

Tânia Machado de Alcântara

**FENOTIPAGEM DAS POPULAÇÕES CELULARES E
DETECÇÃO IN SITU DE CITOCINAS EM BIÓPSIAS
DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu da
Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção do
título de Mestre em Patologia

BOTUCATU
2002

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (Pbmicose) é micose sistêmica, crônica granulomatosa, causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). É endêmica em extensas áreas da América Latina, onde acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, na faixa etária entre 29 e 40 anos (MARQUES *et al.*, 1983). No Brasil, é diagnosticada com maior frequência no estado de São Paulo (WANKE & LONDERO, 1994; LONDERO, 1982).

O Pb é fungo dimórfico de grande complexidade bioquímica e antigênica. A parede celular desempenha importante papel no controle dos mecanismos de patogenicidade desse agente (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1982). É constituída por lipídios, polissacarídeos e proteínas, que estão presentes em proporções variáveis na dependência da virulência da cepa e do dimorfismo térmico do fungo. Em relação aos açúcares, na fase leveduriforme a glicose está estruturada principalmente como α -1,3-glucana (cerca de 95%) e, em pequena proporção, como β -1,3-glucana (cerca de 5%). Na fase micelial, sua quase totalidade está estruturada como β -1,3-glucana, encontrando-se apenas traços de α -1,3-glucana. Quitina é comum a ambas as formas e galactomanana está presente em quantidades relativamente altas na fase micelial e em pequena quantidade na leveduriforme (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1982; KANETSUNA *et al.*, 1972 e 1987; SAN-BLAS *et al.* 1992).

Os fatores que determinam o grau de virulência do Pb ainda não estão completamente estabelecidos. Existem observações demonstrando estreita relação entre maior quantidade de α -1,3-glucana, menor de galatomanana e

maior virulência. A α -1,3-glucana caracteriza-se assim, como um dos fatores de virulência do fungo, atuando como uma camada protetora contra os mecanismos de defesa do hospedeiro, tornando-o resistente à ação dos fagócitos, que não conseguem digerir-la (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1977 e 1982).

A glicoproteína de 43 KDa (gp43) também parece atuar como fator de virulência do Pb. Essa glicoproteína é importante componente antigênico do fungo, sendo detectada na sua superfície, em sobrenadantes de culturas da levedura e no soro de pacientes portadores da doença (BLOTTA & CAMARGO, 1993; STAMBUK *et al.*, 1988; MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989). Induz produção de anticorpos (GIANNINI *et al.*, 1990; BLOTTA & CAMARGO, 1993), reconhecidos por diferentes métodos sorológicos, em virtualmente todos os indivíduos com Pbmicose e também reações de hipersensibilidade tardia (DTH) nos indivíduos infectados (SARAIVA *et al.*, 1996). É protease capaz de hidrolisar colágeno e elastina podendo assim, facilitar a invasão dos tecidos do hospedeiro pelo fungo (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1990). Além disso, VINCENTINI *et al.* (1994) demonstraram que a gp43 funciona como receptor para laminina. Hamsters inoculados, pela via intratesticular, com leveduras do Pb recobertas com laminina, desenvolveram lesões mais extensas e graves em relação aos controles inoculados com fungo não recoberto com laminina. Portanto, a gp43, mediando a interação do fungo com elementos da matriz extracelular, poderia ser um dos fatores responsáveis pela disseminação do mesmo no organismo do hospedeiro.

A penetração do fungo no hospedeiro parece acontecer, mais freqüentemente, pela inalação de conídios ou fragmentos micelianos, que ganham as vias aéreas e chegam até bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares. Nesse local, ocorreria a transformação do fungo para a forma de levedura, instalando-se a infecção. Outra via, menos comum, seria a invasão, em geral traumática, de pele ou mucosa (RESTREPO *et al.*, 1978; RESTREPO, 1985 e 1988a).

Uma vez no organismo, o Pb pode ser imediatamente destruído ou então, persistir e multiplicar produzindo lesão de inoculação, que associada à disseminação para linfonodos regionais constitui o complexo primário. Esta lesão pode evoluir para regressão ou progressão. Na regressão, há cicatrização com destruição do fungo ou persistência deste e formação de foco quiescente. A progressão determina o aparecimento de sintomas e sinais (FRANCO *et al.*, 1987).

