

MÁRCIA CRISTINA FORNAZIM

***ESTUDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES
COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE PULMONAR***

CAMPINAS

2003

MÁRCIA CRISTINA FORNAZIM

***ESTUDO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES
COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE PULMONAR***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas*

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA

CAMPINAS

2003

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

F767e Fornazim, Márcia Cristina
 Estudo do lavado broncoalveolar de pacientes com
 paracoccidioidomicose pulmonar. / Márcia Cristina Fornazim.
 Campinas, SP : [s.n.], 2003.

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

 1. Paracoccidioides brasiliensis. 2. Linfócito T. 3.
 Macrófagos. 4. Adesão celular. 5. *Citocina. I. Maria
 Heloisa Souza Lima Blotta. II. Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Tese de Mestrado

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

Banca examinadora da Tese de Mestrado

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

DEDICATÓRIA:

Para a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta, pela orientação, amizade, confiança e pelas palavras de incentivo que me conduziram ao término deste estudo.

Ao Dr. Alexandre Eduardo Nowill, pela amizade e tolerância na flexibilidade de meus horários durante a rotina de trabalho, o que possibilitou o término deste estudo.

Ao Dr. Alípio B. Balthazar, responsável pela coleta do lavado broncoalveolar, pela disponibilidade em todos os momentos deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Quagliato Jr, docente da Disciplina de Pneumologia, pelo apoio e incentivo para a realização deste estudo.

Ao enfermeiro Sr. Natal dos Santos Gregório e a auxiliar de enfermagem Sra. Inês Antônio M. Dejavitte que atuam no Procedimento Especializado da Broncoscopia no Hospital das Clínicas da Unicamp, pela cooperação durante a coleta das amostras de lavado broncoalveolar.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunologia Celular do Cipo: Maria Carolina Spago, Gilberto Carlos Franchi Júnior e Carmem Silvia Gabetta, pela colaboração constante e por dividirem comigo este trabalho.

Ao meu amigo Ronei Luciano Mamoni, pela ajuda dispensada em todos os momentos deste estudo.

As minhas amigas: Sara, Érika, Lisandra, Andreinha, Fernanda, Mara, Lúcia e Concília, pelo apoio constante.

A bióloga Fernanda Gonçalves Pereira, pelo processamento e análise das amostras no Citômetro de Fluxo.

A Sra. Marta, por sua amizade, por seus bons conselhos e sólido apoio em todos os momentos deste estudo.

A minha família, em especial a minha mãe Eunice, presente em todos os momentos.

A ciência é incapaz de resolver os mistérios finais da natureza, porque na verdade fazemos parte do mistério que tentamos resolver.

Max Planck (1858-1947)

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
1. INTRODUÇÃO	12
2. ARTIGO	24
Abstract.....	26
Introduction.....	27
Material and Methods.....	28
Results	30
Discussion	32
References.....	34
Legends to the figures.....	37
Figures.....	38
3. DISCUSSÃO	42
4 CONCLUSÕES	50
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
6 APÊNDICE	63



RESUMO

Para investigar a resposta imune local *versus* sistêmica em pacientes com paracoccidioidomicose pulmonar analisamos o fenótipo de diferentes populações celulares e o padrão de produção de citocinas por células do lavado broncoalveolar (LBA) e do sangue periférico. O grupo estudado foi constituído por 19 pacientes com idade entre 36 a 65 anos. O diagnóstico foi confirmado pela demonstração do fungo *P. brasiliensis* no escarro, LBA e/ou biópsia. A análise do LBA mostrou aumento de linfócitos e neutrófilos em relação ao descrito para indivíduos normais saudáveis. Linfócitos T CD8+ encontravam-se em maior número no LBA do que no sangue periférico. A expressão de moléculas do MHC classe II, ICAM-1 (CD54) e B7-2, foi aproximadamente 3 vezes maior em macrófagos alveolares (MA), do que em monócitos do sangue periférico. Sobrenadantes de culturas de curta duração de MA apresentaram níveis mais elevados de IL-6, TNF- α , IL-12 p40 e MIP-1 α , do que sobrenadantes de monócitos do sangue periférico. No LBA destes pacientes também foi possível detectar IL-6, TNF- α e MIP-1 α , assim como anticorpos específicos anti-gp43 de *P. brasiliensis*, principalmente da classe IgG2. Como foi demonstrado que MIP-1 α atrai seletivamente linfócitos T CD8+ e esta população celular está aumentada no LBA, nossos achados sugerem que além de macrófagos ativados, células T CD8+ devem ter um importante papel no desenvolvimento da PCM pulmonar.



ABSTRACT

To investigate the local immune response we analyzed the cellular infiltrate and patterns of cytokine production in bronchoalveolar lavage cells and fluid from patients with pulmonary paracoccidioidomycosis (PCM). The group consisted of 19 patients, 16 male and 3 female, with age ranging from 36 to 65 years. The diagnosis was confirmed by demonstration of fungus in the sputum or bronchoalveolar lavage fluid (BAL), in addition to serological tests. Cytospin preparations from patients with PCM showed an increased number of lymphocytes in BAL, mostly CD8+T cells. Cultured alveolar macrophages produced higher levels of IL-6, TNF- α and MIP-1 α as compared with PBMC. No differences were detected in relation to IL-8, IL-12p40, IL-10 and TGF- α . BAL fluid from PCM patients contained low but significant levels of IL-6, TNF- α and MIP-1 α , and specific antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*, mainly of the IgG2 isotype. These findings indicate that the local inflammatory reaction in the lungs of patients with pulmonary paracoccidioidomycosis is mediated by the inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and MIP-1 α characterized by a lymphocytic infiltration and local release. MIP-1 α may play an important role in the pathogenesis of PCM, mediating the recruitment of lymphocytes and macrophages to the site of infection.



INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis (*P. brasiliensis*) é o agente causador da paracoccidioidomicose (PCM), doença granulomatosa crônica que acomete principalmente os pulmões, pele, mucosas e linfonodos. O *P. brasiliensis* apresenta dimorfismo termo-dependente, desenvolvendo-se na forma de levedura em vida parasitária ou quando cultivado em meios de cultura a 37°C. As culturas mantidas à temperatura ambiente (20-24°C) apresentam-se, na fase micelilar, com colônias de aspecto cotonoso, micélio hialino com hifas finas, septadas, com conídios terminais (FRANCO *et al*, 1989; BRUMMER, CASTANEDA & RESTREPO, 1993). A PCM foi observada pela primeira vez no Brasil por Adolpho Lutz em 1908, que isolou o fungo de lesões nasofaríngeas de pacientes (LACAZ, 1991).

A PCM se distribui pelas regiões tropicais e subtropicais da América Latina, desde o norte do México até o Sul da Argentina (BARBOSA & DAHER, 1991). Os países mais atingidos são o Brasil, Argentina, Venezuela, Colômbia e Equador, onde afeta endemicamente a população rural. O Brasil possui mais de 80% dos registros da doença, sendo que as maiores incidências concentram-se nas regiões sudeste e centro-oeste. Calcula-se que 10 milhões de pessoas estão infectadas pelo fungo, das quais 2% podem desenvolver a doença. Fatores de risco como tabagismo, etilismo e desnutrição são freqüentemente associadas à doença (TRAVASSOS, 2000).

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

A PCM é adquirida através da inalação de conídios produzidos pela forma miceliana do fungo, sendo os pulmões os primeiros órgãos a serem atingidos e a partir dos quais a infecção pode ou não se disseminar. A história natural da doença tem sido confirmada por estudos de pacientes com PCM pulmonar utilizando tomografia computadorizada de alta resolução, evidenciando as seguintes etapas: 1) inalação, com

focos parenquimatosos exsudativos, que regredem com o tratamento ou evoluem para a forma produtiva ou mais raramente para a escavação. 2) progressão das lesões iniciais para fase produtiva com nódulos densos, insuflação periférica, alargamento fibroso de septos perilobulares, necrose e formação de cavidades, 3) extensão do foco parenquimatoso para as vias linfáticas broncopulmonares (QUAGLIATO *et al*, 1999).

A maioria dos indivíduos expostos ao fungo desenvolve infecção assintomática. Quando presentes, as manifestações clínicas são diversas, envolvendo um (forma localizada) ou mais órgãos (forma disseminada) (RESTREPO, 1988). As formas clínicas da PCM podem ser classificadas em dois grandes grupos: a forma aguda ou juvenil e a forma crônica ou adulta. A forma juvenil acomete crianças e adultos jovens, progride rapidamente (semanas a meses) e é caracterizada pelo envolvimento marcante do sistema fagocítico mononuclear (fígado, baço, linfonodos e medula óssea) (TERRA *et al*, 1991). A forma adulta, mais freqüente em indivíduos do sexo masculino, com idade entre 30 e 50 anos, progride lentamente e pode levar meses ou anos até se estabelecer por completo. Aproximadamente 90% dos pacientes com a FA apresentam comprometimento pulmonar (LONDERO, 1986), sendo o diagnóstico confirmado pelo achado do fungo no exame direto de escarro ou lavado broncoalveolar (LBA).

As manifestações clássicas da PCM pulmonar no radiograma de tórax revelam padrão reticulonodular difuso, bilateral, predominando nos campos médios intersticial e às vezes alveolares, com hiperinsuflação e pouca reação pleural ou ganglionar. As cavidades podem ocorrer em até 30% dos casos.

A alveolite observada na PCM e outras doenças pulmonares intersticiais representa os fenômenos que ocorrem nos compartimentos alveolar e intersticial, que estão em equilíbrio dinâmico. Foi demonstrado que células recuperadas do espaço alveolar refletem a celularidade do interstício, ou seja o número e a proporção de células obtidos a partir da análise do LBA são similares aos encontrados em biópsias de pulmão (figura 1).

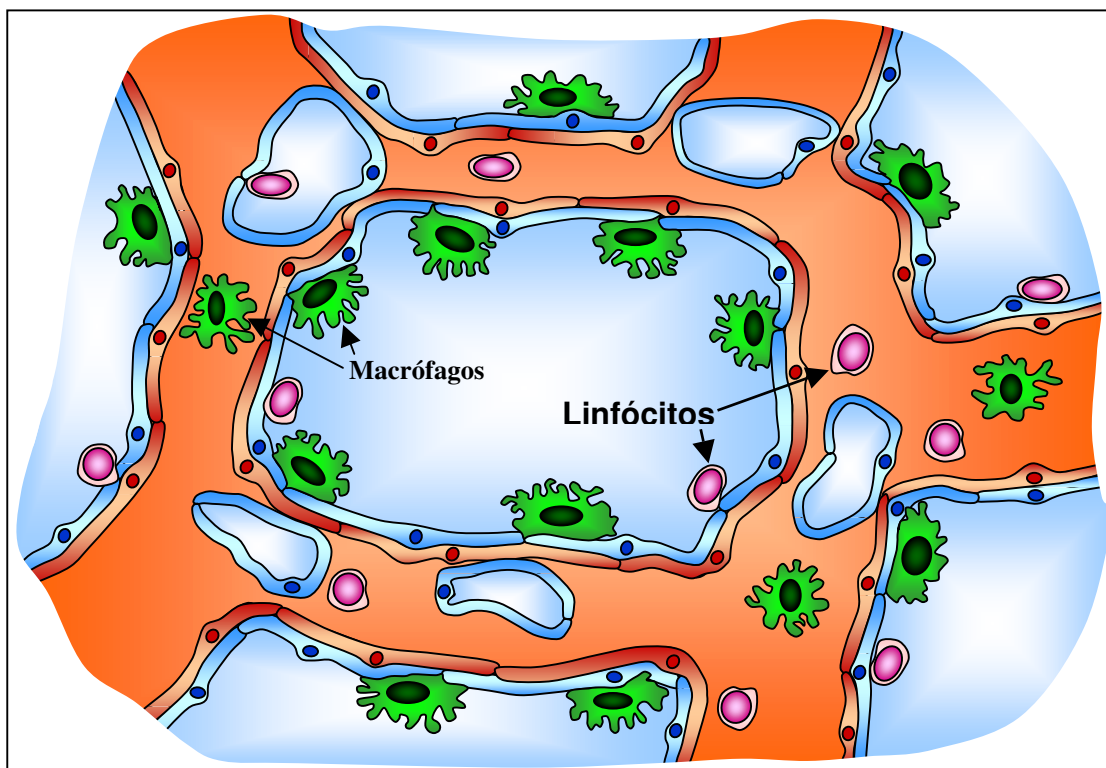


Figura 1. Células inflamatórias e células imunes efetoras nas estruturas alveolares do pulmão normal, onde se localizam na superfície epitelial dos alvéolos e no interstício. Mediadores solúveis que participam das resposta imune inespecífica e específica são também encontrados nestes locais. Hunninghake *et al.* Am. J. Pathol. 97 (1): 149-205.

O lavado broncoalveolar (LBA) representa uma ferramenta clínico-laboratorial de grande valor para o estudo de várias doenças pulmonares, auxiliando no diagnóstico, monitoramento do tratamento e avaliação de cura. A análise do LBA fornece informações a respeito das células e mediadores presentes nas secreções pulmonares (IIDA *et al.*, 1997) (figura 2). Estima-se que 100 mL de LBA correspondem a uma amostra de 10^6 alvéolos.

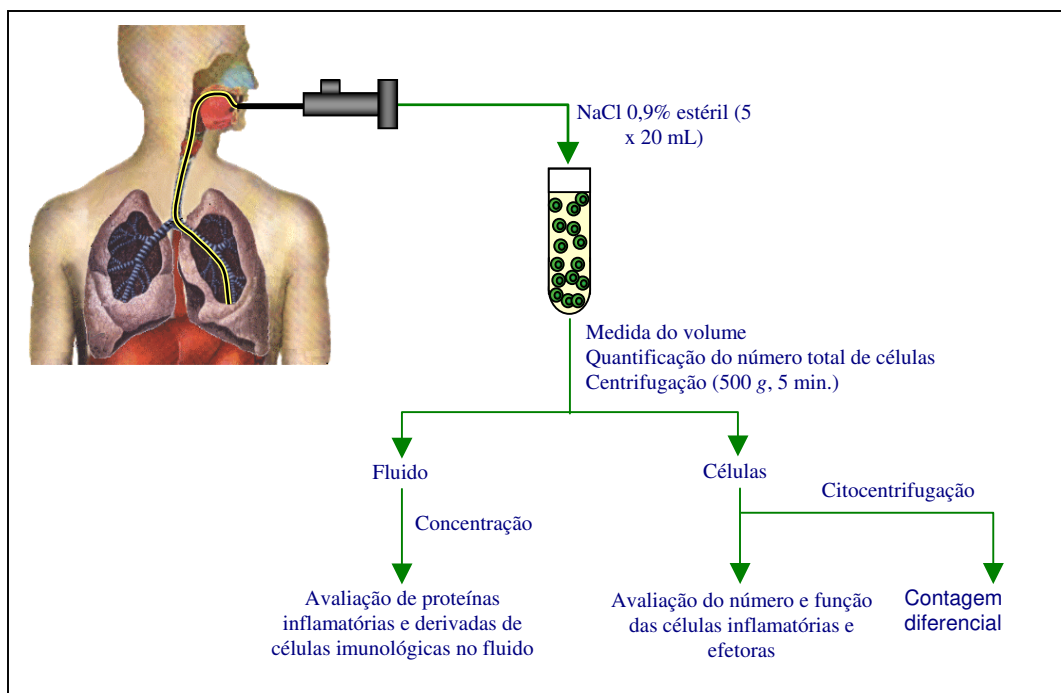


Figura 2. Obtenção de células e mediadores solúveis das estruturas alveolares por meio da lavagem broncoalveolar. Após anestesia local das vias aéreas o broncoscópio é inserido no pulmão. Salina estéril (10 alíquotas de 20 ml) é instilada e recuperada por sucção. O volume do líquido e o número total de células recuperadas são quantificados e as células separadas por centrifugação. Antes da quantificação dos componentes solúveis o sobrenadante é concentrado em membrana de ultrafiltração. As células obtidas são utilizadas para avaliação do número e função. A composição celular do LBA é obtida a partir de preparações em citocentrífuga e coloração com Wright-Giemsa. Hunninghake *et al.* Am. J. Pathol. 97 (1): 149-205.

