infecção. Em trabalho anterior verificamos um aumento do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no lavado broncoalveolar de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM) pulmonar, sugerindo um papel para estas células, cuja ação efetora se dá por meio da produção de citocinas como o IFN- $\gamma$  e atividade citotóxica. O presente estudo teve por objetivo verificar o estado de ativação e a produção de moléculas citotóxicas por linfócitos do sangue periférico (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-Infecção e controles, tanto *ex-vivo* como *in vitro*, após estimulação com leveduras de *P. brasiliensis*. A expressão dos marcadores de ativação e moléculas citotóxicas foi avaliada por citometria de fluxo. A análise *ex-vivo* mostrou que, de maneira geral, os pacientes apresentam menor frequência de células positivas para moléculas citotóxicas (granzima A, B e perforina), em relação aos indivíduos com PCM-infecção. A estimulação com leveduras de *P. brasiliensis* levou a um aumento discreto de células ativadas (CD69<sup>+</sup>) e uma redução na expressão de grânulos citotóxicos. A adição de IL-15 às culturas mostrou elevação da frequência de células CD69<sup>+</sup> apenas no grupo com PCM-infecção e controles. Já as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos pacientes foram ativadas apenas na ausência do fungo. O efeito da adição de IL-15 na expressão dos grânulos foi pouco expressivo em relação à granzima A e B, mas maior frequência de células CD8<sup>+</sup>perforina<sup>+</sup> foi observada em indivíduos com PCM-infecção, em relação aos pacientes. Menor expressão do receptor para IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) foi detectada em células T CD4<sup>+</sup> de pacientes com PCM comparada ao grupo PCM-infecção e aos controles. A dosagem da granulicina sérica pela metodologia de ELISA mostrou níveis inferiores nos pacientes com PCM, comparado aos outros grupos. Além disso, os resultados mostraram uma tendência a um aumento de granulicina nos pacientes após terapia antifúngica. Em conjunto os resultados mostraram que os linfócitos de pacientes com PCM encontram-se em um estado de menor ativação, expressam menores quantidades do receptor para IL-15 e produzem níveis basais de grânulos citotóxicos (granzima A, B, perforina e granulicina). Estes fatores, ao lado de outros mecanismos que comprometem a imunidade celular, poderiam resultar em atividade citotóxica deficitária e, portanto, menor capacidade de lisar o fungo.



# **ABSTRACT**

CD8<sup>+</sup> T cells play a pivotal role in host defense against diseases caused by intracellular pathogens such as tuberculosis, cryptococcosis and listeriosis. In a previous study we verified an increased number of T CD8<sup>+</sup> cells in bronchoalveolar lavage of patients with pulmonary paracoccidioidomycosis (PCM), suggesting a role for them in the local immune response. CD8<sup>+</sup> T cells effector functions include cytokines production, mainly IFN- $\gamma$  and cytotoxic activity. The aims of this study were to verify the activation state as well as the production of cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes (CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>) from patients with PCM, individuals with PCM-infection and controls, both *ex-vivo* and *in vitro* after stimulation with *P. brasiliensis* yeast cells. The expression of activation and cytotoxic molecules was evaluated by flow cytometry. The *ex-vivo* analysis showed that, in general, the patients presented a lower frequency of granzyme A, B and perforin-positive cells as compared to PCM-infection individuals. *P. brasiliensis* yeast cells stimulation led to a discrete increase in CD69<sup>+</sup> cells and a reduction in cytotoxic granules expression in all groups. The addition of IL-15 to the cultures induced an increase in the frequency of CD69<sup>+</sup> cells only in individuals with PCM-infection and controls. Differently, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells from PCM patients were activated only in the absence of fungal cells. The effect of IL-15 in granzyme A and B expression was low but a higher frequency of CD8<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> was detected in individuals with PCM-infection than in patients with PCM. IL-15R $\alpha$  expression was lower in CD4<sup>+</sup> T cells from patients in relation to individuals with PCM-infection and controls. The detection of granulysin levels by ELISA showed lower levels in PCM patients than in individuals with PCM-infection and controls. Moreover, a tendency to a rise in granulysin levels was observed after antifungal therapy. Altogether the results showed that lymphocytes from PCM patients are poorly activated, express low levels of IL-15R $\alpha$  and produce basal levels of cytotoxic granules (granzyme A, B, perforin and granulysin). These findings, in addition to other mechanisms that impair cellular immunity, may account to defective cytotoxic activity and consequently low capacity to kill the fungus.

# **INTRODUÇÃO**

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica, adquirida por inalação, passível de provocar infecção pulmonar primária ou doença de disseminação hematogênica, com instalação em qualquer órgão ou sistema. É causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* e se restringe à América Latina do México à Argentina. Entretanto, sua distribuição não ocorre de forma homogênea, o maior número de casos é registrado no Brasil, com mais de 80% dos casos descritos, seguido da Argentina, Venezuela e Colômbia (Bummer et al., 1993; Goldani e Sugar, 1995). Estima-se que por toda a região endêmica, aproximadamente 10 milhões de pessoas estejam infectadas, apesar da maioria não apresentar sintomas clínicos (Restrepo et al., 2001).

O habitat natural do *Paracoccidioides brasiliensis* ainda não foi definido com precisão, mas acredita-se que seja um saprófita de solo ou plantas sendo, por esse motivo, causa freqüente de doença em indivíduos que trabalham ou moram na zona rural, embora mais recentemente tenha sido observada em moradores de áreas periurbanas (Restrepo, 1985; Blotta et al., 1999). O fungo se desenvolve na forma de micélio à temperatura ambiente, enquanto que a 35-37°C cresce sob a forma de levedura, apresentando parede celular refringente e muitas vezes brotamentos laterais que lhe dão aspecto de roda-de-leme, característica importante para o estabelecimento do diagnóstico por exame micológico direto em materiais clínicos (Franco et al., 1989; Brummer et al., 1993).

A maior prevalência da PCM é observada em regiões de clima úmido, com temperaturas médias de 17 a 24°C, com índices pluviométricos de 900 a 1800 mm/ano, altitude média, solo ácido e vegetação densa, condições encontradas em florestas tropicais e subtropicais (Brummer et al., 1993). Em regiões de alta incidência da doença, o *Paracoccidioides brasiliensis* foi isolado de solo úmido e sombreado, e também encontrado em habitações de tatus (*Dasyus novemlineatus*), sendo estes animais considerados como prováveis reservatórios do fungo e marcadores epidemiológicos da doença (Restrepo et al., 2001; Bagagli et al., 2006). O fungo também foi encontrado em tecidos e excrementos de diversos animais como morcegos, esquilos e pingüins (Restrepo et al., 2001). Mais recentemente foi demonstrado que animais domésticos possuem anticorpos que reconhecem antígenos de *P. brasiliensis*, sendo potenciais reservatórios do fungo (Ono et al., 2001).

Diferentes cepas de *P. brasiliensis* variam quanto a virulência. Este fenômeno pode estar relacionado com variações na composição da parede celular do fungo que influencia a suscetibilidade aos mecanismos imunológicos do hospedeiro e, conseqüentemente o curso da doença (Franco, 1987). Considerando que a parede celular realiza o primeiro, e mais extenso contato com o hospedeiro, esta estrutura tem sido incluída entre os fatores de virulência do fungo (San-Blas e Vernet, 1977). Além das diferenças entre polissacarídeos da parede celular há variações entre as enzimas que degradam os compostos da matriz extracelular, o que auxilia a invasão dos tecidos (San-Blas e San-Blas, 1977). Entre os polissacarídeos encontrados na parede celular dos fungos patogênicos ou não estão as  $\alpha$ - $\beta$ -glucanas e segundo Hogan et al. (1996) as cepas mais virulentas de *P. brasiliensis* apresentam uma maior porcentagem de  $\alpha$ -1,3-glucanas.

Singer-Vermes et al. (1989) classificaram as cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* quanto a sua virulência e entre as várias cepas analisadas a Pb18 foi considerada como altamente virulenta, por causar um elevado número de lesões peritoniais nos animais inoculados, por se disseminar para vários órgãos, principalmente fígado, baço e pulmões e por apresentar um baixo valor de LD<sub>50</sub>. Ao contrário, a cepa Pb265 foi considerada de baixa virulência por não apresentar letalidade, por induzir poucas lesões peritoniais e raras lesões de disseminação.

No entanto, o principal antígeno de superfície do *P. brasiliensis* e fator de virulência é a gp43, glicoproteína de 43 KDa contra a qual a maior parte dos indivíduos com PCM apresenta anticorpos específicos (Blotta e Camargo, 1993; Taborda et al., 1998; Sousa et al., 2000).

O impacto sócio-econômico da PCM é grande por acometer principalmente homens na fase mais produtiva da vida: 84,75% dos casos entre 30 e 59 anos (Negroni, 1993; Wanke e Londero, 1994), gerando custos sociais e econômicos significativos devido não só a doença em atividade, mas também pelas seqüelas secundárias à infecção, motivo comum de incapacitação para o trabalho (Barbosa, 1991; Brummer et al., 1993; Mota, 1996). Em pacientes com menos de 30 anos e em crianças, os níveis de infecção diminuem, sendo ambos os sexos igualmente afetados. O número reduzido de mulheres com a doença está relacionado ao efeito protetor de hormônios

femininos, visto que o 17- $\beta$ -estradiol inibe, *in vitro*, a conversão dos propágulos infecciosos do *P. brasiliensis* em leveduras (Restrepo et al., 1984; Aristizabal et al., 1998).

A infecção geralmente ocorre por inalação de propágulos uninucleados, denominados conídios. Os conídios constituem as formas de resistência às condições adversas ambientais, que transitam para forma leveduriforme (parasitária) nos alvéolos pulmonares do hospedeiro suscetível (Brummer et al., 1993; Borges-Walmsley et al., 2002). 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., 1989; Cano et al., 1992). Se ocorrer disseminação fúngica por via linfática ou hematogênica o parasita irá aderir e penetrar no endotélio dos vasos sanguíneos para invadir tecidos mais profundos (Kullberg e Anaissie, 1998).

As lesões causadas pelo *P. brasiliensis* podem gerar fibrose nos órgãos atingidos, afetando sua função normal (Tuder et al., 1985). Nas mucosas nasal e oral, as lesões são destrutivas, acarretam incapacidade de respiração plena e de alimentação, além de deformidades estéticas. Além disso, a PCM exige tratamento com antifúngicos de custo elevado e por tempo prolongado, levando muitos pacientes ao abandono da medicação, elevando o risco de reativação da doença (Barbosa, 1991; Brummer et al., 1993; Mota, 1996). A PCM não é transmitida de pessoa a pessoa.

Para inquéritos epidemiológicos, a melhor ferramenta disponível é o teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) com preparações antigênicas do fungo ou com a gp43 purificada (Saraiva et al., 1996). Sua utilização tem demonstrado que o contato com o fungo é freqüente durante as duas primeiras décadas de vida (Mangiaterra et al., 1996). Grande parte dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue conter a infecção e não desenvolver a doença. Esse fato é evidenciado pela alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam HTT positivo para antígenos do fungo (Londero e Ramos, 1990; Bethlem et al., 1991; Wanke e Londero, 1994).

Essa condição, denominada PCM-infecção (PI), é muito mais comum do que a PCM-doença, embora não estejam estabelecidos os índices precisos dessa relação (Souto et al., 2000). A reação de HTT, além de útil para inquéritos epidemiológicos pode ser utilizada na avaliação do estado imunológico do paciente, quando a reversão do teste negativo após terapia mostra que a resposta imune celular foi restaurada (Brummer et al., 1993; Wanke e Londero, 1994; Silva-Vergara, 1998).

A progressão de infecção para doença depende do tamanho do inóculo, da patogenicidade e virulência do fungo, bem como da qualidade e integridade dos mecanismos de defesa do hospedeiro e possivelmente de fatores genéticos (Brummer et al., 1993). O tabagismo e o etilismo são fatores de risco que parecem estar associados à doença (Londero e Ramos, 1990; Martinez e Moya, 1992) e todas as raças são suscetíveis.

A PCM se manifesta de diferentes formas que podem ser reunidas em dois grupos principais: a forma juvenil (FJ) ou aguda de maior gravidade e forma adulta (FA) ou crônica, normalmente mais localizada e menos agressiva. Em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de terapia específica leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças (Lacaz, 2002; Benard et al., 1996).

No padrão juvenil, a infecção pulmonar primária dissemina-se rapidamente com adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea, simulando patologias linfoproliferativas. Nesses casos a evolução da doença é rápida, com febre, emagrecimento e comprometimento do sistema fagocítico-mononuclear (fígado, baço, linfonodos e medula óssea). A resposta imune humoral destes indivíduos é preservada, com aumento de anticorpos específicos do tipo IgG4, IgE e IgA (Benard et al., 2001; Mamoni et al., 2001; Mamoni et al., 2002), enquanto a resposta imune celular a antígenos do fungo está severamente deprimida (Mota et al., 1985; Musati et al., 1994; Benard et al., 1996; Oliveira et al., 2002). A análise histopatológica das lesões mostra reação inflamatória não específica com formação de granulomas frouxos, observando-se multiplicação ativa do fungo dentro das células fagocitárias (Franco et al., 1987).

A forma adulta acomete cerca de 90% dos casos e pode levar meses ou anos para se estabelecer. Os fungos, presumivelmente ativados de seu estado de latência, provocam doença pulmonar localizada progressiva. Dependendo das condições gerais e imunológicas do paciente, a forma adulta pode ser leve, moderada ou grave, com lesões que variam desde uma ulceração oral isolada até o envolvimento pulmonar difuso.

Na forma adulta localizada (unifocal), o pulmão é o órgão mais atingido com múltiplas lesões em todo o trato respiratório e manifestações clínicas como tosse, expectoração e dispnéia a esforços. A infecção pulmonar primária ocorre comumente na primeira e segunda década da vida, tendo curso benigno e autolimitado (Bethlem et al., 1999). A forma adulta multifocal atinge mais de um órgão ou sistema, com sintomas variados como 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).

Na forma adulta unifocal, a resposta imune humoral caracteriza-se pela produção de níveis elevados de anticorpos tipo IgG1, e na forma multifocal pelo aumento de anticorpos tipo IgG4 e IgE (Silva e Figueiredo, 1991; Mamoni et al., 2002), demonstrando uma associação destes anticorpos com a gravidade da doença. Pacientes com a forma adulta geralmente apresentam teste cutâneo de HTT positivo e achados histopatológicos mostrando granulomas epitelióides típicos, que circundam as lesões e dificultam a multiplicação do fungo (Montenegro, 1986).

Quando o fungo invade os tecidos, a interação dos antígenos liberados com o sistema imune do hospedeiro causa uma resposta imunológica, que tem importância fundamental no desenvolvimento da infecção. Na PCM como em outras doenças infecciosas granulomatosas crônicas, a resposta imune celular é considerada o principal mecanismo de defesa contra o parasita (Calich e Blotta, 2005; Cano et al., 1995; Romano et al., 2002), enquanto anticorpos específicos produzidos em grandes quantidades não conseguem conferir proteção a doença (Benard et al., 2001). 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*. Esse equilíbrio é influenciado em grande parte pela ativação preferencial de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que são agrupados de

acordo com o tipo de citocinas que produzem. Assim, os macrófagos e linfócitos T citotóxicos (CTL) são ativados preferencialmente por células T *helper* 1 (Th1), produtoras de interleucina 2 (IL-2), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alpha (TNF- $\alpha$ ), enquanto que as células T *helper* 2 (Th2) produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e participam da resposta imune humoral (Mosmann et al., 1986; Romagnani, 1991). Acredita-se que o balanço entre a resposta Th1/Th2 seja importante no desenvolvimento da PCM, assim como em outras doenças infecciosas (Spellberg e Edwards, 2001).

Estudos em modelos experimentais na PCM confirmam a associação entre uma resposta Th2 dominante e doença severa (Calich et al., 1987; Calich et al., 1998). Quando estimulados com antígenos do fungo camundongos suscetíveis (linhagem B10A) apresentam diminuição na proliferação de linfócitos e teste HTT negativo (Teixeira et al., 1987, Castanheda et al., 1988), aumento de citocinas do tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-10 e o fator de transformação do crescimento-beta (TGF- $\beta$  além de aumento de anticorpos das classe IgG1 e IgA (Cano et al., 1995; Cano et al., 1998; Vaz et al., 1998; Kashino et al., 2000). Estes animais não são capazes de conter a infecção e apresentam disseminação do fungo por todo o organismo. Ao contrário, camundongos da linhagem A/Sn são considerados resistentes, com resposta imune celular preservada frente a antígenos do fungo, capacidade de proliferação de linfócitos, teste cutâneo de HTT positivo e com produção de citocinas tipo Th1 como o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , assim como anticorpos da classe IgG2a (Cano et al., 1995; Cano et al., 1998; Vaz et al., 1998; Kashino et al., 2000). Estes estudos confirmam a importância da resposta imune celular no controle da PCM e encontram paralelo na doença humana.

Experimentos com animais suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis*, depletados de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> mostraram que ambas as subpopulações estão envolvidas na resposta HTT, enquanto nas linhagens resistentes essa resposta é mediada por células T CD4<sup>+</sup> (Calich et al., 1998).

Vários estudos têm demonstrado que o papel das células T CD8<sup>+</sup> na resposta imune pode ser protetor (Deepe, 1994; Huffnagle et al; 1991; Muller et al., 1994), supressor (Phillips et al., 1991) ou apenas inócuo (Adams et al., 1993), dependendo do

organismo infectado e das características genéticas do hospedeiro. Na PCM experimental foi sugerido um papel protetor para os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, visto que a sua depleção induz doença mais grave e disseminada, tanto em camundongos suscetíveis como resistentes à infecção por *P. brasiliensis* (Cano et al., 2000).

Em trabalho anterior verificamos um aumento do número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes com PCM pulmonar e produção aumentada de MIP-1 $\alpha$  (CXCL3) detectada tanto no LBA, como no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares, sugerindo o envolvimento desta quimiocina na atração e ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Fornazim et al., 2003). Linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) representam uma importante linha de defesa contra patógenos intracelulares devido à produção de IFN- $\gamma$  e por sua atividade citotóxica. Estas células podem estar envolvidas na resposta imune ao *P. brasiliensis* nos pulmões. Achados recentes de nosso laboratório demonstraram que as células T CD8<sup>+</sup> têm atividade citotóxica direta contra leveduras viáveis de *P. brasiliensis*, assim como contra macrófagos infectados pelo fungo (Mamoni e Blotta, submetido).

As células T CD8<sup>+</sup> exercem sua ação de defesa por meio da produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e da produção de substâncias citotóxicas armazenadas em grânulos citoplasmáticos. Quando em contato com a célula alvo o conteúdo destes grânulos é liberado na região de contato, desencadeando mecanismos que levam a apoptose (Lieberman, 2003; Pipkin e Lieberman, 2007). Dentre estas substâncias citotóxicas está a perforina, uma glicoproteína que forma poros na membrana celular, causando desequilíbrio osmótico e conseqüentemente lise da célula infectada e as granzimas, enzimas com atividade proteolítica, capazes também de ativar mecanismos de apoptose por vias dependentes ou não das caspases induzindo rápida morte celular (Barry e Bleakley, 2002; Lieberman, 2003). Estudos mais recentes mostraram a ação da granulísina, molécula antimicrobiana da família de proteínas ligante de lipídios, com capacidade de destruir patógenos diretamente. Esta molécula, encontrada nos grânulos citotóxicos de CTL e células NK humanas, em co-localização com as granzimas e a perforina, reduz a viabilidade de bactérias patogênicas, fungos e parasitas (Peña e Krensky, 1997; Hanson et al., 1999). A participação da granulísina tem sido apontada como fundamental no controle das infecções causadas por micobactérias, tanto na tuberculose como na

hanseníase (Ochoa et al., 2001; van Pinxteren et al., 2000), entretanto, sua ação citotóxica depende da presença da perforina, que permite a sua liberação no interior das células infectadas (Zhou et al., 2001).

Huffnagle et al. (1994) demonstraram que na criptococose experimental a presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> é necessária para o recrutamento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para os pulmões, para a produção de IFN- $\gamma$ , essencial para a ativação local de macrófagos e desenvolvimento de uma resposta protetora do tipo Th1.

Na tuberculose inúmeras evidências têm indicado importante papel das células T CD8<sup>+</sup> na resposta imune a micobactéria e em camundongos a eliminação de células T CD8<sup>+</sup> aumenta a suscetibilidade à doença (Sousa et al., 2000). Células T CD8<sup>+</sup> podem eliminar a micobactéria lisando as células infectadas (Serbina et al., 2000), produzindo IFN- $\gamma$  (Serbina e Flynn, 1999) ou por meio da produção de moléculas com atividade antimicrobiana (Stenger et al., 1998). Na infecção humana, células T CD8<sup>+</sup> citolíticas específicas para *M. tuberculosis* foram isoladas do lavado broncoalveolar, sugerindo que contribuem para a resposta imune local (Tan et al., 1997). Adicionalmente, células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  podem ser detectadas no sangue de indivíduos saudáveis PPD positivos e de pessoas vacinadas com BCG (Lewinsohn et al., 1998a).

Tsao et al. (2002) observaram que pacientes com tuberculose em estado avançado apresentam maior proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e menor proporção de células T CD8<sup>+</sup>, resultando em relação CD4/CD8 aumentada no LBA, em comparação com indivíduos com comprometimento pulmonar mínimo. Por outro lado, o inverso foi encontrado no sangue periférico, onde menor porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> foi encontrada, sugerindo que ocorre o seqüestro de células T CD4<sup>+</sup> nos pulmões na forma grave da doença. Este achado fundamenta o argumento de que linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem ter um papel protetor nos pulmões, e que a sua presença indica um processo de contenção da doença.

As células T CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos de origem intracitoplasmática, apresentados por moléculas MHC de classe I (Barry e Bleackley, 2002; Wong e Pamer, 2003). Após sua ativação, as células T CD8<sup>+</sup> podem exercer diversas

funções e participar da resposta imunológica por meio de 3 mecanismos principais: produção e liberação de citocinas; indução da morte das células infectadas por apoptose, expondo o patógeno a ação de fagócitos ativados e a ação de anticorpos; e destruição direta do mesmo (Wong e Pamer, 2003). Os linfócitos T citotóxicos são importantes na resposta de defesa contra células tumorais, vírus e outros microrganismos intracelulares. Sua ação se dá por meio de citólise dependente da perforina, e da liberação de granzimas e granulisina ou pela ligação CD95L ligante (CD95L) expresso na superfície destes linfócitos e CD95 expresso em macrófagos infectados (Sousa et al., 2000; Oddo et al., 1998; Stenger et al., 1998; Waterhouse et al., 2006).

A citotoxicidade mediada por grânulos é indiscutivelmente o mecanismo efetor mais importante das células T CD8<sup>+</sup> e das células natural killer (NK) na imunidade adaptativa e inata, respectivamente (Lieberman, 2003). Embora sejam desencadeados por receptores distintos e a expressão de moléculas citotóxicas seja constitutiva nas células NK e regulada nas células T, estas células se utilizam basicamente dos mesmos mecanismos de destruição de seus alvos.

Os grânulos citotóxicos presentes em linfócitos T citotóxicos e células Natural Killer contêm perforina, granzimas e granulisina (Deng et al., 2005; Pipkin e Lieberman, 2007). Após o reconhecimento do antígeno, os grânulos citotóxicos armazenados em vesículas no interior das células citotóxicas, se movem para a sinapse imunológica e ocorre a fusão da membrana das células efetoras com a membrana plasmática da célula a ser destruída. Este mecanismo permite a liberação dos grânulos e a indução de mecanismos apoptóticos na célula alvo (Lieberman, 2003; Pipkin e Lieberman, 2007).

Neste processo de citotoxicidade a perforina é uma molécula fundamental que age formando poros na membrana celular através de um mecanismo dependente de Ca<sup>2+</sup>, causando desequilíbrio osmótico e conseqüente lise das células infectadas. É uma proteína de aproximadamente 67 KDa, cuja expressão é regulada durante a diferenciação linfocitária por sinais de receptores de ativação como receptor de célula T e NKG2D e por citocinas como IL-2, IL-15 e IL-21 (Barry e Bleackley, 2002; Pipkin e Lieberman, 2007). A perforina tem homologia com componentes do complemento, particularmente C9 e sua

expressão é controlada por um domínio extenso de 150 kilobases que regula o desenvolvimento e a expressão desta molécula em células T e em células NK após ativação específica (Pipkin e Lieberman, 2007).

As granzimas são enzimas com atividade proteolítica, capazes de ativar mecanismos de apoptose principalmente pela ativação das caspases (Pham e Ley, 1997; Barry e Bleackley, 2002; Lieberman, 2003). As granzimas A e B são as mais abundantes em camundongos e em humanos e têm sido amplamente estudadas, em especial as granzimas B (Russel e Ley, 2002; Lieberman e Fan, 2003; Lieberman, 2003; Lord et al., 2003). As granzimas A e B são as granzimas predominantes, com reconhecida importância na imunidade viral. A participação da granzima B na indução da apoptose mostrou maior relevância, na medida em que animais deficientes deste grânulo também apresentaram ausência de granzima C (Trapani e Smyth, 2002). As granzimas são redundantes, cada uma é capaz de ativar a morte celular de forma independente (Pipkin e Lieberman, 2007). Durante a ativação primária as células T CD8<sup>+</sup> adquirem progressivamente e individualmente a capacidade de expressar os genes para todas as granzimas, mas posteriormente a ativação pode ocorrer de forma diferencial com maior expressão de apenas um grupo delas (Kelso et al., 2002).

Como a perforina é a única molécula que permite a entrada das granzimas na célula alvo, animais deficientes nesta proteína apresentam uma grave deficiência na resposta imunológica e alta suscetibilidade a infecções virais e ao desenvolvimento de células cancerígenas. Por outro lado a falta de granzima A e B em camundongos não têm tanto impacto na resposta de defesa, a não ser contra determinados vírus (Nakajima et al., 1995; Heusel et al., 1994; Mullbacher et al., 1996; Rossi et al., 1998; Smyth et al., 2003). Indivíduos com linfocitose hemofagocítica, doença hematológica causada por uma mutação bialélica no gene da perforina, apresentam a imunidade severamente comprometida (Stepp et al., 1999; Goransdotter et al., 2001; Katano et al., 2004).

A granulicina, que atua na destruição direta de patógenos, é outra molécula presente nos grânulos citotóxicos de linfócitos T citotóxicos e células NK (Jonsgstra et al., 1987; Penã et al., 1997). A granulicina é um membro da família das saposinas, é produzida em uma forma inativa (15 kD) e apresenta função biológica após sua conversão para a

forma de 9 kD. Seu mecanismo de atuação envolve a interação com lipídios presentes na estrutura de diversos patógenos, que pode resultar na morte bactérias, fungos e protozoários (Stenger et al., 1998; Ernst et al., 2000). A participação da granulísina tem sido apontada como fundamental no controle das infecções causadas por micobactérias, tanto na tuberculose como na hanseníase (Ochoa et al., 2001; van Pinxteren et al., 2000). Entretanto, apesar de apresentar uma potente ação direta sobre os patógenos, a granulísina depende da presença de perforina para atuar no interior das células infectadas (Zhou et al., 2001). Na criptococose foi demonstrado que a granulísina é necessária para a atividade fungicida exercida pelas células T CD8<sup>+</sup> (Ma et al., 2002), enquanto que as células NK utilizam preferencialmente a perforina como molécula efetora para matar o *Cryptococcus neoformans* (Ma et al., 2004).

Deng et al. (2005) verificaram que a concentração local de granulísina é crítica para a sua atividade biológica de forma que, em altas concentrações é citotóxica, enquanto níveis diminuídos resultam em atividade quimiotática para monócitos, células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de memória, células NK e células dendríticas maduras.

A concentração de granulísina no sangue periférico pode ser relacionada à atividade de células T e células NK. Recentemente dois trabalhos mostraram que na tuberculose pulmonar ocorre uma associação inversa entre os níveis de granulísina plasmática e a atividade da doença sugerindo um importante papel para este mediador na defesa contra a micobactéria (Di Liberto et al., 2007; Sahiratmadja et al., 2007).

A proliferação e a ativação das células T CD8<sup>+</sup> e das células NK é dependente de IL-15 (Ma et al., 2000). Esta citocina, similar a IL-2, é produzida principalmente por células apresentadoras de antígeno e outras células não-linfóides (Tagaya et al., 1996; Fehniger e Caligiuri, 2001). Na sua ausência, as células T CD8<sup>+</sup> não se acumulam eficientemente nos linfonodos drenantes e nos locais de infecção. Animais *Knockout* para IL-15 ou para a cadeia  $\alpha$  de seu receptor apresentam redução expressiva no número de células NK e uma redução parcial de células T CD8<sup>+</sup> (Lodolce et al., 1998; Kennedy et al., 2000). Além disso, a IL-15 parece ser essencial para a homeostase e manutenção das células T CD8<sup>+</sup> de memória (Ma et al., 2000; Liu et al., 2002) e para a produção dos grânulos citotóxicos (Mody et al., 1998).

Na criptococose ficou bem definido que a IL-15 é necessária e suficiente para a expressão de granulinsina e conseqüente indução da atividade citotóxica de células T CD8<sup>+</sup>. Para a sua produção as células T CD4<sup>+</sup> poderiam funcionar como intermediárias estimulando células acessórias a produzir IL-15, que por sua vez agiria nas células T CD8<sup>+</sup> (Ma et al., 2002).

A participação das células T CD8<sup>+</sup> e seus componentes na resposta de defesa contra o fungo *Cryptococcus neoformans* tem sido bastante explorada. Entretanto poucos trabalhos avaliaram a participação das células T CD8<sup>+</sup> na PCM. Com o objetivo de preencher esta lacuna o presente trabalho visou avaliar o estado de ativação e a produção de grânulos citotóxicos (granzima A, B, perforina e granulinsina) em células do sangue periférico de pacientes com a forma adulta e juvenil da PCM, indivíduos com PCM-infecção e controles. A inclusão do grupo de indivíduos com PCM-infecção se justifica pelo fato de representarem o pólo de resistência à doença. A elucidação dos mecanismos imunoprotetores, que impedem a ocorrência da doença nesses indivíduos, traria grandes benefícios para o entendimento da fisiopatologia da PCM, abrindo caminhos para novas medidas preventivas e terapêuticas.

# **OBJETIVOS**

## 2.1- Objetivo geral

Nosso estudo teve por objetivo geral verificar o estado de ativação e a produção de moléculas citotóxicas por linfócitos do sangue periférico (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-Infecção e controles.