A evolução e as conseqüências da infecção vão depender da interação de fatores relacionados ao fungo, como virulência e composição antigênica; ao hospedeiro, como características genéticas e estado imunitário e ao meio ambiente (RESTREPO *et al.*, 1988b; CALICH *et al.*, 1985 e 1987).

Grande parte dos indivíduos infectados não desenvolve a doença, mas positiva os testes cutâneos de hipersensibilidade tardia, o que caracteriza a Pbmicosse-infecção (FRANCO *et al.*, 1987). Estudos epidemiológicos, utilizando o teste cutâneo da paracoccidioidina, revelaram que a infecção é muito mais freqüente que a doença ativa e tem prevalência semelhante em ambos os sexos (RESTREPO, 1988a, b).

A Pbmicose-doença apresenta grande polimorfismo clínico. Comprometimento pulmonar e cutâneo-mucoso predominam, seguindo-se o de outros órgãos como linfonodos, supra-renal, baço, fígado, intestino, ossos, sistema nervoso, etc (RATTO, 1982). É classificada, de acordo com sua história natural e condições clínicas do paciente, nas formas aguda ou subaguda e crônica. A forma aguda ou subaguda, em geral, se desenvolve a partir de lesão primária não detectada; afeta pessoas jovens de ambos os sexos e progride rapidamente com disseminação linfática e hematogênica do fungo para o sistema fagocítico mononuclear envolvendo baço, fígado, linfonodos e medula óssea e levando a deterioração da condição clínica do paciente. Altos títulos séricos de anticorpos específicos e depressão grave da imunidade celular são comumente observados (FRANCO *et al.*, 1987). Visando, principalmente, estabelecer a conduta terapêutica e avaliar o prognóstico, a forma aguda pode ser classificada, segundo a gravidade, em moderada e grave (FRANCO *et al.*, 1987; MENDES, 1996).

A forma crônica é a mais freqüente e se desenvolve a partir do complexo primário ou da reativação de foco quiescente. Progride lentamente, afeta, em geral, indivíduos adultos do sexo masculino com mais de 30 anos de idade e, a maior parte dos casos, tem início nos pulmões. Pode permanecer localizada (forma unifocal) ou sofrer disseminação para outros órgãos ou sistemas (forma multifocal). Apresenta gravidade variável e dependendo dos achados clínicos e das condições gerais do paciente pode ser classificada como leve, moderada ou grave. A resposta humoral específica é variável e a

imunidade celular pode estar preservada ou deprimida (FRANCO *et al.*, 1987; MENDES, 1996).

Na forma crônica leve, os pacientes apresentam bom estado geral e envolvimento pulmonar discreto ou ausente. Comprometimento de vias aerodigestivas superiores, se presente, também é discreto, o mesmo acontecendo com a linfadenopatia, que quando ocorre, está limitada às cadeias do segmento cefálico e é do tipo inflamatório. Não existem evidências clínicas de envolvimento de outros órgãos, aparelhos e sistemas, os níveis séricos de anticorpos específicos são baixos e o teste cutâneo da paracoccidiodina é fortemente positivo (MENDES, 1996).

Na forma crônica grave, há intenso comprometimento do estado geral e extensas lesões pulmonares. As lesões tegumentares normalmente estão presentes e podem ser graves. A linfadenopatia, quando ocorre, não está limitada às cadeias do segmento cefálico e é do tipo tumoral ou supurativo. Pode haver participação de outros órgãos como adrenais, sistema nervoso central, tubo digestivo e ossos; os níveis séricos de anticorpos específicos são elevados e o teste da paracoccidiodina negativo (MENDES, 1996).

Os portadores da forma crônica moderada representam o grupo mais heterogêneo. Há casos que se aproximam da forma leve e podem ser classificados como apresentando a forma crônica leve para moderada. Outros se aproximam da grave e podem ser classificados como portadores da forma moderada para grave. E, finalmente, alguns se mantêm equidistantes dos dois pólos e apresentam assim, a forma moderada (MENDES, 1996).