A composição celular do LBA de indivíduo normal, não fumante é: 85% de macrófagos, 7-12% de linfócitos, 1-2% de PMNs, <1% de eosinófilos/basófilos e 1-5% células ciliadas (HUNNINGHAKE *et al*, 1979, DANIELE *et al*, 1985, REYNOLDS, 1987, ETTENSOHN *et al*, 1988, GOLDSTEIN *et al*, 1990). A população de linfócitos é constituída de 70% de células T e 5-10% de células B.

O estudo do LBA permitiu melhor caracterizar a resposta inflamatória crônica nos pulmões, que pode envolver o predomínio de neutrófilos, como por exemplo, na fibrose pulmonar idiopática ou linfócitos e macrófagos, como na sarcoidose, e até mesmo de eosinófilos nas patologias que envolvem resposta alérgica.

Macrófagos alveolares (MA) são importantes na defesa do hospedeiro contra o *P. brasiliensis*, tendo em vista que os pulmões representam a porta de entrada para o fungo. Na PCM experimental foi observado que conídios inalados são fagocitados por macrófagos alveolares, responsáveis pela apresentação do antígeno e produção de substâncias ativas (CANO *et al*, 1995). Nos pulmões os conídios se transformam rapidamente em leveduras, capazes de se multiplicar livremente no parênquima pulmonar.

Moléculas acessórias contribuem para a regulação da resposta imune influenciando a recirculação de células T do sangue para os tecidos e a apresentação de antígeno. A variação na expressão destas moléculas tanto na célula T (LFA-1, CD2, CD28), como de seus ligantes (ICAM-1, LFA-3, B7-1/B7-2) nas células apresentadoras de antígeno (APCs), pode prejudicar a capacidade da célula T em responder ao antígeno (CANTRELL *et al*, 1996).

Se as moléculas de adesão promovem a migração de células para sítios inflamatórios, a expressão de moléculas do MHC classe II e moléculas co-estimulatórias como B7-1(CD80) e B7-2 (CD86), são essenciais para que os macrófagos possam atuar como APCs. Baixa expressão de moléculas do MHC classe II ou de moléculas co-estimulatórias na superfície das APCs podem prejudicar de forma importante o reconhecimento de antígenos e a resposta imune (MATULONIS *et al*, 1996).

Citocinas imunorreguladoras que determinam o desenvolvimento da resposta Th1/Th2 modulam a expressão das moléculas co-estimulatórias B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) (CREERY *et al*, 1996). A interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-10 (IL-10), características da resposta Th2 induzem a diminuição da expressão de B7-2, enquanto que o interferon gama (IFN- γ), citocina Th1, leva ao aumento da expressão das moléculas B7-1/B7-2 e do MHC classe II. Por outro lado, o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) suprime a expressão do B7-2, mas não altera a expressão do B7-1.

Macrófagos alveolares, assim como macrófagos do trato intestinal, podem se tornar anérgicos pela contínua exposição a antígenos, condição esta relacionada a uma deficiente expressão de B7-1/B7-2 (CHELEN *et al*, 1995, NICOD *et al*, 1997). Entretanto, em doenças como a sarcoidose, macrófagos alveolares são ativados, expressam maior quantidade da molécula B7-2 e têm função APC aumentada (ISRAEL-ASSAYAG *et al*, 1999).

Citocinas tem importante papel na estimulação da fagocitose, sendo o IFN- γ apontado como a principal delas (BRUMMER, HANSON & STEVENS, 1988; CANO, 1995). Nos pulmões, bem como em outros tecidos, a resposta ao *P. brasiliensis* é caracterizada pela formação de granulomas, com participação ativa de células T, que atuam no recrutamento e na ativação dos macrófagos. A formação dos granulomas, se deve a produção do TNF- α em resposta aos componentes da parede do fungo, responsável pela atração e ativação de células efectoras e pelo acúmulo e diferenciação de macrófagos em células epitelióides (FIGUEIREDO, 1993; BRITO & FRANCO, 1994). Os granulomas são basicamente constituídos por macrófagos e linfócitos, localizados na porção central e periférica, respectivamente. Células gigantes, formadas a partir da fusão de macrófagos, são visualizadas com frequência no interior dos granulomas (FRANCO *et al*, 1989).

A fibrose pulmonar é a principal seqüela da PCM. FRANCO *et al* (1998), desenvolveram um modelo experimental de fibrose pulmonar em camundongos infectados por meio da inalação de conídios de *P. brasiliensis* (RESTREPO *et al*, 1992). Nestes animais a fibrose, observada após 8 semanas de infecção, foi associada à formação de granulomas, aumento de hidroxiprolina, TNF- α e TGF- β . Estas citocinas, melhor detectadas no tecido pulmonar do que no LBA, foram associadas à fibrose progressiva observada na infecção (RESTREPO *et al*, 1992; BRETANA *et al*, 1995).

O TNF- α é uma citocina produzida por monócitos/macrófagos ativados por IFN- γ , com atividade citotóxica para células tumorais. A ação imunorreguladora do TNF- α é exercida através da ativação de polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos estimulados por IFN- γ , para os quais atua como um segundo sinal (RUDDLE, 1987). A detecção de níveis elevados de TNF- α no soro de pacientes com PCM foi relatada por SILVA &

FIGUEIREDO, 1991. O TNF- α juntamente com outras citocinas inflamatórias como IL-1 β e IL-6 regula a expressão de moléculas de adesão tanto no endotélio como nos leucócitos.

Trabalhos experimentais utilizando a via intratraqueal de inoculação *do P. brasiliensis* demonstraram que camundongos A/Sn (resistentes) desenvolvem infecção pulmonar crônica benigna, associada a baixos níveis de mortalidade, resposta cutânea de hipersensibilidade do tipo tardio positiva e persistente e produção de anticorpos do tipo IgG2a e IgG3. Em contraste, animais B10.A (suscetíveis) desenvolvem infecção disseminada e progressiva, resultando em altos índices de mortalidade, discreta reação de HTT e produção de anticorpos do tipo IgG2b (CANO *et al*, 1998). O mesmo tipo de polaridade da resposta imune é observada na PCM humana, na qual a forma juvenil, mais grave e disseminada, é associada à resposta Th2, com a produção de citocinas inibidoras da ativação de macrófagos como IL-4, IL-5 e TGF- β (MAMONI *et al*, 2002, OLIVEIRA *et al*, 2002). Por outro lado indivíduos moradores da zona endêmica que entraram em contato com o fungo, mas não desenvolveram a doença, são produtores de IFN- γ , TNF- α e interleucina-12 (IL-12), citocinas Th1 que comprovadamente ativam macrófagos (MAMONI *et al*, 2002, OLIVEIRA *et al*, 2002). Macrófagos ativados atuam na destruição do fungo já nos pulmões, evitando a sua proliferação e disseminação. A forma mais localizada e benigna da doença crônica, muitas vezes com manifestações apenas pulmonares, também pode ser associada a uma resposta Th1 com produção de anticorpos específicos do tipo IgG1 e das citocinas IL-12 e IFN- γ (MAMONI *et al*, 2002, OLIVEIRA *et al*, 2002).

Para que os leucócitos deixem os vasos e migrem para o sítio inflamatório citocinas e quimiocinas modulam a expressão de moléculas de adesão e integrinas, envolvidas na marginação, adesão e posterior diapedese das células. Integrinas do tipo β 2, especialmente CD11a/CD18 (LFA-1) e CD11b/CD18 (Mac-1) são implicadas na migração de leucócitos, apresentação do antígeno, fagocitose e produção de derivados citotóxicos de oxigênio. Níveis elevados de integrinas β 2 CD11/CD18 foram observados em leucócitos do sangue periférico de pacientes com sarcoidose e tuberculose (SHAKOOR & HAMBLIN, 1992; YASSIN & HAMBLIN, 1994). Macrófagos alveolares de pacientes com tuberculose expressam níveis elevados de CD11b/CD18, o que poderia estar relacionado a uma produção aumentada de produtos de oxigênio (KUO *et al*, 1996).

Nos pulmões, o aumento da expressão das moléculas de adesão resulta na ancoragem de neutrófilos, linfócitos e monócitos no endotélio vascular, mas a subsequente migração dessas células para o espaço alveolar requer a presença de citocinas quimiotáticas ou quimiocinas.

Quimiocinas são citocinas que induzem a migração dirigida de subpopulações de leucócitos para os locais de inflamação. As quimiocinas são proteínas estruturalmente relacionadas ou homólogas e podem ser subdivididas em 2 subfamílias principais: α (ou CXC) onde as duas primeiras cisteínas da molécula são separadas por um aminoácido e, β (ou CC), nas quais as duas primeiras cisteínas são adjacentes (ADAMS & LLOYD, 1997). As quimiocinas do tipo α , que contém a sequência ácido glutâmico-leucina-arginina precedendo a sequência CXC, são quimiotáticas para neutrófilos (IL-8) e aquelas que não contém esta sequência atuam sobre linfócitos como a Proteína Inflamatória de Macrófagos α e β (MIP-1 α e MIP-1 β Proteína Quimiotática para Monócitos-1 (MCP-1), RANTES (Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted) e Proteína Indutora de IFN- γ IP-10). A ação das quimiocinas se dá por meio de sua ligação a receptores específicos, presentes na superfície da célula alvo (LUSTER, 1998).

O acúmulo de células T e monócitos nos sítios de inflamação representa o primeiro passo, numa série de eventos, que levam a formação do granuloma. AGOSTINI *et al* (1998) demonstraram que células do LBA de pacientes com sarcoidose, produzem IP-10, que estimula a migração direcional de células T ativadas. Também constataram que existe uma correlação positiva entre níveis de IP-10 e o número de células T CD45RO+ (linfócitos T de memória) presentes no LBA e que estas expressavam RNAm para citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ).

A quimiocina RANTES com ação quimiotática sobre linfócitos T, particularmente do tipo CD45RO+ (linfócitos T de memória) está envolvida na reação inflamatória pulmonar que ocorre na sarcoidose e na alveolite fibrosante (PETREK *et al*, 1997).

As quimiocinas MIP-1 α e MIP-1 β estão envolvidas na expressão de moléculas de adesão e migração de células inflamatórias para os pulmões. Em ensaios *in vitro* MIP-1 α atrai predominantemente células T CD8+ enquanto MIP-1 β é mais direcionado para células

T CD4⁺ (TAUB *et al*, 1993, SCHALL *et al*, 1993) . Outros alvos celulares para MIP-1 α inclui células dendríticas, células NK, basófilos e eosinófilos.

Estudos de SHANLEY *et al*, (1995), demonstraram que o MIP-1 α induz a produção de TNF- α por macrófagos alveolares, aumentando a inflamação nos pulmões. O aumento da secreção de β quimiocinas e das citocinas inflamatórias como: TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzem o aumento da expressão das moléculas de adesão (ICAM-1, CD11b, CD18) na superfície das células endotélio pulmonar e dos PMN (KOCK *et al*, 1994; SHANLEY *et al*, 1995).

OMOIKE *et al*, (2000), observaram níveis elevados do MIP-1 α no LBA de indivíduos com sarcoidose. O aumento do MIP-1 α no espaço alveolar durante os processos inflamatórios promove o acúmulo de linfócitos T CD8⁺ (KADOTA *et al*, 2001).

Em sua tese de doutorado, SOUTO (2001) verificou que células pulmonares e esplênicas de camundongos produzem diferentes quimiocinas durante a infecção por *P. brasiliensis*, com alta expressão de CXCR3 e CCR5, RANTES, Mig e IP-10, sugerindo uma resposta protetora do tipo Th1. Entretanto, não existem trabalhos sobre a produção desses mediadores na PCM humana.

A infecção experimental por meio da inoculação intranasal de conídios do fungo, assemelha-se à infecção humana em vários aspectos. Inicialmente ocorre um influxo de PMNs, que muda para infiltrado linfo-histio-plasmocitário, terminando com a formação do granuloma. Foi demonstrado que nos tecidos PMNs tendem a rodear as leveduras e provavelmente as destroem liberando seu conteúdo granular. SILVA *et al*, (1994), sugeriram que durante os estágios iniciais da interação parasita hospedeiro, ocorre uma intensa infiltração de PMNs, que também são visualizados em focos supurativos dos granulomas na fase mais tardia da doença.

Camundongos infectados pela via intra-venosa apresentam, a medida em que a infecção progride, aumento do número total de células no LBA, com predomínio de linfócitos e neutrófilos, assim como aumento na porcentagem de células gigantes nos granulomas (VILANI-MORENO, 1998).

A migração de neutrófilos para o pulmão, contribui para a destruição alveolar e subsequente fibrose pulmonar. Pacientes com fibrose pulmonar idiopática apresentam um aumento no número total de células no LBA, devido à intensa migração de macrófagos e neutrófilos (CARRÉ *et al*, 1991). O processo que controla o influxo das células inflamatórias para o espaço alveolar foi relacionado a IL-8, presente tanto no LBA, como nos macrófagos alveolares. Além disso, CARRÉ *et al* (1991) correlacionaram os níveis de IL-8 ao número de neutrófilos e à gravidade da doença, demonstrando a importância desta quimiocina, na resposta inflamatória pulmonar.

Células T citotóxicas representam um importante mecanismo de defesa pela produção de IFN- γ e atividade citotóxica. Várias evidências indicam a existência de diferentes populações de células T CD8+, de acordo com o padrão de citocinas secretadas. Pacientes com bronquite obstrutiva crônica apresentam frequência aumentada de células T CD8+ produtoras de IL-4 e IL-5 tanto nos pulmões como no sangue periférico, o que levaria a secreção aumentada de muco, infecções pulmonares repetidas e declínio da função pulmonar (MATTOLI *et al*, 1997).