## 2.2- Objetivos específicos

- a) Avaliar o estado de ativação (expressão de CD69) e a capacidade de expressão de grânulos citotóxicos (granzima A, granzima B e perforina) *ex vivo* por linfócitos (CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>) de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-Infecção e controles;
- b) Avaliar o estado de ativação (expressão de CD69) e a capacidade de expressão de grânulos citotóxicos (granzima A, granzima B e perforina) por linfócitos (CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>) de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-Infecção e controles em resposta à estimulação com leveduras vivas de *P. brasiliensis*;
- c) Verificar o efeito da IL-15 sobre o estado de ativação (expressão de CD69) e a capacidade de expressão de grânulos citotóxicos (granzima A, granzima B e perforina) por linfócitos (CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>) de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-Infecção e controles;
- d) Analisar a expressão *ex-vivo* do receptor alfa da IL-15 (IL-15R $\alpha$ ), em linfócitos (CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>) de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-Infecção e controles;
- e) Determinar as concentrações séricas de granulicina em pacientes com PCM, indivíduos com PCM-Infecção e controles e avaliar, nos pacientes, o impacto do tratamento com drogas antifúngicas.

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

## **Casuística**

O grupo controle foi constituído de indivíduos moradores da zona endêmica de Campinas, principalmente trabalhadores de fazendas e hortas de bairros vizinhos ao campus da UNICAMP. Após a realização do teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio com antígeno de *Paracoccidioides brasiliensis* o grupo controle foi subdividido 2 subgrupos, o primeiro formado por indivíduos com teste positivo (PCM-infecção) e o segundo com teste cutâneo negativo (C).

Os pacientes com paracoccidioidomicose foram selecionados no ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP e classificados quanto à forma clínica conforme os critérios estabelecidos por (Franco et al., 1987). Todas as coletas foram realizadas antes do início do tratamento. 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. Participaram da análise por citometria de fluxo 9 indivíduos controle, 8 indivíduos PCM-infecção, 11 pacientes com a forma adulta e 9 pacientes com a forma juvenil da PCM.

## **Soros**

Os soros foram obtidos de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Unicamp e agrupados de acordo com a forma clínica da doença. As amostras foram coletadas antes ou no início do tratamento e após a terapia. Analisamos o soro de 18 pacientes com a FJ (11 homens e 7 mulheres, 9-44 anos), 16 soros de pacientes com a FA (15 homens 1 e mulher, 19-72 anos), 8 soros de indivíduos PCM-infecção (7 homens e 1 mulher, 24-53 anos) e 8 soros de indivíduos controle (7 homens e 1 mulher, 24-53 anos).

## **Teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio**

O teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio foi realizado no antebraço esquerdo inoculando-se, por via intra-dérmica, 100  $\mu$ L (7,5  $\mu$ g) de g43 de *Paracoccidioides brasiliensis* (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo da Universidade Federal de São Paulo). A leitura foi realizada após 24 h e reações com área de endureção acima de 5 mm foram consideradas positivas.

### **Obtenção de células leveduriformes de *P. brasiliensis***

Células leveduriformes de *P. brasiliensis* cepa Pb18 (alta virulência) e cepa Pb265 (baixa virulência) foram gentilmente cedidas pela Profa. Vera Calich do ICB-USP e mantidas a 36°C na Seção de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica/HC/UNICAMP, por meio de repiques semanais em meio de Fava Neto. Para os experimentos foram utilizadas células após 5 dias em cultura. Após crescimento fúngico as leveduras foram coletadas por meio de lavagem do tubo com cerca de 15 mL de tampão PBS estéril e a suspensão de leveduras homogeneizada no vórtex com esferas de vidro de 4 mm por 4 minutos para dissolução dos grumos. Após incubação de 45 minutos em estufa a 37°C o número de leveduras viáveis foi determinado do sobrenadante por contagem em hematócrito na presença de verde de Janus. Foram utilizadas suspensões contendo mais de 85% de fungos viáveis.

### **Estimulação de células para a análise da expressão de grânulos citotóxicos e de citocinas por linfócitos, por citometria de fluxo**

A coleta do sangue periférico (20 mL) de indivíduos controle e pacientes com PCM foi realizada em tubos contendo heparina sódica.

Amostras de 500 µL de sangue total foram distribuídas em placas de cultura com 24 cavidades nas quais se acrescentou 1 mL de meio RPMI (Sigma- Aldrich, St Louis, MO, USA) suplementado (10% de soro humano AB inativado, 2% de L-glutamina, 25µL de gentamicina, e 100µL de piruvato). Em seguida foram adicionadas 100.000 leveduras de *P. brasiliensis*, cepa Pb265 (baixa virulência) ou Pb18 (alta virulência) em cada cavidade e as placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C por 5 dias.

Para alguns experimentos as culturas foram estimuladas com IL-15 (50 ng/mL), adicionada nas últimas 48 horas. Neste caso, além da frequência (%) de células foi calculado o índice de aumento após a adição de IL-15. Para isso, calculou-se a média da frequência de células positivas para cada marcador antes e após o estímulo com a IL-15 e desta diferença foi subtraído 1.

## **Obtenção das células após estimulação**

Após a incubação por 5 dias a 37°C (5% CO<sub>2</sub>), as placas de cultura foram colocadas sobre gelo e mantidas em geladeira por 15 minutos, em seguida as cavidades foram lavadas diversas vezes com PBS-azida sódica (2 mM) para a remoção total das células, que foram transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a 240 g por 10 minutos, a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 1 mL de tampão de lise (FACS Lysing Solution – Becton & Dickinson) e seguiu-se homogeneização em vórtex e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então centrifugadas novamente (240 g, por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante descartado. Finalmente as células foram ressuspensas em tampão de lavagem (PBS + BSA + azida 2 mM) e a concentração acertada para 1 x 10<sup>7</sup> células/mL.

## **Imunofluorescência para citometria de fluxo – marcação de superfície e intracelular**

As células obtidas de cultura e ex-vivo foram submetidas à imunofluorescência direta para marcação de superfície e intracitoplasmática. 20 µL da suspensão celular (2 x 10<sup>5</sup>) foram transferidos para placas de 96 cavidades de fundo em U contendo a mistura de anticorpos para marcação de superfície: anti-CD3 (BD - Cy-Chrome ou FITC), anti-CD4 (FITC, PE ou Cy-Chrome), anti-CD8 (FITC, PE ou Cych), anti-CD69 (FITC), anti-CD45RA (FITC), anti-CD45RO (FITC) e anti-IL-15Rα (biotinilado), assim como os controles isotípicos, diluídos em tampão de lavagem e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Com exceção do anticorpo biotinilado que foi adquirido da R & D Systems (Mineápolis, MN, USA), todos os demais anticorpos utilizados para marcação de superfície e os controles isotípicos foram adquiridos da empresa BD – Biosciences (San José, CA, USA). Após incubação foram adicionados 120 µL de tampão de lavagem e a placa foi centrifugada a 240 g, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante desprezado. Para uma segunda lavagem foram adicionados 120 µL de tampão de lavagem seguida de outra centrifugação a 240 g por 10 minutos, a 4°C. Após as células serem ressuspensas no vórtex, foi adicionada a estreptoavidina (BD – PE) diluída em tampão de lavagem às cavidades contendo anticorpos biotinilados e a placa incubada por

20 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após a incubação as células foram lavadas 2 vezes com 120 µl de tampão de lavagem e ressuspensas em vórtex. Seguiu-se então a adição de 150 µL de PBS-formaldeído a 2 % e a placa foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após nova lavagem o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 120 µL de tampão de permeabilização (PBS-saponina (0,5%)–PBS-S) e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em vórtex e em seguida submetidas à marcação intracitoplasmática, utilizando os seguintes anticorpos diluídos em tampão de permeabilização: anti-granzima A (FITC), anti-granzima B (FITC), anti-perforina (PE), todos da BD – Biosciences (San José, CA, USA). A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro e depois foram realizadas duas lavagens com 150 µL de tampão de permeabilização, seguidas de centrifugação a 240 g, por 10 minutos, a 4°C. Após a segunda lavagem foram adicionados 200 µL de tampão de lavagem com nova centrifugação. As células foram então fixadas em 200 µL de PBS-formaldeído a 2%. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACSscalibur, Becton & Dickson, San José, CA, USA) e para a análise dos resultados foi utilizado o programa De Novo Software - FCS Express (Los Angeles, CA, USA). Os resultados foram expressos como porcentagem de células positivas e da Intensidade Média de Fluorescência (IMF).

### **ELISA - Detecção de granulinsina**

Placas de alta afinidade (NUNC ou Corning) foram recobertas com 100 µL por cavidade do anticorpo anti-granulinsina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluído a 1/5000 em tampão TBS (sem adição de proteínas) pH 7,2 e incubadas por uma noite à temperatura ambiente. Depois do período de incubação as placas foram lavadas duas vezes com 380 µl por cavidade de tampão TBS pH 7,2, com intervalo de 30 segundos entre as lavagens e após a adição de 300 µl de tampão de bloqueio (TBS-leite desnatado 5%) a cada cavidade, as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C e lavadas por 3 vezes com 380 µl de tampão TBS pH 7,2 com intervalo de 30 segundos entre as lavagens. As amostras de soro (100 µl/cavidade) foram então adicionadas em duplicata e as placas foram incubadas por 90 minutos a 37°C. Como controle negativo foi utilizado soro bovino

fetal e como controle positivo um pool de soros positivos para o antígeno dominante gp 43. Foram realizadas a seguir, quatro lavagens com 380  $\mu$ L de tampão TBS pH 7,2 com intervalo de 30 segundos e em seguida foi adicionado a cada cavidade 100  $\mu$ l do anticorpo anti-granulicina (produzido em coelho e gentilmente cedido por Carol Cleyberger, Universidade de Stanford, CA, EUA) diluído a 1/5000 em tampão TBS-BSA-0,1% pH7,2, seguido de um período de incubação de 90 minutos a 37°C. Após quatro lavagens com 380  $\mu$ L/cavidade com tampão TBS pH 7,2 com intervalo de 30 segundos entre as lavagens, foi adicionado 100  $\mu$ l do anticorpo anti-coelho biotilado, diluído a 1/1000 em tampão TBS-BSA-0,1% pH 7,2 e as placas incubadas por 90 minutos a 37°C. As placas foram novamente lavadas quatro vezes com 380  $\mu$ l por cavidade com tampão TBS pH 7,2 com intervalo de 30 segundos entre as lavagens e em seguida adicionado 100  $\mu$ l/cavidade do conjugado estreptoavidina-peroxidase diluído 1/1000 em TBS-BSA-0,1% pH 7,2. Foi utilizado a seguir o tampão TBS-0,05% Tween-20 pH 7,2 para lavar as placas quatro vezes com intervalo de 30 segundos entre as lavagens e a cada cavidade foi adicionado 100  $\mu$ l do substrato-cromógeno (TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - diluído em tampão acetato de sódio pH 5,5) . As placas foram então incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro e para parada da reação foram adicionados a cada cavidade 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N). A leitura foi realizada em leitora de ELISA (Bio Rad, Hercules, CA, USA) a 450 nm e a quantidade relativa de granulicina foi determinada dividindo-se a absorbância das amostras (média das duplicatas) pela absorbância de um pool de soros com elevada concentração de granulicina (controle positivo).

### **Análise estatística**

Os resultados foram analisados por meio de software GraphPad Software Prism 5 (San Diego, CA, USA). A comparação entre os grupos nos experimentos *ex-vivo* e nas culturas na presença de leveduras do fungo foi feita utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns. A comparação entre parâmetros antes e após tratamento com a IL-15 foi feita pelo teste t pareado. Na comparação da dosagem de granulicina entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA com pós-teste *t* student. Foram consideradas significantes diferenças com valor de  $p \leq 0,05$ .

# **RESULTADOS**

#### **4.1- Expressão constitutiva (*ex-vivo*) de CD45RO, CD45RA, CD69 e grânulos citotóxicos por linfócitos T CD8<sup>+</sup> E T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico**

4.1.1- Expressão constitutiva de CD45RO (células de memória) e CD45RA (células *naive*) em células do sangue periférico de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-infecção e controles

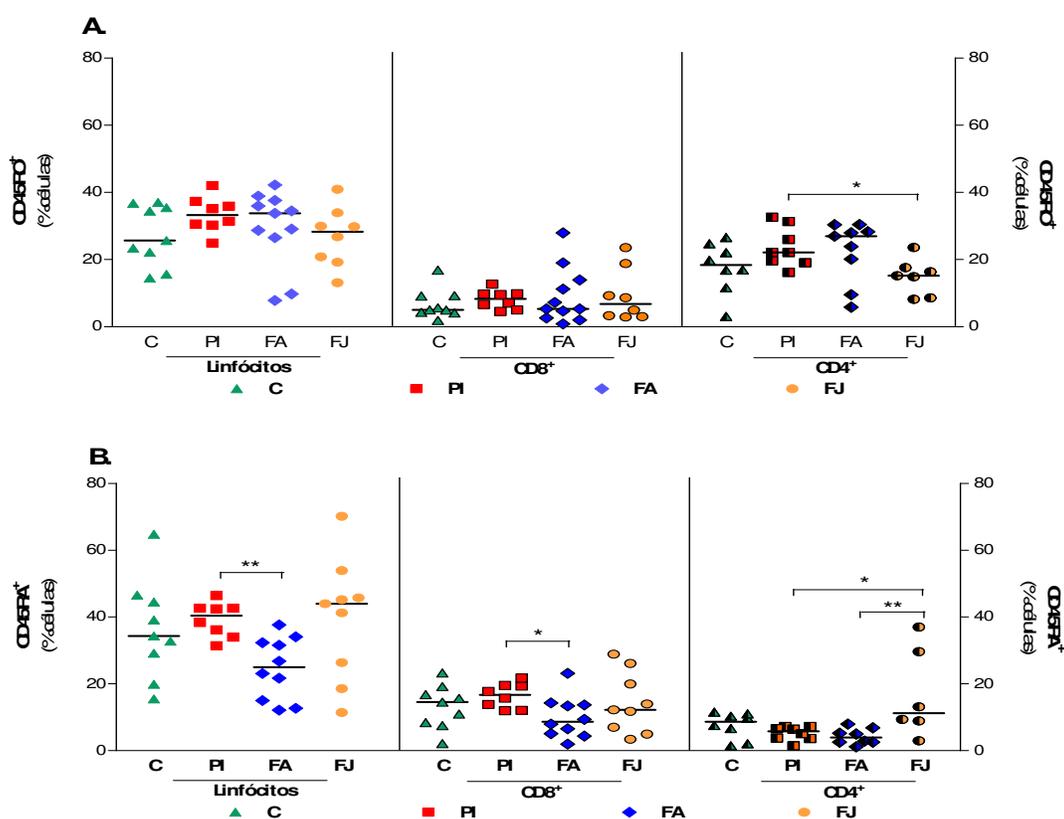
#### **Maior expressão de células CD45RO<sup>+</sup> pelos indivíduos PCM-infecção e menor expressão de células CD45RA<sup>+</sup> nos pacientes com a forma adulta da PCM**

A expansão do *pool* de células de memória garante ao hospedeiro uma resposta secundária rápida e eficaz. Com a finalidade de avaliar a expressão constitutiva de CD45RO, que caracteriza a população de células de memória, procedemos a fenotipagem de células do sangue periférico de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-infecção e controles por citometria de fluxo. Os gráficos representam a porcentagem de células positivas para os vários parâmetros na região (*gate*) determinada por tamanho e granulosidade (FSC/SSC) como sendo a região de linfócitos.

Os resultados mostraram que os indivíduos com PCM-infecção apresentam tendência à maior frequência de linfócitos positivos para esse marcador em relação aos outros grupos. Quando analisamos as células T CD4<sup>+</sup> observamos aumento significativo da população CD45RO<sup>+</sup> nos indivíduos PCM-infecção em relação aos pacientes com a forma aguda da doença, mas sem diferença em relação aos outros grupos. Finalmente, considerando as células T CD8<sup>+</sup>, verificamos que não houve diferença significativa na porcentagem de células CD45RO<sup>+</sup>, no entanto os indivíduos PCM-infecção demonstraram expressão pouco aumentada deste marcador (Figura 1A).

Os linfócitos *naive* são células que já completaram seu estágio de maturação, mas ainda não tiveram contato com antígenos. Este grupo celular pode ser caracterizado pelo marcador de superfície CD45RA. A análise *ex-vivo* de linfócitos do sangue total de pacientes com a forma adulta da PCM demonstrou menor frequência de células *naive* em

comparação com os outros grupos, embora diferença estatística significativa tenha sido observada somente em relação aos indivíduos com PCM-infecção. O mesmo foi encontrado para as células T  $CD8^+CD45RA^+$ , encontradas em menor número nos pacientes com a forma adulta da PCM. Diferentemente, a análise da população  $CD4^+CD45RA^+$  mostrou uma frequência significativamente maior dessas células nos pacientes com a forma juvenil em relação aos demais grupos. Ao analisar mais detalhadamente os dados detectamos aumento expressivo deste marcador em 2 crianças apresentando uma forma muito grave da doença, com baixa resposta ao tratamento ( $CD4^+CD45RA^+$ : 37 e 30% vs.  $CD4^+CD45RO^+$  8 e 14%, respectivamente).

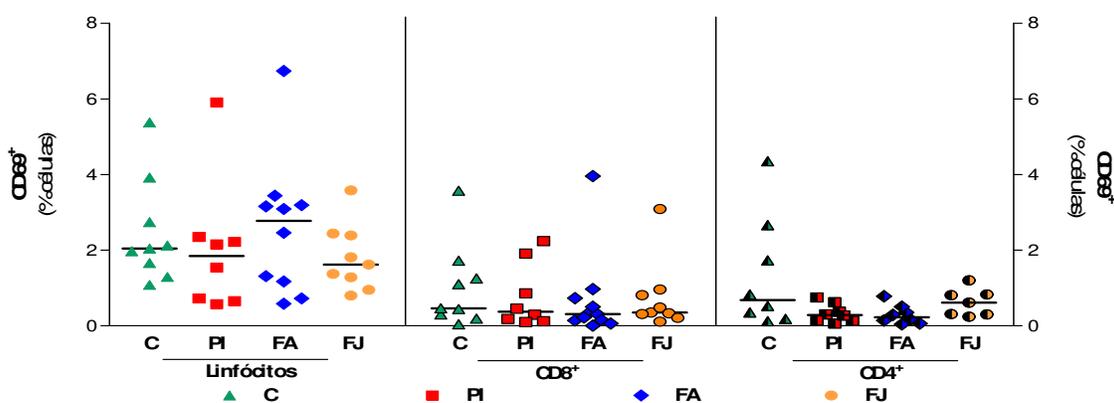


**Figura 1-** Porcentagem de linfócitos totais, células T  $CD8^+$  e células T  $CD4^+$ , *ex-vivo*, no sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM. **A:** Expressão de  $CD45RO^+$ ; **B:** Expressão de  $CD45RA^+$ . As linhas horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,005$ .

#### 4.1.2- Expressão constitutiva do marcador de ativação CD69 em células do sangue periférico de pacientes com PCM, indivíduos PCM-infecção e controles

### Baixa expressão constitutiva de CD69 em indivíduos controle, PCM-infecção e pacientes com PCM

A análise da expressão constitutiva do marcador de ativação celular CD69 mostrou uma baixa frequência de células positivas em todos os grupos estudados. A análise comparativa da expressão deste marcador nos linfócitos totais e nas populações de células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> não mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 2).



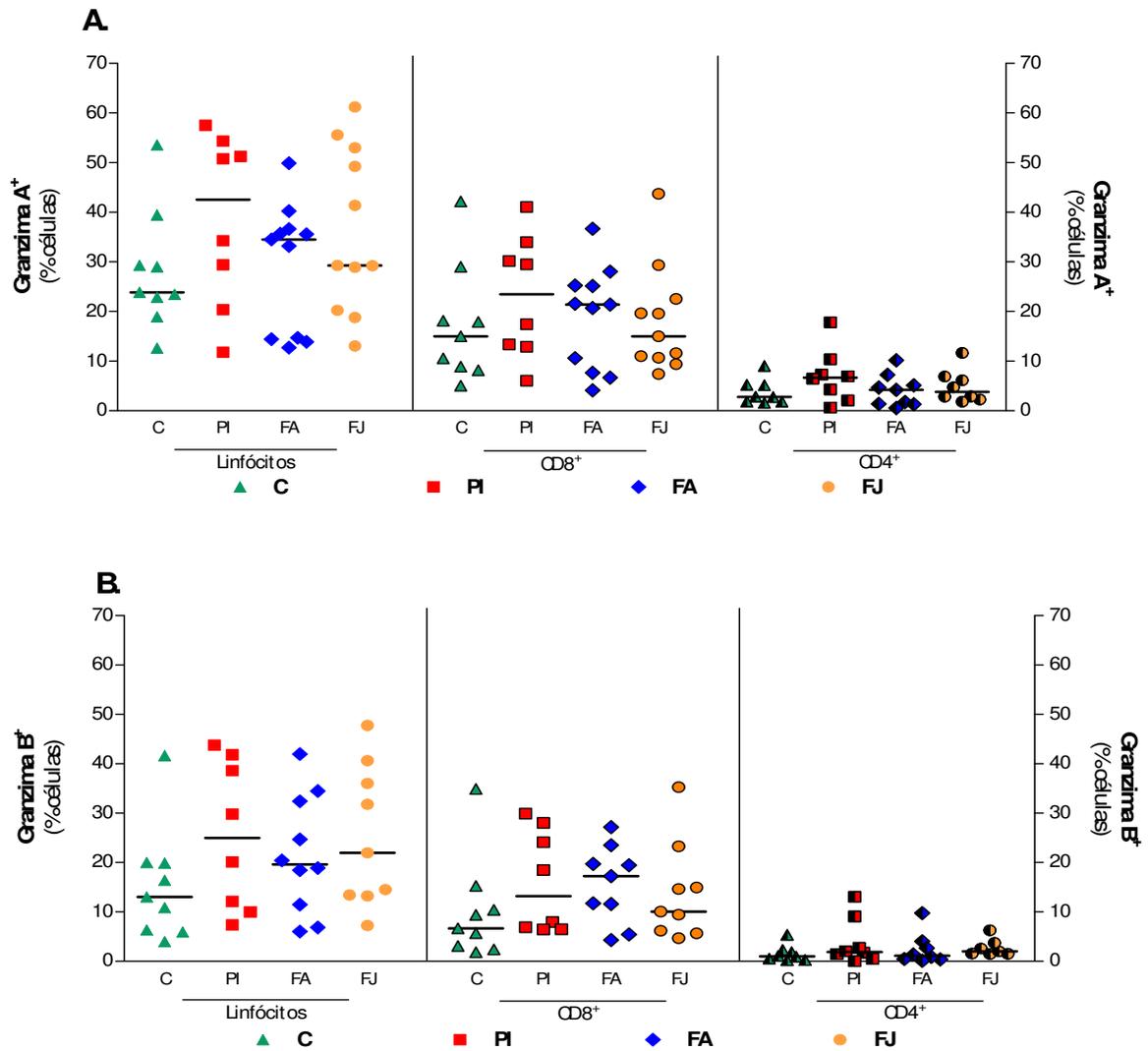
**Figura 2-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup>, *ex-vivo*, expressando CD69 no sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM. As linhas horizontais representam a mediana.

4.1.3- Expressão constitutiva de grânulos citotóxicos (granzima A, granzima B e perforina) em células do sangue periférico de pacientes com PCM, indivíduos PCM-infecção e controles

### **Maior expressão de granzima A e B por células T CD8<sup>+</sup> do que células T CD4<sup>+</sup>**

A liberação de grânulos citotóxicos por células T efectoras constitui um importante mecanismo de defesa contra microrganismos intracelulares. Dentre eles destacam-se a granzima A, granzima B e perforina que atuam em conjunto ou separadamente para promover a lise da célula alvo infectada.

A análise por citometria de fluxo demonstrou expressão constitutiva intracelular significativa de granzima A, granzima B e perforina em linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup> em todos os grupos analisados (C, PI, FA e FJ). O grânulo encontrado com maior frequência nestes linfócitos foi a granzima A, seguida da granzima B e comparativamente a perforina foi o grânulo encontrado constitutivamente em menor número de células (Figura 3 e 4). A análise também deixou claro que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> constituem a principal população celular produtora desses grânulos, enquanto que as células T CD4<sup>+</sup> contribuem com uma porcentagem bem menor. Embora não haja diferença significativa entre os grupos os indivíduos PCM-infecção apresentam maiores níveis de expressão de granzima A e granzima B quando se analisa a população de linfócitos e também apresentam maior expressão de células T CD8<sup>+</sup>granzima A<sup>+</sup>. Em relação às células T CD8<sup>+</sup>granzima B<sup>+</sup> os indivíduos com a forma adulta da PCM apresentam maior expressão. Os níveis de expressão tanto de granzima A quanto de granzima B são muito baixos nas células T CD4<sup>+</sup> (Figura 3).

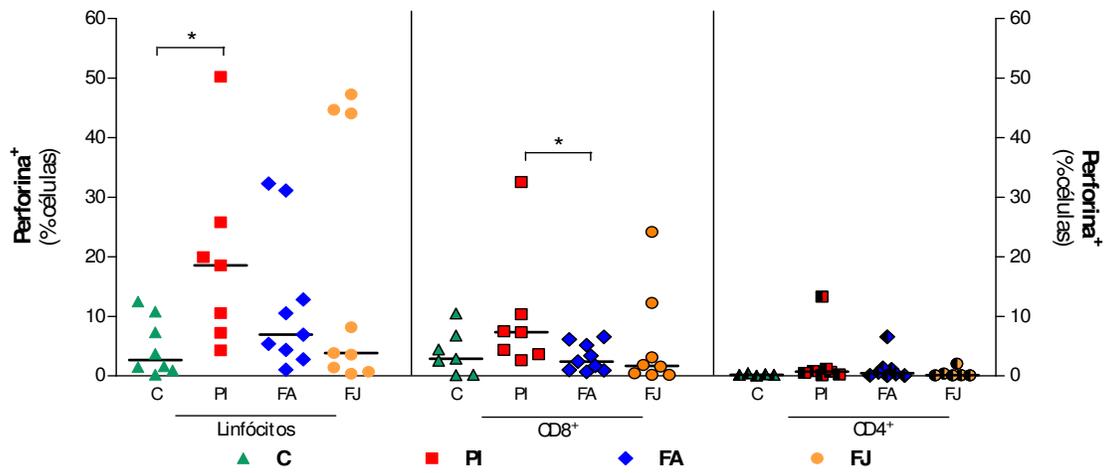


**Figura 3-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup>, *ex-vivo*, positivos para granzima A (A) e granzima B (B) no sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM. As linhas horizontais representam a mediana.

## **Indivíduos PCM-infecção apresentam maior expressão constitutiva de perforina**

A perforina é uma molécula de fundamental importância para a atividade citotóxica. A análise de sua expressão *ex-vivo* na população de linfócitos totais demonstrou níveis elevados nos indivíduos PCM-infecção, com diferença significativa entre o grupo controle. Perfil semelhante ocorreu com as células T CD8<sup>+</sup> e neste caso a diferença significativa foi observada entre o grupo PCM-infecção e pacientes com a forma adulta da doença (Figura 4). É possível observar também, principalmente na população de linfócitos, que alguns indivíduos doentes, apresentam expressão *ex-vivo* deste grânulo acima da média do grupo, com uma porcentagem de células superior a maioria dos indivíduos PCM-infecção, que como já descrito apresentam o maior índice de células perforina<sup>+</sup>. Estes dados indicam diferenças particulares na expressão deste marcador.

Em relação à população de linfócitos totais, os pacientes com a forma juvenil apresentam também, menor proporção de células T CD8<sup>+</sup> positivas para a granzima A, granzima B e perforina quando comparados aos indivíduos PCM-infecção (Tabela 1). Enquanto as células T CD8<sup>+</sup>granzima A<sup>+</sup> dos indivíduos PCM-infecção compreendem cerca de 60% dos linfócitos, nos indivíduos FJ esta porcentagem é de 49%. Para a granzima B observamos 63% para os indivíduos PCM-infecção em relação a 55% para os pacientes com a forma juvenil. A diferença é ainda mais marcante em relação à perforina, cuja porcentagem de células CD8<sup>+</sup>perforina<sup>+</sup> no grupo PCM-infecção (50,3%) e controle (81,3%) é bem maior em relação aos pacientes (FA: 26,1% e FJ: 32,2%), sugerindo um papel protetor para as células CD8<sup>+</sup> (Tabela 1).



**Figura 4-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup>, *ex-vivo*, positivos para perforina no sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM. As linhas horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, \* p<0,05.

A análise por citometria de fluxo demonstrou que apenas um pequeno número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> expressa granzima A, granzima B e perforina, indicando que além das células T CD8<sup>+</sup> outras populações celulares também expressam quantidades significativas desses grânulos. Embora não tenha havido diferença relevante os indivíduos PCM-infecção apresentaram um discreto aumento na frequência de células CD4<sup>+</sup> produtoras de grânulos citotóxicos em relação aos demais grupos.

**Tabela 1-** Frequência de linfócitos totais, células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e outras células (dentro do gate de linfócitos), *ex-vivo*, positivas para granzima A, granzima B e perforina em indivíduos controle, PCM-infecção e pacientes com PCM (FA e FJ).