Característica importante da Pbmicose é a freqüente ocorrência de distúrbios imunorregulatórios. Estes se manifestam em graus variáveis e incluem: depressão da imunidade mediada por células, ativação deficiente de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, ativação policlonal de linfócitos B e, hipergamaglobulinemia com títulos elevados de anticorpos principalmente da classe IgG. A maior gravidade e grau de disseminação da doença correlacionam-se com a imunodepressão e são proporcionais aos níveis de ativação policlonal de linfócitos B e de antigenemia (MOK & GREER, 1977; CHEQUER-BOU-RABIB *et al.*, 1989; MOTA *et al.*, 1985).

Apesar dos mecanismos da depressão imunocelular não terem sido ainda completamente elucidados, citam-se como fatores envolvidos na sua gênese, a atuação de imunocomplexos circulantes, geração de células T supressoras, alterações na relação de linfócitos T $CD4^+$ / $CD8^+$ com redução no número total de linfócitos T devida principalmente à redução de linfócitos T $CD4^+$, efeito supressor de substâncias derivadas do fungo, presença de fatores séricos inibidores e níveis alterados de citocinas como manifestados, por exemplo, pela produção deficiente de interleucina 2 (IL-2) e/ou IL-1 (FRANCO, 1987; MOK & GREER, 1977; MOTA *et al.*, 1988; MUSATTI *et al.*, 1976; JIMENEZ-FINKEL & MURPHY, 1988 e BAVA *et al.*, 1991).

O substrato morfológico da paracoccidioidomicose é caracterizado por reação inflamatória granulomatosa e supurativa. O termo granuloma foi introduzido por Virchow, há cerca de um e meio século atrás, e se traduz, morfolologicamente, por coleção focal, mais ou menos compacta e organizada de fagócitos mononucleares e suas células derivadas, células epitelióides e

células gigantes multinucleadas, acompanhada ou não de elementos acessórios como linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, fibroblastos e necrose. Organização e ativação de fagócitos mononucleares distingue a inflamação granulomatosa de uma inflamação crônica inespecífica (ADAMS, 1976; BOROS, 1978; WILLIAMS & WILLIAMS, 1983).

A inflamação granulomatosa é mecanismo utilizado pelo organismo para seqüestrar e, se possível, destruir agentes irritantes exógenos ou endógenos que se caracterizem por serem persistentes ou de difícil digestão. O Pb induz granulomas que se desenvolvem sob controle imunológico, denominados epitelióides, de hipersensibilidade ou imunes (BRITO & FRANCO, 1994; WARREN, 1976; MARIANO, 1995). Reação de hipersensibilidade tardia, com a participação de linfócitos T sensibilizados, está envolvida na morfogênese e modulação dessas lesões (BRITO & FRANCO, 1994; MIELKE *et al.*, 1997). O granuloma paracoccidióidico é também considerado, com relação à cinética dos fagócitos mononucleares que o constituem, como granuloma de alta rotatividade ou renovação celular, significando que a velocidade de morte e substituição dos fagócitos mononucleares (por recrutamento a partir de células do sangue circulante e, de maneira bem menos importante, por divisão local destes) nessas lesões, é alta (BRITO & FRANCO, 1994; ADAMS & HAMILTON, 1989).

O contato do Pb com o tecido do hospedeiro desencadeia, inicialmente, reação inflamatória congestivo-exsudativa com afluxo predominante de granulócitos neutrófilos. Progressivamente essas células são substituídas por macrófagos, que se dispõem em nódulos frouxos, onde aparecem, de permeio,

células gigantes multinucleadas. Com a evolução do processo, são encontradas células epitelióides e concomitantemente, forma-se halo linfoplasmocitário. Assim o granuloma paracoccidióidico é constituído por arranjo nodular de células epitelióides e células gigantes multinucleadas de tipo Langhans e corpo estranho, muitas contendo fungos. É comum a presença de área central de supuração e de exsudato inflamatório rico em linfócitos, plasmócitos e eosinófilos permeando ou circundando a reação granulomatosa. Também pode estar presente necrose. Fibrose de intensidade variável é vista em geral, circundando o granuloma ou áreas de necrose, que vão sendo progressivamente substituídos por tecido fibroso cicatricial (FRANCO & MONTENEGRO, 1982; IABUK & MONTENEGRO, 1979).