Os pulmões podem ser o local de uma resposta inflamatória compartimentalizada, como na alveolite extrínseca (pulmão de fazendeiro), na qual a doença é restrita a esse órgão. Na sarcoidose, por exemplo, as alterações imunológicas que ocorrem nas vias aéreas e pulmões são opostas às encontradas no sangue periférico. A razão para esta diferença não é bem clara, mas uma hipótese é que quando os pulmões estão envolvidos, parecem atuar como um alvo seletivo para as células inflamatórias agudas (neutrófilos) e crônicas (linfócitos e monócitos), que estão aumentadas tanto no parênquima como no LBA.

Tendo em vista o pequeno número de trabalhos que analisaram a resposta imune local em pacientes com PCM pulmonar, foi nosso objetivo estudar a composição celular, os mediadores inflamatórios e a expressão de moléculas de ativação, adesão e co-estimulação por células do LBA. A composição celular do LBA foi determinada pela análise em lâminas de citospin e as populações de linfócitos CD4 e CD8 quantificadas por citometria de fluxo. A produção de mediadores inflamatórios como as citocinas TNF- α , IL-6, IL-12p40 e as quimiocinas IL-8 e MIP-1 α foi avaliada em sobrenadantes de cultura de

células aderentes do LBA e sangue periférico. Estas células também foram avaliadas quanto a expressão de moléculas HLA-classe II, ICAM-1, CD11b e B7-2. Os mesmos parâmetros foram estudados no LBA e sangue periférico com o intuito de comparar a resposta inflamatória local versus sistêmica na PCM pulmonar.



ARTIGO

EVALUATION OF BRONCHOALVEOLAR CELLS IN PULMONARY PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

Márcia C. Fornazim¹, Alípio Balthazar², Reynaldo Quagliato Jr², Ronei L. Mamoni¹, Concília Garcia¹, Blotta, MHSL^{1*}

1Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

2 Department of Internal Medicine, State University of Campinas (UNICAMP) Medical School, Campinas, SP, Brazil

*Correspondence to Maria Heloisa S. L. Blotta, Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), PO Box 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. Phone/Fax: 55-19-3289-3273. e-mail: heblotta@fcm.unicamp.br

Key words: paracoccidioidomycosis, bronchoalveolar lavage (BAL), MIP-1 α , CD8+ T cells, IL-6, TNF- α

ABSTRACT

To investigate the local immune response we analyzed the cellular infiltrate and cytokine levels in bronchoalveolar lavage (BAL) from patients with pulmonary paracoccidioidomycosis (PCM). The group consisted of 19 patients, with age ranging from 36 to 65 years. The diagnosis was confirmed by demonstration of fungus in the sputum or BAL fluid, in addition to serological tests. Cytospin preparations showed an increased number of lymphocytes and neutrophils in BAL. A higher number of CD8⁺ lymphocytes were observed in BAL as compared to peripheral blood (PB). Alveolar macrophages expressed ~3-fold more MHC class II, ICAM-1 and B7-2 molecules in their surfaces than their circulating counterparts, findings that indicated they had differentiated into activated macrophages into the lungs. Cultured alveolar macrophages produced higher levels of IL-6, TNF- α , and MIP-1 α than peripheral blood monocytes. BAL fluid contained low, but detectable amounts of IL-6, TNF- α and MIP-1 α , and specific antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*, mainly of the IgG2 isotype. As MIP-1 α was shown to selectively attract CD8⁺ T cells and this population is elevated in BAL, our data suggest that, besides macrophages, CD8⁺ T cells might have an important role in the pathogenesis of pulmonary PCM.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The disease involves the lungs, mononuclear-phagocytic system and mucocutaneous areas. The infection is caused by inhalation of airborne propagules of the mycelial phase of the fungus, which reach the lungs, eventually evade the host defenses and disseminate via the bloodstream and/or lymphatics to virtually all parts of the body (1,2). The mycosis occurs more frequently in males (80%), most of them agriculturists. Two main clinical forms of the disease are observed: the acute (juvenile) form and the chronic (adult) form. About 90% of the patients with the adult form present pulmonary involvement (3). The symptoms are nonspecific and include cough, expectoration, shortness of breath, weight loss, fever and anorexia. It has been shown that phagocytes have an important defense role in the natural resistance to *P. brasiliensis*. Inhaled conidia are phagocytosed by alveolar macrophages (AM) that are responsible for antigen presentation to T cells and by secreting active substances (4). Recently a number of cell surface molecules involved in cell adhesion, co-stimulation, motility and migration have been recognized (5, 6). Cytokines and chemokines have been implicated in the pathophysiology and development of pulmonary diseases such as tuberculosis and sarcoidosis. Macrophage inflammatory protein- α (MIP-1 α) is a C-C chemokine induced during inflammation by alveolar macrophages, CD8 T cells, $\gamma\delta$ T cells, NK cells and lung epithelium (7). MIP-1 α is related to the expression of adhesion molecules and the migration of inflammatory cells to the lung. Increased levels of IL-8, MIP-1 α and TNF- α are detected in the supernatants of bronchoalveolar cells from patients with sarcoidosis (8, 9).

Bronchoalveolar lavage (BAL) represents a valuable clinical-laboratory tool for the study of the pathogenesis of pulmonary diseases and comparison with peripheral blood (PB) enables one to identify selectively recruited leukocytes subsets and to assess the influence of the inflammatory microenvironment on their state of activation/differentiation. In this study we investigate the cell populations and cytokine production by AM in comparison with peripheral blood monocytes. Data reported here suggest the involvement of inflammatory cytokines and MIP-1 α in the local accumulation and activation of cells in the lungs of patients with PCM.

MATERIALS AND METHODS

Patients: The group consisted of 19 patients (16 male and 3 female) with age ranging from 36 to 65 years. Diagnosis was confirmed by demonstration of fungus in the sputum, bronchoalveolar lavage fluid (BAL), or biopsy, in addition to serological tests. Tobacco smoking and alcoholism were associated with the disease in almost all cases. The chest X-ray revealed bilateral and diffuse pulmonary infiltrates. The patients were not receiving treatment by the time of the study.

Bronchoalveolar lavage: Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage was performed as describe previously (10). Lavage was performed using 200 ml of saline solution in 25ml aliquots with immediate vacuum aspiration of each aliquot. The fluid was filtered through sterile gauze into 50 ml conical tubes. The tubes were centrifuged at 400 x g for 10 min at 4°C and the pellets were resuspended in 1640-RPMI media (Sigma), followed by Ficoll-Hypaque (Sigma) gradient separations, as previously described (12,13). The resultant supernatant was concentrated 10-fold on a 10,000 molecular weigh cut-off filter (Amicon) under nitrogen. The concentrated supernatant was then divided into 200- 1 aliquots and rapidly frozen at -80°C.

BAL cells analysis: Alveolar macrophages (AM), lymphocytes, neutrophils and eosinophils were differentially counted in a total of 300 cells, according to morphological criteria, in cytocentrifuged smears stained with Wright-Giemsa.

Preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC): PBMCs were isolated from heparinized venous blood by density centrifugation over Ficoll-Hypaque (12,13). After washing three times with PBS, the mononuclear cells were resuspended (2 x 10⁶ cells/ml) in 1640 RPMI supplemented with 10% AB serum, 2% L-glutamin and antibiotics.

Cell cultures: BAL cells and PBMC were separately incubated for 90 min in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. The glass nonadherent cells were gently removed. The adherent cells (AM and blood monocytes) were cultivated in 24-well plates over a period of 18 h in the presence (or absence) of LPS (10 µg/ml, Sigma). This early time point (eighteen hours) was chosen to allow for the analysis of cytokines that were being actively expressed in vivo (media condition) and to reveal the cytokine profile of cells that were

previously activated and differentiated *in vivo* in response to infection with *P. brasiliensis*. Moreover, this short-term stimulation avoids problems of *in vitro* skewing of the cytokine profiles and consumption which can occur with longer culture times.

At the end of the culture period, the supernatants were harvested and immediately frozen at -80°C. The cytokine (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40 and MIP-1 α) levels in the cell culture supernatants and in-house ELISAs using antibodies from R&D Systems measured BAL fluid.

Flow cytometry analysis of BAL cells and PBMC: The commercially available unconjugated mAbs (anti-CD4, anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD54, anti-HLA class II, anti-B7-2) from PharMingen were used. The frequency of BAL cells and PBMCs positive for the above reagents was determined by flow cytometry. FITC anti-mouse IgG (Sigma) represented the second-step reagents. Isotype matched mouse mAbs were used to set the negative control (IgG1, IgG2a, IgG2b, Sigma). To eliminate nonspecific binding, the cells were initially incubated with heat inactivated human AB serum. Cells were score using a FACScan analyzer (Becton Dickinson, Mountain View, CA) and the data were processed using the Macintosh Cell Quest software program (Becton Dickinson).

Statistical analyses: Data are presented as mean $\pm$ SEM unless otherwise noted. Comparison of group data was accomplished using the *t* test or paired *t* test. *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

The cytopsin analysis showed elevated number of lymphocytes ($18.8\% \pm 4.2$) and neutrophils ($5\% \pm 1.3$) in BAL from patients with pulmonary PCM, compared with standard reference values for healthy subjects (10, 11, 12). In these individuals the proportion of CD8 T cells in BAL was higher than in PB (fig. 1) resulting in a decreased CD4/CD8 ratio (BAL: 1.0 ± 0.2 and PB: 2.5 ± 0.3).

Flow cytometric studies were performed to identify surface markers in AM and PBM. The proportion of cells expressing MHC class II, B7-2, ICAM-1 molecules in BAL did not differ significantly from those in PB (Fig. 2A). Considering the fluorescence intensity, however, AM expressed ~3-fold more MHC class II, ICAM-1 and B7-2 in their surfaces than their circulating counterparts, findings that indicated that they had differentiated into activated macrophages into the lungs. On the other hand, PB monocytes expressed ~2-fold more CD11b, than AM.

To evaluate the in vitro production of cytokines, cell-free supernatants were obtained from AM or PBM short-term cultures and tested for the presence of IL-6, TNF- α , MIP-1 α , IL-12p40 and IL-8. The early time point (eighteen hours) was chosen to allow for the analysis of cytokines that were being actively expressed in vivo (media condition) and to reveal the cytokine profile of cells that were previously activated and differentiated in vivo in response to infection with *P. brasiliensis*. Markedly elevated levels of MIP-1 α were found in BAL fluid and AM supernatants as compared with PBM supernatants. Moreover AM also produced more IL-6 and TNF- α than did PBM (fig. 3). The stimulation with LPS resulted in significant increase of MIP-1 α , TNF- α and IL-6 concentration in cultures of both, AM and PBM (data not shown).

The spontaneous production of IL-12p40 was low and not significantly different between BAL and PBM cultures, but after stimulation by LPS, this production was higher in AM (figure 4).

AM and PBM spontaneously produced high amounts of IL-8 (3051 ± 501 vs. 3015 ± 573 pg/ml) and stimulation with LPS resulted in a small increase (data no shown).

BAL fluid from PCM patients contained low, but detectable levels of IL-6, TNF- α and MIP-1 α , and specific antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*, mainly of the IgG2 isotype (data not shown).

DISCUSSION

The analysis of BAL cells from patients with pulmonary PCM showed an increased number of lymphocytes and neutrophils. These data are in accordance with Carvalho et al. (1987) (13) but disagree with Boscardin et al. (1985), who described a neutrophilic alveolitis in six patients with the disease (14).

The expression of HLA class II, B7-2 and ICAM-1 in AM is indicative of a preserved and active macrophage function in patients with PCM. ICAM-1 (CD54) plays an important role in the extravasation of leukocytes and in other cellular functions such as cytotoxicity, phagocytosis, chemotaxis and induction of lymphocyte proliferation. The activation molecule MHC-class II as well as B7-2 are essential for the macrophage-APC function. The expression of activation, co-stimulatory and adhesion molecules is directly influenced by the cytokines present in the milieu where the inflammatory response takes place. In this report we were able to demonstrate that cultured AM spontaneously produced higher levels of IL-6, TNF- α , and MIP-1 α as compared with PBM. BAL fluid from PCM patients also contained detectable levels of IL-6, TNF- α and MIP-1 α . In a previous paper we related the detection of IL-6, TNF- α and MIP-1 α in serum from patients with PCM (15). TNF- has been shown to be a critical mediator of innate immunity against several respiratory pathogens. Its activities include stimulation of neutrophils for enhanced protein release and respiratory burst, and enhancement of neutrophils phagocytic activity and killing. TNF- α is also required for macrophages accumulation and differentiation into epithelioid cells and for the persistence of well-formed granulomas (16), a common finding in lung biopsies of patients with pulmonary PCM. In human (17) and murine (18, 19, 20) PCM, the protective role of TNF- α and IFN- γ was associated to an efficient macrophage response to the infection.

IL-12 is a critical cytokine, which stimulates IFN- γ production and proliferation of activated T cells and NK cells. In sarcoidosis it was demonstrated enhanced production of IL-12 by lung macrophages (21). We found that AM from patients with PCM are able to produce more IL-12 than PBM, indicating a local immune response to the fungus in the lungs.

MIP-1 α is a C-C chemokine induced during inflammation, by alveolar macrophages, T cells, NK cells and lung epithelium. MIP-1 α was shown to promote chemotaxis of lymphocytes selectively recruiting CD8+ T cells (22, 23, 24). Our finding of an increased number of CD8+ in PCM BAL supports the notion that MIP-1 α is important in attracting and stimulating this subpopulation. A protective role for CD8+ T cells was suggested in experimental PCM since its depletion induces a more severe and/or disseminated disease in both, resistant and susceptible mice (25). Cytotoxic CD8+ T cells represent a major defense against pathogens by the production of IFN- γ and cytolytic activity and may be involved in the clearance of *P. brasiliensis* cells. In experimental cryptococcosis it was demonstrated that CD8+ T cells are required for maximal recruitment of CD4+ T cells into the lungs and IFN- γ production, which play a role in macrophage activation and development of a protective Th1 CD4+ T cell (26).

In conclusion our findings suggest that AM are activated within the proinflammatory environment created by the fungus in the lungs of patients with PCM. This activation is demonstrated by the elevated expression of adhesion and co-stimulatory molecule as well as by the ex-vivo production of IL-6, TNF- α and MIP-1 α . The high detection of MIP-1 α in BAL fluid and AM supernatants indicates a potential role of this chemokine in regulating the migration and activation of inflammatory cells, including CD8+Tcells, toward sites of *P. brasiliensis* inflammatory process. Further studies are required to define the role of CD8+ T cells and MIP-1 α in pulmonary PCM.