		<b>Linfócitos Totais</b>	<b>CD8</b>	<b>(%)</b>	<b>CD4</b>	<b>(%)</b>	<b>Outras células</b>	<b>(%)</b>
<b>Granzima A</b>	<b>C</b>	28.1	17.2	(61.2)	3.8	(13.5)	7.1	(25.3)
	<b>PI</b>	38.7	23.1	(59.7)	7.0	(18.1)	8.6	(22.2)
	<b>FA</b>	29.2	19.0	(65.1)	4.0	(13.7)	21.2	(6.2)
	<b>FJ</b>	36.0	17.2	(49.1)	5.8	(16.6)	12.0	(34.3)
<b>Granzima B</b>	<b>C</b>	15.3	10.0	(65.4)	1.6	(10.5)	3.7	(24.2)
	<b>PI</b>	25.5	16.0	(62.7)	3.8	(14.9)	5.7	(22.4)
	<b>FA</b>	21.6	15.6	(72.2)	7.5	(11.6)	3.5	(16.2)
	<b>FJ</b>	25.2	13.8	(54.8)	2.7	(10.7)	8.7	(34.5)
<b>Perforina</b>	<b>C</b>	4.8	3.9	(81.3)	0.2	(4.2)	0.7	(14.6)
	<b>PI</b>	17.1	8.6	(50.3)	2.1	(12.3)	6.4	(37.4)
	<b>FA</b>	11.9	3.1	(26.1)	1.3	(10.9)	7.5	(63.0)
	<b>FJ</b>	17.1	5.5	(32.2)	0.5	(2.9)	11.1	(64.9)

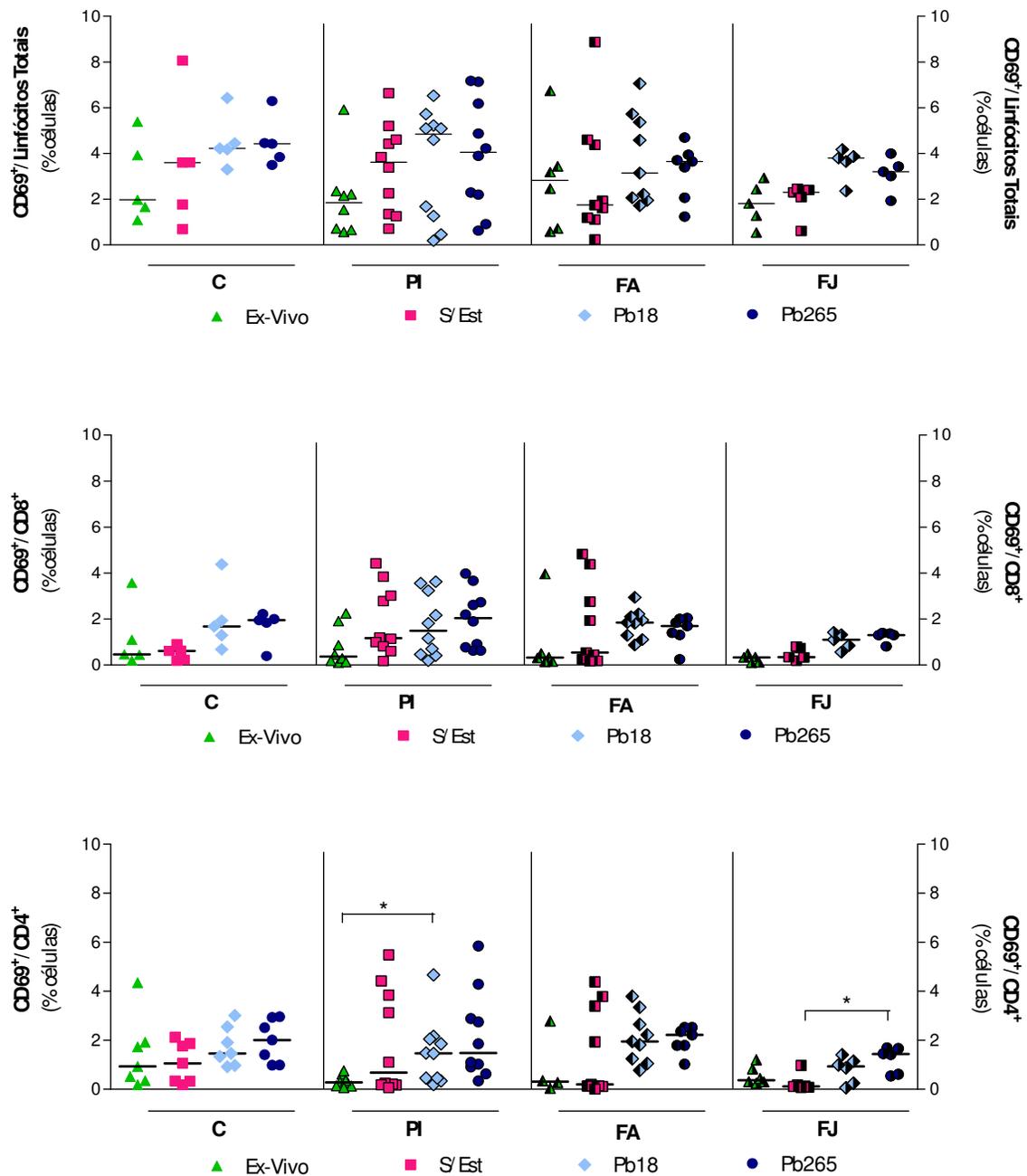
Valor obtido a partir de: Linfócitos Totais - (CD8 e CD4). A porcentagem de cada população em relação ao número de linfócitos totais está indicada entre parêntesis.

#### **4.2- Expressão de CD69 e grânulos citotóxicos por linfócitos (CD4<sup>+</sup> E CD8<sup>+</sup>) do sangue periférico estimulados com leveduras viáveis de *Paracoccidioides brasiliensis* (cepa Pb18 ou Pb265)**

##### **Indivíduos controle e PCM-infecção aumentam o número de células ativadas após estímulo com *P. brasiliensis***

A expressão do marcador de ativação CD69 e dos grânulos citotóxicos também foi avaliada por citometria de fluxo em células do sangue periférico após estimulação com leveduras viáveis de *Paracoccidioides brasiliensis* (cepa Pb18 ou Pb265) por 5 dias em cultura. As figuras abaixo representam a porcentagem de células positivas para os vários parâmetros na região (*gate*) determinada por tamanho e granulosidade (FSC / SSC) como sendo a região de linfócitos.

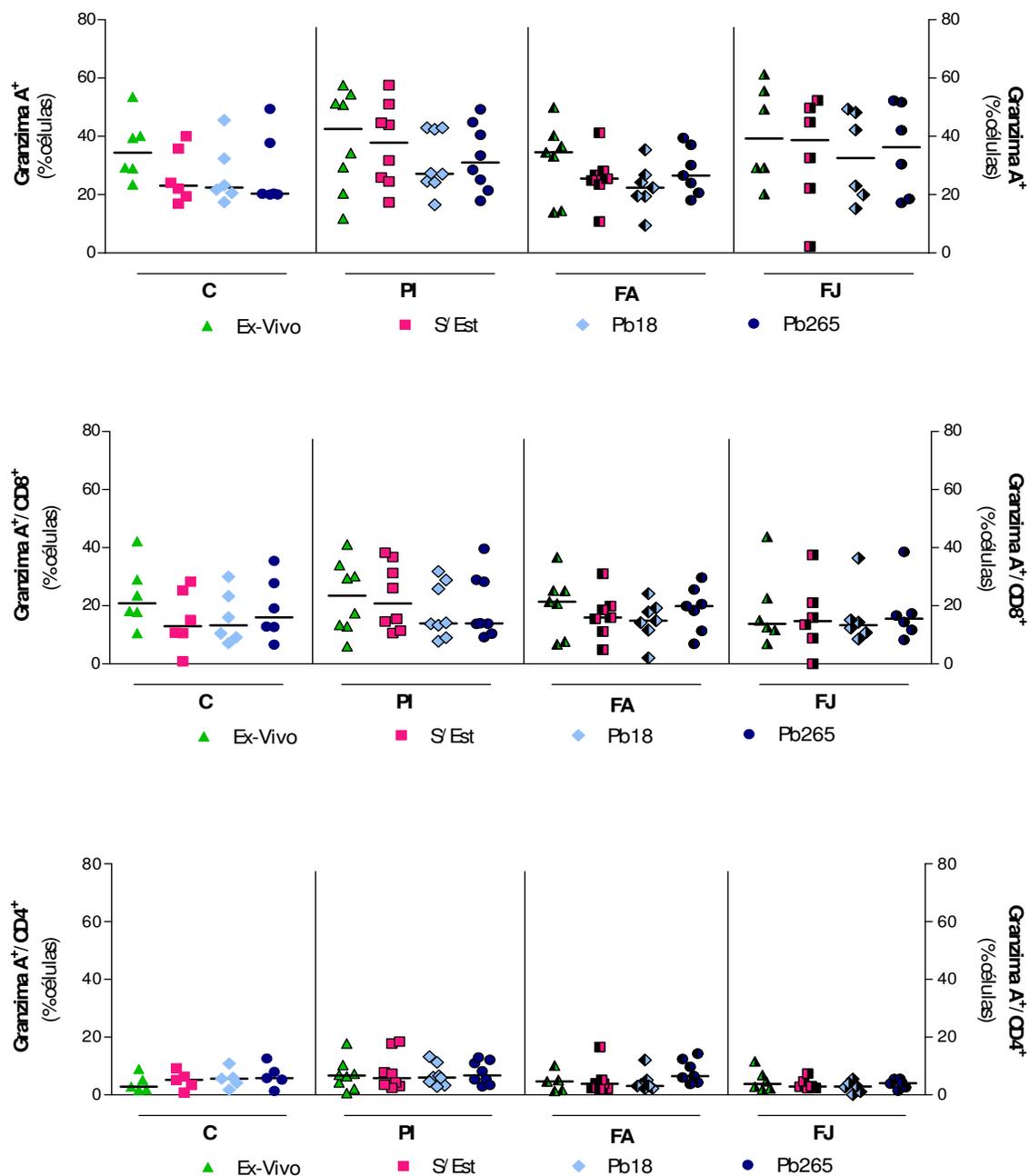
A presença de leveduras de baixa virulência (Pb265) e de alta virulência (Pb18) induziu um pequeno aumento na frequência de células ativadas (linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>) em todos os grupos analisados. Diferenças em relação à condição *ex vivo* foram significativas na população de células T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos PCM-infecção e os pacientes com a forma juvenil demonstraram aumento relevante na expressão do marcador de ativação CD69 entre as células não estimuladas e estimuladas com a cepa de baixa virulência (Pb265). De maneira geral, os indivíduos controle e PCM-infecção apresentaram aumento de células CD69<sup>+</sup> nas culturas não estimuladas, em relação às células *ex-vivo*, o mesmo não foi observado nos indivíduos doentes, para os quais a proporção de células *ex-vivo* e não estimuladas foi menor ou semelhante. O número de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> foi semelhante nos quatro grupos e os pacientes com a forma juvenil da PCM exibiram as menores frequências destas células em relação aos demais grupos estudados (Figura 5).



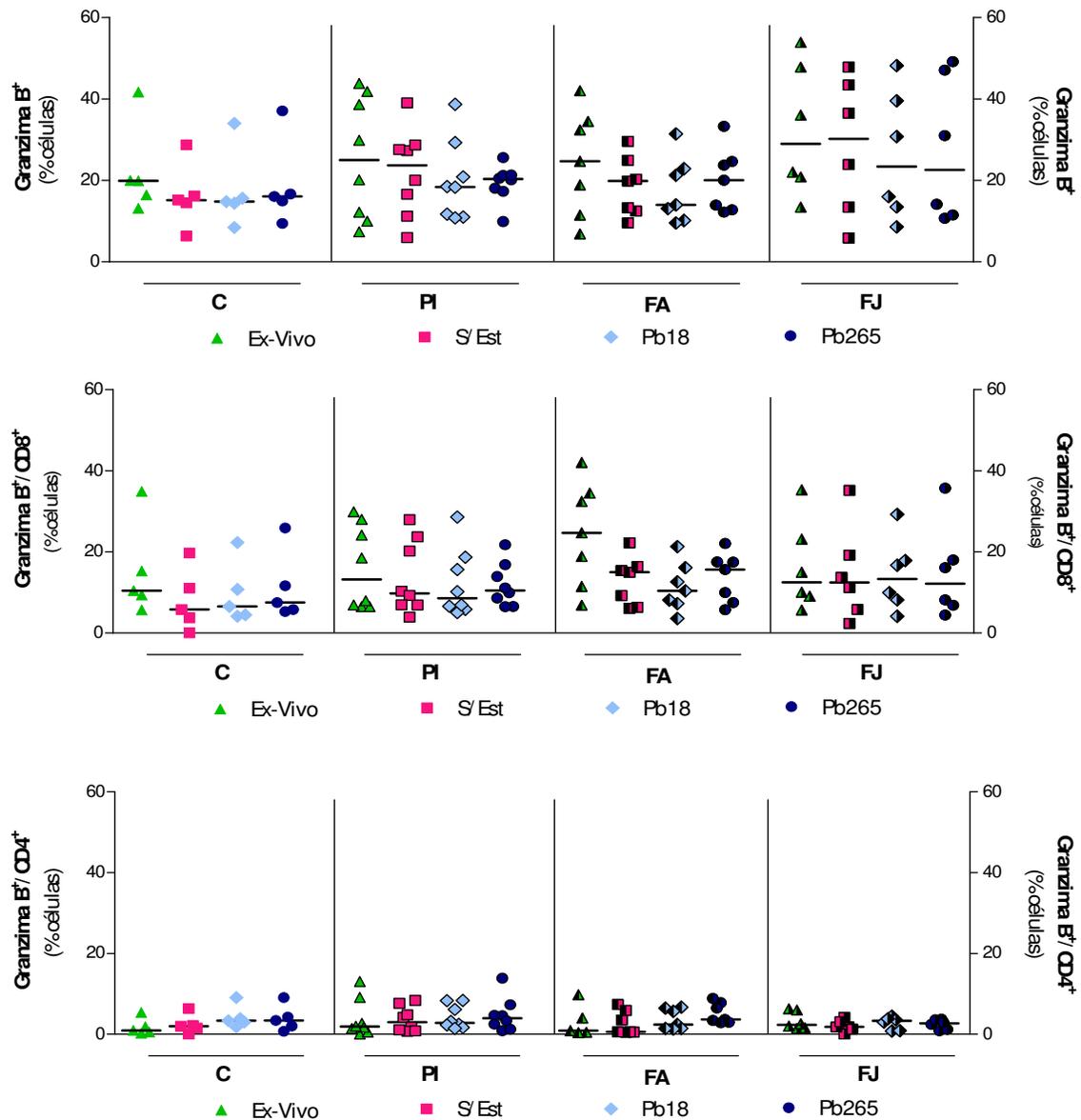
**Figura 5-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com paracoccidiodomycose-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando CD69, *ex-vivo* e estimuladas ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência). As linhas horizontais representam a mediana. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. \*p<0,05.

### **Discreta redução na expressão de granzima A, granzima B após estímulo com as cepas Pb18 e Pb265 em linfócitos e células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos PCM-infecção**

As células T CD8<sup>+</sup> apresentam um maior número de células positivas para a granzima A e B, em relação às células T CD4<sup>+</sup>. Na comparação entre as cepas (Pb18 e Pb265) e entre os grupos estudados, não observamos diferenças relevantes na expressão de granzima A e granzima B (Figuras 6 e 7). Entretanto, observamos nos linfócitos e células T CD8<sup>+</sup> de todos os grupos, tendência de diminuição da expressão destes grânulos após serem submetidas à cultura com o fungo. Nos indivíduos PCM-infecção e FA foi possível detectar também, que embora haja uma menor expressão de granzima A e granzima B, mesmo nas células não estimuladas, após a cultura, principalmente nos linfócitos e nas células T CD8<sup>+</sup> a adição da cepa de alta virulência reduziu ainda mais os níveis de expressão destes grânulos (Figuras 6 e 7).



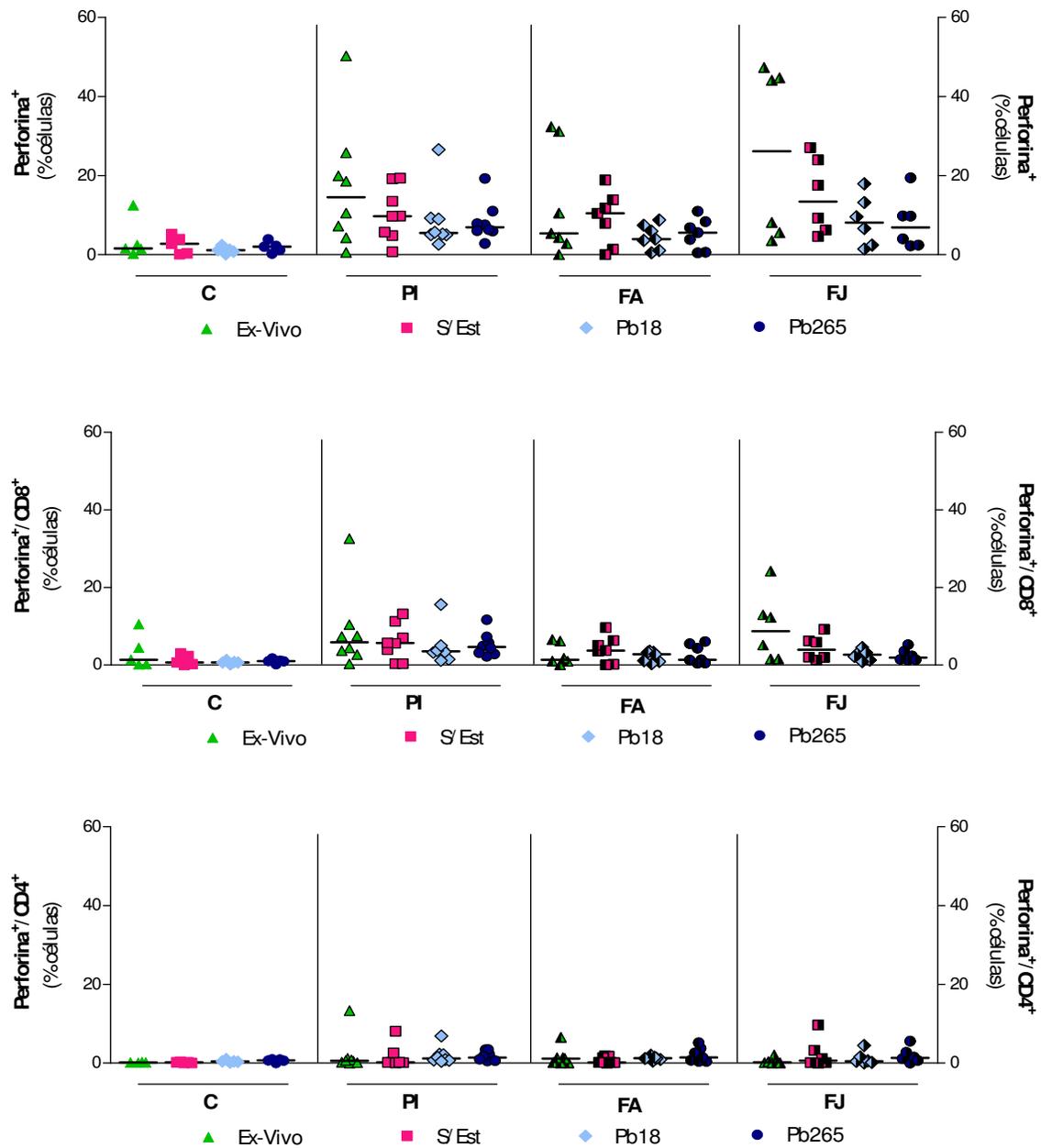
**Figura 6-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com paracoccidiodomycose-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando granzima A, *ex-vivo* e estimuladas ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência). As linhas horizontais representam a mediana.



**Figura 7-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com paracoccidiodomycose-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando granzima B, *ex-vivo* e estimuladas ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência). As linhas horizontais representam a mediana.

### **Linfócitos e células T CD8<sup>+</sup> apresentam pequena redução na expressão de perforina na presença das cepas (Pb18 e Pb265) de *P. brasiliensis***

Em relação à perforina, da mesma forma que para as granzima A e B, a maior expressão deste marcador é observada nas células T CD8<sup>+</sup> e na maior parte das culturas também é clara a diminuição da frequência de células positivas (linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup>) após o procedimento de incubação, na presença ou não de leveduras do fungo. Também observamos que os linfócitos totais e as células T CD8<sup>+</sup> apresentaram pequena redução na expressão de perforina na presença das cepas Pb18 e Pb265, em relação às culturas não estimuladas, em todos os grupos estudados, enquanto o grupo controle apresenta expressão muito reduzida deste marcador. A frequência de células CD4<sup>+</sup>perforina<sup>+</sup> foi bastante baixa e sem diferença significativa entre os grupos e as condições estudadas (Figura 8).



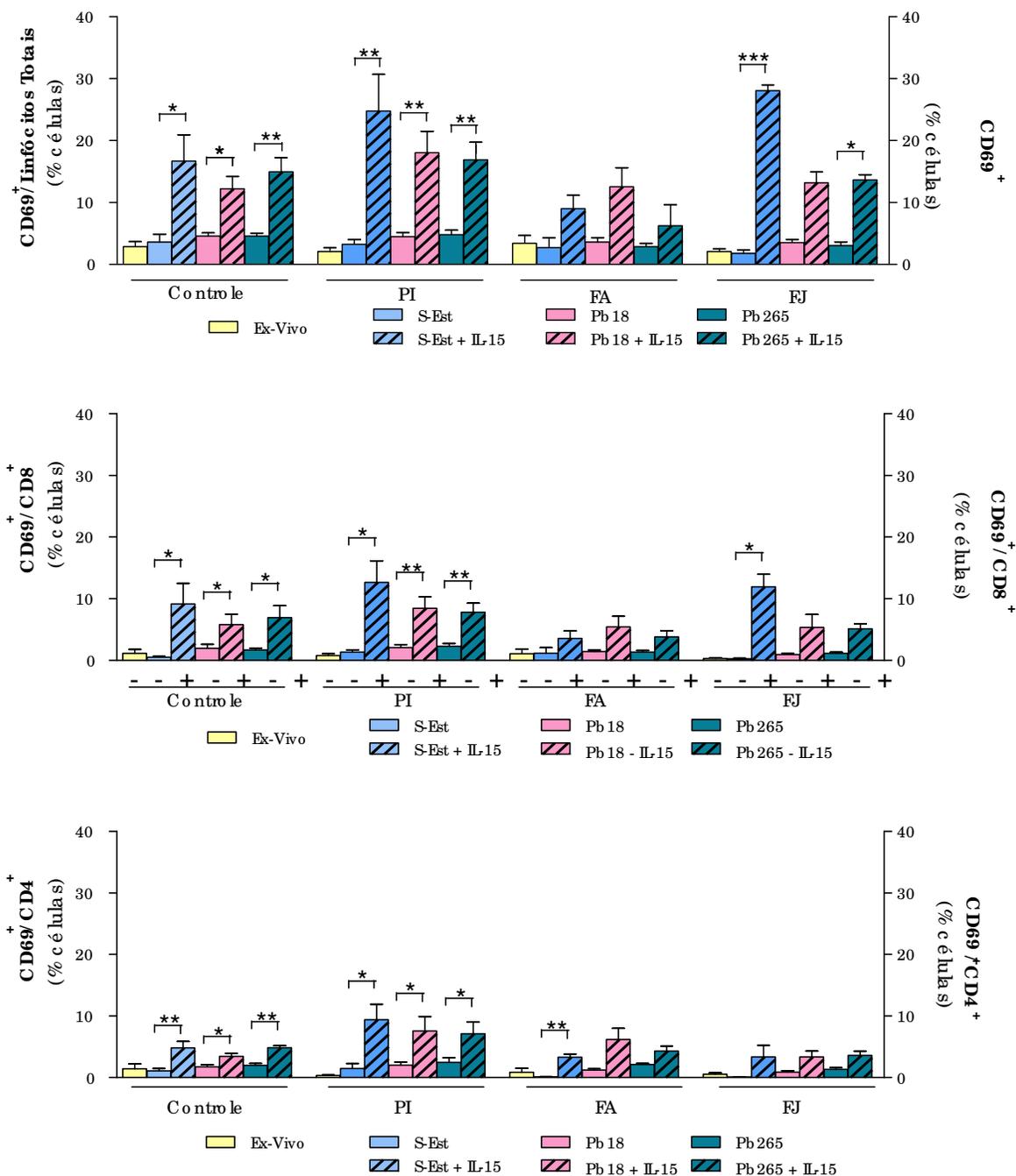
**Figura 8-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com paracoccidiodomycose-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando perforina, *ex-vivo*, estimuladas ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência). As linhas horizontais representam a mediana.

#### 4.2.1- Efeito da adição de IL-15 sobre a expressão de CD69 e grânulos citotóxicos em culturas estimuladas com leveduras viáveis de *Paracoccidioides brasiliensis* (cepa Pb18 ou Pb265)

### **Aumento significativo no número de células ativadas em indivíduos controle e PCM-infecção após estímulo com as cepas Pb18 e Pb265**

A IL-15, citocina produzida por fagócitos mononucleares, é essencial para a expansão e ativação das células T CD8<sup>+</sup> efectoras e de memória. Desta forma a secreção de quantidades adequadas deste mediador constitui um requisito básico para ativação e desenvolvimento de resposta protetora mediada por células TCD8<sup>+</sup>.

A adição da IL-15 nas culturas de células resultou em um aumento da expressão do marcador de ativação CD69 nos grupos controle e PCM-infecção, considerando-se tanto os linfócitos totais, como as populações de células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, na presença das cepas de alta e baixa virulência. Os indivíduos com a forma juvenil da doença foram capazes de responder significativamente a IL-15 apenas nas culturas não estimuladas, ou seja, na ausência das leveduras de *P. brasiliensis* e na presença da cepa de baixa virulência. Além da reconhecida ação da IL-15 nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, esta citocina também mostrou um potente efeito sobre os linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos pacientes com a forma adulta da PCM que, da mesma forma que as células T CD8<sup>+</sup> dos pacientes com a FJ, também só demonstraram resposta significativa nas células cultivadas sem o fungo. A maior frequência de células positivas foi observada no grupo PCM-infecção e as menores porcentagens de células CD69<sup>+</sup> foram observadas nas preparações de pacientes com a forma adulta da PCM (Fig. 9). Este grupo de pacientes apresentou também aumento relevante na expressão, de CD69<sup>+</sup>, após adição da IL-15, apenas nas células T CD4<sup>+</sup> não estimuladas com as cepas de *P. brasiliensis*. Não foram detectadas diferenças quanto às cepas Pb18 ou Pb265 em relação ao marcador de ativação CD69 (Figura 9).



**Figura 9-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando CD69, *ex-vivo*, estimuladas ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência) e na presença ou ausência de IL-15 (50 ng/mL). Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico *t* pareado, \*p<0,05, \*\*p<0,005.

## **Indivíduos PCM-infecção tem maior índice de aumento nas culturas estimuladas com IL-15 na ausência do fungo**

Ao avaliar o índice de aumento na frequência de células positivas para o marcador de ativação CD69 provocado pela IL-15, verificamos maior valor nas células em cultura apenas com a IL-15. Após a adição das cepas (Pb18 e Pb265) o índice de aumento é reduzido significativamente. Em todos os grupos não observamos diferenças relevantes entre as cepas. As células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos controle, PCM-infecção e com forma adulta também apresentam maior resposta a IL-15 com maior índice nas células ausentes do fungo e por isso apresentam diferença significativa após cultivo com o *P. brasiliensis*. Nas células T CD4<sup>+</sup> apenas os indivíduos PCM-infecção demonstraram diferença significativa antes e após cultura com o fungo.

Embora os indivíduos com a forma juvenil da PCM tenham apresentado um aumento expressivo de células ativadas nas culturas apenas com IL-15 a análise da diferença do índice de aumento em relação às células em cultura com as cepas não se mostrou significativa, provavelmente pelas variações de expressão de CD69 observadas entre estes indivíduos (Tabela 2). Estes resultados sugerem ação mais eficiente da IL-15 em linfócitos, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> de indivíduos PCM-infecção, e em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos controle e FA, mesmo na presença da cepa de alta virulência.

**Tabela 2-** Índice de aumento da frequência de células CD69<sup>+</sup> em linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> após adição de IL-15

		<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>	
<b>CD69</b>	<b>Linfócitos</b>	S/Est	5.17 ± 1.64	9.80 ± 2.87	12.44 ± 7.10	25.94 ± 8.87
		Pb18	1.72 ± 0.40	3.31 ± 0.76*	3.34 ± 1.57	3.28 ± 1.41
		Pb265	2.34 ± 0.45	3.43 ± 0.90*	1.46 ± 0.70	3.96 ± 1.21
	<b>Células TCD8<sup>+</sup></b>	S/Est	14.57 ± 2.21	15.38 ± 4.49	21.02 ± 6.21	50.25 ± 15.95
		Pb18	2.17 ± 0.86*	4.15 ± 1.20*	3.70 ± 2.15*	5.49 ± 2.64
		Pb265	3.70 ± 1.15*	5.03 ± 1.53*	2.21 ± 0.79	3.90 ± 1.67
	<b>Células TCD4<sup>+</sup></b>	S/Est	4.57 ± 1.95	26.80 ± 8.82	21.71 ± 8.37	21.80 ± 9.86
		Pb18	0.83 ± 0.50	3.80 ± 1.02	3.67 ± 1.67	3.48 ± 1.20
		Pb265	1.31 ± 0.58	4.18 ± 1.37	1.12 ± 0.41	2.52 ± 1.57

Índice de aumento= razão unitária da variação antes e após a adição de IL-15. Valores expressos como média ± EPM. Teste estatístico Mann Whitney, \*p<0,05, em relação às culturas não estimuladas com o fungo.

### **Indivíduos doentes apresentam aumento significativo da IMF de CD69 em células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> após adição de IL-15 e estímulo com a cepa de baixa virulência**

A diferença de virulência entre as cepas pode ser observada nos pacientes tanto da forma crônica quanto da forma aguda da PCM, após estímulo com a cepa de baixa virulência. Embora não se tenha observado diferenças no aumento da expressão de CD69 nas células T CD8<sup>+</sup> após estímulo com as cepas, nos indivíduos doentes, ficou demonstrado aumento significativo na intensidade média de fluorescência após adição de

IL-15 apenas com a cepa de baixa virulência, evidenciando o efeito patogênico da cepa de alta virulência Pb18 (Tabela 6).

Nas células T CD4<sup>+</sup> o aumento da IMF das células ativadas foi possível ser observado em todos os grupos, com exceção do grupo PCM-infecção, apenas no estímulo com a cepa de baixa virulência. A ação da IL-15 não demonstrou aumento significativo com a cepa de alta virulência. Embora os indivíduos PCM-infecção tenham demonstrado aumento significativo na expressão de CD69 e apresentem o maior número de células ativadas não apresentaram diferença significativa na IMF nas células T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Tabela 3).

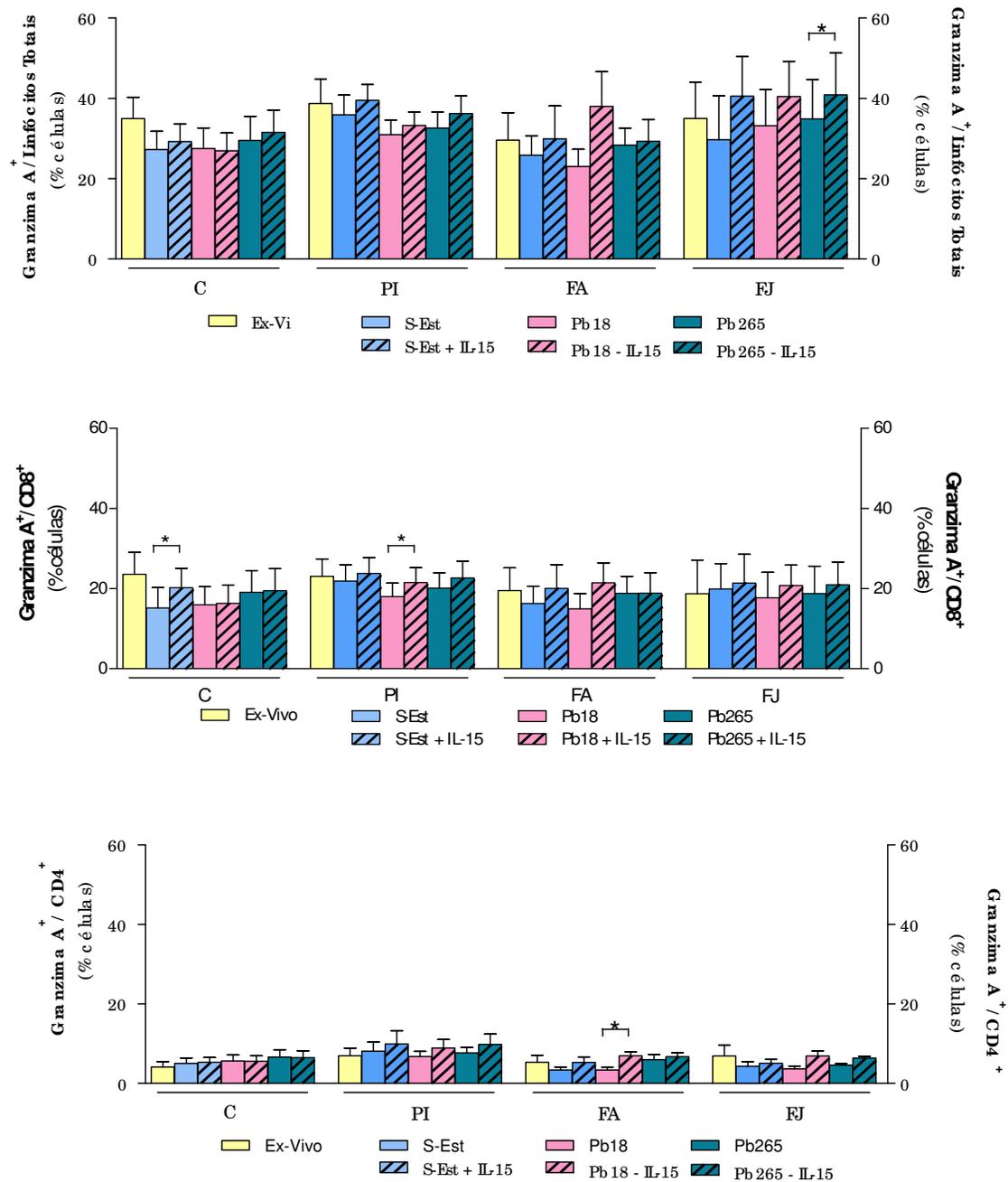
**Tabela 3-** Efeito da adição da IL-15 na intensidade média de fluorescência (IMF) de CD69 por células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> de controles, indivíduos com PCM-infecção e pacientes com a forma adulta (FA) e juvenil (FJ) da PCM

		Intensidade Média de Fluorescência (IMF)				
		Células CD8 <sup>+</sup>		Células CD4 <sup>+</sup>		
		- IL-15	+ IL-15	- IL-15	+ IL-15	
CD69	Controle	S/Est	10.94 ± 1.19	15.60 ± 2.52*	10.25 ± 0.86	14.47 ± 2.11
		Pb18	15.64 ± 2.00	18.64 ± 3.27	11.53 ± 0.94	15.77 ± 2.45
		Pb265	13.91 ± 1.82	17.07 ± 2.96	11.54 ± 1.27	15.53 ± 2.64*
	PI	S/Est	10.19 ± 1.52	11.71 ± 1.10	10.6 ± 1.20	11.11 ± 0.92
		Pb18	9.83 ± 0.52	12.05 ± 1.17	9.35 ± 0.49	11.86 ± 1.00
		Pb265	9.72 ± 0.67	10.61 ± 0.80	9.48 ± 0.52	11.13 ± 0.68
	FA	S/Est	10.17 ± 3.65	12.79 ± 1.78	10.17 ± 3.65	12.79 ± 1.78
		Pb18	9.51 ± 0.92	13.65 ± 2.50	9.51 ± 0.92	13.65 ± 2.50
		Pb265	10.32 ± 1.72	13.08 ± 1.88*	10.32 ± 1.72	13.08 ± 1.88*
	FJ	S/Est	9.74 ± 1.95	10.44 ± 1.33	9.74 ± 1.95	11.68 ± 0.71
		Pb18	7.00 ± 2.41	10.41 ± 1.16	6.98 ± 1.71	10.45 ± 1.12
		Pb265	8.27 ± 0.33	10.28 ± 0.82*	8.27 ± 0.33	10.28 ± 0.82*

Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico *t* pareado, \*p<0,05 com IL-15 vs. sem IL-15.

### **Maior expressão de grânulos citotóxicos pelas células T CD8<sup>+</sup> após adição de IL-15**

O impacto da adição de IL-15 sobre a expressão de granzima A foi pouco expressivo. Entretanto, diferenças significativas foram observadas em linfócitos totais, de pacientes com a FJ na presença de leveduras de baixa virulência de *P. brasiliensis* (Pb265). Também foi possível verificar aumento significativo da frequência de células T CD8<sup>+</sup> para granzima A em indivíduos controle, em culturas não estimuladas com o fungo e em indivíduos PCM-infecção, em culturas estimuladas com Pb18. Células T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos FA também demonstraram aumento significativo com adição de IL-15, mesmo na presença da cepa de alta virulência Pb18.



**Figura 10-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando granzima A, *ex-vivo*, estimuladas ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e

Pb265 (baixa virulência) e na presença ou ausência de IL-15 (50 ng/mL). Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Teste estatístico *t* pareado, \**p*<0,05.

A análise do índice de aumento da expressão de granzima A demonstra que o efeito da IL-15 na expressão deste grânulo é bem menor comparado ao do marcador de ativação CD69. Não foi observada diferença significativa entre linfócitos, células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> na comparação do índice entre culturas apenas com IL-15 e após adição das cepas (Pb18 e Pb265), em nenhum dos grupos analisados. É possível observar apenas que nas células T CD4<sup>+</sup> há um discreto aumento deste indicador na presença de leveduras da cepa Pb18 em relação à cepa de baixa virulência nos pacientes com PCM (FA e FJ) e que os indivíduos controle apresentam índices de aumento inexpressivos com as duas cepas, e nas três populações celulares (Tabela 4).

**Tabela 4-** Índice de aumento da frequência de células granzima A<sup>+</sup> em linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> após adição de IL-15.

		<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>	
<b>Granzima A</b>	<b>Linfócitos</b>	S/Est	0.10 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.08	0.24 $\pm$ 0.13	0.13 $\pm$ 0.10
		Pb18	0.00 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.10	0.69 $\pm$ 0.28	0.29 $\pm$ 0.15
		Pb265	0.10 $\pm$ 0.10	0.14 $\pm$ 0.09	0.12 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.07
	<b>Células TCD8<sup>+</sup></b>	<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>	
		S/Est	1.35 $\pm$ 0.97	0.13 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.15	0.04 $\pm$ 0.09
		Pb18	0.02 $\pm$ 0.09	0.24 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.38	0.31 $\pm$ 0.24
	<b>Células T CD4<sup>+</sup></b>	Pb265	0.05 $\pm$ 0.07	0.17 $\pm$ 0.11	0.15 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.12
		<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>	
		S/Est	0.14 $\pm$ 0.16	0.35 $\pm$ 0.29	0.27 $\pm$ 0.29	0.33 $\pm$ 0.26
	Pb18	0.00 $\pm$ 0.07	0.29 $\pm$ 0.13	1.70 $\pm$ 0.59	1.14 $\pm$ 0.56	
	Pb265	0.05 $\pm$ 0.11	0.24 $\pm$ 0.14	0.16 $\pm$ 0.15	0.40 $\pm$ 0.14	

Índice de aumento= razão unitária da variação antes e após a adição de IL-15. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.

### **Indivíduos PCM-infecção e FA apresentam aumento significativo da IMF de granzima A após adição de IL-15 e estímulo com a cepa de alta virulência**

A expressão de granzima A não sofreu aumento significativo após adição de IL-15 e estímulo com as cepas Pb18 e Pb265, no entanto a análise da intensidade média de fluorescência deste grânulo nas células T CD8<sup>+</sup> demonstrou aumento significativo após estímulo com a IL-15 tanto nos indivíduos PCM-infecção como nos indivíduos FA, nas células estimuladas ou não com Pb18 e Pb265. Além disso, demonstrou que os indivíduos FJ também apresentaram aumento da IMF na presença da cepa de baixa virulência. Nos indivíduos controle foi possível observar aumento de IMF apenas nas células T CD8<sup>+</sup> que não tiveram contato com o fungo.

Diferente do observado com o marcador de ativação CD69, as células T CD4<sup>+</sup> da mesma forma que as células T CD8<sup>+</sup> dos pacientes com a forma adulta e dos indivíduos PCM-infecção, foram capazes de aumentar a expressão de granzima A, mesmo após estímulo com a cepa de alta virulência. Chama a atenção o aumento da IMF nas células T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos FA com aumento significativo nas células estimuladas ou não com as cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis*. Da mesma forma que o observado nas células T CD8<sup>+</sup>, este grupo de indivíduos respondeu a IL-15 de forma semelhante aos indivíduos PCM-infecção, demonstrando aumento significativo na IMF da granzima A, mesmo na presença da cepa de alta virulência. As células T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos controle não apresentaram aumento relevante da IMF para a granzima A no estímulo com a IL-15 e nos pacientes com a forma juvenil o aumento foi observado apenas nas células que não tiveram contato com o fungo (Tabela 5).

Estes resultados demonstraram diferenças na capacidade de resposta das células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> dos indivíduos com a forma crônica da PCM em relação aos indivíduos com a forma aguda e que em relação à IMF da granzima A os indivíduos FA demonstraram resposta semelhante aos indivíduos PCM-infecção (Tabela 5).

**Tabela 5-** Efeito da adição da IL-15 na intensidade média de fluorescência (IMF) de granzima A por células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> de controles, indivíduos com PCM-infecção e pacientes com a forma adulta (FA) e juvenil (FJ) da PCM

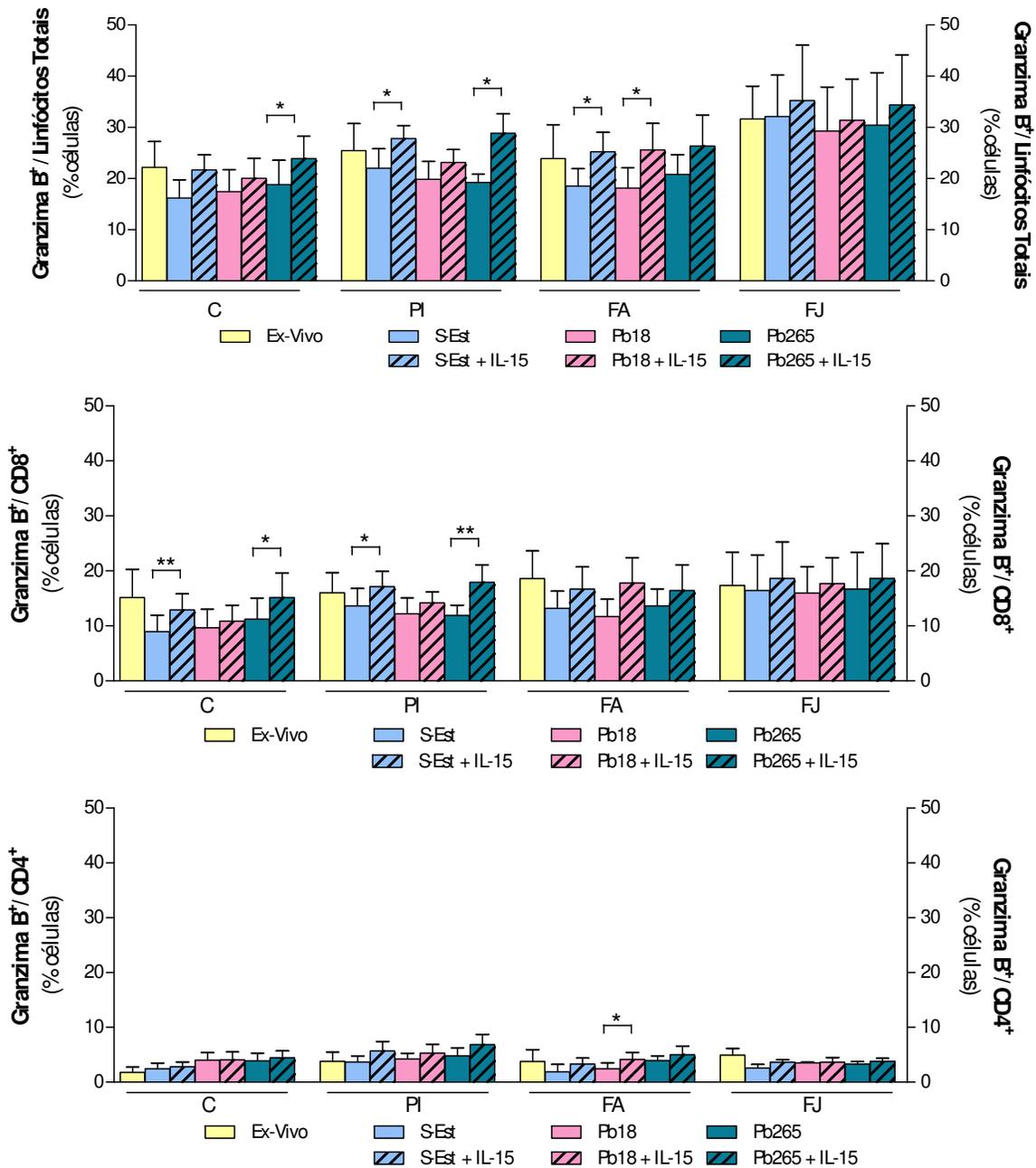
		Intensidade Média de Fluorescência (IMF)				
		Células CD8 <sup>+</sup>		Células CD4 <sup>+</sup>		
		- IL-15	+ IL-15	- IL-15	+ IL-15	
Granzima A	Controle	S/Est	15,12 ± 1,79	24,96 ± 3,61*	13,7 ± 1,84	18,04 ± 3,39
		Pb18	17,18 ± 1,67	18,77 ± 2,96	14,45 ± 1,61	16,06 ± 2,39
		Pb265	18,31 ± 2,45	21,7 ± 3,937	14,25 ± 1,87	16,51 ± 3,07
	PI	S/Est	13,02 ± 1,17	18,78 ± 0,84*	10,88 ± 0,68	15,19 ± 0,55*
		Pb18	11,82 ± 0,90	14,77 ± 0,96*	10,26 ± 0,36	13,24 ± 0,62*
		Pb265	12,83 ± 1,025	16,47 ± 1,08*	11,07 ± 0,49	13,60 ± 0,60
	FA	S/Est	15,60 ± 2,40	20,13 ± 1,66*	11,72 ± 1,70	17,89 ± 2,61*
		Pb18	11,21 ± 1,47	18,69 ± 2,34*	9,64 ± 1,97	15,9 ± 2,08*
		Pb265	12,29 ± 1,06	19,91 ± 1,86*	11,16 ± 1,22	15,8 ± 1,82*
	FJ	S/Est	14,64 ± 3,44	18,21 ± 1,09	11,35 ± 1,70	13,31 ± 0,97*
		Pb18	13,92 ± 2,52	18,28 ± 3,43	11,91 ± 1,10	14,94 ± 1,81
		Pb265	13,77 ± 1,94	19,35 ± 2,30*	11,89 ± 0,58	14,52 ± 1,47

Resultados expressos como média ± EPM, teste estatístico *t* pareado \* p<0,05 com IL-15 vs, sem IL-15

**Apenas os indivíduos PCM-infecção apresentam expressão aumentada de granzima B em linfócitos e células T CD8<sup>+</sup> após a adição de IL-15**

A adição da IL-15 se mostrou mais relevante na expressão de granzima B em relação à granzima A. Esta citocina aumentou significativamente o número de linfócitos granzima B<sup>+</sup> em indivíduos do grupo controle e PCM-infecção, na presença de leveduras da

cepa de baixa virulência (Pb265). Nos Indivíduos PCM-infecção também se observou um aumento significativo da frequência de células positivas para granzima B nas culturas onde o fungo não foi adicionado (sem estímulo). É interessante notar que para os pacientes com a forma adulta da PCM um aumento significativo da expressão de granzima B foi detectado em linfócitos totais, nas células não estimuladas e da mesma forma que as células T CD4<sup>+</sup> também foi observado na presença de leveduras de alta virulência (Pb18). Para os pacientes com a forma juvenil da doença a IL-15 não causou nenhum efeito detectável sobre a expressão da granzima B, em nenhuma das populações celulares avaliadas. Finalmente, em relação às células T CD8<sup>+</sup> pudemos observar que a IL-15 induziu aumento da frequência de células granzima B positivas no grupo controle na ausência do fungo e na presença apenas da cepa de baixa virulência e o mesmo foi observado nos indivíduos PCM-infecção (Figura 11).



**Figura 11-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando granzima B, *ex-vivo*, estimuladas ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e

Pb265 (baixa virulência) e na presença ou ausência de IL-15 (50 ng/mL). Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Teste estatístico *t* pareado, \**p*<0,05, \*\**p*<0,005.

Da mesma forma que para a granzima A o índice de aumento não foi tão expressivo quanto o observado no marcador CD69. Nos linfócitos e células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos controle e PCM-infecção os maiores valores são observados nas culturas não estimuladas ou estimuladas com a cepa de baixa virulência. Os indivíduos com a FA da PCM demonstraram um discreto aumento deste índice com a cepa de alta virulência em relação à de baixa virulência e os indivíduos com a forma juvenil demonstraram discreta redução. Nas células T CD4<sup>+</sup> maiores valores do índice de aumento foram observados na ausência do fungo. Observamos um índice significativamente menor nas células T CD4<sup>+</sup> de indivíduos FA, após estímulo com a cepa de baixa virulência em relação às células em cultura apenas com IL-15. Estes resultados sugerem uma ação mais positiva da IL-15 nos indivíduos com a FA em relação aos com a forma juvenil da PCM (Tabela 6).

**Tabela 6-** Índice de aumento da frequência de células granzima B<sup>+</sup> em linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> após adição de IL-15

		<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>	
<b>Granzima B</b>	<b>Linfócitos</b>	S/Est	0.50 $\pm$ 0.23	0.48 $\pm$ 0.19	0.41 $\pm$ 0.08	0.04 $\pm$ 0.10
		Pb18	0.23 $\pm$ 0.21	0.28 $\pm$ 0.13	0.45 $\pm$ 0.18	0.15 $\pm$ 0.15
		Pb265	0.34 $\pm$ 0.10	0.49 $\pm$ 0.14	0.26 $\pm$ 0.10	0.25 $\pm$ 0.20
	<b>Células T CD8<sup>+</sup></b>		<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>
		S/Est	0.38 $\pm$ 0.36	0.48 $\pm$ 0.18	0.26 $\pm$ 0.17	0.15 $\pm$ 0.08
		Pb18	0.02 $\pm$ 0.22	0.39 $\pm$ 0.20	0.55 $\pm$ 0.21	0.14 $\pm$ 0.14
	<b>Células T CD4<sup>+</sup></b>		<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>
		S/Est	1.51 $\pm$ 1.56	1.11 $\pm$ 0.52	2.47 $\pm$ 1.36	0.76 $\pm$ 0.49
		Pb18	0.00 $\pm$ 0.18	0.28 $\pm$ 0.18	0.97 $\pm$ 0.39	0.07 $\pm$ 0.61
	Pb265	0.12 $\pm$ 0.26	1.24 $\pm$ 0.75	0.19 $\pm$ 0.12	0.23 $\pm$ 0.30	

Índice de aumento= razão unitária da variação antes e após a adição de IL-15. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.

**Apenas indivíduos PCM-infecção demonstraram aumento da IMF em células CD4<sup>+</sup>granzima B<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>granzima B<sup>+</sup> após adição da IL-15 e na presença da cepa de alta virulência**

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos indivíduos PCM-infecção sofreram aumento de IMF na presença da cepa de alta e baixa virulência enquanto que as mesmas células dos pacientes (FA e FJ) só apresentaram aumento significativo de IMF para granzima B na presença da cepa de baixa virulência, demonstrando maior capacidade de resposta ao *P. brasiliensis* das células T CD8<sup>+</sup> dos indivíduos com PCM-infecção, após estímulo com a IL-15. Na comparação com a ação da IL-15 na porcentagem de células CD8<sup>+</sup>granzima B<sup>+</sup> pudemos observar que não houve aumento de expressão com a cepa de alta virulência mesmo nos indivíduos saudáveis (C e PI), caracterizando a ação da IL-15 apenas no aumento da IMF e não na porcentagem de células positivas (Tabela 7). Da mesma forma que nas células T CD8<sup>+</sup>, apenas os indivíduos PCM-infecção demonstraram aumento significativo na IMF das células T CD4<sup>+</sup>granzima B<sup>+</sup> após adição da IL-15 e estímulo com as cepas Pb18 e Pb265 (Tabela 7). Nos indivíduos com a forma adulta e juvenil o aumento da IMF não se mostrou significante.

Os indivíduos PCM-infecção demonstraram mais uma vez maior capacidade de expressão de grânulos citotóxicos em relação aos indivíduos doentes.

**Tabela 7-** Efeito da adição da IL-15 na intensidade média de fluorescência (IMF) de granzima B por células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> de controles, indivíduos com PCM-infecção e pacientes com a forma adulta (FA) e juvenil (FJ) da PCM

		Intensidade Média de Fluorescência (IMF)				
		Células CD8 <sup>+</sup>		Células CD4 <sup>+</sup>		
		- IL-15	+ IL-15	- IL-15	+ IL-15	
Granzima B	Controle	S/Est	14.01 ± 1.26	18.79 ± 2.44	12.58 ± 1.78	15.71 ± 2.55
		Pb18	13.96 ± 1.66	16.53 ± 2.51	12.73 ± 1.38	14.16 ± 1.99*
		Pb265	14.86 ± 1.81	18.99 ± 3.06	12.82 ± 1.33	15.27 ± 2.26
	PI	S/Est	13.02 ± 1.17	18.78 ± 0.84*	9.12 ± 0.78	12.64 ± 0.95*
		Pb18	11.82 ± 0.90	14.77 ± 0.96*	9.22 ± 0.43	10.61 ± 0.51*
		Pb265	12.83 ± 1.03	16.47 ± 1.08*	9.67 ± 0.43	11.65 ± 0.71*
	FA	S/Est	15.6 ± 2.40	20.13 ± 1.66	9.61 ± 1.36	14.29 ± 2.67
		Pb18	11.21 ± 1.47	18.69 ± 2.34	9.19 ± 1.78	13.53 ± 2.85
		Pb265	12.29 ± 1.06	19.91 ± 1.86*	11.58 ± 1.36	14.7 ± 2.44
	FJ	S/Est	14.64 ± 3.43	18.21 ± 1.10	9.56 ± 0.82	11.74 ± 0.44
		Pb18	13.92 ± 2.52	18.28 ± 3.43	10.33 ± 0.28	12.47 ± 0.73
		Pb265	13.77 ± 1.94	19.35 ± 2.31*	10.63 ± 0.39	12.36 ± 0.65

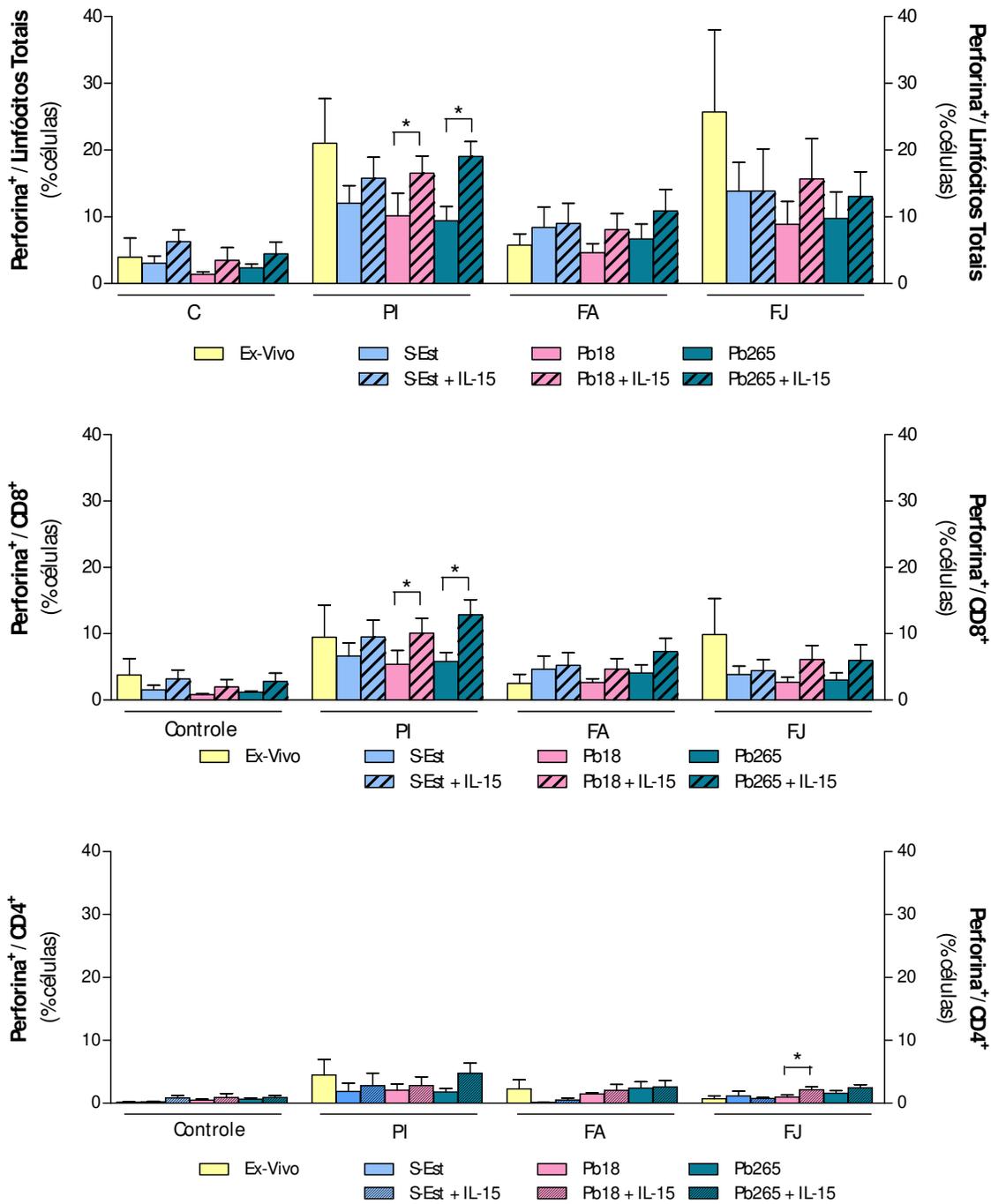
Resultados expressos como média ± EPM, teste estatístico *t* pareado \* p<0,05 com vs, sem IL-15

### Maior expressão de perforina em indivíduos com PCM-infecção

Os indivíduos PCM-infecção tem um maior número de células expressando perforina e conseguem um aumento significativo após a adição de IL-15. A ação desta citocina foi significativa quando se avaliou os linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos PCM-infecção, tanto na presença de leveduras da cepa de alta virulência como na de baixa virulência. No grupo de pacientes com a forma juvenil da doença verificou-se que a adição de IL-15 provocou aumento da frequência de células positivas para perforina em linfócitos, células T CD8<sup>+</sup> e em células T CD4<sup>+</sup> principalmente na presença de

leveduras da cepa Pb18, no entanto a diferença se mostrou significativa apenas nas células T CD4<sup>+</sup>. Estes pacientes também expressam um maior número de células positivas para a perforina em relação os indivíduos com a forma adulta.

Em conjunto os resultados obtidos demonstraram que, para os indivíduos com PCM-infecção, a adição de IL-15 resultou em maior estímulo para a produção de perforina. A porcentagem de células positivas, tanto para linfócitos totais como células T CD8<sup>+</sup> praticamente dobrou. Por outro lado, o impacto da adição de IL-15 foi bem menor, nos pacientes e de forma especial nos indivíduos com a forma crônica da PCM, resultando em acréscimo pouco significativo na produção deste grânulo (Figura 12).



**Figura 12-** Porcentagem de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando perforina,

*ex-vivo*, estimuladas ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência) e na presença ou ausência de IL-15 (50 ng/mL). Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Teste estatístico *t* pareado, \**p*<0,05.

Considerando o índice de aumento da expressão de perforina provocado pela IL-15, fica evidente que não ocorrem diferenças marcantes. Entretanto pode-se notar que nos pacientes com a FJ da PCM a presença de leveduras Pb18 tem ação indutora da expressão de perforina. Além disso, estes indivíduos, como observado com a granzima B têm menor índice de aumento em culturas não estimuladas com o fungo, principalmente na população de linfócitos e células T CD8<sup>+</sup> e de forma particular para a perforina têm maior índice de aumento com a cepa Pb18 (Tabela 8).

A análise dos resultados demonstra que a IL-15 além de estimular a ativação e a expressão de grânulos por células T CD8<sup>+</sup> também se mostrou eficaz em aumentar a capacidade citotóxica de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que embora em menor grupo também participam deste tipo de resposta. Além disso, fica mais uma vez registrada a participação de outras células que não as células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> na produção de grânulos citotóxicos (Figuras 9-12).

**Tabela 8-** Índice de aumento da frequência de células perforina<sup>+</sup> em linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> após adição de IL-15

		<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>	
<b>Perforina</b>	<b>Linfócitos</b>	S/Est	0.92 $\pm$ 0.17	0.37 $\pm$ 0.17	0.00 $\pm$ 0.27	0.00 $\pm$ 0.17
		Pb18	1.54 $\pm$ 1.30	0.98 $\pm$ 0.29	0.39 $\pm$ 0.44	1.00 $\pm$ 0.35
		Pb265	1.43 $\pm$ 0.57	1.46 $\pm$ 0.55	1.04 $\pm$ 0.37	0.64 $\pm$ 0.29
	<b>Células T CD8<sup>+</sup></b>	<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>	
		S/Est	1.90 $\pm$ 0.68	0.81 $\pm$ 0.39	0.24 $\pm$ 0.28	0.46 $\pm$ 0.63
		Pb18	1.32 $\pm$ 1.45	1.19 $\pm$ 0.41	0.32 $\pm$ 0.47	1.33 $\pm$ 0.40
	Pb265	1.60 $\pm$ 0.45	1.54 $\pm$ 0.61	0.92 $\pm$ 0.22	1.06 $\pm$ 0.37	
	<b>Células T CD4<sup>+</sup></b>	<b>C</b>	<b>PI</b>	<b>FA</b>	<b>FJ</b>	
		S/Est	2.61 $\pm$ 0.61	0.84 $\pm$ 0.28	0.00 $\pm$ 0.33	0.52 $\pm$ 0.39
Pb18	4.06 $\pm$ 3.45	0.75 $\pm$ 0.76	0.14 $\pm$ 0.56	2.12 $\pm$ 1.17		

Pb265      0.00 ± 0.04      1.43 ± 0.67      1.08 ± 0.79      0.90 ± 0.66

Índice de aumento= razão unitária da variação antes e após a adição de IL-15. Valores expressos como média ± EPM.