REFERENCES

1. Franco M. Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1987; 25: 5-18.
2. Mc Ewen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Micol* 1987; 25:165-75.
3. Brummer E, Castaneda E & Restrepo, A . Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 89-117.
4. Cano LE, Arango R, Salazar ME, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. Killing of *P. brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 161-168.
5. Larson S, Springer TA. Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol Rev* 1990; 114: 181-217.
6. Allison JP. CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Current Opinion Immunol* 1994; 6: 414-432.
7. Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 1997; 349: 490-495.
8. Ziegenhagen MW, Schurum S, Zissel G, Zipfel PF, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Increased expression of proinflammatory chemokines in bronchoalveolar lavage cells of patients with progressing idiopathic pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *J Invest Med* 1998; 46 (5): 223-231.
9. Takizawa H, Satoh M, Okazaki H, Matsuzaki G, Suzuki N, Ishui A, Suka M, Okudaira H, Morita Y, Ito K. Increased IL-6 and IL-8 in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) from patients with sarcoidosis: correlation with the clinical parameters. *Clin Exp Immunol* 1997; 107 (1): 175-181.

10. Goldstein RA, Rohatgi PK, Bergofsky EH, Block ER, Daniele RP, Dantzker DR, Davis GS, Hunninghake GW, King Jr, TE, Metzger WJ, Rankin JA, Reynolds HY, Turino GM. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary diseases. *Am Rev. Respir. Dis.* 1990; 142: 481-486.
11. Ettensohn DB, Jankowski MJ, Duncan PG & Lalor PA. Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. I. Technical aspects and intersubject variability. *Chest* 1988; 94 (2): 275-280.
12. Daniele RP, Elias JA, Epstein PE, Rossman MD. Bronchoalveolar lavage: role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung diseases. *Ann Intern Med* 1985; 102: 93-108.
13. Carvalho CRR, Kairalla RA, Carvalho-Filho RS, et al. O lavado broncoalveolar nas pneumopatias intersticiais pulmonares. *Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo* 1987; 42: 110 -114.
14. Boscardin RN, Brandão H, Balla A. Bronchoalveolar lavage findings in pulmonary paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1985; 23: 143-146.
15. Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHSL. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2002; 40(2):153-9.
16. Shikama, Y, Koabyashi, K, Kasahara, K et al. Granuloma formation by artificial macroparticles in vitro: macrophages and monokines play a critical role in granuloma formation. *Am J Pathol* 1989; 134: 1189 -1199.
17. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microb Infect* 2002; 4: 139-144.
18. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, André D, Xidieh C, Singer-Vermes LM, Vaz CAC, Burger E, Calich VLG. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 1998; 66 (2): 800-806.

19. Souto JT, Figueiredo, F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA & Silva JS. Interferon - γ and Tumor Necrosis Factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am J Pathol* 2000; 156: 1811-1820.
20. Nascimento FRF, Calich VLG, Rodríguez D, Russo M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essencial for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* 2002; 168: 4593-4600.
21. Shigehara K, Shijubo N, Ohmichi M, Takahashi R, Kon S, Okamura H, Kurimoto M, Hiraga Y, Tatsuno T, Abe S, Sato N. IL-12 and IL-18 are increased and stimulate IFN- γ production in sarcoid lungs. *J Immunol* 2001; 166: 642-649.
22. Serody JS, Burkett SE, Panoskaltsis-Mortari A, Ng-Cashin J, McMahon E, Matsushima GK, Lira SA, Cook DN & Blazar BR. T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 α is critical to the recruitment of CD8+ T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood* 2000; 96 (9): 2973-2980.
23. Schall TJ, Bacon K, Camp RDR, Kaspari JW, Goeddel DV. Human macrophage inflammatory protein- α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 1993; 177: 182.
24. Denis M. Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 164-169.
25. Cano LE, Singer-Vermes LM, Costa T, Mengel JO, Xidieh CF, Arruda C, André DC, Vaz CA, Burger E, Calich VLG. Depletion of CD8 T cells in vitro impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 2000; 68: 352-359.
26. Huffnagle, GB, Lipscomb, MF, Lovchic, JA, Hoag, KA and Street NE. The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. *J Leuk Biol* 1994; 55: 35-42.

LEGENDS TO THE FIGURES:

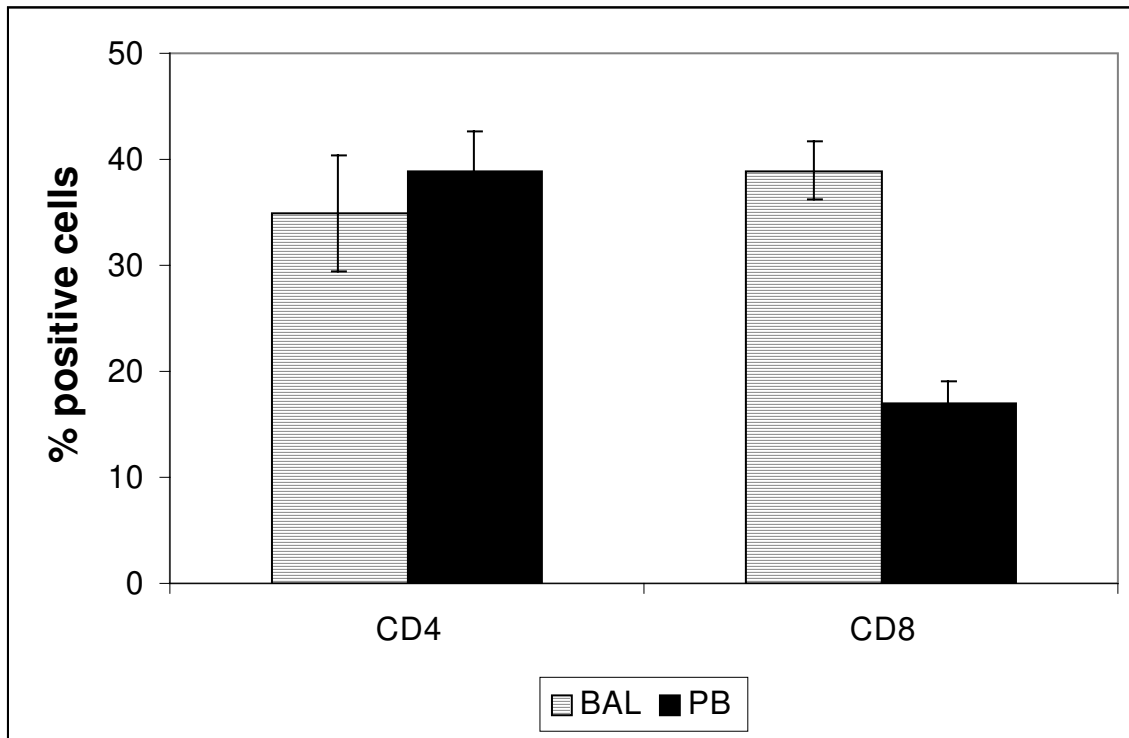
Figure 1: Mean percentage of CD4+ T cells and CD8+ T cells in bronchoalveolar lavage (BAL) and peripheral blood (PB) of patients with pulmonary PCM. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. BAL-CD8+ vs. PB-CD8+, $p < 0.0001$.

Figure 2: Flow cytometric analysis of surface markers of alveolar macrophages (AM) and peripheral blood monocytes from patients with pulmonary PCM. Panel A shows the percentages of positive cells, while the panel B shows mean fluorescence intensities. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$

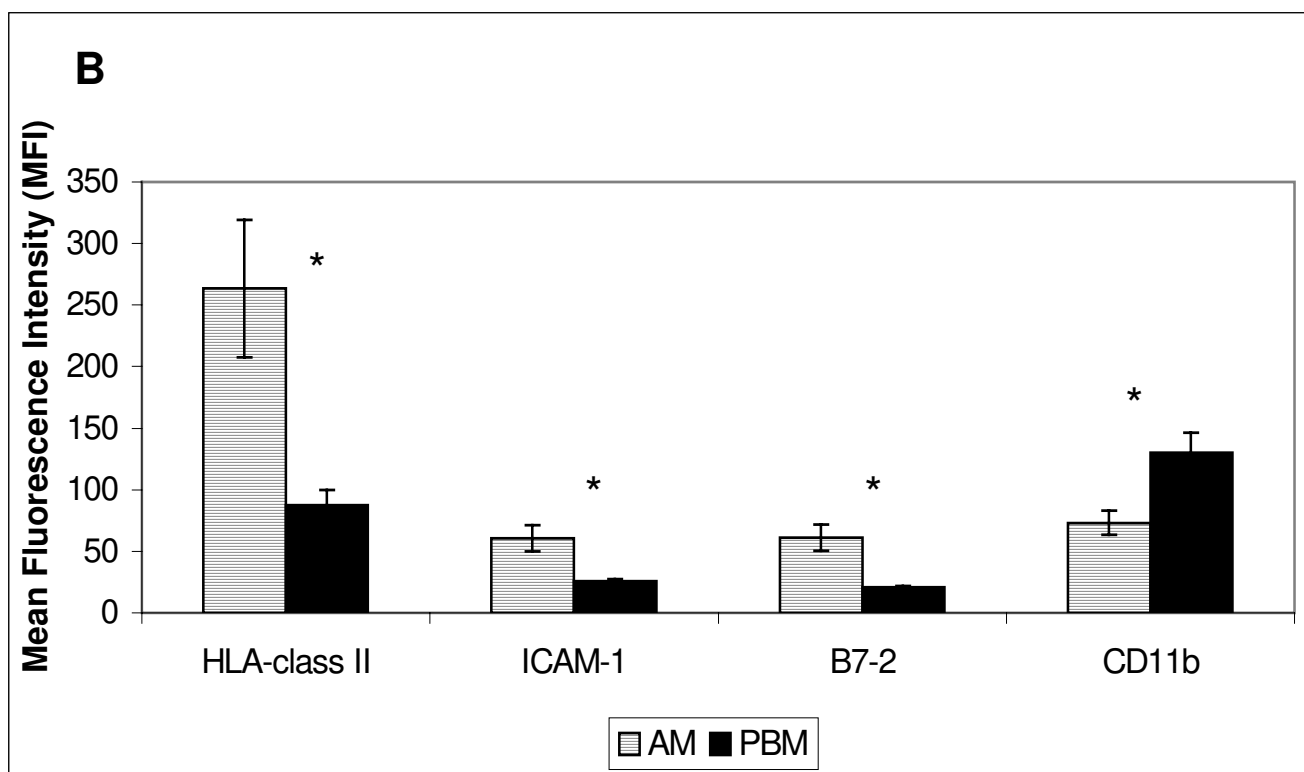
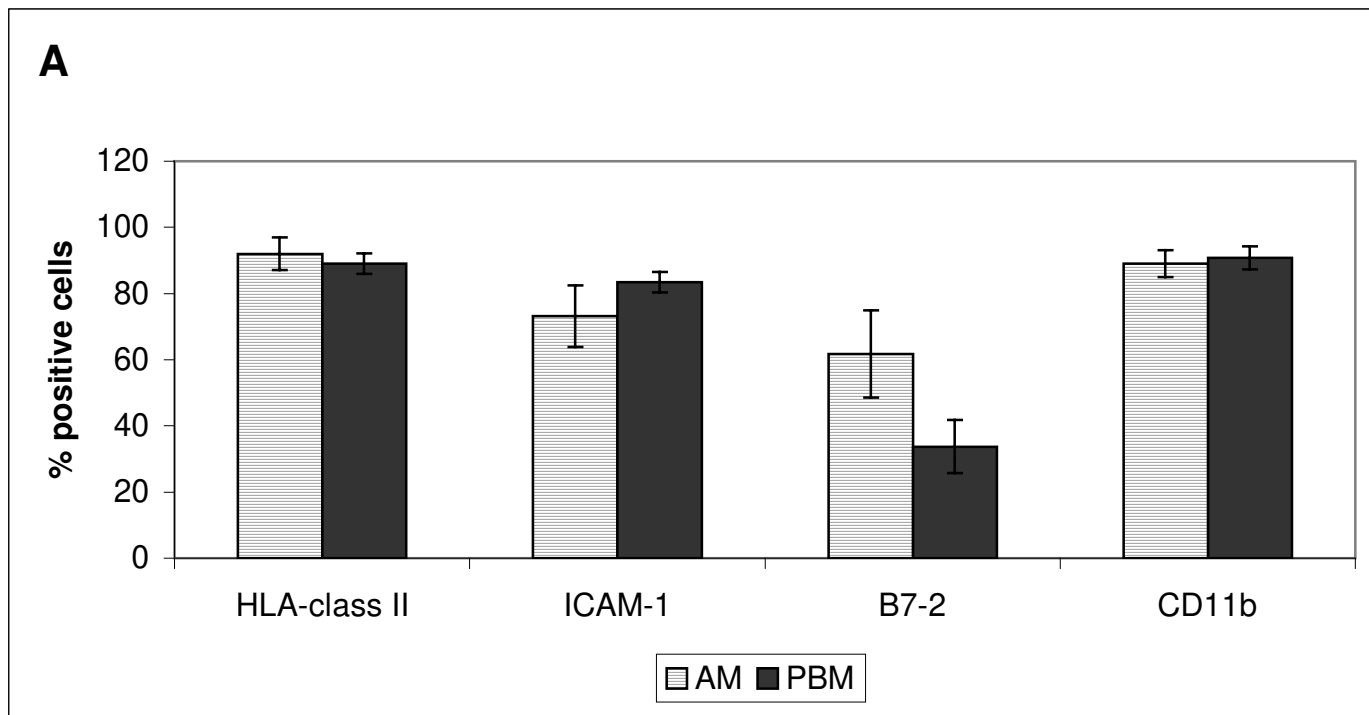
Figure 3: Cytokine production by alveolar macrophages (AM) and peripheral blood monocytes from patients with pulmonary PCM. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$

Figure 4: IL-12p40 production by alveolar macrophages (AM) and peripheral blood monocytes from patients with pulmonary PCM, cultured in medium alone or with LPS. Each line represent one patient. AM vs. AM-LPS, $p < 0.05$