**As células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> perforina<sup>+</sup> não apresentaram aumento da IMF após estímulo com a IL-15 em nenhum dos grupos estudados**

Apesar da expressão de perforina se mostrar aumentada nas células T CD8<sup>+</sup> dos indivíduos PCM-infecção, após adição de IL-15, o mesmo não aconteceu com a IMF. Em nenhum dos grupos analisados foi possível observar diferença significativa deste indicador. Para as células T CD4<sup>+</sup> o mesmo foi observado, apesar dos indivíduos com a forma juvenil terem apresentado maior expressão de células T CD4<sup>+</sup>perforina<sup>+</sup>, não demonstraram aumento relevante na IMF, após adição de IL-15. Em nenhum dos outros grupos analisados (C, PI e FA) foi detectado também aumento significativo na IMF.

**Tabela 9-** Efeito da adição da IL-15 na intensidade média de fluorescência (IMF) de perforina por células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> de controles, indivíduos com PCM-infecção e pacientes com a forma adulta (FA) e juvenil (FJ) da PCM.

		Intensidade Média de Fluorescência (IMF)				
		Células CD8 <sup>+</sup>		Células CD4 <sup>+</sup>		
		- IL-15	+ IL-15	- IL-15	+ IL-15	
Perforina	Controle	S/Est	15.82 ± 3.49	18.57 ± 5.13	23.32 ± 5.05	24.97 ± 4.75
		Pb18	18.73 ± 4.20	23.11 ± 5.05	28.96 ± 4.20	28.47 ± 5.49
		Pb265	19.26 ± 3.68	24.99 ± 5.15	25.70 ± 4.07	27.22 ± 4.027
	PI	S/Est	12.25 ± 1.50	15.88 ± 3.88	13.12 ± 2.65	15.08 ± 1.50
		Pb18	15.27 ± 3.85	16.73 ± 3.84	12.87 ± 2.02	14.36 ± 1.98
		Pb265	15.25 ± 3.86	16.55 ± 4.75	12.42 ± 0.94	14.45 ± 1.257
	FA	S/Est	7.43 ± 2.47	9.50 ± 0.63	16.4 ± 8.69	19.51 ± 2.07
		Pb18	9.77 ± 0.92	11.94 ± 2.54	20.45 ± 1.07	20.98 ± 1.60
		Pb265	9.83 ± 1.08	9.75 ± 0.86	18.19 ± 1.33	20.96 ± 2.99
FJ	S/Est	9.83 ± 0.91	15.82 ± 4.80	28.09 ± 6.87	28.22 ± 5.32	

Pb18	14.91 ± 4.23	17.16 ± 5.91	26.27 ± 4.57	30.85 ± 4.38
Pb265	11.16 ± 0.21	11.34 ± 0.16	25.71 ± 4.07	27.22 ± 4.03

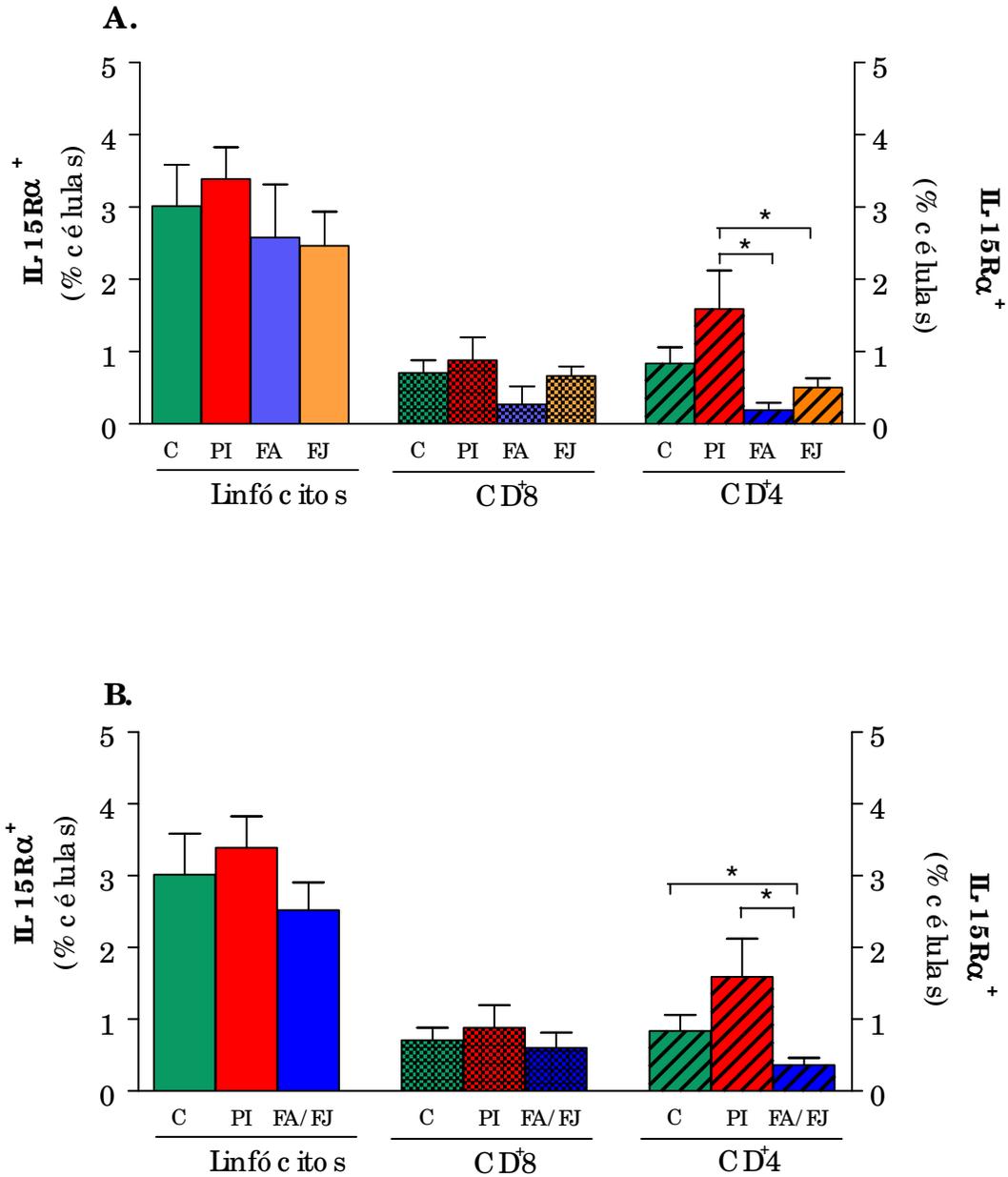
Resultados expressos como média ± EPM

### **4.3- Expressão constitutiva do receptor para IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) em células do sangue periférico**

Tendo em vista a resposta deficitária apresentada pelos pacientes com PCM frente à estimulação com IL-15 avaliamos a expressão do receptor para esta citocina (IL-15R $\alpha$ ) em linfócitos totais, células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup> em comparação com os demais grupos.

Considerando os linfócitos totais e as células CD8<sup>+</sup> observou-se uma tendência a menor frequência de células IL-15R $\alpha$  nos pacientes, em relação aos indivíduos com PCM-infecção e controles. As diferenças foram mais evidentes nas células CD4<sup>+</sup>IL-15R $\alpha$ , encontradas em frequência significativamente mais elevadas nos indivíduos com PCM-infecção em relação aos pacientes com a forma juvenil e crônica da PCM (Figura 13A).

Quando colocamos todos os pacientes em um único grupo a diferença significativa se manteve nas células CD4<sup>+</sup>IL-15R $\alpha$ , que apresentaram frequência reduzida tanto em relação aos indivíduos PCM-infecção como ao grupo controle.



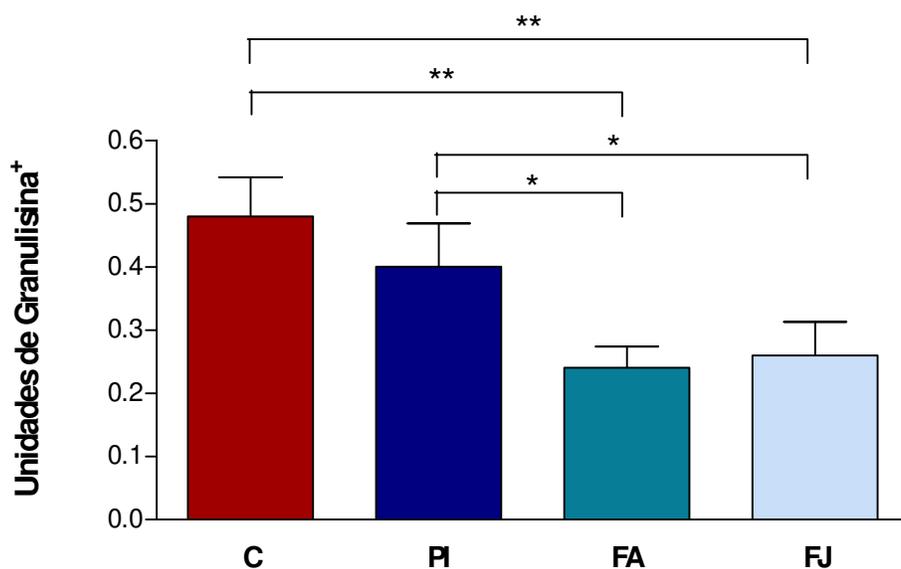
**Figura 13-** Expressão *ex-vivo* do IL-15R $\alpha$  em linfócitos, células T CD8<sup>+</sup>, células T CD4<sup>+</sup>. (A) Indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção e pacientes com a forma adulta e forma juvenil da PCM. (B) Indivíduos controle (C), indivíduos PCM-infecção e pacientes com PCM. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Teste estatístico: ANOVA com pós-teste de Dunns, \* p<0,05.

## Detecção de granulinsina sérica

### Pacientes tem níveis inferiores de granulinsina sérica

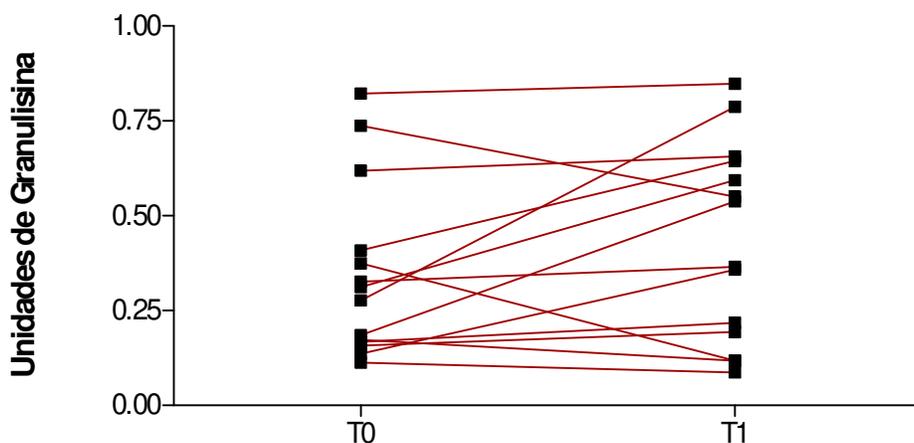
Além dos grânulos citotóxicos descritos acima, a granulinsina vem sendo estudada como uma importante molécula com atividade citotóxica direta devido a sua interação com lipídios presentes na estrutura de diversos patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* e *Cryptococcus neoformans*. Como não há até o momento disponibilidade de anticorpos para detecção da granulinsina por citometria de fluxo avaliamos a presença desta molécula no soro dos indivíduos envolvidos no estudo.

A dosagem da granulinsina sérica pela metodologia de ELISA mostrou níveis inferiores nos pacientes com PCM comparado aos controles (C e PI) (Figura 14).



**Figura 14-** Quantificação de granulinsina em soro de indivíduos controle, indivíduos com PCM-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM. Resultados expressos como média ± SEM, Teste estatístico ANOVA com pós test *t* student, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ .

Para alguns pacientes foi possível avaliar os níveis de granulisina sérica ao longo do tratamento com drogas antifúngicas (tempo médio: 1,5 anos). Os resultados foram variáveis, mas parece haver uma tendência de aumento na medida em que o paciente responde à terapêutica.



**Figura 15-** Quantificação de granulisina em soro de pacientes com a forma adulta e juvenil (n=14) da PCM antes e depois de tratamento anti-fúngico. Cada linha corresponde a um paciente. Tempo médio de tratamento: 1,5 anos.

# **DISCUSSÃO**

Em doenças causadas por microorganismos intracelulares como a tuberculose e a criptococose, foi demonstrado que as células T CD8<sup>+</sup> contribuem de forma relevante para o controle da infecção. Na PCM pulmonar experimental também se observou que o controle da carga fúngica é realizado principalmente por células T CD8<sup>+</sup>, a despeito da suscetibilidade do hospedeiro, enquanto a resposta de HTT e a produção de anticorpos são reguladas por células T CD4<sup>+</sup> (Chiarella et al., 2007).

Nosso estudo teve por objetivo principal verificar o estado de ativação e a produção de grânulos citotóxicos por linfócitos do sangue periférico (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-Infecção e controles, tanto *ex-vivo* como após estimulação com leveduras de *P. brasiliensis*.

Observamos primeiramente que os indivíduos com a forma juvenil da PCM apresentaram uma menor porcentagem de linfócitos CD4<sup>+</sup> de memória, embora não houvesse diferença significativa na população de células CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> e nem tampouco quando se avaliou os linfócitos totais. A formação de um número adequado de células de memória evita a reincidência da doença capacitando o hospedeiro a uma resposta imunológica mais rápida e eficaz. A baixa proporção de células de memória também pode ser relacionada a uma apresentação mais grave e disseminada da doença, como é o caso da forma juvenil ou aguda da PCM. Por outro lado, em indivíduos com PCM-infecção, que não desenvolvem a doença e exibem vigorosa resposta imune celular a antígenos do fungo (HTT, linfoproliferação e produção de citocinas Th1) (Oliveira et al., 2002) detectamos uma maior porcentagem de células de memória.

Em relação às células CD45RA<sup>+</sup> o grupo que apresentou menor frequência desta população foi o dos pacientes com a forma adulta da PCM, o que poderia refletir doença de longa duração com estimulação antigênica persistente. Em estudo recente Bozzi et al., (2007) constataram haver uma associação entre a deficiência de células de memória (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) induzidas por antígeno de *P. brasiliensis* e doença recidivante. Em nosso trabalho verificamos haver uma frequência elevada de células T CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> e diminuída de células T CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> em pacientes com a forma juvenil, principalmente naqueles com resposta deficitária ao tratamento antifúngico. Na mesma linha, Jacobsen et al., (2007) demonstraram um aumento significativo de células efetoras

CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> em crianças com doença ativa em relação aquelas com infecção latente e com teste tuberculínico não reagente (Jacobsen et al., 2007).

A resposta protetora mediada por células T CD8<sup>+</sup> é dependente da liberação de moléculas citotóxicas e subsequente lise da célula alvo infectada. Em nosso trabalho verificamos a expressão de moléculas citotóxicas (granzima A e B e perforina) em células do sangue periférico de pacientes com PCM, indivíduos com PCM-infecção e controles. Primeiramente foi feita a análise da expressão constitutiva em linfócitos totais, células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que mostrou que a granzima A foi o grânulo mais expresso, seguido da granzima B e perforina. As células T CD8<sup>+</sup> constituem a principal população produtora de grânulos e as células T CD4<sup>+</sup> apresentam expressão bem menor.

O perfil de expressão dos grânulos mostrou que embora não haja diferenças significativas entre os grupos os indivíduos PCM-infecção exibem maior expressão de granzima A e B. Níveis um pouco mais elevados de granzima B foram observados nas células T CD8<sup>+</sup> nos pacientes com a forma adulta da PCM. Já em relação à perforina também observamos aumento significativo na expressão deste grânulo nos indivíduos PCM-infecção, com diminuição na frequência de células positivas nos pacientes, principalmente com a forma juvenil da doença.

Com o objetivo de melhor analisar a contribuição de cada população celular na expressão de grânulos calculamos a porcentagem de células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e outras (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) em relação à população de linfócitos totais (Tabela I). Para granzima A e B a distribuição de células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e outras em relação aos linfócitos totais foi bastante homogênea entre os grupos, com uma porcentagem média de aproximadamente 60, 15 e 25%, respectivamente. Por outro lado, a distribuição das células perforina positivas foi muito diferente entre os grupos. Enquanto nos indivíduos controle e PCM-infecção a porcentagem de células CD8<sup>+</sup> foi de 80 e 50%, respectivamente, nos pacientes com PCM caiu para 26% (FA) e 32% (FJ). Desta forma constatamos que nos pacientes com PCM, diferentemente dos controles e indivíduos PCM-infecção, outras células (CD8 e CD4 negativas) contribuem com a maior produção de perforina dentro da população de linfócitos totais.

Jimenez e Murphy (1984) demonstraram que em camundongos além dos linfócitos, as células NK são importantes na contenção do crescimento do fungo *in vitro*. Por outro lado, Peraçoli et al. (1991) verificaram que embora os pacientes com a forma aguda da PCM apresentassem um aumento do número de células NK circulantes, estas células apresentavam atividade citotóxica diminuída, quando comparadas a de indivíduos normais. Em estudo realizado em hamsters infectados pelo *P. brasiliensis* verificou-se uma elevação do número de células NK no período inicial da infecção, com diminuição após 8 semanas acompanhada pela supressão da resposta imunológica mediada por células (Peraçoli et al., 1995). De fato, ao lado das células T CD8<sup>+</sup>, as células NK (CD56<sup>+</sup>) apresentam vigorosa atividade citotóxica contra células alvo infectadas por *P. brasiliensis*, mas nos pacientes esta resposta é menor do que nos indivíduos com PCM-infecção (Mamoni e Blotta, submetido).

Em conjunto os resultados mais interessantes das análises *ex-vivo* referem-se a uma maior capacidade de formação de células T de memória em indivíduos PCM-infecção, comparada a pacientes com a FJ da PCM, principalmente aqueles com resposta deficitária ao tratamento. Em concordância, células *naive* foram encontradas com maior frequência nos pacientes com a forma juvenil da PCM e em menor frequência nos pacientes com a forma adulta, refletindo as marcantes diferenças entre as formas clínicas da doença, a primeira com evolução mais rápida, grave e disseminada e a última com característica de uma infecção crônica, com estimulação antigênica constante. Em relação aos grânulos citotóxicos os resultados mostraram uma tendência à maior expressão constitutiva de granzima A, granzima B e em especial de perforina nos indivíduos PCM-infecção, em comparação aos pacientes (FA e FJ). Como consequência os indivíduos PCM-infecção estariam aptos a desenvolver uma resposta citotóxica mais eficaz, enquanto que a mesma seria deficitária nos doentes. Em trabalho recente de nosso grupo verificamos que a atividade fungicida e citotóxica exercida por células T CD8<sup>+</sup> e células NK de pacientes com PCM ativa é menor do que a observada para indivíduos com PCM-infecção (Mamoni e Blotta, submetido).

Células T CD8<sup>+</sup> com baixa expressão de perforina e granulisina foram detectadas em granulomas presentes nas lesões de pacientes com formas sintomáticas e crônicas da tuberculose em comparação com aquelas encontradas em indivíduos com

infecção latente (Andersson et al., 2007). Diferentemente, outros autores relataram uma elevada porcentagem de células positivas para perforina na tuberculose pulmonar ativa em relação a controles normais saudáveis, embora o número absoluto fosse similar nos dois grupos (Nisha-Rajeswari et al., 2006).

Camundongos *knockout* para perforina infectados com *Histoplasma capsulatum* apresentam elevada mortalidade e aumento da carga fúngica, exacerbada pela depleção de células T CD8<sup>+</sup>. Esses resultados mostram que as células T CD8<sup>+</sup> exercem sua ação efetora também por mecanismos independentes da perforina (Zhou et al., 2001).

As células T CD4<sup>+</sup> também exercem atividade citotóxica e o seu papel foi bem estudado na infecção por *Cryptococcus neoformans* (Zheng et al., 2007). Ao lado das células T CD8<sup>+</sup> e NK, os autores mostraram que as células T CD4<sup>+</sup> utilizam a granzulina como principal agente citotóxico contra o fungo e que na infecção pelo HIV este mecanismo é comprometido, levando a uma atividade microbicida deficiente (Zheng et al., 2007). A presença da granzima B nas células T CD4<sup>+</sup> foi demonstrada em vários estudos, entretanto apesar dos avanços na elucidação dos mecanismos efetores das granzimas B em células NK e CTLs, nas células T CD4<sup>+</sup> ainda são pouco conhecidos (Devadas et al., 2006).

Quanto à estimulação dos linfócitos do sangue periférico em cultura na ausência ou na presença de leveduras de *P. brasiliensis* nossos resultados mostraram baixos níveis de ativação, com diferença significativa apenas na população de células T CD4<sup>+</sup> de indivíduos PCM-Infecção e em pacientes com a forma juvenil. Na ausência do fungo as células de pacientes com PCM não foram ativadas, ao contrário do que ocorreu com os indivíduos saudáveis. Embora, os pacientes com a forma mais grave da doença (FJ) tenham apresentado aumento relevante de linfócitos totais após estímulo com a cepa de baixa virulência, os pacientes, de forma geral, demonstraram um menor número de células expressando o marcador de ativação CD69 em todas as condições, quando comparados aos controles, caracterizando um estado de anergia.

A expressão das granzimas A e B mostrou-se reduzida, embora não significativamente, em todos os grupos na presença do fungo, exceto nos indivíduos FJ, que apresentaram níveis menores ainda em culturas estimuladas com a cepa de alta

virulência. Ao contrário das células T CD8<sup>+</sup>, as células T CD4<sup>+</sup> demonstraram tendência de aumento de expressão destes grânulos quando em cultura, exceto nos indivíduos FJ. Ficou então caracterizada resposta diferenciada quanto à expressão de granzima A e B após estímulo com as cepas nos pacientes com a forma mais grave da doença. Em todos os grupos ficou demonstrada também uma discreta redução na expressão de perforina nos linfócitos e células T CD8<sup>+</sup> na presença das cepas Pb18 e Pb265.

A queda na porcentagem de células positivas para os grânulos citotóxicos pode ser devido ao processo de desgranulação sofrido por estas células frente aos antígenos, demonstrando a presença de atividade citotóxica (Weren et al., 2004). Estudos *in vitro* na tuberculose humana também mostraram que as células T CD8<sup>+</sup> são ativadas e têm atividade citolítica quando estimuladas com o *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv (Esin et al., 1996; Turner e Dockrell, 1996) e que a presença de células T CD8<sup>+</sup>perforina<sup>+</sup> evidencia a ativação da resposta imunológica adquirida e o seu papel citolítico *in vivo* (Nisha-Rajeswari et al., 2006).

Um requisito básico para ativação e desenvolvimento de resposta protetora mediada por células T CD8<sup>+</sup> seria a capacidade de responder a IL-15, visto que esta citocina é essencial para a expansão e ativação de células T CD8<sup>+</sup> efetoras e de memória (Fehninger e Caligiuri, 2001; Waldmann et al., 2001).

Em nosso trabalho a adição de IL-15 às culturas mostrou mais evidentemente que apenas as células do sangue periférico de indivíduos controle e PCM-infecção responderam de forma significativa com aumento da expressão do marcador de ativação CD69, na população de linfócitos, células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, mesmo na presença da cepa de alta virulência. Por outro lado, os pacientes demonstraram capacidade de ativação celular significativa apenas na ausência do fungo ou na presença da cepa de baixa virulência. Em todos os grupos o maior índice de aumento foi observado nas culturas na ausência do fungo e não se observou diferenças entre as cepas. Estes resultados confirmam também o estudo de Liu et al. (2002), que mostrou que a IL-15 age não apenas como um fator de crescimento de células T CD8<sup>+</sup>, mas também é capaz de ativar as funções efetoras de células T CD8<sup>+</sup> de memória de forma antígeno independente.

No grupo com a forma juvenil da PCM ficou patente a maior inibição da resposta à IL-15 imposta pelo fungo, principalmente nas células CD8<sup>+</sup>. Por outro lado, embora os pacientes com a FJ não tenham apresentado aumento significativo na porcentagem de células ativadas na presença da IL-15, a análise da IMF mostrou um aumento na quantidade deste marcador por célula, mas apenas nas culturas estimuladas com a cepa de baixa virulência do fungo, confirmando o potencial de virulência da cepa Pb18 (Singer-Vermes et al., 1989). Indivíduos PCM-infecção responderam melhor à estimulação com IL-15 apresentando um maior número de células CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> em relação aos outros grupos, mesmo quando estimuladas com a cepa de alta virulência de *P. brasiliensis*. Na tuberculose experimental foi demonstrada a dependência da IL-15 para o desenvolvimento de resposta protetora relevante mediada por células T CD8<sup>+</sup> (Rausch et al., 2006) e que a resposta destas células se dá através de mecanismos citotóxicos com a lise de macrófagos infectados (Serbina et al., 2000). Na infecção por *Candida albicans* a IL-15 também atua como um potente estimulador da atividade pró-inflamatória e antifúngica de polimorfonucleares e monócitos humanos (Vazquez et al., 1998; Musso et al., 1998).

O impacto da IL-15 na expressão das granzimas A e B foi pouco expressivo, no entanto também demonstrou que apenas os indivíduos PCM-infecção apresentam aumento da IMF em células T CD8<sup>+</sup>, na presença da cepa de alta virulência (PB18). Os pacientes com a forma adulta da PCM exibiram uma frequência mais elevada de células positivas para granzima B em linfócitos totais e células T CD4<sup>+</sup>, em comparação aos pacientes com a forma juvenil, demonstrando novamente as diferenças de resposta entre as formas clínicas da doença. Nas células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos controle só se observou aumento de expressão e na IMF em resposta à cepa de baixa virulência (Pb265).

A ação da IL-15 na expressão de perforina foi significativa quando se avaliou os linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos PCM-infecção, tanto na presença de leveduras da cepa de alta virulência, como de baixa virulência. Nas células estimuladas a porcentagem de células positivas, tanto linfócitos totais como células T CD8<sup>+</sup> praticamente dobrou. Por outro lado, nos pacientes com a forma adulta e juvenil da PCM o impacto da adição de IL-15 foi bem menor, resultando em acréscimo pouco significativo na produção

deste grânulo. No grupo de pacientes com a forma juvenil da doença verificou-se que a adição de IL-15 provocou aumento da frequência de células positivas para perforina apenas em células T CD4<sup>+</sup> e na presença de leveduras da cepa Pb18.

As células T CD4<sup>+</sup> atuam classicamente como reguladoras e efetoras da resposta imune a patógenos (Hahn et al., 1995) por meio da produção de citocinas, entretanto há mais de duas décadas têm sido descrito a seu importante papel na resposta citotóxica, tanto em camundongos quanto em humanos contra aloantígenos, células infectadas por microrganismos e células cancerígenas (Hahn et al., 1995; Faber et al., 1995; Kresnky et al., 1982; Lewinsohn et al., 1998b; Lukacher et al., 1985; McCarthy et al., 1986; Paludan et al., 2002). Os primeiros estudos mostraram que as células T CD4<sup>+</sup> citotóxicas agiam preferencialmente pela interação CD95/CD95L (Hanabuchi et al., 1994; Ju et al 1994; Stalder et al., 1994; Williams e Engelhard, 1996). Entretanto posteriormente foi demonstrado células CD4<sup>+</sup> citotóxicas também utilizam a perforina e a exocitose de granzimas (Hahn et al., 1999; Vergelli et al., 1997; Williams e Engelhard, 1997). A participação das células T CD4<sup>+</sup> na resposta citotóxica contra o *Cryptococcus neoformans* (Zheng et al., 2007) e o *Mycobacterium tuberculosis* (Tan et al., 1997; De la Barrera et al., 2003) comprovam o importante papel desta população celular na defesa contra microrganismos intracelulares.

O receptor da IL-15 é composto por 3 cadeias, sendo que duas ( $\beta$  e  $\gamma$ ) são compartilhadas por outras citocinas (IL-2, IL-4, IL-7 e IL-9), enquanto que a cadeia  $\alpha$  confere especificidade de ligação. Nas células T CD8<sup>+</sup> a ligação da IL-15 com o seu receptor resulta em efeitos similares aos que ocorrem quando do reconhecimento do antígeno via complexo TCR-CD3 participando, portanto, da manutenção do conjunto de células de memória (Liu et al., 2002) e da produção dos grânulos citotóxicos (Mody et al., 1998).

A menor resposta dos pacientes com PCM a IL-15 nos levou a questão se não haveria um defeito ou uma menor expressão de seu receptor nos linfócitos. A avaliação da expressão constitutiva do receptor alfa da IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) não mostrou diferenças quando se analisou os linfócitos totais e as células CD8<sup>+</sup>. Entretanto, observamos uma maior

freqüência de células  $CD4^+IL-15R\alpha^+$  em indivíduos com PCM-infecção em relação aos pacientes com a forma adulta da doença. Quando agrupamos os pacientes com a forma juvenil e adulta, confirmamos a diferença entre pacientes e indivíduos com PCM-infecção e também em relação aos controles, com os doentes apresentando os menores níveis. Foi demonstrado que a co-expressão de IL-15 e do IL-15R $\alpha$  na mesma célula resulta no aumento da estabilidade e da secreção de ambas as moléculas como um complexo. Na ausência da co-expressão do IL-15R $\alpha$  a citocina é degradada rapidamente, logo após a síntese, prejudicando a expansão das células NK e linfócitos T nos pulmões, fígado e baço de camundongos (Bergamaschi et al., 2007). A infecção murina pelo *P. brasiliensis* resulta em um forte parasitismo dos órgãos citados, sendo estes também sítios frequentemente acometidos na infecção humana. Desta forma, a baixa expressão de IL-15R $\alpha$  teria impacto importante na produção, estabilidade e disponibilidade tecidual da IL-15, prejudicando a ativação de células efetoras nestes locais (Sato et al., 2007).

Além da ação na imunidade adaptativa, foi demonstrado que neutrófilos de indivíduos normais saudáveis pré-tratados com IL-15 apresentam atividade fungicida aumentada contra *P. brasiliensis*, com elevada produção de ânion superóxido e água oxigenada (Tavian et al., 2008). O efeito da IL-15 na ativação do *burst* oxidativo de neutrófilos humanos já havia sido constatado anteriormente em resposta à estimulação com *Aspergillus* (Winn et al., 2003), *Fusarium spp* e *Saedosporium spp* (Winn et al., 2005). Portanto a menor freqüência IL-15R $\alpha$  na superfície de linfócitos poderia ter importante impacto tanto na primeira linha de defesa contra o fungo, como na resposta mediada por células citotóxicas, levando a formação de menor número de células de memória, menor ativação e expressão de grânulos nos pacientes com PCM. Na criptococose foi demonstrado que as células T  $CD4^+$  são necessárias para que as células T  $CD8^+$  produzam granulinsina e se tornem citotóxicas contra o fungo (Ma et al., 2002). As células T  $CD4^+$  secretam fatores de crescimento como a IL-2 que ativa as células T  $CD8^+$ , adicionalmente estimulam células acessórias como células dendríticas e monócitos/macrófagos a produzir citocinas como IL-1, IL-6, IL-15 e TNF- $\alpha$  ou ligantes de superfície como CD40, LFA-1 ou ICAM-1, de forma que as células T  $CD8^+$  possam ser ativadas. Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a necessidade de IL-15. A primeira seria que as células  $CD4^+$  funcionariam

como intermediárias, ou seja, que a IL-15 seria necessária para a resposta de células T CD4<sup>+</sup> que então ativariam as células T CD8<sup>+</sup>. Neste caso, a indisponibilidade ou número insuficiente de IL-15R $\alpha$  em células T CD4<sup>+</sup> repercutiriam nas respostas mediadas por células T CD8<sup>+</sup>.

Uma segunda teoria baseada no fato da IL-15 substituir a necessidade da célula T CD4<sup>+</sup> advoga que as células T CD4<sup>+</sup> são ativadas, mas como não produzem IL-15, elas estimulam células acessórias da linhagem mielóide a fazê-lo. A IL-15, por sua vez, estimula as células T CD8<sup>+</sup> a expressar granulisina e ter atividade citotóxica. Neste caso a expressão do receptor para IL-15 na célula CD8<sup>+</sup> é crítica para a sua ativação.

A relação entre a produção de granulisina e a resposta de defesa contra microrganismos intracelulares é evidenciada na hanseníase, na qual é detectada em uma frequência pelo menos 6 vezes mais elevada em células infiltrantes em lesões localizadas de pacientes com a forma benigna (tuberculóide) em contraste com as lesões que caracterizam a forma disseminada da doença (lepromatosa) (Ochoa et al., 2001).

Na tuberculose a expressão coordenada de CCL5 (quimiocina envolvida principalmente na atração de linfócitos e eosinófilos), perforina e granulisina por células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos previamente sensibilizados garantem o seu potencial em atrair macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* e lisá-los (Stegelman et al., 2005). Quando as células T e células NK matam as células alvo *in vitro* ocorre um aumento da concentração de granulisina no sobrenadante de culturas, devido à exocitose dos grânulos. Por outro lado, a granulisina é produzida espontaneamente por células T e células NK do sangue periférico por um mecanismo não relacionado à exocitose de grânulos. Foi proposto que os níveis séricos de granulisina refletem o estado da resposta imune celular do hospedeiro por estarem associados a diversas atividades das células NK e das células T citotóxicas (Ogawa et al., 2003). Na tuberculose ocorre uma correlação inversa entre a concentração plasmática de granulisina e a atividade da doença, sendo que após o tratamento os níveis séricos se elevam (Sahiratmadja et al., 2007).

Em nosso trabalho a avaliação da concentração sérica de granulisina mostrou concentração diminuída nos pacientes com PCM comparado aos indivíduos com PCM-infecção e controles. Além disso, verificamos que ocorre uma tendência a um

aumento dos níveis de granulicina durante o tratamento antifúngico para a maioria dos pacientes analisados. Esses resultados indicam que as concentrações elevadas de granulicina no soro podem ser associadas à melhora do paciente e capacidade de resposta citotóxica.

Em conjunto os resultados mostraram que os linfócitos de pacientes com PCM encontram-se em um estado de menor ativação, expressam menores quantidades do receptor para IL-15 e produzem níveis basais de grânulos citotóxicos (granzima A, granzima B, perforina e granulicina), quando comparados a células de indivíduos com PCM-infecção. Estes fatores, ao lado de outros mecanismos que comprometem a imunidade celular, poderiam resultar em atividade citotóxica deficitária e, portanto menor capacidade de combate ao fungo.

# **CONCLUSÃO**

A análise *ex-vivo* demonstrou maior porcentagem de células de memória nos indivíduos PCM-infecção em relação aos pacientes com a forma juvenil da PCM, enquanto estes mostraram uma maior frequência de células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> em relação aos outros grupos. Por outro lado uma frequência diminuída de células CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> foi detectada nos pacientes com a forma adulta da doença. Estas características refletem diferenças entre as formas clínicas da PCM, a forma juvenil de evolução mais rápida, grave e disseminada e a forma adulta com característica crônica e estimulação antigênica constante. Houve uma tendência a maior expressão constitutiva de granzima A, granzima B e em especial de perforina pelos indivíduos com PMC-infecção em relação aos pacientes. Este resultado poderia indicar um maior potencial para o desenvolvimento de uma resposta citotóxica eficaz, que nos doentes estaria mais comprometida.

A estimulação das células com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) não aumentaram significativamente a ativação e a expressão de granzima A, B e perforina. Foi possível observar que as células dos pacientes com a forma juvenil demonstram o menor número de células CD69<sup>+</sup>, quando comparados aos indivíduos controles, caracterizando um estado de anergia. Na presença do fungo a expressão dos grânulos citotóxicos mostrou-se reduzida, embora não de forma significativa, em todos os grupos e esta queda poderia indicar desgranulação frente ao estímulo antigênico.

Após a adição de IL-15, citocina fundamental para desenvolvimento de resposta mediada por células T CD8<sup>+</sup>, apenas os indivíduos controle e com PCM-infecção responderam de forma significativa com aumento da expressão do marcador de ativação CD69 na população de linfócitos totais, células T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, mesmo na presença da cepa de alta virulência do fungo. Estes grupos também demonstraram aumento significativo de células perforina<sup>+</sup> em linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup>. A análise da expressão de CD69 avaliada pelo IMF em linfócitos demonstrou o potencial inibitório das leveduras da cepa de alta virulência do fungo nos pacientes, sendo que, após a adição de IL-15, só foi observado aumento nas culturas com a cepa de baixa virulência. A análise da expressão de granzima B em linfócitos e células T CD4<sup>+</sup> foi maior nos pacientes com a forma adulta da PCM, em relação aqueles com a forma juvenil demonstrando mais uma vez diferenças entre as formas clínicas da doença.

Os indivíduos PCM-infecção demonstraram maior capacidade de resposta a IL-15, com maior produção de grânulos citotóxicos, mesmo frente à cepa de alta virulência, o que não foi observado nos pacientes. Além disso, apresentam expressão mais elevada do receptor da IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) em células T CD4<sup>+</sup> em relação aos pacientes. A menor frequência de células IL-15R $\alpha$  poderia resultar em resposta deficitária a IL-15 com impacto negativo tanto sobre a primeira linha de defesa contra o fungo, como na resposta mediada por células citotóxicas, levando a formação de menor número de células de memória, menor ativação e expressão de grânulos nos pacientes com PCM.

Menores concentrações de granulisina, importante molécula microbicida, foram detectadas no soro de pacientes com PCM em relação aos indivíduos com PCM-infecção e controles. Além disso, verificamos uma tendência a um aumento dos níveis de granulisina durante o tratamento antifúngico para a maioria dos pacientes analisados. Esses resultados poderiam indicar que concentrações mais elevadas de granulisina no soro podem ser associadas à melhora do paciente e maior capacidade de resposta citotóxica.

De maneira geral os resultados mostraram que os linfócitos dos pacientes com PCM encontram-se em um estado de menor ativação, expressam menores quantidades do receptor para IL-15 e produzem níveis basais de grânulos citotóxicos (granzima A, B, perforina e granulisina), quando comparados a células de indivíduos com PCM-infecção. Estes fatores, ao lado de outros mecanismos que comprometem a imunidade celular, poderiam resultar em atividade citotóxica deficitária e, portanto menor capacidade de combate ao fungo.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adams J, Follet D, Hamilton H, Czuprynski C. Effects of administration of anti-CD4<sup>+</sup> anti-CD8<sup>+</sup> monoclonal antibodies on *Mycobacterium paratuberculosis* infection in intragastrically challenged mice. *Immunol Lett* 1993; 35:183-9.

Andersson J, Samarina A, Fink J, Rahman S, Grundstrom S. Impaired expression of perforin and granulysin in CD8<sup>+</sup> T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 2007; 75:5210-22.

Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. *Infect Immun* 1998; 66:5587-91.

Bagagli E, Bosco SM, Theodoro RC, Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet and Evol* 2006; 6:344-51.

Barbosa W. Paracoccidioidomicose (Blastomicose Sul-Americana). In: Amato Neto V. Doenças transmissíveis. São Paulo: Sarvier Editora; 1991. p.653-62.

Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 401-9.

Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54:7-12.

Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Gianini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2001; 13:248-52.

Bergamaschi C, Rosati M, Jalah R, Valentin A, Kulkarni V, Alicea C, et al. Intracellular interaction of IL-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity. *J Biol Chem* 2007; (in press).

Bethlem EP, Capone D, Maranhão B, Carvalho CR, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Curr Opin Pulm Med* 1999; 5:319-25.

Bethlem NM, Lemle A, Bethlem EP, Wanke B. Paracoccidioidomycosis. *Sem Respir Med* 1991; 12:81-97.

Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:671-6.

Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer AS, Papaiordanou PM, Gouveia A, Camargo ZP. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:390-4.

Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* 2002; 10:80-7.

Bozzi A, Reis BS, Goulart MI, Pereira MC, Pedroso EP, Goes AM. Analysis of memory T cells in the human paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment. *Immunol Lett* 2007; 114:23-30.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an Update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:89-117.

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

Calich VLG, Blotta MHSL. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. In: Huffnagle G, Fidel P. *Fungal Immunology from an organ perspective*. New York: Springer; 2005. p.201-227.

Calich VL, Burger E, Kashino SS, Fazioli RA, Sinver-Vermes LM. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. *Infect Immun* 1987; 55:1919-23.

Calich VS, Vaz CAC, Burger E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol* 1998; 149:407-17; discussion 499-500.

Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:161-6.

Cano LE, Kashino SS, Arruda C, Andre D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidiodomycosis. *Infect Immun* 1998; 66:800-6.

Cano LE, Singer-Vermes LM, Costa TA, Mengel JO, Sidieh CF, Arruda C, et al. Depletion of CD8<sup>+</sup> T cell in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidiodomycosis. *Infect Immun* 2000; 68:352-9.

Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. Pulmonary paracoccidiodomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, broncoalveolar cell activation, cellular immune response and specific isotype patterns. *Infect Immun* 1995; 63:1777-83.

Castaneda E, Brumer E, Pappagianis D, Stevens DA. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidiodomycosis in mice. *Infect Immun* 1988; 56:1171-7.

Chiarella AP, Arruda C, Pina A, Costa TA, Ferreira RC, Calich VL. The relative importance of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in immunity to pulmonary paracoccidiodomycosis. *Microbes Infect* 2007; 9:1078-88.

De la Barrera SS, Finiasz M, Frias A, Aleman M, Barrionuevo P, Fink S, et al. Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2003; 132:450-61.

Deepe GS Jr. Role of CD8<sup>+</sup> T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice. *J Immunol* 1994; 152:3491-500.

Deng A, Chen S, Li Q, Lyu SC, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 2005; 174:5243-8.

Devadas S, Das J, Liu C, Zhang L, Roberts AI, Pan Z, Moore PA, Das G, Shi Y. Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* 2006; 25:237-47.

Di Liberto D, Buccheri S, Caccamo N, Meraviglia S, Romano A, Di Carlo P, et al. Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy. *Tuberculosis (Edinb)* 2007; 87:322-8.

Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, Ko C, Hanson DA, Clayberger C, et al. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunology* 2000; 165:7102-8.

Esin S, Batoni G, Kallenius G, Gaines H, Campa M, Svenson SB, Anderson R, Wigzell H. Proliferation of distinct human T cell subsets in response to live, killed or soluble extracts of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Clin Exp Immunol* 1996; 104:419-25.

Faber LM, van Luxemburg-Heijs SA, Veenhof WF, Willemze R, Falkenburg JH. Generation of CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones from a patient with severe graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: implication for graft-versus-leukemia reactivity. *Blood* 1995; 86:2821-8.

Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin-15: biology and relevant to human disease. *Blood* 2001; 97:14-32.

Fornazim MC, Balthazar A, Quagliato R, Mamoni RL, Garcia C, Blotta MH. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J* 2003; 22:895-9.

Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bachi M, Reskallah-Iwasso MT, Montenegro MR. Paracoccidioidomycosis. *Baillière's Clin Trop Med Commun Dis* 1989; 4:185-220.

Franco M. Host parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1987; 25:5-18.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20:129-32.

Goldani LZ, Sugar AM. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. *Clin Infect Dis* 1995; 21:1275-81.

Goransdotter Ericson K, Fadeel B, Nilsson-Ardnor S, Soderhall C, Samuelsson A, Janka G, et al. Spectrum of perforin gene mutation in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet* 2001; 68:590-7.

Hanh S, Erb P. The immunomodulatory role of CD4-positive cytotoxic T-lymphocytes in health and disease. *Int Rev Immunol* 1999; 18:449-64.

Hahn S, Gehri R, Erb P. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 1995; 146:57-79.

Hanabuchi S, Koyanagi M, Kawasaki A, Shinohara N, Matsuzawa A, Nishimura Y, et al. Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad U S A* 1994; 91:4930-4.

Hanson DA, Kaspar AA, Poulain FR, Krensky AM. Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol Immunol* 1999; 36:413-22.

Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russel JH, Ley TJ. Cytotoxic Lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994; 76:977-87.

Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9:469-88.

Huffnagle GB, Lipscomb MF, Lovchik JA, Hoag KA, Street NE. The role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. *J Leukoc Biol* 1994; 55:35-42.

Jacobsen M, Detjen Ak, Mueller H, Gutschmidt A, Leitner S, Wahn U et al. Clonal expansion of CD8<sup>+</sup> effector T cells in childhood tuberculosis. *J Immunol* 2007; 179:1331-9.

Jimenez BE, Murphy JW. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect Immun* 1984; 46:552-8.

Jongstra J, Schall TJ, Dyer BJ, Clayberger C, Jorgensen J, Davis MM, Krensky AM. The isolation and sequence of a novel gene from a human functional T cell line. *J Exp Med* 1987; 165:601-14.

Ju ST, Cui H, Panka DJ, Ettinger R, Marchak-Rothstein A. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4<sup>+</sup> Th1 and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. Proc Natl Acad U S A 1994; 91:4185-9.

Kashino SS, Fazioli RA, Cafalli-Favati C, Meloni-Bruneri LH, Vaz CA, Burger E, *et al.* 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 2000; 20:89-97.

Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Jaffe ES, Kimura H, Dale JK, Strauss SE, Cohen JI. Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in perforin that impairs its maturation. Blood 2004; 103:1244-52.

Kelso A, Costelloe EO, Johnson BJ, Groves P, Buttigieg k, Fitzpatrick DR. The genes for perforin, granzymes A-C and IFN-gamma are differentially expressed in single CD8(+) T cells during primary activation. Int Immunol 2002; 14:605-13.

Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, *et al.* Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. J Exp Med 2000; 191:771-80.

Krensky AM, Reiss CS, Mier JW, Strominger JL, Burakoff SJ. Long-term human cytolytic T-cell lines allospecific for HLA-DR6 antigen are OKT4<sup>+</sup>. Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79:2365-9.

Kullberg BJ, Anaissie EJ. Cytokines as therapy for opportunistic fungal infections. Res Immunol 1998; 149:478-88.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Vacari-Heins EM, Mello NT. Paracoccidioidomicose. In: Micologia Médica, 9<sup>th</sup> ed. São Paulo: Sarvier Editora; 2002. p. 639-729.

Lewinsohn DM, Alderson MR, Briden AL, Riddell SR, Reed SG, Grabstein KH. Characterization of human CD8<sup>+</sup> T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen presented cells. J Exp Med 1998a; 187:1633-40.

Lewinsohn DM, Bement TT, Xu J, Lynch DH, Grabstein KH, Reed SG, et al. Human purified protein derivative-specific CD4<sup>+</sup> T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms, *J Immunol* 1998b; 160:2374-9.

Lieberman J. Cell death immunity: The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003; 361-70.

Lieberman J, Fan Z. Nuclear war: the granzyme A bomb. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:553-9.

Liu K, Catalfamo M, Li Y, Henkart PA, Weng NP. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8<sup>+</sup> memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6192-7.

Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassapoulos T, Trettin S, et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998; 9:669-76.

Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomicose: Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *J Pneumol* 1990; 16:129-32.

Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC: Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev* 2003; 199:31-8.

Lukacher AE, Morrison LA, Braciale VL, Malissen B, Braciale TJ. Expression of specific cytolytic activity by H-2I region-restrict, influenza virus-specific T lymphocyte clones. *J Exp Med* 1985; 162:171-87.

Ma A, Boone DL, Lodolce JP. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J Exp Med* 2000; 191:753-6

Ma LL, Spurrell JCL, Wang JF, Neely GG, Epelman S, Krensky AM, Mody CH. CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *J Immunol* 2002; 169:5787-95.

Ma LL, Wang CL, Neely GG, Epelman S, Krensky AM, Mody CH. NK cells use perforin rather than granulysin for anticytotoxic activity. *J Immunol* 2004; 173:3357-65.

Mamoni RL, Blotta MHSL. Impaired cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> and CD56<sup>+</sup> cells in patients with Paracoccidioidomycosis. (submetido)

MamonI RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhance production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2002; 40:153-9.

Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blota MHSL. Capture Enzyme-linked Immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:237-41.

Mangiaterra M, Alonso J, Galvan M, Giusiano G, Gorodner J. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1996; 38:349-53.

Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev Saude Publica* 1992; 26:12-6.

McCarthy SA, Singer A. Recognition of MHC class I allodeterminants regulates the generation of MHC class II-specific CTL. *J Immunol* 1986; 137:3087-92.

Mody CH, Spurrell JC, Wood CJ. Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes. *J Infect Dis* 1998; 178: 803-14.

Montenegro MR. Clinical Forms of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1986; 28:203-4.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357.

Mota CCS. Contribuição ao estudo da epidemiologia da blastocisose sul Americana no Paraná. *An Fac Med Univ Fed Paraná* 1966; 9-10:53-92.

Mota NG, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MT, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, et al. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79:765-72.

Mullbacher A, Ebnet K, Blanden RV, Hla RT, Stehle T, Museteanu C, Simon MM. Granzyme A is critical for recovery of mice from infection with the natural cytopathic viral pathogen, ectromelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:5783-7.

Muller I, Kropf P, Louis JA, Milon G. Expansion of gamma interferon-producing CD8<sup>+</sup> T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect Immun* 1994; 62:2575-81.

Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Reskalah Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p.175-6.

Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Puliti M, Bulfone-Paus S, et al. Interleukin-15 activates proinflammatory and antimicrobial functions in polymorphonuclear cells. *Infect Immun* 1998; 66:2640-7.

Nakajima H, Park HL, Henkart PA. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolytic/perforin. *J Exp Med* 1995; 181:1037-46.

Negrón R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lutz's mycosis). *Int J Dermatol* 1993; 32:847-59.

Nisha-Rajeswari D, Selvaraj P, Jawahar MS, Adhilakshmi AR, Vidyanani M, Narayanan PR. Elevated percentage of perforin positive cells in active pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2006; 123:687-90.

Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S, et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med* 2001; 7: 174-9.

Odo M, Renno T, Attinger A, Bakker T, MacDonald HR, Meylan PR. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998; 160:5448-54.

Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K, Nagasawa M, Takano S, Kasahara Y, et al. Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* 2003; 33:1925-33.

Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PMO, Blotta MHSL. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* 2002; 4:139-44.

Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol* 2001; 39:277-82.

Paludan C, Bickham K, Nikiforow S, Tsang ML, Goodman K, Hanekom WA, et al. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol* 2002; 169:1593-603.

Pena SV, Krensky AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 1997; 9:117-25.

Peraçoli MT, Fortes MR, Da Silva MF, Montenegro MR. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995; 37:129-36.

Peraçoli MT, Soares AM, Mendes RP, Marques SA, Pereira PC, Rezkallah-Iwasso MT. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1991; 29:373-80.

Pham CT, Ley TJ. The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 1997; 9:127-33.

Phillips SM, Lin JJ, Galal N, Tung AS, Linette GP, Perrin PJ. Resistance in murine schistosomiasis is contingent on activated IL-2 receptor-gearing L3T4<sup>+</sup> lymphocytes, negatively regulated by Lyt-2<sup>+</sup> cells, and uninfluenced by the presence of IL-4. *J Immunol* 1991; 146:1335-40.

Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the Kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:301-8.

Rausch A, Hessmann M, Holscher A, Schreiber T, Bulfone Paus S, Ehlers S, Hólscher C. Interlukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: A role for NKG2D-dependent effectors mechanisms of CD8<sup>+</sup> T cells. Eur J Immunol 2006; 1156-67.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia 1985; 23:323-34.

Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Med. Mycol 2001; 39:233-41.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Infect Immun 1984; 46:346-53.

Romagnani S. Human TH1 e TH2 subsets: doubt no more. Immunol Today 1991; 12:256-7.

Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. Cytokine 2002; 18:149-57.

Rossi CP, McAllister A, Tanguy M, Kagi D, Brahic M. Theiler's virus infection of peforin-deficient mice. J Virol 1998; 72:4515-9.

Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. Annu Rev Immunol 2002; 20:323-70.

Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S, Di Liberto D, de Boer T, Adnan I, et al. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. Tuberculosis (Edinb) 2007; 87:312-21.

San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. A review. Mycopathologia 1977; 62:77-86.

San-Blas G, Vernet D. Induction of the synthesis of cell wall alpha-1,3-glucan in the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9 by fetal calf serum. *Infect Immun* 1977; 15(3):897-902.

Saraiva EC, Altemani A, Franco MF, Unterkircher CS, Camargo ZP. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *J Med Vet Mycol* 1996; 34:155-61.

Sato N, Patel H J, Waldmann T A, Tagaya Y. The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:588-93.

Serbina NV, Flynn JL. Early emergence of CD8<sup>+</sup> T cell primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun* 1999; 67:3980-8.

Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. CD8<sup>+</sup> CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin *in vivo* and lyse infected macrophages. *J Immunol* 2000. 165:353-63.

Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med. Mycol* 1998; 36:37-42.

Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF, Moscardi-Bacchi M, Mendes-Gianinni MJS, Calich VLG. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol* 1989; 27:71-82.

Silva CL, Figueiredo F. Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. *J Infect Dis* 1991; 164:1033-4.

Smyth MJ, Street SE, Trapani JA. Cutting edge: granzymes A and B are not essential for perforin-mediated tumor rejection. *J Immunol* 2003; 171:515-8.

Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection mice. *Am J Pathol* 2000; 156:1811-20.

Sousa AO, Mazzaccaro R J, Russell RG, Lee F K, Turner OC, Hong S, et al. Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:4204-8.

Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001; 32:76-102.

Stalder T, Hahn S, Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1994; 152:1127-33.

Stegelmann F, Bastian M, Swoboda K, Bhat R, Kiessler V, Krensky AM, et al. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8<sup>+</sup> T cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2005; 175:7474-83.

Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum T, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282:121-5.

Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* 1999; 286: 1957-9.

Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by passive haemagglutination assay of antibody using a purified and specific antigen-gp43. *J Med Vet Mycol* 1993; 31:155-60.

Taborda CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 1998; 66:786-93.

Tagaya Y, Bamford R, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity* 1996; 4:329-36.

Tan JS, Canaday DH, Boom WH, Balaji KN, Schwander SK, Rich EA. Human alveolar T lymphocyte response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol* 1997; 159:290-7.

Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ, Graciani AP, Peraçoli MT, Soares AM. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine* 2008; 41:48-53.

Teixeira HC, Calich VL, Singer-Vermes LM, D'Imperio-Lima MR, Russo M. Experimental paracoccidioidomycosis: early immunosuppression occurs in susceptible mice after infection with pathogenic fungi. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20:587-9.

Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:735-47.

Tsao TC, Chen CH, Hong JH, Hsieh MJ, Tsao KC, Lee CH. Shifts of T4/T8 T lymphocytes from BAL fluid and peripheral blood by clinical grade in patients with pulmonary tuberculosis. *Chest* 2002; 122:1285-91.

Tuder RM; el Ibrahim R, Godoy CE, De Brito T. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1985; 92:179-88.

Tuner J, Dockrell HM. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. *Immunology* 1996; 87:339-42.

van Pinxteren LA, Cassidy JP, Smedegaard BH, Agger EM, Andersen P. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol* 2000; 30:3689-98.

Vaz CA, Singer-Vermes LM, Calich VL. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:971-7.

Vazquez N, Walsh TJ, Friedman D, Chanock SJ, Lyman CA. Interleukin-15 augments superoxide production and micobicial activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infect Immun* 1998; 66:145-50.

Vergelli M, Hemmer B, Muraro PA, Tranquilli L, Biddison WE, Sarin A, et al. Human autoreactive CD4+ T cells clones use perforin-or Fas/Fas ligand-mediated pathways for target cell lysis. *J Immunol* 1997; 158:2756-61.

Waldmann TA, Dubois S, Tagaya Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity* 2001; 14:105-10.

Wanke B, Londero A. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Florida: CRS Press; 1994. p.109-20.

Waterhouse NJ, Sutton VR, Sedelies KA, Ciccone A, Jenkins M, Turner SJ, et al. Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *J Cell Biol* 2006; 173:133-44.

Weren A, Bonnekoh B, Schraven B, Gollnick H, Ambach A. A novel flow cytometric assay focusing in perforin release mechanisms of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol Methods* 2004; 289:17-26.

Williams NS, Engelhard VH. Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes perforin-rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J Immunol* 1996; 156:153-9.

Williams NS, Engelhard VH. Perforin-dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4+ T cells are regulated by CD8+ T cells. *J Immunol* 1997; 159:2091-9.

Winn RM, Gil-Lamaignere C, Roilides E, Simitsopoulou M, Lyman CA, Maloukou A, Walsh TJ. Selective effects of interleukin (IL)-15 on antifungal activity and IL-8 release by polymorphonuclear leukocytes in response to hyphae of *Aspergillus* species. *J Infect Dis* 2003; 188:585-90.

Winn RM, Gil-Lamaignere C, Roilides E, Simitsopoulou M, Lyman C A, Maloukou A, et al. Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp. *Cytokine* 2005; 31:1-8.

Wong P, Pamer EG. CD8 T cell response to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 29-7.

Zheng CF, Ma LL, Jones GJ, Gill JM, Krensky AM, Kubes P, et al. Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. *Blood* 2007; 109: 2049-57.

Zhou P, Freidag BL, Caldwell CC, Seder RA. Perforin is required for primary immunity to *Histoplasma capsulatum*. *J Immunol* 2001; 166:1968-74.

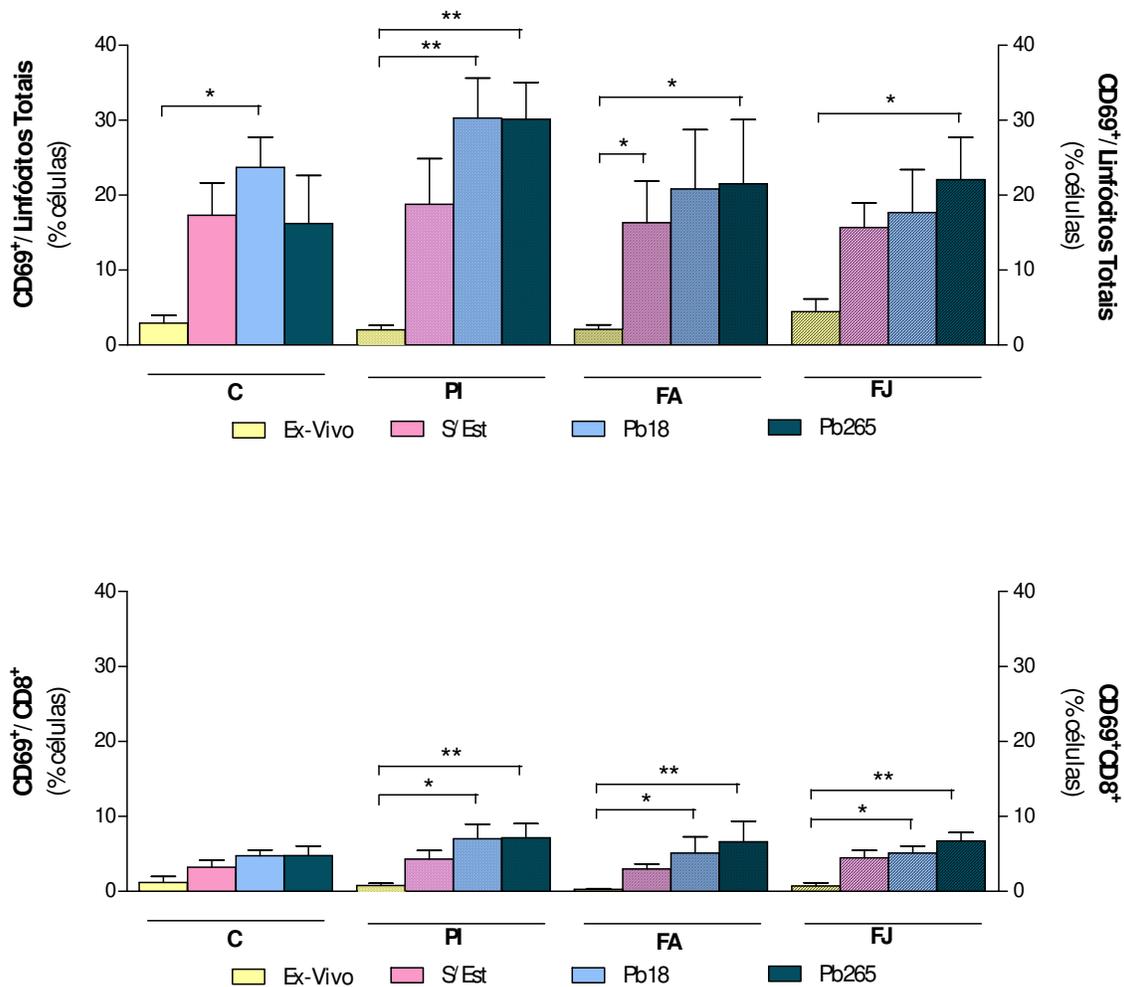
# **ANEXOS**

**EXPRESSÃO DO MARCADOR DE ATIVAÇÃO CD69 E  
DOS GRÂNULOS CITOTÓXICOS GRANZIMA A, GRANZIMA B E PERFORINA  
APÓS ESTÍMULO COM LEVEDURAS DE *P. brasiliensis* E  
REESTÍMULO COM PMA E IONOMICINA**

**Indivíduos com PCM-infecção apresentam aumento de linfócitos mesmo após estímulo com a cepa de alta virulência**

Além da estimulação específica com cepas Pb18 e Pb265 por 5 dias, realizamos culturas reestimuladas com PMA e ionomicina nas últimas 6 horas de cultura. O PMA (phorbol myristate acetate) é um potente indutor da ativação celular com ação direta sobre a proteína C quinase (PKC), sendo assim potente estímulo para a transcrição gênica. O ionóforo de cálcio potencializa a ação do PMA por meio da elevação dos níveis de cálcio intracelular agindo, portanto em diversas vias de sinalização.