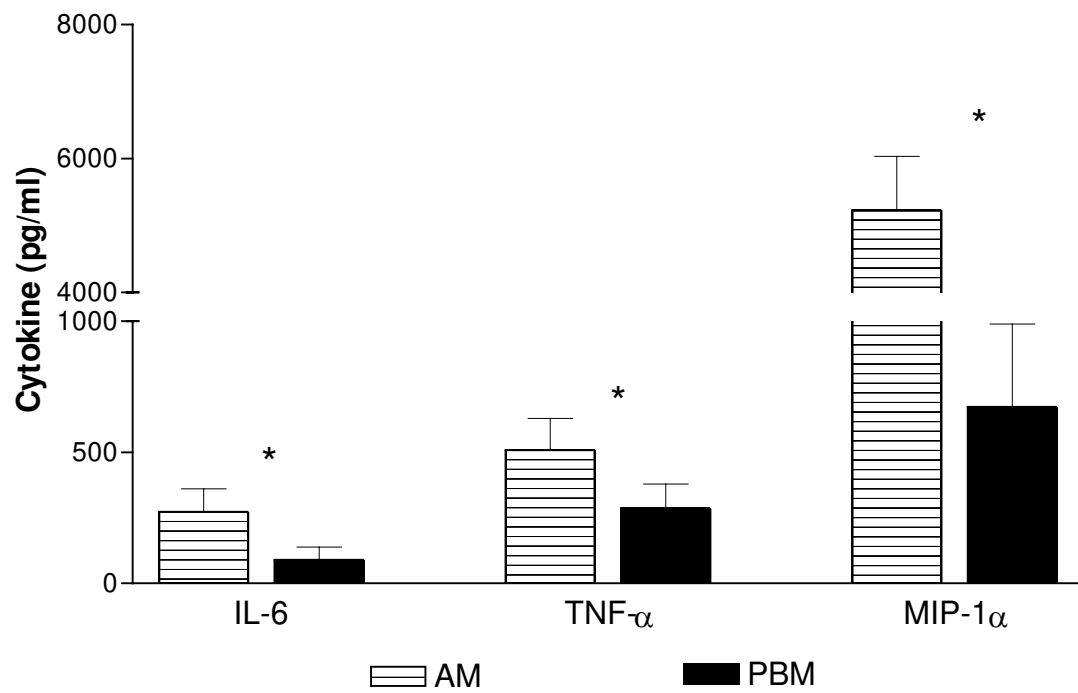
FIGURES



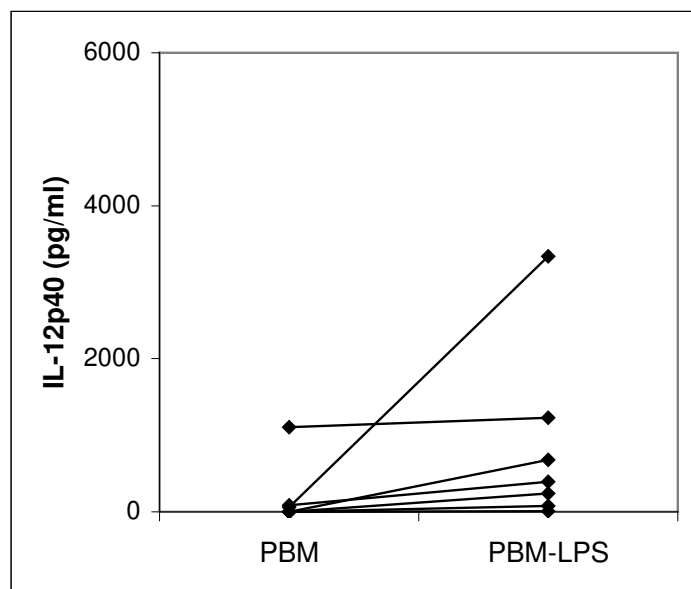
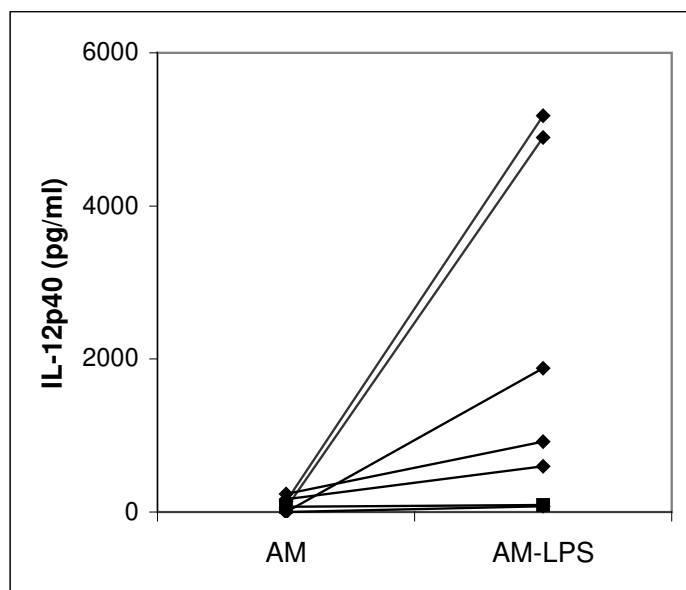
Fornazim *et al.* Fig. 1



Fornazim *et al.* Fig. 2



Fornazim *et al.* Fig. 3



Fornazim *et al.* Fig 4



DISCUSSÃO

Um dos aspectos mais comuns da PCM é o comprometimento pulmonar, que ocorre em aproximadamente 80% dos casos da doença. A reação inflamatória em resposta à presença do *P. brasiliensis* pode levar à destruição do parênquima pulmonar, fibrose e grave restrição da função respiratória.

Em nosso trabalho analisamos o LBA de 19 pacientes com a forma pulmonar da PCM, confirmada pelo achado do fungo em escarro ou no próprio LBA. Em lâminas obtidas em citocentrífuga foram observadas leveduras de *P. brasiliensis* isoladas ou no interior de macrófagos alveolares em 8 dos casos estudados (apêndice, fig. 3).

Os poucos trabalhos que estudaram o LBA de pacientes com PCM pulmonar apresentam resultados controversos. BOSCARDIN *et al.* (1985) analisaram 6 pacientes com a doença e encontraram importante aumento do número de neutrófilos (57 a 95%) no LBA. Já CARVALHO *et al.* (1987) avaliando o LBA de pacientes com diferentes doenças intersticiais pulmonares, classificaram a sarcoidose e PCM como patologias caracterizadas por alveolite linfocitária. Em nosso estudo encontramos um aumento do número de linfócitos ($18.8\% \pm 4.2$) e neutrófilos ($5\% \pm 1.3$), quando comparado aos valores de referências para indivíduos normais saudáveis (apêndice, tabela 3).

Em trabalhos experimentais nos quais camundongos foram inoculados com *P. brasiliensis* pela via endovenosa, foi observado que o número de linfócitos e neutrófilos no LBA aumenta a medida em que a infecção progride, assim como a porcentagem de células gigantes e linfócitos T CD4+ e CD8+ (TANI & FRANCO, 1984, FERREIRA, 1993, VILANI-MORENO *et al.*, 1998). Utilizando citometria de fluxo para análise das populações celulares presentes no LBA e sangue periférico (apêndice, fig. 2), verificamos um aumento da porcentagem de células T CD8+ no LBA (Artigo, fig. 1 e apêndice fig.2) e conseqüente diminuição da relação CD4/CD8 ($0,88 \pm 0,3$), em comparação ao descrito para indivíduos normais saudáveis (apêndice, tabela 3) e também em relação ao encontrado no sangue periférico ($1,61 \pm 0,9$). TAPIA *et al.* (1991) descreveram uma diminuição da porcentagem de células T CD4+ tanto no LBA como no sangue periférico de pacientes com PCM pulmonar, com a relação CD4/CD8 por volta de $1,58 \pm 0,31$, similar ao encontrado no sangue periférico.

A análise da expressão de marcadores de superfície celular em monócitos do sangue periférico e em macrófagos alveolares de pacientes com PCM pulmonar demonstrou que a expressão das moléculas HLA-classe II, ICAM-1 e B7-2 estava significativamente aumentada em células do LBA.

O ICAM-1 (CD54) exerce uma importante função no extravasamento e na ativação dos leucócitos estimulando a função citotóxica, fagocítica e quimiotática dos macrófagos. A expressão das moléculas MHC-classe II assim como de B7-2 é essencial para a apresentação do antígeno por macrófagos. Os resultados obtidos sugerem que na PCM os macrófagos alveolares encontram-se ativados e aptos a exercer a função de apresentação de antígenos do fungo para linfócitos T. Em condições normais, macrófagos alveolares não expressam ou expressam pouco B7-1 e B7-2, quando comparados aos monócitos do sangue periférico, justamente por estarem localizados em local de alta estimulação antigênica (CHELEN *et al*, 1994). Além disso a produção de IL-10 nos pulmões, teria uma ação anti-inflamatória, inibindo a secreção de TNF- α e IL-1 β e conseqüentemente a expressão de moléculas de adesão, B7-1 e B7-2 (SHANLEY, VASI & DENENBERG, 1999).

TAPIA *et al*, (1991), observaram que na PCM humana, a proporção de macrófagos alveolares vacuolados é significativamente menor do que em outras doenças respiratórias, e sugeriram que este aspecto poderia indicar uma ativação deficitária destas células. Verificaram também que a porcentagem de macrófagos alveolares que expressam MHC classe II é baixa, o que poderia estar relacionado a uma diminuição da função APC exercida por estas células. Em nosso trabalho não encontramos diferenças significativas quando comparamos o número de células positivas para HLA-classe II, ICAM-1, B7-2 ou CD11b, no LBA ou sangue periférico de pacientes com PCM pulmonar (artigo, figura 2A). Entretanto, diferença marcante foi observada em relação à intensidade média de fluorescência, que avalia o número de moléculas expressas por célula, significativamente maior em macrófagos alveolares, do que em monócitos do sangue periférico, com relação aos marcadores HLA-classe II, ICAM-1 e B7-2 (artigo, fig. 2B).

Diferentemente, a expressão de CD11b (Mac-1) foi menor em macrófagos alveolares. As β -integrinas, especialmente CD11a e CD11b têm importante papel no extravasamento de leucócitos e outras funções celulares como citotoxicidade, fagocitose, quimiotaxia e indução da proliferação de linfócitos (ARNAOUT, 1990). Expressão aumentada de CD11b em macrófagos foi previamente associada à atividade fagocítica elevada (PETTERSON, JOHNSON & OLSEN, 1990). CD11b é encontrado em monócitos, macrófagos, granulócitos e células NK e se liga ao componente do complemento iC3b, ICAM-1, fator X, fibrinogênio e polissacárides. Na tuberculose, a expressão elevada de CD11b foi associada a maior produção de peróxido de hidrogênio em resposta a invasão pela micobactéria (KUO *et al*, 1996). O fato de encontrarmos maior expressão desta molécula em monócitos do sangue periférico poderia ser interpretado como uma condição essencial para que ocorra a migração da periferia para o compartimento pulmonar. Em estudos *in vitro* foi demonstrado que a migração espontânea de monócitos para ao epitélio alveolar é mediada predominantemente pela expressão de CD11b/CD18 e CD47, além da síntese local de β -quimiocinas e TNF- α (ROUSSEAU *et al*, 2000)

A expressão de moléculas de ativação, co-estimulação e adesão é diretamente influenciada pelas citocinas presentes no local, onde a resposta inflamatória está ocorrendo.

Em nosso estudo a avaliação da produção de citocinas em culturas de curta duração (18 horas) demonstrou que macrófagos alveolares dos pacientes com PCM pulmonar encontravam-se ativados a ponto de, mesmo sem estímulo, secretar níveis elevados de IL-6, TNF- α e MIP-1 α , quando comparados a monócitos do sangue periférico. A estimulação com LPS resultou em incremento na produção dessas citocinas, igualando os níveis obtidos pelas duas populações celulares. Em trabalho anterior detectamos níveis elevados de IL-6, TNF- α e MIP-1 α no soro de pacientes com a forma adulta multifocal da PCM (MAMONI *et al*, 2002). Recentemente, ANJOS *et al*. (2002) relataram que monócitos humanos estimulados com fração da parede celular do *P. brasiliensis*, rica em β -glucana, produzem H₂O₂ e altas concentrações de TNF- α , fatores que contribuem para a atividade fungicida dessas células. Uma associação entre a produção de TNF- α e atividade fungicida de macrófagos na PCM experimental foi descrita por vários autores, comprovando a importância dessa citocina na resistência à infecção pelo *P. brasiliensis*

(CANO *et al*, 1998, SOUTO *et al*, 2000, PARISE-FORTES *et al*, 2000, NASCIMENTO *et al*. 2002).

A produção espontânea de IL12p40 por macrófagos alveolares e monócitos do sangue periférico não diferiu significativamente, entretanto em culturas estimuladas com LPS obtivemos maior produção pelas células obtidas no LBA (artigo, figura 4). Estes resultados falam a favor de que no ambiente inflamatório causado pelo *P. brasiliensis* células estão ativadas para produção de IL-12, citocina reguladora da resposta Th1. A IL-12 tem papel central estimulando a produção de IFN- γ e a proliferação de células T e NK ativadas, além de promover a citotoxicidade mediada por células T (MOLLER *et al*, 1996). ROMANO *et al*. (2002) demonstraram que a adição de IL-12 em culturas de células mononucleares de pacientes com PCM aumenta a produção de IFN- γ e quando adicionada em culturas junto com anti-IL-10 aumenta também a resposta de linfoproliferativa frente a antígeno do fungo. Pacientes com sarcoidose e tuberculose apresentam maior número de células expressando RNAm para os receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ da IL-12 (TAHA *et al*, 1999), por células T CD8 (tuberculose) e CD4+ (sarcoidose) mostrando um comprometimento preferencial desses linfócitos para a resposta Th1.

A IL-10 inibe a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , e IL-8 e aumenta a produção do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) por macrófagos alveolares (THOMASSEN, DIVIS & FISHER, 1996). Adicionalmente, foi demonstrado, em modelos animais, que a IL-10 regula a síntese de MIP-1 α e o influxo de neutrófilos para os pulmões (SHANLEY, VASI & DENENBERG, 1999). Com base nestes dados, presumimos que nos pacientes com PCM pulmonar a detecção de níveis elevados de TNF- α , IL-6 e MIP-1 α no LBA e sobrenadante de macrófagos alveolares poderia estar relacionada a uma diminuição da produção local de IL-10. Entretanto, a quantificação desta citocina mostrou a presença de níveis basais em culturas de curta duração não estimuladas e um incremento na produção, após estimulação com LPS, mas sem diferença significativa entre culturas de macrófagos alveolares e de monócitos do sangue periférico (apêndice, fig. 4).

Quanto a IL-8, quimiocina envolvida no recrutamento seletivo de neutrófilos, nossos resultados mostraram alta produção espontânea nas culturas de macrófagos alveolares e de monócitos de sangue periférico (apêndice, fig.5). Foi descrito que a simples aderência de monócitos/macrófagos ao plástico promove tanto a expressão do gene para IL-8 (KASAHARA *et al*, 1991), como a produção da proteína no meio de cultura (SPORN *et al*, 1990). A estimulação com LPS praticamente não alterou os níveis de produção de IL-8, sugerindo que as células já estavam expressando todo o seu potencial de síntese.

O MIP-1 α é uma quimiocina do tipo C-C sintetizada durante a inflamação por macrófagos alveolares, linfócitos T, células NK e células do epitélio pulmonar. MIP-1 α promove a quimiotaxia de linfócitos, recrutando seletivamente linfócitos T CD8+ (TAUB *et al*, 1993; SCHALL *et al*, 1993; DENIS, 1995; SERODY *et al*, 2000). Estudos em camundongos nos quais o gene para MIP-1 α foi inativado mostraram uma demora na resolução de infecções virais associada a uma redução substancial no recrutamento de células T CD8 para os pulmões (COOK *et al*, 1995).

Nossos resultados mostrando um aumento do número de linfócitos T CD8+ no LBA de pacientes com PCM pulmonar e produção aumentada de MIP-1 α , detectada tanto no LBA, como no sobrenadante de macrófagos alveolares, sugerem o envolvimento dessa quimiocina na atração e ativação dos linfócitos T CD8+. Na PCM experimental foi aventado um papel protetor para os linfócitos T CD8+, 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). Linfócitos T citotóxicos (CD8+) representam uma importante linha de defesa contra patógenos intra-celulares devido a produção de IFN- γ e a atividade citotóxica. Estas células poderiam estar envolvidas na resposta imune ao *P. brasiliensis* nos pulmões.