Os resultados obtidos com esta forma de reestimulação confirmam vantagem dos indivíduos PI em relação aos outros grupos, com aumento da expressão do marcador de ativação CD69 nos linfócitos totais mesmo após estímulo com a cepa de alta virulência. A análise da expressão deste marcador nas células T CD8<sup>+</sup> não demonstrou diferença entre os indivíduos PCM-infecção e os pacientes com a forma adulta e juvenil da PCM. Diferença significativa foi observada entre as células *ex-vivo* e as estimuladas com a cepa de alta virulência e baixa virulência. Na comparação da expressão de CD69 entre os grupos não houve diferença significativa (dados não mostrados).

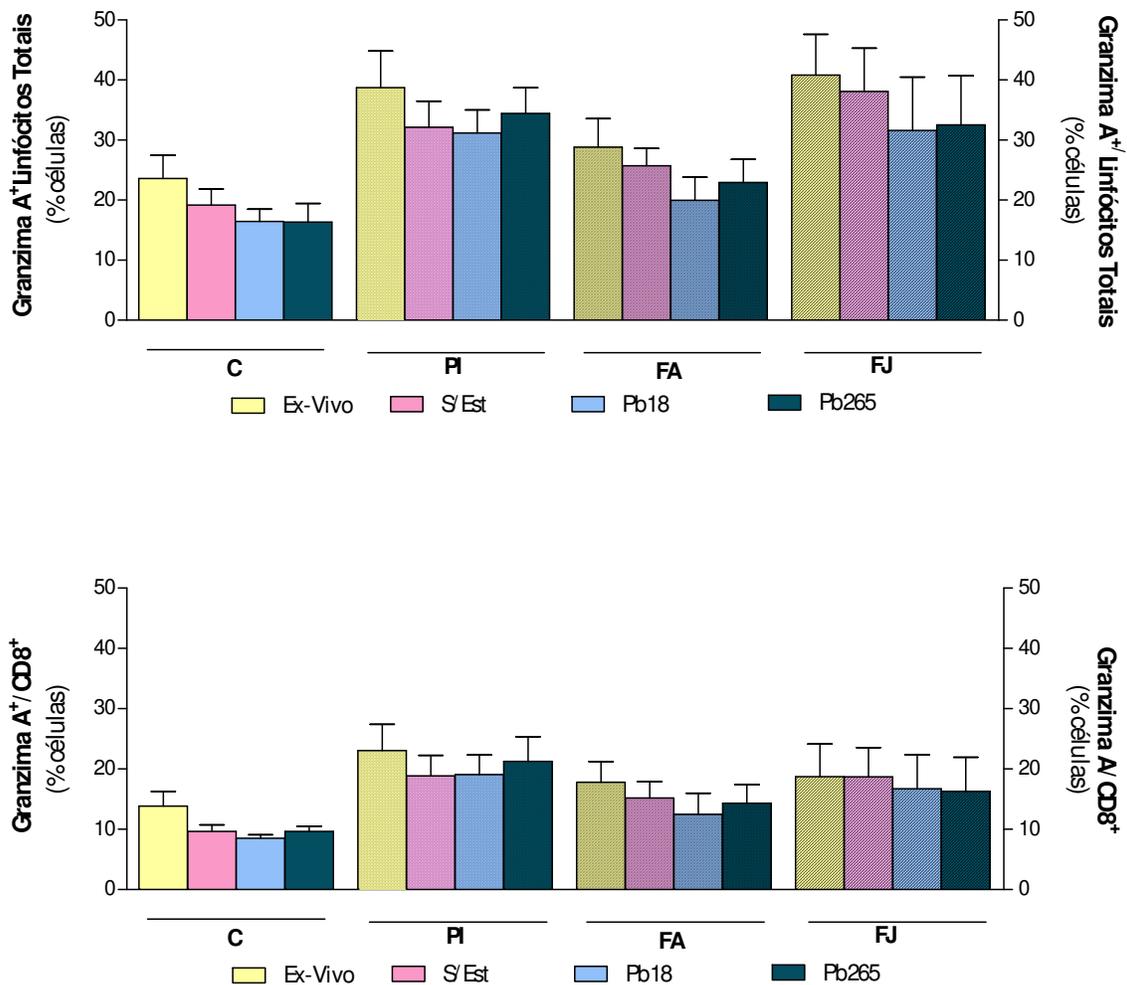


**Figura 16-** Porcentagem de linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com paracoccidiodomycose-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando CD69, *ex-vivo* e após estímulo ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência) e reestímulo com PMA (50ng/ml) e Ionomicina (250 ng/mL). Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. \*p<0,05, \*\*p<0,005.

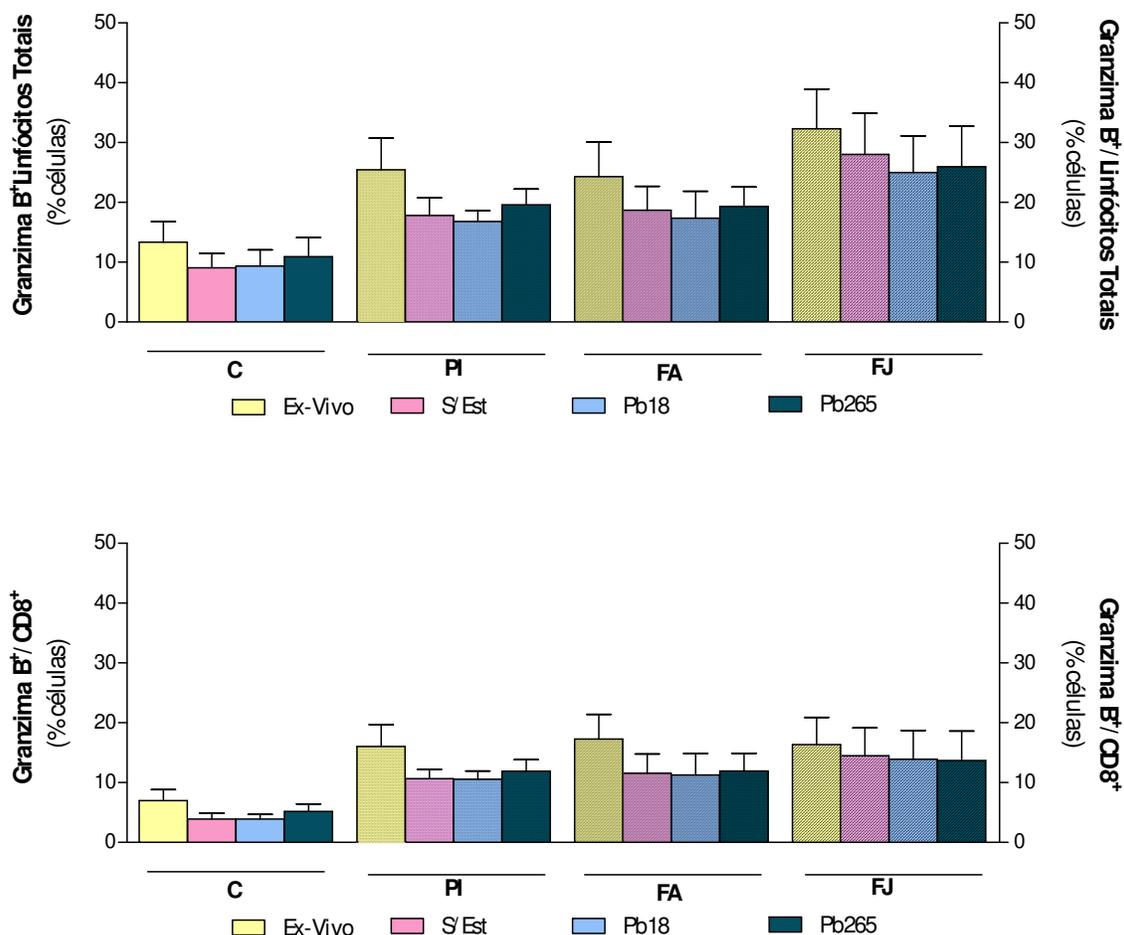
**A expressão dos grânulos citotóxicos granzima A, granzima B e perforina não foi alterada significativamente após estímulo com o *P. brasiliensis* e reestímulo com PMA e ionomicina**

A expressão dos grânulos citotóxicos granzima A e granzima B por linfócitos e células T CD8<sup>+</sup> *ex-vivo* não demonstrou diferença relevante entre as células *ex-vivo* e estimuladas ou não com o *P. brasiliensis* (cepa Pb18 e Pb265). Na comparação destas moléculas entre os indivíduos controle, PCM-infecção e os pacientes (FA e FJ) também não foi possível observar diferenças relevantes e o mesmo foi observado na comparação da expressão destas moléculas entre os grupos (dados não mostrados).

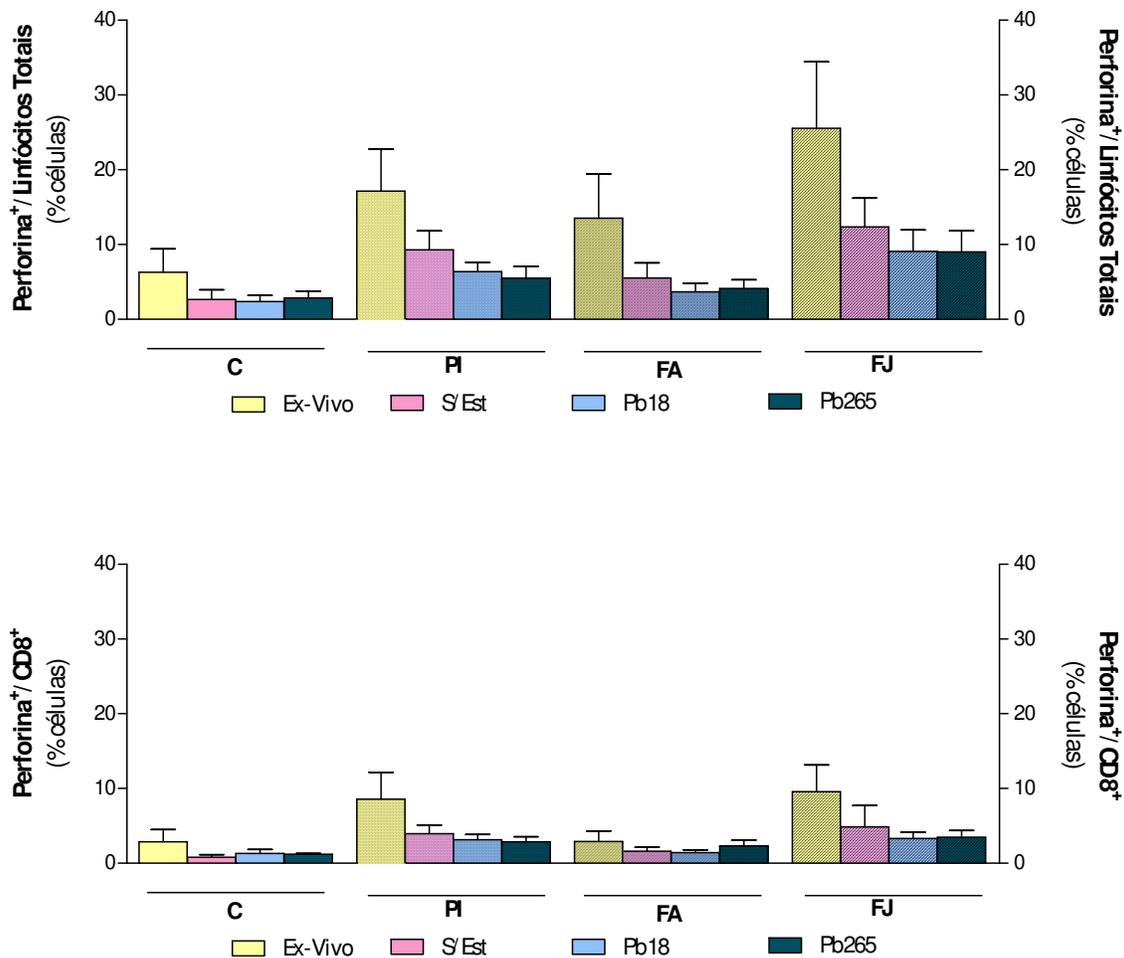
Embora não tenha sido observada diferença relevante na expressão de perforina, entre os grupos, após a cultura houve queda na expressão desta molécula na comparação com a análise *ex-vivo*, nas culturas com ausência e presença do fungo. Não observamos diferenças no estímulo com a cepa Pb18 ou Pb265.



**Figura 17-** Porcentagem de linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando granzima A, *ex-vivo* e após estímulo ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência) e reestímulo com PMA (50ng/ml) e Ionicina (250 ng/mL). Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. \*p<0,05, \*\*p<0,005.



**Figura 18-** Porcentagem de linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando granzima B, *ex-vivo* e após estímulo ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência) e reestímulo com PMA (50ng/ml) e Ionomicina (250 ng/mL). Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. \*p<0,05, \*\*p<0,005.



**Figura 19-** Porcentagem de linfócitos totais e células T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de indivíduos controle, indivíduos com paracoccidiodomicose-infecção, pacientes com a forma adulta e pacientes com a forma juvenil da PCM expressando perforina, *ex-vivo* e após estímulo ou não com as cepas Pb18 (alta virulência) e Pb265 (baixa virulência) e reestímulo com PMA (50ng/ml) e Ionomicina (250 ng/mL). Resultados expressos como média ± EPM. Teste estatístico: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns. \*p<0,05, \*\*p<0,005.

**EXPRESSION OF CYTOTOXIC MOLECULES BY  
PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES FROM  
PATIENTS WITH PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS**

**Short title:** Citotoxiciy in paracoccidioidomycosis

Burlandy-Soares L, Mamoni RL, Lyra L, Schreiber AZ, Blotta MHSL\*

Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), 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: +55 19 3521 9453, Fax: +55 19 3521 9434

e-mail: heblotta@fcm.unicamp.br

**Keywords:** Paracoccidioidomycosis, CD8<sup>+</sup> T cells, perforin, granulysin.

## Abstract

In a previous study we verified an increased number of T CD8<sup>+</sup> cells in BAL of patients with pulmonary paracoccidioidomycosis (PCM), suggesting a role for them in the local immune response. The aims of this study were to verify the activation state as well as the production of cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes (CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>) from patients with PCM, individuals with PCM-infection (PI) and controls, both *ex-vivo* and *in vitro* after stimulation with *P. brasiliensis* yeast cells, by flow cytometry. The *ex-vivo* analysis showed that the patients presented a lower frequency of granzyme A, B and perforin-positive cells as compared to PI individuals. *P. brasiliensis* stimulation led to a discrete increase in CD69<sup>+</sup> cells and a reduction in cytotoxic granules expression in all groups. The addition of IL-15 induced an increase in the frequency of CD69<sup>+</sup> cells only in PI individuals and controls. The effect of IL-15 on granzyme A and B expression was low but a higher frequency of CD8<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> was detected in PI individuals than in patients. IL-15R $\alpha$  expression was lower in CD4<sup>+</sup> T cells from patients in relation to the PI group. Furthermore, low levels of granulysin were detected in sera from PCM patients but a tendency to a rise was observed after antifungal therapy. Altogether the results showed that lymphocytes from PCM patients are poorly activated, express low levels of IL-15R $\alpha$  and produce basal levels of cytotoxic granules. These findings may account to defective cytotoxic activity and consequently low capacity to kill the fungus.

## Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis endemic in various countries of Latin America, mainly in Brazil. The etiological agent of PCM is the thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* [1]

The disease presents a broad spectrum of clinical and pathological manifestations ranging from benign and localized forms to severely disseminated disease. According to the current classification [2] the adult or chronic progressive form of the disease (AF) predominantly affects adult males, with a high frequency of pulmonary, skin, adrenal and visceral involvement. In clear contrast to the adult type, the juvenile type (JF) equally affects young patients of both sexes and is characterized by systemic lymph node involvement, hepatosplenomegaly, and bone marrow dysfunction. Patients with AF usually exhibit low levels of specific antibodies and adequate cellular immune responses, while those with the JF typically show high levels of specific antibodies, polyclonal activation of B cells, antigenemia, and impaired cellular immune responses [3].

A protective role for CD8<sup>+</sup> T cells was suggested in experimental PCM since its depletion induces a more severe and/or disseminated disease in both, resistant and susceptible mice [4]. Moreover, an elevated number of CD8<sup>+</sup> T cells is detected in the lungs of patients with pulmonary PCM, in addition to high concentration of MIP-1 $\alpha$  in BAL, a chemokine known to selectively attract this cell subset [5].

Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells represent a major mechanism of defense against intracellular pathogens by the production of IFN- $\gamma$  and cytolytic activity [6], and is involved in the clearance of *P. brasiliensis* cells. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes disrupt the target cell membrane through extracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent polymerization of perforin, in addition to the uptake of granzymes. These cytotoxic granules are responsible for downstream activation of caspases and subsequent DNA fragmentation, resulting in target cell apoptosis [7, 8]. Granulysin, a recently identified antimicrobial molecule produced by CD8<sup>+</sup> and NK cells [9], has also been associated with CD8<sup>+</sup> T cell killing of *Cryptococcus neoformans* and *Mycobacterium tuberculosis* [10-12]. Circulating granulysin levels are related to T- and NK-cell activity, and may thus reflect protection-associated cellular immune responses [13].

Lymphocyte mediated anti-fungal activity is dependent on IL-15 as it is an important growth factor for T cells and NK cells [14]. IL-15 is a potent chemoattractant [15] and controls both proliferation and survival of naive and memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells [16, 17]. Furthermore, mice lacking IL-15 or the IL-15 receptor alpha (IL-15R $\alpha$ ) are deficient in generating memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells [16, 18] and are highly susceptible to infection with *Mycobacterium tuberculosis* [19]. Lymphocyte mediated anti-fungal activity is dependent on IL-15 as demonstrated in *Cryptococcus neoformans* [10, 20] and *Candida albicans* infection [21]. In the present study we sought to assess the activation state and production of cytotoxic granules (granzyme A, B and perforin) by peripheral blood T cells of patients with the adult and juvenile form of PCM and controls. We also included a group of paracoccidioidin-positive individuals (PI) since they represent the resistance pole of the disease [22]. The comprehension of the immunoprotective mechanisms, that blocked the development of the disease in these individuals, could contribute a better understanding of PCM physiopathology.

## **Methods**

### **Subjects**

We analyze peripheral blood cells from patients with newly diagnosed PCM attended to at the Clinical Hospital of UNICAMP, Campinas, São Paulo Brazil. The diagnosis was established by fungus detection in clinical specimens and serology (immunodiffusion test). The patients were grouped according to clinical form in juvenile (JF, n=9) and adult form (AF, n=11). We also analyzed 8 healthy paracoccidioidin-reactive (PI) individuals living in an endemic area for PCM, and 9 paracoccidioidin-non reactive controls (C). This study was approved by the Medical School Ethics Committee of State University of Campinas (UNICAMP) and informed consent was obtained from each participant.

## **Sera**

The detection of granulysin was determined in a group of individuals that included the ones used for cell analysis, described above. Serum samples were obtained at baseline (T0) and after antifungal therapy for 1 to 2 years (T1). We analyzed 18 sera from patients with JF, 16 sera from patients with AF, 8 sera from PI individuals and 9 controls.

## **Delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction**

Skin tests were performed on the left forearm by intradermal infection of 100  $\mu$ l of *P. brasiliensis* gp43 (7.5  $\mu$ g), and considered positive when an induration larger than 5 mm was observed after 24h [23].

## ***P. brasiliensis* yeast cells**

*P. brasiliensis* of Pb18 (high virulent) and Pb265 (low virulent) strains were maintained by weekly sub-cultivation in the semisolid culture medium at 36°C as described elsewhere [24]. The yeast cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7,2) and adjusted to 2 x 10<sup>6</sup>/ml. Viability was determined with Janus green B vital dye (Merck, Darmstadt, Germany) and was always higher than 85%.

## **Culture conditions**

Peripheral blood was obtained by vein puncture from patients and healthy controls in tubes with heparin. Whole blood cultures were performed (500  $\mu$ L in 1640 RPMI supplemented with 10% AB serum, 2% L-glutamine and antibiotics) and stimulated with *P. brasiliensis* yeast cells (Pb265 or Pb18) for 5 days at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator. The cells were then stimulated with IL-15 (50ng/mL) for 48 hours. At the end of the period, the cells were harvested, washed with sodium azide-PBS (2mM)

and lysed with FACS Lysing Solution (Becton & Dickinson). Finally the cells was washed in staining buffer (PBS + BSA + azide 2 mM) and adjusted to  $1 \times 10^7$ /ml based on hematocytometer counter.

## **Flow Cytometry**

*Ex-vivo* and cultured cells were collected and labeled with monoclonal antibodies against surface molecules (CD69-FITC, CD4 PE, CD8-CyChrome, anti-IL-15R $\alpha$  and isotype controls) fixed and permeabilized. After that, the cells were labeled with monoclonal antibodies against intracitoplasmic granules and cytokines (granzyme A-FITC, granzyme B-FITC, perforin-PE). All labeled antibodies were from BD – Biosciences (San José, CA, USA), except biotinilated anti-IL-15R $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The cells were acquired in a Flow Cytometer (FACScalibur, Becton & Dickson) and analyzed with De Novo Software - FCS Express (Los Angeles, CA, USA). In all cases at least 10,000 gated events were acquired. The results were expressed as percentage of positive cells.

## **ELISA for granulysin detection**

Ninety-six well plates were coated with antibody anti-granulysin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), (1:5,000 dilution in Tris Buffer Saline, TBS), without protein addition (pH 7,2), overnight at 25°C. The plates were washed twice with TBS (pH 7,2). The remaining binding sites were blocked with TBS-5% nonfat dry milk for 2 h at 37°C. After tree washes with TBS (pH 7,2), serum samples were added in duplicate, and the plates were incubated for 1.5 h at 37°C. The wells were washed four times with TBS (pH 7,2) and the anti-granulysin antibody (rabbit anti-human, a gift from C. Clayberger, Stanford University) was added, diluted at 1:5,000 in TBS-BSA-0,1%, pH7,2. After 1.5 h incubation at 37°C, the plates were washed again, and anti-rabbit biotinilated antibody, 1:1,000 dilution in TBS-BSA-0,1% pH7,2 was added. After 1.5 h incubation at 37°C and four washes with TBS, the streptoavidin-peroxidase conjugated was added

(1:1,000 dilution in TBS-BSA-0,1% pH7,2), the plates were then incubated for 1.5 h at 37°C and washed four times with TBS-0,05% Tween 20 pH 7,2. The substrate solution (TMB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in sodium-acetate buffer pH 5.5) was added, and the reaction was stopped by the addition of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The optical densities (ODs) were read in an ELISA reader (Bio Rad, Hercules, CA, USA) at 450 nm. Results were expressed as granulysin units, an arbitrary value calculated as: absorbance of test sample – absorbance of low concentration serum pool/absorbance of high concentration serum pool. The low and high concentrations pool were prepared using at least 4 different sera from patients with PCM (low) or normal controls (high) and used in all plates.

### **Statistical analysis**

Patients (AF and FJ) as well individuals with PCM-infection and control group were compared before and after IL-15 treatment using the paired *t* test. Differences in IL-15R $\alpha$  expression between groups were compared with ANOVA test, Dunn's pos test. In order to compare the granulysin production for the groups the ANOVA test, *t* student pos test was used. Significance was defined as  $P \leq 0.05$ .

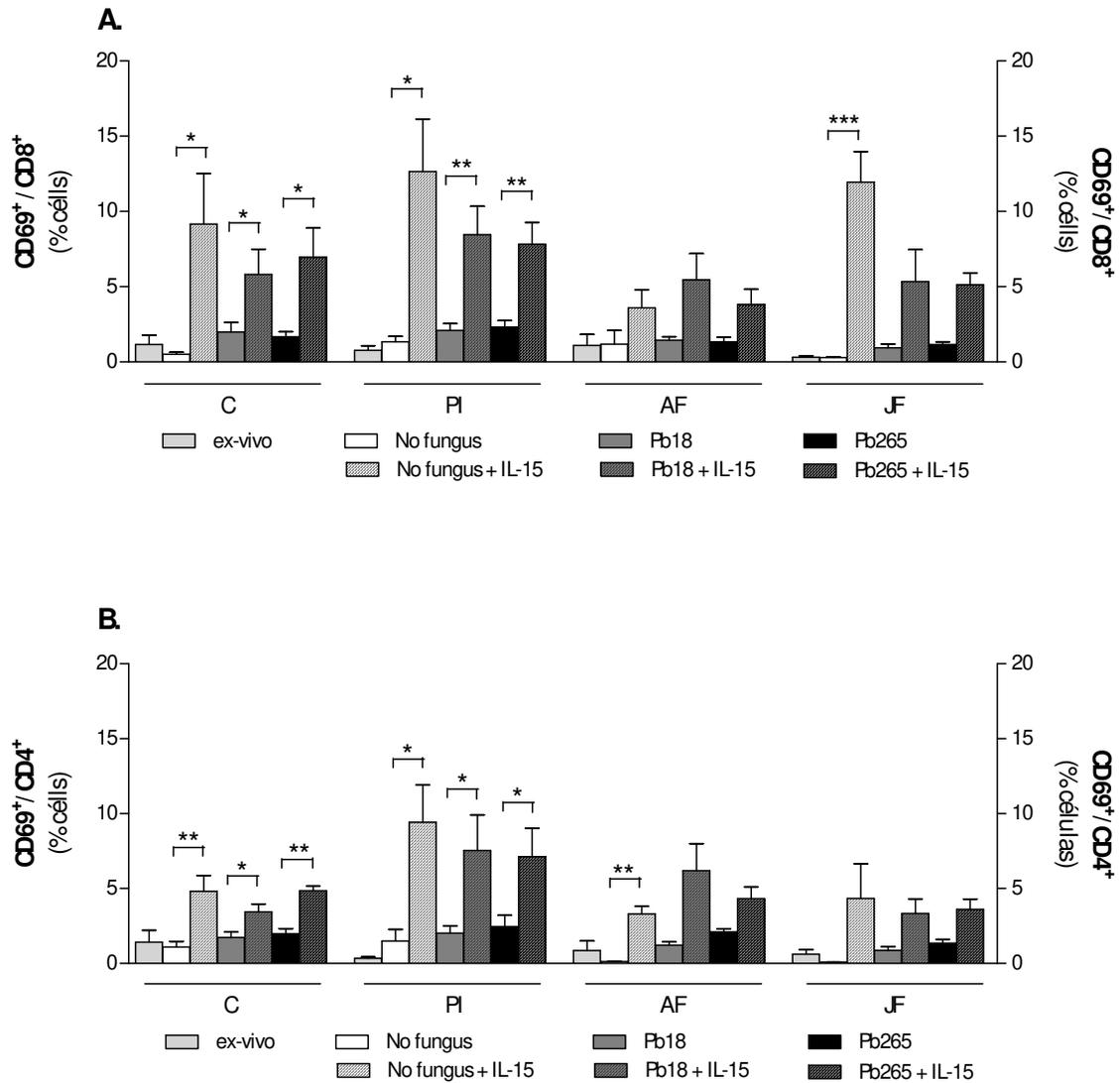
### **Results**

#### **a) CD69 expression**

The ex-vivo expression of CD69, an activation marker, was very low and did not show differences among the groups except for CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells from JF patients that presented a tendency to lower levels. Peripheral blood cells cultured for 5 days in the absence of *P. brasiliensis* yeast cells and without IL-15 stimulation also exhibited low expression of CD69 with the lowest levels observed in CD8<sup>+</sup> cells from controls and patients with the JF of PCM and for CD4<sup>+</sup> cells in patients with JF and AF of the disease (Figure1).

IL-15 is required to elicit an efficient activation and development of CD8<sup>+</sup> T cell mediated response. In cells from controls and PI individuals cultured in the absence or in the presence of *P. brasiliensis* yeast cells (strain Pb18 or Pb265), the addition of IL-15 promoted a significant enhancement in CD69<sup>+</sup> expression in CD8<sup>+</sup> as well as in CD4<sup>+</sup> T cells in all conditions, mainly in PI individuals (Fig. 1). In patients with AF of PCM IL-15 induced a lower increase in CD69 expression as compared to controls and PI group. The only significant differences were detected in CD8<sup>+</sup> T cells from JF patients and in CD4<sup>+</sup> T cell from AF patients without fungal stimulation (Fig. 1A-B). Moreover, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> cells from AF and JF patients presented an increase in the Mean Fluorescence Intensity of (MFI) of CD69 expression after IL-15 addition in the presence of Pb265 (data not shown).

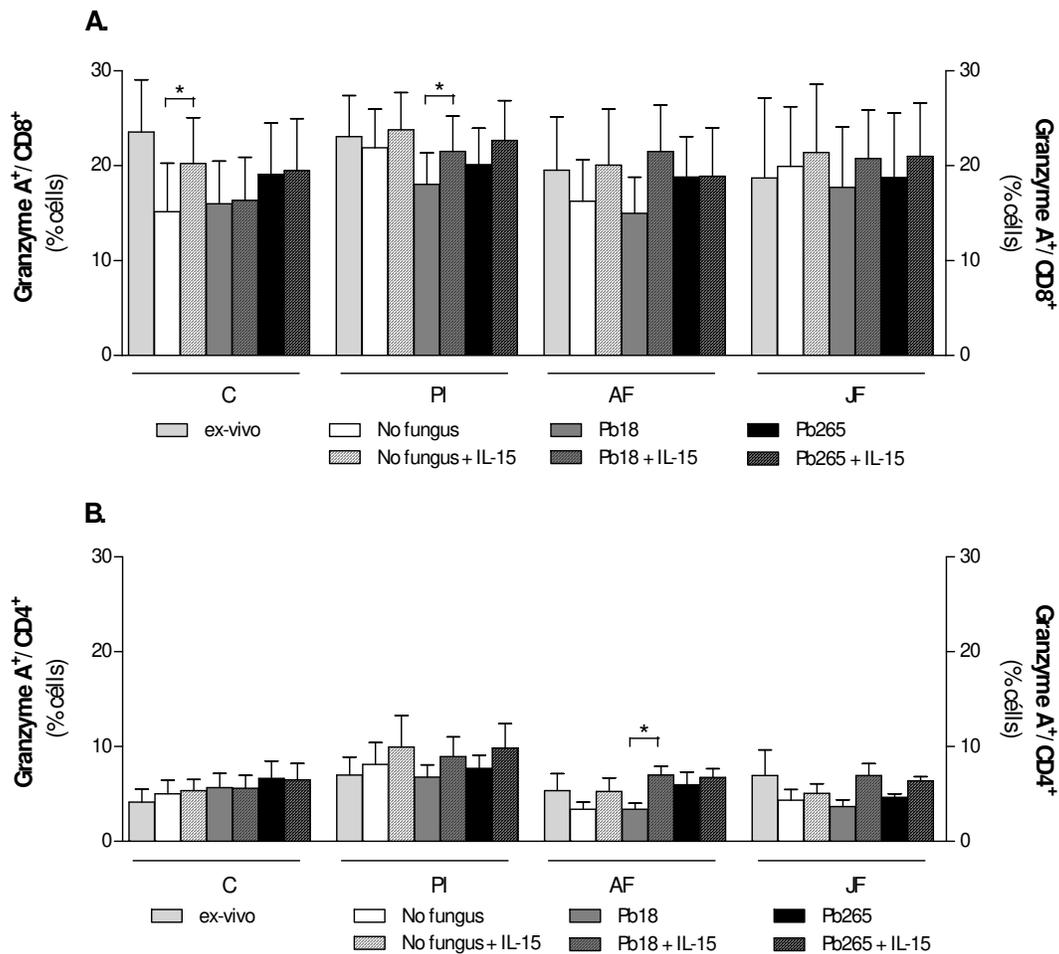
In general the increment promoted by IL-15 was high in the absence of *P. brasiliensis* yeast cells. Moreover, the inhibition promoted by the fungus was more evident in CD8<sup>+</sup> than in CD4<sup>+</sup> cells.



**Figure 1-** Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells (A), and CD4<sup>+</sup> (B) expressing CD69 *ex-vivo* or after 5 days in culture not stimulated (no fungus) or stimulated with *P. brasiliensis* (Pb18 or Pb265) yeast cells in the presence or absence of IL-15 (50 ng/mL) in controls (C), individuals with PCM-infection (PI), and patients with the adult (AF) or juvenile form of PCM (JF). Data are expressed as mean ± SEM. *t* Test \*p<0.05, \*\*p<0,005.

## b) Granzyme A expression

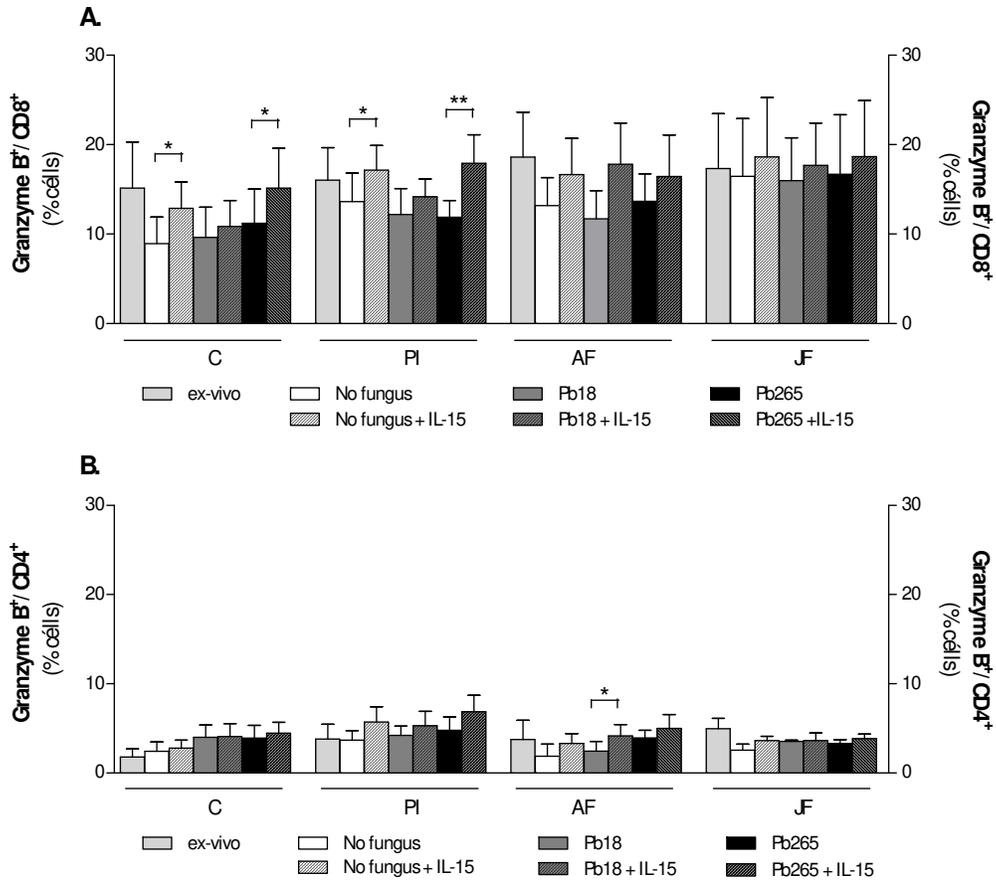
The constitutive expression of granzyme A was high in all groups, mainly in  $CD8^+$  cells and no differences were detected in relation to the presence of *P. brasiliensis* high virulent (Pb18) or low virulent yeast cells (Pb265). IL-15 promoted a slight increase in granzyme A expression (Figure 2A). In relation to  $CD4^+$  subset a significant increased was induced by IL-15 in Pb18-stimulated cells from patients with the adult form of PCM (Figure 2B).



**Figure 2-** Percentage of  $CD8^+$  T cells (A), and  $CD4^+$  (B) expressing granzyme A *ex-vivo* or after 5 days in culture not stimulated (no fungus) or stimulated with *P. brasiliensis* (Pb18 or Pb265) yeast cells in the presence or absence of IL-15 (50 ng/mL) in controls (C), individuals with PCM-Infection (PI), and patients with the adult (AF) or juvenile form of PCM (JF). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. *t* Test \*  $p < 0.05$ .

### **c) Granzyme B expression**

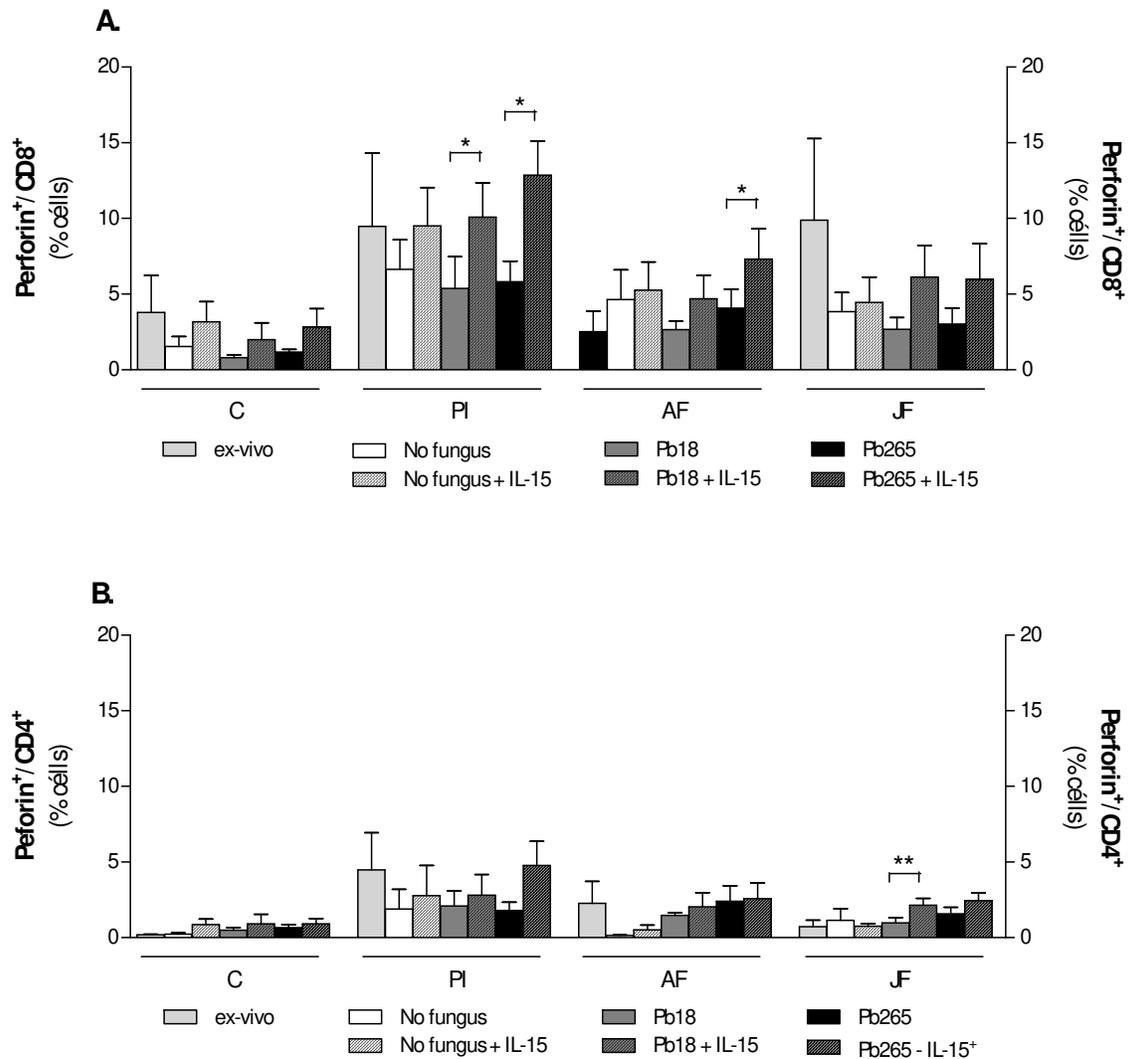
*Ex-vivo* expression of granzyme B<sup>+</sup> was at least two times higher in CD8<sup>+</sup> cells as compared with CD4<sup>+</sup> cells in all groups. Compared to granzyme A, the effect of IL-15 on granzyme B expression was more relevant, although CD8<sup>+</sup> T cell from PCM patients did not respond to IL-15. In controls and PI groups IL-15 alone enhanced the frequency of CD8<sup>+</sup>granzyme B<sup>+</sup> T cells (Figure 3A). Interestingly CD4<sup>+</sup> T cells of AF patients presented a significant augment in granzyme B expression even in the presence of the high virulent strain (Pb18). Compared with JF patients, CD8<sup>+</sup> T cells from AF patients also presented higher granzyme B expression after IL-15 stimulation, even in the presence of high virulent yeast cells (Figure 3B).



**Figure 3-** Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells (A), and CD4<sup>+</sup> (B) expressing granzima B *ex-vivo* or bafter 5 days in culture not stimulated (no fungus) or stimulated with *P. brasiliensis* (Pb18 or Pb265) yeast cells in the presence or absence of IL-15 (50 ng/mL) in controls (C), individuals with PCM-infection (PI), and patients with the adult (AF) or juvenile form of PCM (JF). Data are expressed as mean ± SEM. *t* Test \**p*<0.05.

#### **d) Perforin expression**

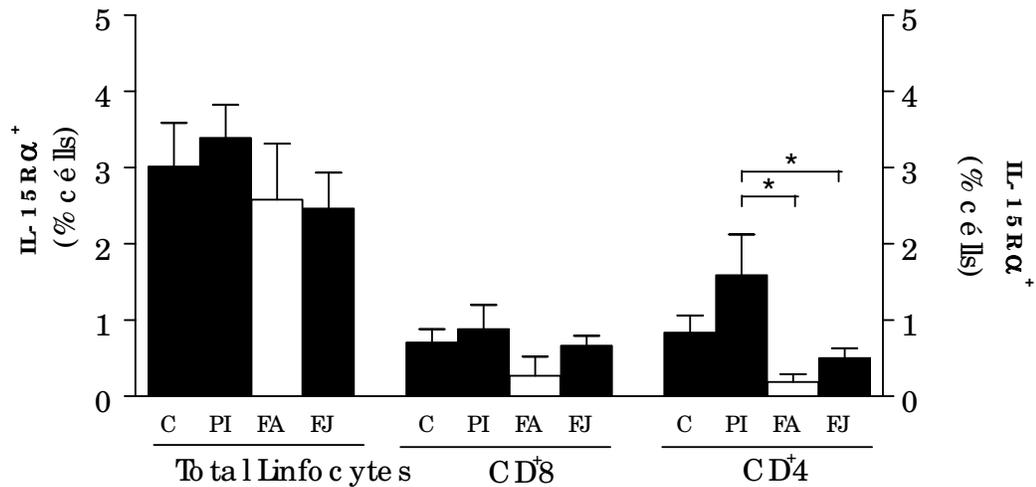
The *ex-vivo* expression of perforin was significantly higher in CD8<sup>+</sup> T cells from PI individuals and in patients with the severe form of PCM (JF) than in control group and patients with the adult form of the disease. However, perforin expression after cell culture was considerably reduced in JF group even in the absence of fungal cells. The addition of IL-15 did not promote an expressive increase in the frequency of CD8<sup>+</sup> perforin<sup>+</sup>. Only CD8<sup>+</sup> T cells of PI individuals responded with higher perforin expression in the presence of both Pb18 and Pb265 yeasts. The frequency of CD4<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> T cells was at least two times less than CD8<sup>+</sup>perforin<sup>+</sup> T cell. In JF patients the IL-15 induced a significant increase of perforin expression only in CD4<sup>+</sup> cells in the presence of the high virulent strain of *P. brasiliensis* (Figure 4B).



**Figure 4-** Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells (A), and CD4<sup>+</sup> (B) expressing perforin *ex-vivo* or after 5 days in culture not stimulated (no fungus) or stimulated with *P. brasiliensis* (Pb18 or Pb265) yeast cells in the presence or absence of IL-15 (50 ng/mL) in controls (C), individuals with PCM-infection (PI), and patients with the adult (AF) or juvenile form of PCM (JF). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. *t* Test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

### e) *Ex-vivo* expression of IL-15R $\alpha$

Considering the low response to IL-15 exhibited by patients with PCM we next examined the *ex-vivo* expression of IL-15R $\alpha$ . The analysis of total lymphocytes and CD8<sup>+</sup> T cell did not show any difference among the groups. However, in relation to CD4<sup>+</sup> T cells higher expression of IL-15R $\alpha$  was observed in PI individuals compared with patients with the adult and juvenile form of PCM (Figure 5).

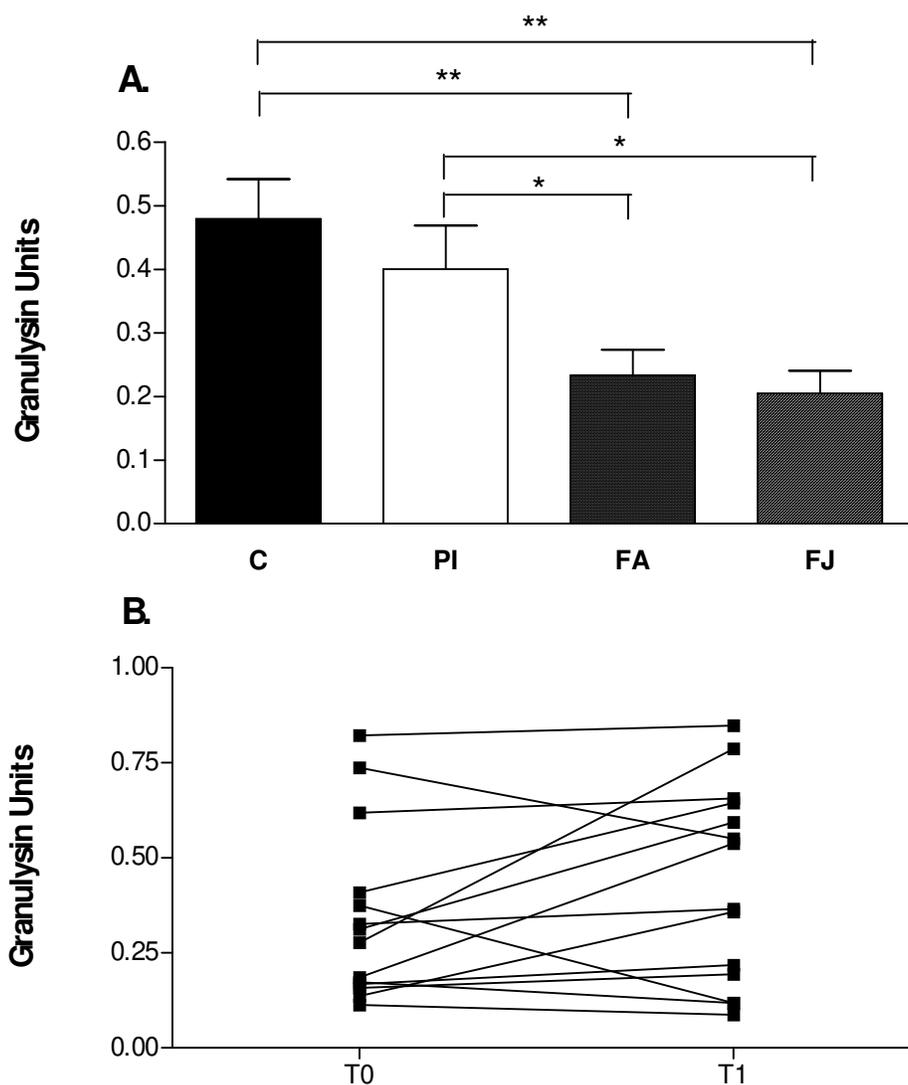


**Figure 5-** *Ex-vivo* expression of IL-15R $\alpha$  in total lymphocytes, CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells from controls (C), individuals with PCM-Infection (PI), and patients with the adult (AF) or juvenile form of PCM (JF). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. NOVA test, Dunn's pos test, \*  $p < 0,05$ .

### f) Serum granulysin levels

Granulysin is an antimicrobial molecule able to directly kill microorganisms. Patients with PCM had significantly lower serum granulysin levels compared to control and PI group, but without significant differences between juvenile and adult form of the disease (Figure 6A).

We also examined serum granulysin levels in some patients with the AF and JF of PCM before and after antifungal treatment. As a result we observed that for the majority of patients granulysin concentrations tend to increase by the end of treatment (around 1.5 years) (Figure 6B).



**Figure 6-** Granulysin levels at baseline in sera from controls (C), individuals with PCM-Infection (PI) and patients with the adult (AF) or juvenile form of PCM (JF). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. *t* Test \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ . (A). Levels of granulysin in sera from patients with the adult (AF) or juvenile form of PCM (JF) at baseline (T0) and after 1-2 years (T1) of antifungal treatment (B).

## Discussion

In diseases caused by intracellular microorganisms it was demonstrated that CD8<sup>+</sup> T cells are pivotal to the infection control. In experimental PCM, fungal loads are mainly controlled by CD8<sup>+</sup> T cells, whereas antibody production and DTH reactions are regulated by CD4<sup>+</sup> T cells [25].

The aims of this study were to verify the activation state as well as the production of cytotoxic molecules by peripheral blood lymphocytes (CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>) from patients with PCM, PI individuals and controls, both *ex-vivo* and *in vitro* after stimulation with *P. brasiliensis* yeast cells.

The *ex-vivo* data showed a tendency to a higher constitutive expression of granzyme A, B and mainly perforin in PI individuals than in patients (JF and AF). Consequently PI individuals would be able to develop an effective cytotoxic response while in patients it would be impaired. We have recently shown that CD8<sup>+</sup> and NK cells from patients with active PCM present a lower fungicidal and cytotoxic response to *P. brasiliensis* as compared to PI individuals.

CD8<sup>+</sup> T cells capacity to respond to IL-15 is critical to the development of protection immunity, considering that this cytokine is essential for activation and expansion of effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells [26].

The IL-15 addition to the cell cultures induced a significant increased in the activation marker CD69 only in CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells from controls and PI individuals, even in the presence of the high virulent strain of *P. brasiliensis* (Pb18). IL-15 alone elevated significantly the frequency of CD69<sup>+</sup> cells in all groups, except AF group, demonstrating that IL-15 influence was higher in the absence of fungal cells. These data are in accordance with Liu et al (2002) who have shown that IL-15 is not only a crucial growth factor but also an antigen-independent activator of the effector functions of CD8<sup>+</sup> memory T cells [27].

The lowest effect of IL-15 on CD69 expression was observed in CD8<sup>+</sup> T cells subset of the patients with the juvenile form of the disease, in the presence of fungal yeast cells. However, the MFI of CD69 in these patients increased in the presence of IL-15 but only in cultures with the low virulent fungal cells (data not show), confirming the inhibition potential of the high virulence Pb18 strain.

PI individuals presented higher CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells number after IL-15 addition, even in the presence of *P. brasiliensis* high virulent strain. In experimental tuberculosis it has been demonstrated that IL-15 is necessary to regulate the expansion and the effector mechanisms of CD8<sup>+</sup> T cells [28, 29]. IL-15 is a potent inducer of both, pro-inflammatory and antifungal activities of polymorfonuclear cells, activating several antimicrobial functions involved in the cellular response against *C. albicans* [30]. Neutrophils from healthy donors pretreated with IL-15 show enhanced fungicidal activity against *P. brasiliensis* with elevated superoxide anion production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release [31].

IL-15 treatment induced a modest effect on granzyme A and B expression, although an increase on MFI was verified in CD8<sup>+</sup> T cells from PI individuals, even in presence of high virulent yeast cells (data not show). After IL-15 treatment patients with the adult form of the disease showed higher capacity to respond to Pb18 strain than patients with the juvenile form of the PCM. The CD4<sup>+</sup> T cells of these individuals increased the granzymes A and B expression after IL-15 addition, confirming different response between the clinical forms of PCM. In experimental PCM the CD4<sup>+</sup> T cells display a protective role in the resistant and intermediate mouse strains, whereas in susceptible mice they are deleted or anergic [32].

CD8<sup>+</sup> T cells of PI individuals also showed an increase in CD8<sup>+</sup> T cells expressing perforin in response to IL-15, in relation to patient's cells. Interestingly, in patients with the juvenile form of the disease IL-15 increased perforin expression only in CD4<sup>+</sup> T cells and in the presence of Pb18 yeast cells.

CD4<sup>+</sup> T cells exert a regulator and an effector function during the immune response by the production of cytokines [33], however, over the past two decades, the ability of CD4<sup>+</sup> T cells to become cytotoxic has been reported in both mouse and human against alloantigens, microbe-infected cells and cancer [34, 35]. Previous studies in mice demonstrate that CD4<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes (CTL) cause target cell lysis primarily via CD95/CD95L interactions [34]. However, another studies on human CD4<sup>+</sup> T cells demonstrated that CD4<sup>+</sup> CTL also employ perforin and granzyme-based granule exocytosis pathway [36, 37].

CD4<sup>+</sup> T cells cytotoxic have an important role in the cytotoxic response to *Cryptococcus neoformans* [11] and *Mycobacterium tuberculosis* [38].

The deficient response of PCM patients to IL-15 stimulation led us to investigate the expression of IL-15R $\alpha$  on their lymphocytes. Constitutive IL-15R $\alpha$  expression was low and similar on total lymphocytes as well as on CD8<sup>+</sup> T cells subset. However a higher frequency of CD4<sup>+</sup>IL-15R $\alpha$ <sup>+</sup> was observed in PI individuals, compared to JF and AF of PCM patients. In addition to its role in adaptive immunity, IL-15 is able to stimulate the oxidative burst of neutrophils against *P. brasiliensis* [31], *Aspergillus* [39], *Fusarium spp* and *Saedosporium Spp* [40]. Therefore the low expression of IL-15R $\alpha$  frequency in lymphocytes could have important impact in innate as well as in cytotoxic responses as observed in PCM patients. It has been shown that coordinate expression of IL-15 and IL-15R $\alpha$  in the same cell increases the stability and secretion of both molecules as a complex. In the absence of co-expressed IL-15R $\alpha$ , a large portion of the produced IL-15 is rapidly degraded immediately after synthesis, impairing the expansion of NK and T cells in the lungs, liver and spleen of mice [41]. The murine infection by *P. brasiliensis* results in heavy fungal loads in these organs. The lungs are also frequently involved in human PCM, so lower IL-15 R $\alpha$  expression could impair the sustained IL-15 activity and consequently the expansion and activation of cytotoxic effectors cells in these sites [42].

The relation between granulysin production and host defense against microbial pathogens was described in leprosy. Granulysin-expressing T cells were detected in cutaneous leprosy lesions at a six-fold greater frequency in patients with the localized tuberculoid form as compared with the disseminated lepromatous form of the disease [43].

Plasma granulysin levels production correlate with curative host response in tuberculosis, and increased after completion of tuberculosis therapy [44]. In this study the granulysin concentration in the serum show reduced levels as compare with the PI individuals and controls. In addition, an increase tendency of this granule levels was observed during antifungal treatment, in most of the analyzed patients, indicating the association of high granulysin levels in serum with response to antifungal therapy and improvement of cytotoxic response.

Altogether these results indicate that PCM patient's lymphocytes are in lower activating status, presented reduced expression of IL-15 receptor and as compare with PI group demonstrate minor granules cytotoxic expression (granzyme A, B, perforin and granulysin). These factors in association to others mechanisms which compromise cellular immunity, could result in deficient cytotoxic activity, and, therefore reduced capacity to kill this fungus.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Dr. Carol Clayberger (Stanford University) for the anti-granulysin antibody. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

## References

- [1] Franco M, Peracoli MT, Soares A et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993; 5: 115-49.
- [2] Franco M, Montenegro MR, Mendes RP et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20: 129-32.
- [3] Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1987; 25: 5-18.
- [4] Cano LE, Singer-Vermes LM, Costa TA et al. Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 2000; 68: 352-9.
- [5] Fornazim MC, Balthazar A, Quagliato R, Jr. et al. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J* 2003; 22: 895-9.
- [6] Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B et al. NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 2004; 172: 130-7.
- [7] Okada S, Li Q, Whitin JC et al. Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *J Immunol* 2003; 171: 2556-62.
- [8] Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the Kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 301-8.
- [9] Krensky AM, Clayberger C. Granulysin: a novel host defense molecule. *Am J Transplant* 2005; 5: 1789-92.
- [10] Ma LL, Spurrell JC, Wang JF et al. CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *J Immunol* 2002; 169: 5787-95.
- [11] Zheng CF, Ma LL, Jones GJ et al. Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. *Blood* 2007; 109: 2049-57.

- [12] Wagnier A, Sasportes M, Lagrange PH. Granulysin: antimicrobial molecule of innate and acquired immunity in human tuberculosis. *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53: 516-21.
- [13] Ogawa K, Takamori Y, Suzuki K et al. Granulysin in human serum as a marker of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1925-33.
- [14] Tran P, Ahmad R, Xu J et al. Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity. *Immunology* 2003; 109: 263-70.
- [15] Berard M, Brandt K, Bulfone-Paus S et al. IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2003; 170: 5018-26.
- [16] Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 2000; 191: 771-80.
- [17] Judge AD, Zhang X, Fujii H et al. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* 2002; 196: 935-46.
- [18] Lodolce JP, Boone DL, Chai S et al. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998; 9: 669-76.
- [19] Saito K, Yajima T, Kumabe S et al. Impaired protection against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection in IL-15-deficient mice. *J Immunol* 2006; 176: 2496-504.
- [20] Mody CH, Spurrell JC, Wood CJ. Interleukin-15 induces antimicrobial activity after release by *Cryptococcus neoformans*-stimulated monocytes. *J Infect Dis* 1998; 178: 803-14.
- [21] Kim HS, Choi EH, Khan J et al. Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* 2005; 73: 3714-24.

- [22] Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* 2002; 4: 139-44.
- [23] Saraiva EC, Altemani A, Franco MF et al. Paracoccidioides brasiliensis-gp43 used as paracoccidioidin. *J Med Vet Mycol* 1996; 34: 155-61.
- [24] Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA et al. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun* 1995; 63: 1777-83.
- [25] Singer-Vermes LM, Burger E, Franco MF et al. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven Paracoccidioides brasiliensis isolates in susceptible inbred mice. *J Med Vet Mycol* 1989; 27: 71-82.
- [26] Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97: 14-32.
- [27] Liu K, Catalfamo M, Li Y et al. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 6192-7.
- [28] Rausch A, Hessmann M, Holscher A et al. Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 2006; 36: 1156-67.
- [29] Serbina NV, Liu CC, Scanga CA et al. CD8+ CTL from lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *J Immunol* 2000; 165: 353-63.
- [30] Vazquez N, Walsh TJ, Friedman D et al. Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against Candida albicans. *Infect Immun* 1998; 66: 145-50.

- [31] Tavian EG, Dias-Melicio LA, Acorci MJ et al. Interleukin-15 increases *Paracoccidioides brasiliensis* killing by human neutrophils. *Cytokine* 2008; 41: 48-53.
- [32] Chiarella AP, Arruda C, Pina A et al. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect* 2007; 9: 1078-88.
- [33] Hahn S, Stalder T, Wernli M et al. Down-modulation of CD4+ T helper type 2 and type 0 cells by T helper type 1 cells via Fas/Fas-ligand interaction. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2679-85.
- [34] Hahn S, Gehri R, Erb P. Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity. *Immunol Rev* 1995; 146: 57-79.
- [35] Faber LM, van Luxemburg-Heijs SA, Veenhof WF et al. Generation of CD4+ cytotoxic T-lymphocyte clones from a patient with severe graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation: implications for graft-versus-leukemia reactivity. *Blood* 1995; 86: 2821-8.
- [36] Vergelli M, Hemmer B, Muraro PA et al. Human autoreactive CD4+ T cell clones use perforin- or Fas/Fas ligand-mediated pathways for target cell lysis. *J Immunol* 1997; 158: 2756-61.
- [37] Williams NS, Engelhard VH. Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J Immunol* 1996; 156: 153-9.
- [38] Tan JS, Canaday DH, Boom WH et al. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J Immunol* 1997; 159: 290-7.
- [39] Winn RM, Gil-Lamaignere C, Roilides E et al. Selective effects of interleukin (IL)-15 on antifungal activity and IL-8 release by polymorphonuclear leukocytes in response to hyphae of *Aspergillus* species. *J Infect Dis* 2003; 188: 585-90.

- [40] Winn RM, Gil-Lamaignere C, Roilides E et al. Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp. *Cytokine* 2005; 31: 1-8.
- [41] Bergamaschi C, Rosati M, Jalah R et al. Intracellular interaction of IL-15 with its receptor alpha during production leads to mutual stabilization and increased bioactivity. *J Biol Chem* 2007;
- [42] Sato N, Patel HJ, Waldmann TA et al. The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 588-93.
- [43] Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med* 2001; 7: 174-9.
- [44] Sahiratmadja E, Alisjahbana B, Buccheri S et al. Plasma granulysin levels and cellular interferon-gamma production correlate with curative host responses in tuberculosis, while plasma interferon-gamma levels correlate with tuberculosis disease activity in adults. *Tuberculosis (Edinb)* 2007; 87: 312-21.