HUFFNAGLE *et al* (1994) demonstraram que na criptococose experimental a presença de linfócitos T CD8+ é necessária tanto para o recrutamento de linfócitos T CD4+ para os pulmões, como para produção de IFN- γ , essencial para a ativação local de macrófagos e para o desenvolvimento de uma resposta protetora do tipo Th1. Na histoplasmose experimental a participação dos linfócitos T CD8+ também foi associada a resposta imune protetora (DEEPE, 1995). Na tuberculose inúmeras evidências têm indicado

importante papel das células T CD8+ na resposta imune à micobactéria. Em camundongos a eliminação de células T CD8+ aumenta a suscetibilidade à doença (SOUSA *et al.*, 2000). Células T CD8+ podem eliminar a infecção por micobactéria lisando as células infectadas (SERBINA *et al.*, 2000), produzindo IFN- γ (SERBINA & FLYNN, 1999; TASCONE *et al.*, 1998) ou por meio da produção de moléculas com atividade antimicrobiana (STENGER *et al.*, 1997, 1998). Na infecção humana, células T CD8+ 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+ produtoras de IFN- γ podem ser detectadas no sangue de indivíduos saudáveis PPD positivos e pessoas vacinadas com BCG (LALVANI *et al.*, 1998, LEWINSOHN *et al.*, 1998).

Tsao *et al.* (2002) observaram que pacientes com tuberculose em estado avançado apresentam maior proporção de linfócitos T CD4+ e menor proporção de células T CD8+, 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+ foi encontrada, sugerindo que ocorre o seqüestro de células T CD4+ nos pulmões na forma grave da doença. Este achado concorda com a nossa idéia de que a presença de número elevado de linfócitos T CD8+ pode representar uma resposta protetora nos pulmões e talvez um mecanismo de contenção da doença.

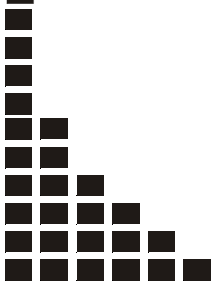
Concluindo, nossos resultados permitem afirmar que na infecção pulmonar pelo *P. brasiliensis* ocorre migração de células inflamatórias (neutrófilos, monócitos) e células imunes (linfócitos) para os pulmões em resposta ao ambiente inflamatório criado pelo fungo, caracterizado pela presença de IL-6, TNF- α e principalmente MIP-1 α . As células recrutadas sob a influência destes mediadores sofrem mudanças fenotípicas e funcionais comprovadas pelo aumento da expressão de moléculas de ativação, adesão e co-estimulação, tornando-se aptas a reconhecer e responder aos antígenos do fungo presentes no local. A elevada produção de MIP-1 α , tanto no LBA como no sobrenadante de culturas de macrófagos alveolares indica um importante papel desse mediador na migração e ativação de células inflamatórias assim como dos linfócitos T CD8+ nos pulmões de pacientes com PCM pulmonar. Estudos estão em andamento para caracterizar o perfil de

produção de citocinas das células T CD8+ obtidas no LBA e assim melhor avaliar o seu papel na doença.



CONCLUSÕES

- ✓ A reação inflamatória presente no pulmão de pacientes com PCM pulmonar é caracterizada por um infiltrado linfocítico, com número aumentado de células T CD8+.
- ✓ Macrófagos alveolares de pacientes com PCM pulmonar expressam níveis mais elevados de moléculas do MHC classe II, B7.2 e ICAM-1(CD54) do que monócitos do sangue periférico.
- ✓ Sobrenadantes de culturas de curta duração de MA de pacientes com PCM pulmonar apresentam níveis mais elevados de IL-6, TNF- α , IL-12 p40 e MIP-1 α , do que sobrenadantes de monócitos do sangue periférico.
- ✓ No LBA de pacientes com PCM pulmonar foi possível detectar IL-6, TNF- α e MIP-1 α , assim como anticorpos específicos anti-gp43 de *P. brasiliensis*, principalmente da classe IgG2.
- ✓ No LBA de pacientes com PCM pulmonar foi possível detectar IL-6, TNF- α e MIP-1 α , assim como anticorpos específicos anti-gp43 de *P. brasiliensis*, principalmente da classe IgG2.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- ADAMS, D.H. & LLOYD, A.R. - Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. **Lancet** **349**: 490-495, 1997.
- AGOSTINI, C.; CASSATELA, M.; ZAMBELLO, R.; TRENTIN, L.; GASPERINI, S.; PERIN, A.; PIAZZA, F.; SIVIERO, M.; FACCO, M.; DZIEFMAN, M.; CHILOSI, M.; QIN, S.; LUSTER, A.D.; SEMENZATO, G. - Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions. **J. Immunol.** **161**: 6413-6420, 1998.
- ANJOS, A.R.; CALVI, S.A.; FERRACINI, R.; PERAÇOLI, M.T.; SILVA, C.L.; SOARES, A.M. – Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. **Med. Mycol.** **40**:377-382, 2002.
- ARNAOUT, M. A. – Structure and function of leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. **Blood** **75**: 1037-1050, 1990.
- BARBOSA, W. & DAHER, R.R. - Blastomicose Sul-Americana (paracoccidioidomicose). In: VERONEZI, R. **Doenças Parasitárias e Infecciosas**. 8º edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1991. Pp. 634-646.
- BOSCARDIN, R.N.; BRANDÃO, H.; BALLA, A. - Bronchoalveolar lavage findings in pulmonary paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, **23**: 143-146, 1985.
- BRETAÑA, A, GOIHMAN-YAHR, M, TAPIA, FJ, ISTÚRIZ, G et al. - Comparative ultrastructure and immunolabeling of MHC-II antigens of alveolar macrophages obtained from patients with paracoccidioidomycosis and other lung diseases. **J. Leukoc. Biol.** **57**: 101-109, 1995.
- BRITO, T. & FRANCO, M.F. - Granulomatous inflammation. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo** **36**:185-192, 1994.
- BRUMMER, C.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. - Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.** **6**(2): 89-117, 1993.
- BRUMMER, E.; HAUSON, L.H.; STEVENS, D.A - INF- γ activation of macrophages for killing of *P.brasiliensis* and evidence of non-oxidative mechanisms. **Int. J. Immunopharmacol.** **10**: 945-952, 1988.

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

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

CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; COSTA, T.; MENGEL, J.O.; XIDIEH, C.F.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.C.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. -Depletion of CD8 T cells in vitro impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.** **68**: 352-359, 2000.

CANTRELL, D. - T cell antigen receptor signal transduction pathways. **Ann. Rev. Immunol.** **14**:259-274, 1996.

CARVALHO, C.R.R.; KAIRALLA, R.A.; FILHO CARVALHO, R.S. - O lavado broncoalveolar nas pneumopatias intersticiais pulmonares. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. S. Paulo** **42**: 110-114, 1987.

CARRÉ, P.C.; MORTENSON, R.L.; KING Jr., T.E.; NOBLE, P.W.; SABLE, C.L.; RICHES, D.W.H. - Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. A potential mechanism for the recruitment and activation of neutrophils in lung fibrosis. **J. Clin. Invest.** **88**: 1802-1810, 1991.

CHELEN, C.J.; FANG, Y.; FREEMAN, G.J.; SECRIST, H.; MARSHALL, J.D.; HWANG, P.T.; FRANKEL, L.R.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D. - Human alveolar macrophages present antigen ineffectively due to defective expression of B7 costimulatory cell surface molecules. **J. Clin. Invest.** **95**: 1415-1421, 1995.

COOK, D.N.; SMITHIES, O.; STRIETER, R. M.; FRELINGER, J. A; SERODY, J.S. - CD8+ T cells are a biologically relevant source of macrophage inflammatory protein-1 α in vivo. **J. Immunol.** **162**:5423-5428, 1999.

- CREERY, W.D.; DIAZ-MITOMA, F.; FILION, L.; KUMAR, A. - Differential modulation of B7.1 and B7.2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. **Eur. J. Immunol.** **26**: 1273-1277, 1996.
- DANIELE, R.P.; ELIAS, J.A.; EPSTEIN, P.E.; ROSSMAN, M.D. - Bronchoalveolar lavage role in the pathogenesis, diagnosis, and management of interstitial lung diseases. **Ann. Intern. Med.** **102**: 93-108, 1985.
- DEEPE, G.S. - Role of CD8+ T cells in host resistance to systemic infection with *Histoplasma capsulatum* in mice. **J. Immunol.** **152**(7): 3491-500, 1994.
- DENIS, M. - Proinflammatory cytokines in hypersensitivity pneumonitis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** **151**(1): 164-169, 1995.
- ETTENSÖHN, D.B.; JANKOWSKI, M.J.; DUNCAN, P.G.; LALOR, P.A. - Bronchoalveolar lavage in the normal volunteer subject. I. Technical aspects and intersubject variability. **Chest** **94**: 275-280, 1988.
- FIGUEIREDO, F.; ALVES, L.M.C. & SILVA, C.L. - Tumor necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clin. Exp. Immunol.** **93**: 189-194, 1993.
- FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACHHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.; MONTENEGRO, M.R. - Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.** **4**: 185-220, 1989.
- FRANCO, L.; NAJVAR, L.; GOMEZ, B.L.; RESTREPO, S.; GRAYBILL, J.R.; RESTREPO, A. - Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **58**: 424-430, 1998.
- GOLDSTEIN, R.A.; ROHATGI, P.K.; BERGOFKY, E.H.; BLOCK, E.R.; DANIELE, R.P.; DANTZKER, D.R.; DAVIS, G.S.; HUNNINGHAKE, G.W.; KING, JR. T.E.; METZGER, W.J.; RANKIN, J.A.; REYNOLDS, H.Y.; TURINO, G.M. - Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary diseases. **Am. Rev. Respir. Dis.** **142**: 481-486, 1990.

- HUFFNAGLE, G.B.; LIPSCOMB, M.F.; LOVCHIC, J.A.; HOAG, K.A. STREET, N.E. - The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. **J. Leuk. Biol.** **55**: 35-42, 1994.
- HUNNINGHAKE, G.W.; GADEK, J.E.; KAWANAMI, O.; FERRANS, V.J.; CRYSTAL, R.G. - Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. **Am. J. Pathol.** **97**: 149-206, 1979.
- IIDA, K.; KADOTA, J.; KAWAKAMI, K.; MATSUBARA, Y.; SHIRAI, R.; KOHNO, S. - Analysis of T cells subsets and β chemokines in with pulmonary sarcoidosis. **Thorax** **52**: 431-437, 1997.
- ISRAEL-ASSAYAG, E.; DAKHAMA, A; LAVIGNE, S.; LAVIOLETTE, M.; CORMIER, Y. - Expression of costimulatory molecules on alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** **159**: 1830-1834, 1999.
- KADOTA, J.; MUKAE, H.; TOMONO, K.; KOHNO, S. - High concentrations of β -chemokines in BAL fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. **Chest** **120**: 602-607, 2001.
- KASAHARA, K.; STRIETER, R.M.; CHENSUE, S.W.; STANDIFORD, T.J.; KUNKEL, S.L. - Mononuclear cell adherence induces neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 gene expression. **J. Leukocyte Biol.** **50**: 287-2095, 1991.
- KOCH, A.E.; KUNKEL, S.L.; HARLOW, L.A.; MAZARAKIS, D.D.; HAINES, G.K.; BURDIK, M.D.; POPE, R.M.; STRIETER, R.M. - Macrophage inflammatory protein-1 α : a novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.** **93**: 921-928. 1994.
- KUO, H.P.; HO, T.C.; WANG, C.H.; YU, C.T.; LIN, H.C. - Increased production of hydrogen peroxidase and expression of CD11b/CD18 on alveolar macrophages in patients with active pulmonary tuberculosis. **Tub. Lung Dis.** **77**: 468-475, 1996.
- LACAZ, C.S. - Paracoccidioidomycose. Micologia Médica. Editora Savier, 8º edição. Capítulo 10:248-297, 1991.

- LALVANI, A.; BROOKES, R.; WIKINSON, R.; MALIN, A.; PATHAN, A.; ANDERSON, P.; DOCKRELL, H.; PASVOL, G.; HILL, A. - Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8⁺ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **95**: 270-275, 1998.
- LEWINSOHN, D.M.; ALDERSON, M.R.; BRIDEN, A.L.; RIDDELL, S.R.; REED, S.G.; GRABSTEIN, K.H. - Characterization of human CD8⁺ T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen-presenting cells. **J. Exp. Med.** **187**: 1633-1640, 1998.
- LONDERO, A.T. – Paracoccidioidomycose: patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **J. Pneumol.** **12**: 41-57, 1986.
- LUSTER, A. D. - Chemokines chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.** **338**(7): 436-444, 1998.
- MAMONI, R.L.; NOUER, S.A.; OLIVEIRA, S.J.; MUSATTI, C.C.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. - Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.** **40**(2):153-159, 2002.
- MATTOLI, S.; KLEIMBERG, J.; STACEY, M.A.; BELLINI, A.; SUN, G.; MARINI, M. - The role of CD8⁺ Th2 lymphocytes in the development of smoking-related lung damage. **Bioch. Bioph. Res. Commun.** **239**: 146-149, 1997.
- MATULONIS, V.; DOSIOU, C.; FREEMAN, G.; LAMONT, C.; MAUCH, P.; NADLER, L.M.; GRIFFIN, J.D. - B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct. **J. Immunol.** **156**(3): 1126-1131, 1996.
- MOLLER, D.R.; FORMAN, J.D.; LIU, M.C.; NOBLE, P.W.; GREENLEE, B.M.; VYAS, P.; HOLDEN, D.A.; FORRESTER, J.M.; LAZARUS, A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; KARP, C. - Enhanced expression of IL-12 associated with Th1 cytokine profiles in active pulmonary sarcoidosis. **J. Immunol.** **156**: 4952-4960, 1996.

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

NICOD, L.P. & ISLER, P. – Alveolar macrophages in sarcoidosis coexpress high levels of CD86 (B7.2), CD40, and CD30L. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** **17**:91-96, 1997.

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

OMOIKE, O.I.; TEAGUE, B.M.; BENEDICT, S.H.; CHAN, M.A. - MIP-1 α induces binding of nuclear factors to the κ B DNA element in human B cells. **Mol. Cell Biol. Res. Commun.** **4**: 15-19, 2000.

PARISE-FORTES, M.R.; da SILVA, M.F.; SUGIZAKI, M.F.; DEFAVERI, J.; MONTENEGRO, M.R.; SOARES, A.M.; PERAÇOLI, M.T. - Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. **Med. Mycol.** **38(1)**: 51-60, 2000.

PETTERSON, H.B.; JOHNSON, E. & ONSSEN, S.S. - Phagocytosis of agarose beads by receptors for C3b (CR1) and iC3b (CR3) on alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. **Scand. J. immunol.** **32**:669-677, 1990.

PETREK, M.; PANTELIDIS, P.; SOUTHCOTT, A.M.; LYMPANY, P.; SAFRANEK, P.; BLACK, C.M.; KOLEK, V.; WEIGL, E.; duBOIS, R.M. - The source and role of RANTES in interstitial lung disease. **Europ. Respir. J.** **10**: 1207-1216, 1997.

QUAGLIATO, R.; REZENDE, S.M.; ZAMBON, L.; ZANARDI, V.; MENEZES, J.R. - Tomografia computadorizada de tórax de alta resolução em paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). **Rev. Bras. Med.** **56**: 239-246, 1999.

- RESTREPO, A.M.E; SALAZAR, L.E.; CANO, E.P.; STOVER, D. F.; STEVENS, D.A. - Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.** **46**: 346-353, 1984.
- RESTREPO, A. - Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. **Curr. Top. Med. Mycol.** **2**: 239-277, 1988.
- RESTREPO, S.; TOBON, A.; TRUJILLO, J.; RESTREPO, A. - Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **J. Med. Vet. Mycol.** **30**:173-184, 1992.
- REYNOLDS, H. - Bronchoalveolar lavage. **Am. Rev. Respir. Dis.** **135**: 250-263, 1987.
- ROMANO, C.C; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S.; BENARD, G. - IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine** **18 (3)**: 149-157, 2002.
- ROSSEAU, S.; SELHORST, J.; WIECHMANN, K.; LEISSNER, K.; MAUS, U.; MAYER, K.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; LOHMEYER, J. - Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. **J. Immunol.** **164(1)**: 427-435, 2000.
- RUDDLE, N. H. - Tumor necrosis factor and related cytotoxins. **Immunol. Today.** **8**: 129-130, 1987.
- SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. & STEVENS, D.A. - Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.** **56**: 711-713, 1988.
- SCHALL, T.J.; BACON, K.; CAMP, R.D.R.; KASPARI, J.W.; GOEDDEL, D.V. - Human macrophage inflammatory protein- α (MIP-1 α) and MIP-1 β chemokines attract distinct populations of lymphocytes. **J. Exp. Med.** **177**:182, 1993.
- SERBINA, N.V. & FLYNN, J.L. - Early emergence of CD8⁺ cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Infect. Immun.** **67**: 3980-3988, 1999.

SERBINA, N.V.; LIU, C.C.; SCANGA, C.A.; FLYNN, J.L. - CD8⁺ CTL from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. **J. Immunol.** **165**: 353-363, 2000.

SERODY, J.S.; BURKETT, S.E.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; NG-CASHIN, J.; MCMAHON, E.; MATSUSHIMA, G.K.; LIRA, S.A.; COOK, D.N.; BLAZAR, B.R. - T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 α is critical to the recruitment of CD8⁺ T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. **Blood** **96**: 2973-2980, 2000.

SHAKOOR, Z. & HAMBLIN, A.S. - Increased CD11/CD18 expression on leukocytes of patients with sarcoidosis. **Clin. Exp. Immunol.** **90**: 95-105, 1992.

SHANLEY, T.P.; SCHMAL, H.; FRIEDL, H.P.; JONES, M.L.; WARD, P.A. - Role of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) in acute lung injury in rats. **J. Immunol.** **154**: 4793-4802, 1995.

SHANLEY, T.P.; VASI, N. & DENENBERG, A. - Regulation of chemokine expression by IL-10 in lung inflammation. **Cytokine** **12 (7)**: 1054-1064, 2000.

SILVA, C.L.; ALVES, L.M. & FIGUEIREDO, F. - Involvement of cell wall glucans in the genesis and persistence of the inflammatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology** **140 (Pt 5)**: 1189-1194, 1994.

SILVA, C.L. & FIGUEIREDO, F. - Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. **J. Infect. Dis.** **164**: 1033-1034, 1991.

SOUSA, A.O.; MAZZACCARO, R.J.; RUSSEL, R.G.; LEE, F.K.; TURNER, O.C.; HONG, S.; VAN KAER, L.; BLOOM, B.R. - Relative contribution of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection of tuberculosis infection in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **97**: 4204-4208, 2000.

SOUTO, J.T. - **Participação de quimiocinas na modulação das respostas imune e inflamatória induzida pela infecção por *Paracoccidioides brasiliensis***. Ribeirão Preto, 2001. (tese - doutorado - Universidade de São Paulo).

SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. - Interferon γ and Tumor Necrosis Factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.** **156**: 156: 1811-1820, 2000.

SPORN, S.A.; EIERMAN, D.F.; JOHNSON, C.E.; MORRIS, J.; MARTIN, G.; LADNER, M.; HASKILL, S. - Monocyte adherence results in selective induction of novel genes sharing homology with mediators of inflammation and tissue repair. **J. Immunol.** **144** (11): 4434-4441, 1990.

STENGER, S.; HANSON, D.A.; TEITELBAUM, R.; DEWAN, P.; NIAZI, K.R.; FROELICH, C.J.; GANZ, T.; THOMA-USZYNSKI, S.; MELIAN, A.; BOGDAN, C.; PORCELLI, S.A.; BLOOM, B.R.; KRENSKY, A.M.; MODLIN, R.L. - An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science** **282**: 121-125, 1998.

STENGER, S.; MAZZACCARO, R.J.; UYEMURA, K.; CHO, S.; BARNES, P.F.; ROSAT, J.P.; BRENNER, M.B.; PORCELLI, S.A.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. - Differential effects of cytolytic T cell subsets in intracellular infection. **Science** **276**: 1684-1687, 1997.

STOVER, E.P.; SCHAR, G.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; FELDMAN, D. - Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.** **51**: 199-203, 1986.

TAHA, R.A.; MINSHALL, E.M.; OLIVENSTEIN, R.; IHAKU, D.; WALLAERT, B.; TSICOPOULOS, A.; TONNEL, A.B.; DAMIA, R.; MENZIES D.; HAMID Q.A - Increased expression of IL-12 receptor mRNA in active plmonary tuberculosis and sarcoidosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** **160**: 1119-1123, 1999.

TAN, J.S.; CANADAY, D.H.; BOOM, W.H.; BALAJI, K.N.; SCHWANDER, S.K.; RICH, E.A. - 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.** **159**(1): 190-292, 1997.

TANI, E.M. & FRANCO, M. - Pulmonary cytology in paracoccidioidomycosis. **Acta Cytologica** **28**:571-575, 1984.

TAPIA, F.J.; YAR, M.G.; DITTMAR, G.C.; ALTIERI, E.; GROSS, A.; ISTUNIZ, G.; ROSQUETE, R.; VILORIA, N.; MILLAN, E.A.; CARRASQUERO, M.; BORGES, N.S.; FERNANDEZ, B.P.; ROTHENBERG, A.; ALBORNOZ, M.B.; PEREIRA, J.; GÓMEZ, M.H.; SAN MARTÍN, B.; de ROMÁN, A.; BRETAÑA, A. - Leukocyte immunophenotypes in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis. **Histol. Histopathol.** **6**: 395-402, 1991.

TAUB, D.D; CONLON, K.; LLOYD AR; OPPENHEIM, J.J. & KELVIN D.J. - Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1alpha e MIP-1 beta. **Science** **260 (5106)**: 355-358, 1993.

TERRA, G.M.F.; RIOS-GONÇALVES, A.J.; LONDERO, A.T.; BRAGA, M.P.; OURIVURI, A.L.; MESQUITA, C.C.; MARINHO, J.C.A.; ERVILHA, L.M.; VIEIRA, A.R.M.; DEKER-MADER, S.; DUARTE, D.M.A. - Paracoccidioidomicose em crianças. ABP. **Arq. Bras. Med.** **65**: 8-15, 1991.

TRAVASSOS, L.R.R.G. - Imunologia: *In*: Uma vitória contra os fungos. **Rev. FAPESP** **50**:22-24, 2000.

THOMASSEEN, M.J.; DIVIS, L.T. & FISHER, C.J. - Regulation of human alveolar macrophage inflammatory cytokine production by interleukin-10. **Clin. Immunol. Immunoph.** **80(3)**: 321-324, 1996.

TSAO, T.C.Y.; CHEN, C.; HONG, J.; HSIEH, M.; TSAO, K, LEE, C. – Shifts of T4/T8 T lymphocytes from BAL fluid and peripheral blood by clinical grade in patients with pulmonary tuberculosis. **Chest** **122**: 1285-1291, 2002.

VILANI-MORENO, F.; FECCHIO, D.; IWAMA DE MATOS, M.C.; MOSCARDI-BACCHI, M.; DEFAVERI, J.; FRANCO, M. - Study of pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells, resistant vs. susceptible mice. **Mycopathol.** **141**: 79-81, 1998.

YASSIN, R.J. & HAMBLIN, A.S. - Altered expression of CD11/CD18 on the peripheral blood phagocytes of patients with tuberculosis. **Clin. Exp. Immunol.** **97**: 120-125,



APÊNDICES

Tabela 1: Dados dos pacientes com paracoccidioidomicose pulmonar.

Paciente	Idade	Profissão	Procedência	Forma clínica	Título de anticorpos*
ACO	58	Lavrador	Hortolândia (SP)	Adulta unifocal	1/8
BP	65	Motorista	São Pedro (SP)	Adulta unifocal	1/16
GB	54	Lavrador	Botelhos (MG)	Adulta unifocal	½
HAO	49	Pedreiro	Monte-Mor (MG)	Adulta unifocal	1/16
JBC	44	Caldeireiro	Vargem Grande do Sul (SP)	Adulta unifocal	1/8
PM	49	Gari	Hortolândia (SP)	Adulta multifocal	1/8
RQ	34	Lavrador	Iracemápolis (SP)	Adulta unifocal	1/32
JTF	65	Não informado	Monte Santo (MG)	Adulta multifocal	¼
PMO	45	Pedreiro	Espírito Santo Dourado (MG)	Adulta unifocal	1/16
UMV	40	Minerador	Ouro Fino (MG)	Adulta unifocal	½
LAL	42	Lavrador	Cambira (PR)	Adulta multifocal	1/8
JTT	62	Lavrador	Caconde (SP)	Adulta unifocal	¼
JF	65	Faxineiro	Não informado	Adulta unifocal	¼
SG	52	Lavrador	Pirassununga (SP)	Adulta multifocal	1/64
BJZ	58	Ceramista	São Sebastião da Gramma (SP)	Adulta multifocal	1/8
AMCP	56	Lavrador	Ibitinga (SP)	Adulta unifocal	1/8
NL	43	Ceramista	São José do Rio Pardo (SP)	Adulta unifocal	1/8
CZ	53	Não informado	Lins (SP)	Adulta unifocal	1/8
NNT	50	Pedreiro	Espírito Santo do Pinhal (SP)	Adulta unifocal	1/16
JZ	60	Não informado	Poloni (SP)	Adulta multifocal	¼
DTL	42	Lavrador	Ouro Fino (MG)	Adulta unifocal	¼
CAPS	36	Lavrador	Populina (SP)	Adulta unifocal	¼
JB	46	Motorista	Araruva (SP)	Adulta unifocal	¼
JAF	42	Lavrador	Sumaré (SP)	Adulta multifocal	¼
DVF	45	Pedreiro	Alagoas	Adulta unifocal	¼
JBS	41	Lavrador	Paraná	Adulta multifocal	1/8

* Imunodifusão radial com exoantígeno de *P. brasiliensis*.

Tabela 2: Dados complementares dos pacientes com PCM pulmonar.

Paciente	Tratamento	Perda Peso	Tosse	Dispnéia	Alcoolismo	Tabagismo
ACO	Virgem	Sim	Seca	Sim	Sim	Sim
BP	Virgem	Sim	Seca	Não	Sim	Sim
GB	Recidiva	Sim	Seca	Não	Sim	Sim
HAO	Virgem	Sim	Seca	Não	Sim	Sim
JBC	Virgem	Não	Seca	Não	Sim	Sim
PM	Virgem	Sim	Seca	Não	Sim	Sim
RQ	Virgem	Não	Não	Não	Sim	Sim
JTF	Virgem	Sim	Seca	Sim	Não	Sim
PMO	Virgem	Sim	Seca	Sim	Sim	Sim
UMV	Resistente	Sim	Seca	Sim	Sim	Sim
LAL	Virgem	Sim	Seca	Sim	Não	Sim
JTT	Recidiva	Não	Seca	Sim	Não	Sim
JF	Em trata/o	Sim	Com expectoração	Não	Sim	Sim
SG	Resistente	Sim	Com expectoração	Sim	Sim	Sim
BJZ	Em tratamento	Sim	Com expectoração	Sim	Sim	Sim
AMCP	Recidiva	Sim	Seca	Sim	Não	Sim
NL	Virgem	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
CZ	Recidiva	Sim	Com expectoração	Sim	Não	Sim
NNT	Em tratamento	Sim	Com expectoração	Não	Sim	Sim
JZ	Em tratamento	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
DTL	Seqüela blasto	Não	Não	Sim	Sim	Sim
CAPS	Em tratamento	Sim	Com expectoração	Sim	Não	Não
JB	Em tratamento	Sim	Seca	Sim	Não	Não
JAF	Virgem	Sim	Não	Sim	Não	Sim
DVF	Virgem	Sim	Com expectoração	Sim	Não	Sim
JBS	Virgem	Sim	Com expectoração	Sim	Sim	Sim

Tabela 3: Contagem diferencial (%) de células do LBA em indivíduos normais

Macrófagos	Linfócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Referências
85	7-12	1-2	<1	-	Reynolds, 1987
93 ± 0.5	7.0 ± 1.0	<1	<1	<1	Hunninghake <i>et al.</i> , 1979
84 ± 1.0	11 ± 1.0	<1	<1	<1	Daniele <i>et al.</i> , 1985
95.1 ± 2.9	3.9 ± 2.4	0.7 ± 0.8	0.17 ± 0.9	-	Ettensohn <i>et al.</i> , 1988.
95 ± 3.0	3.5 ± 2.5	1.7 ± 1.6	-	-	Goldstein <i>et al.</i> , 1990..

Tabela 4: Perfil de subclasses de linfócitos de LBA de indivíduos normais

Linfócitos T	LT CD4+	LT CD8+	Linfócitos B	Referências
70	50	30	5-10	Reynolds, H.Y, 1987.
73 ± 4	-	-	8 ± 3	Hunninghake <i>et al.</i> , 1979
62 ± 2	46 ± 3	25 ± 2	5 ± 2	Daniele <i>et al.</i> , 1985

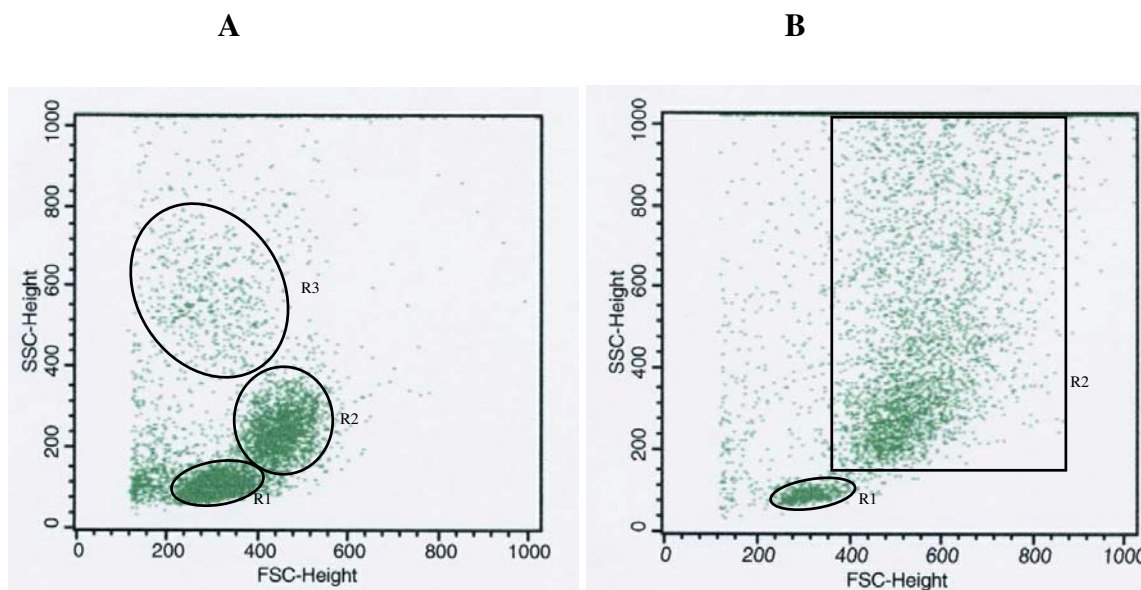


Figura 1: Detecção de populações celulares no sangue periférico (A) e no lavado broncoalveolar (B) de indivíduos normais, por citometria de fluxo. R1 – Linfócitos; R2 – Monócitos/Macrófagos alveolares, R3 – Granulócitos.

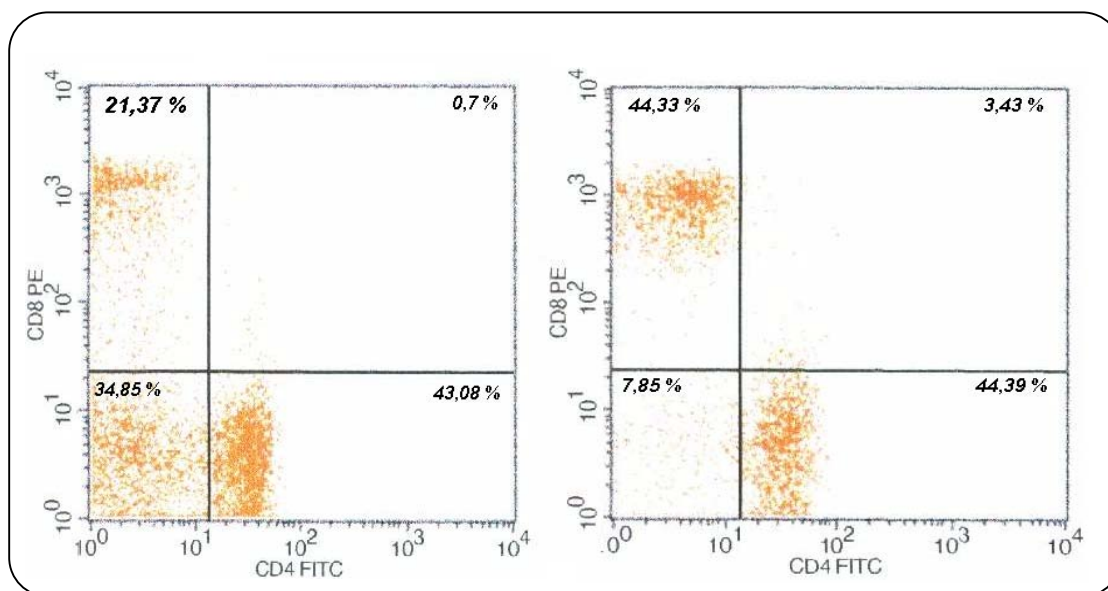


Figura 2: Análise da expressão de CD4 e CD8 em células de sangue periférico (SP) e lavado bronco alveolar (LBA) representativa de um paciente com PCM pulmonar. As células foram coradas com anticorpos anti-CD4 marcado com FITC e anti-CD8 marcado com PE. Os números nos quadrantes indicam a porcentagem de células positivas para cada marcador.

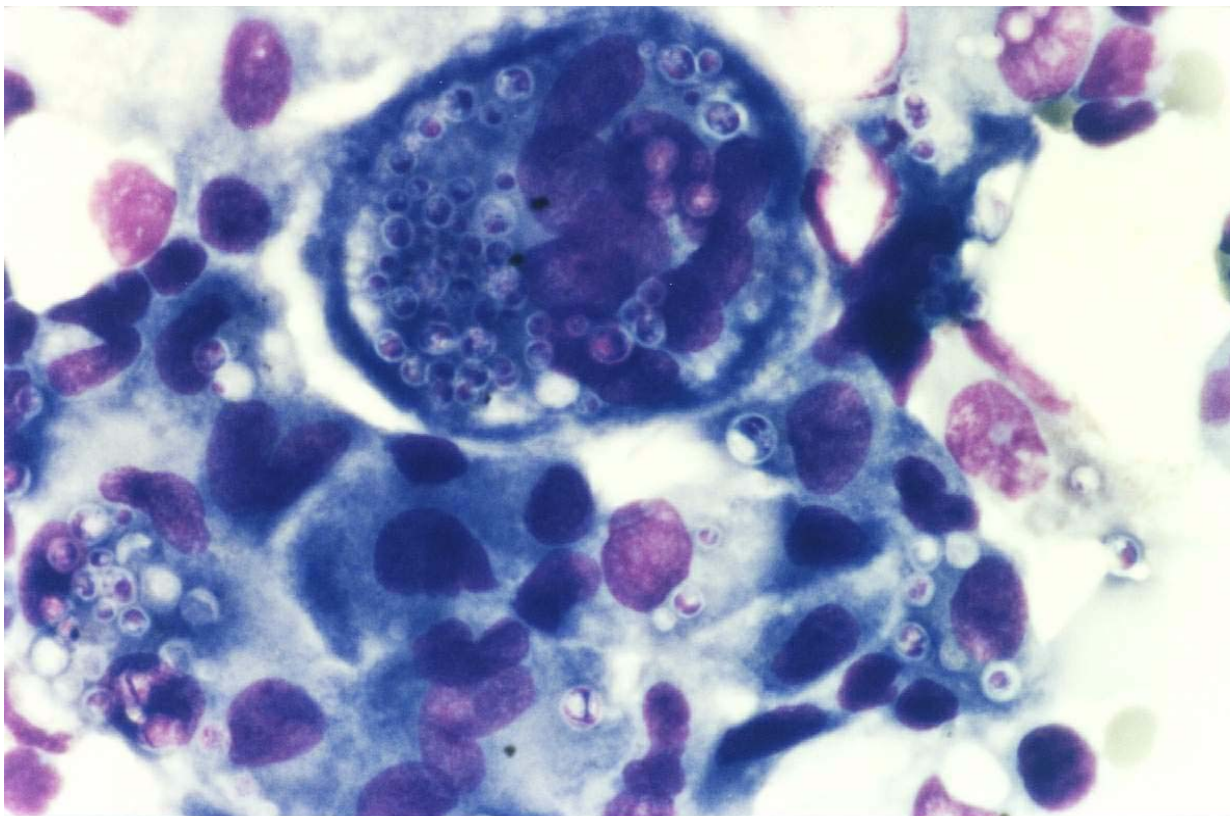


Figura 3: Preparação obtida em citocentrífuga do lavado broncoalveolar de um paciente com PCM pulmonar. Note as inúmeras leveduras de *P. brasiliensis* no interior de macrófagos e a presença de alguns linfócitos.

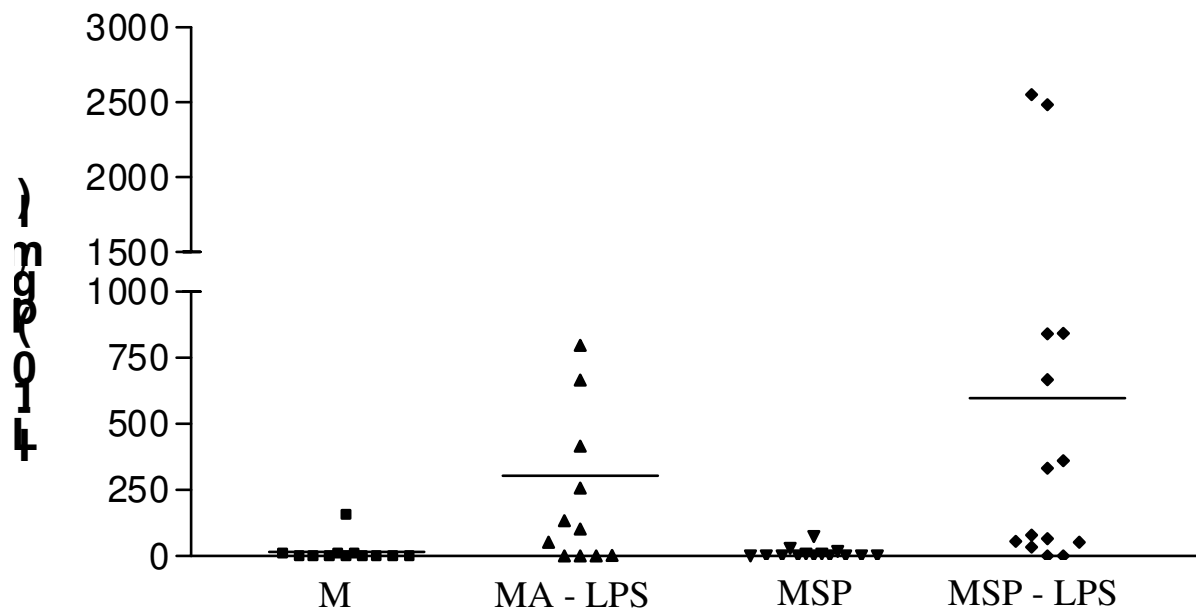


Figura 4: Níveis de IL-10 detectados em culturas de curta duração (18h) de macrófagos alveolares (MA) e monócitos do sangue periférico (MSP) estimulados ou não com LPS. As barras horizontais representam a média.

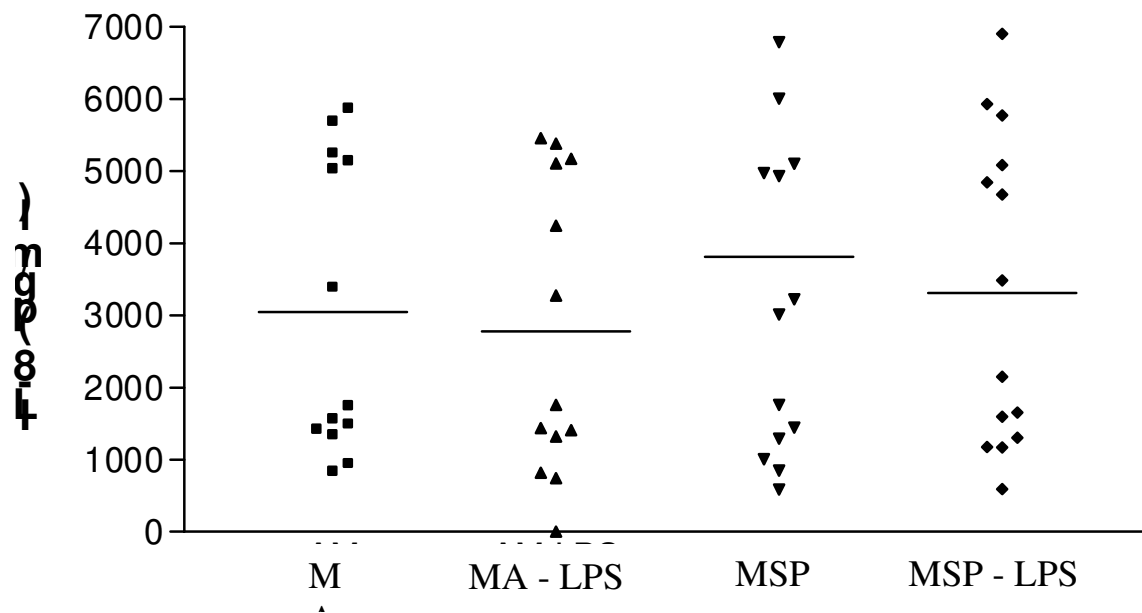


Figura 5: Níveis de IL-8 detectados em culturas de curta duração (18h) de macrófagos alveolares (MA) e monócitos do sangue periférico (MSP) estimulados ou não com LPS. As barras horizontais representam a média.

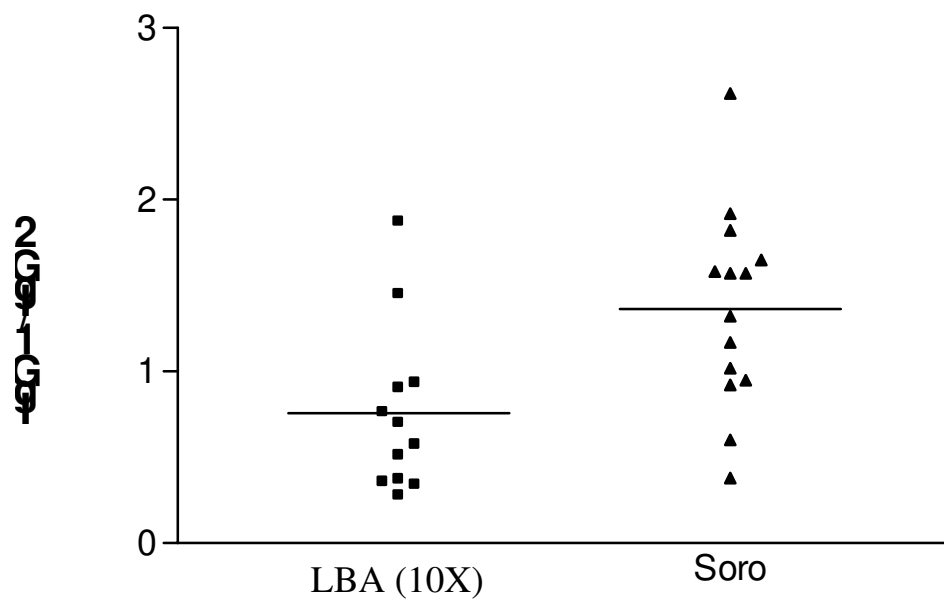


Figura 6: Detecção de IgG1 e IgG2 anti-gp43 de *P. brasiliensis* em LBA (concentrado 10X) e soro de pacientes com PCM pulmonar. Resultados expressos em índice: IgG1/IgG2. As barras horizontais representam a média. LBA (10X) vs. Soro, $p = 0,008$.