Os componentes da parede celular do fungo parecem ser importantes no desencadeamento dessa resposta inflamatória. Assim, a β -glucana, atua como irritante para fagócitos mononucleares conduzindo-os à ativação e diferenciação (SILVA & FAZIOLI, 1985). FIGUEIREDO *et al.* (1986) observaram que quando a fração F1 da parede celular do Pb, constituída por quitina e β -glucana, foi injetada no subcutâneo de camundongos, induziu acúmulo de macrófagos, diferenciação de células epitelióides e persistência de granulomas bem formados. A β -glucana parece ser o principal responsável por essas ações, já que quitina isoladamente não induz migração leucocitária ou formação de granuloma. SILVA (1985) também demonstrou que lipídios extraídos de leveduras do fungo e adicionados a partículas de carvão induziram intensa reação inflamatória granulomatosa, em torno das partículas, a nível pulmonar, quando estas foram inoculadas, pela via intravenosa, em

camundongos. Triglicerídios e ácidos graxos livres eram as principais frações ativas. Estes dados foram comprovados em trabalho experimental de DEFAVERI *et al.* (1989), no qual, após injeção endovenosa em camundongos de partículas de bentonita adsorvidas com antígeno solúvel bruto do Pb, observaram formação de granuloma ao redor dessas partículas alojadas no pulmão. Documentaram, também, a importância da presença da resposta imune celular na formação do granuloma paracoccidióidico, pois granulomas epitelióides foram observados apenas em animais previamente sensibilizados aos antígenos do fungo e que apresentavam intensa resposta de hipersensibilidade retardada e baixa produção de anticorpos.

A configuração morfológica da reação granulomatosa na Pbmicose pode apresentar dois pólos reacionais. Em indivíduos com resposta imune celular preservada, observam-se granulomas epitelióides compactos, bem definidos, por vezes confluentes, com poucos fungos e infecção benigna localizada. Já indivíduos com comprometimento imunológico apresentam inflamação granulomatosa desorganizada, com grande número de fungos e granulomas frouxos, mal definidos, com exsudação supurativa e áreas de necrose. Ocorre então, proliferação e disseminação do fungo levando a doença generalizada de mau prognóstico (FRANCO & MONTENEGRO, 1982; MOTA *et al.*, 1985; BRITO & FRANCO, 1994).

Alguns pesquisadores têm trabalhado no sentido de tentar correlacionar a microanatomia do processo granulomatoso com a eficiência da resposta montada pelo hospedeiro para combater determinado patógeno. Dentro dessa linha, MODLIN *et al.* (1983 e 1985) estudaram os padrões de distribuição de

diferentes subpopulações de linfócitos T em biópsias de pacientes portadores de hanseníase tuberculóide, hanseníase virchowiana, sarcoidose, rinoscleroma e coccidioidomicose disseminada. Utilizando a técnica de marcação pela imunoperoxidase observaram três padrões de distribuição: (1°) na hanseníase tuberculóide e na sarcoidose, células expressando o fenótipo T auxiliar (CD4⁺) foram encontradas no interior dos agregados de células epitelióides, em íntimo contato com os fagócitos mononucleares, enquanto as células T citotóxicas/supressoras (CD8⁺) estavam restritas ao manto linfocitário que circundava os granulomas; (2°) na hanseníase virchowiana e no rinoscleroma, os linfócitos T auxiliares e citotóxicos/supressores estavam difusamente distribuídos entre os fagócitos mononucleares, sem um manto periférico discernível; (3°) na coccidioidomicose disseminada, os linfócitos T de ambos os fenótipos (auxiliar e supressor/citotóxico) estavam presentes no manto em torno do agregado central de macrófagos. Sugeriram então, que o primeiro padrão refletia arranjo regulador *in situ*, que promovia o isolamento e processamento efetivos do agente patogênico. Ao passo que, o segundo e terceiro padrões representavam perda da capacidade de regulação dos mecanismos responsáveis pela contenção do patógeno.

Em relação à Pbmicose, estudos similares (MOSCARDI-BACCHI, 1988; MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1989) demonstraram que, no granuloma paracoccidióidico, as células T localizam-se no manto e algumas poucas permeiam o agregado central de macrófagos e células epitelióides. A maioria dos linfócitos T expressa o fenótipo auxiliar (CD4⁺) com poucas células supressoras/citotóxicas (CD8⁺). Tal padrão de distribuição das células T, com

nítida predominância do fenótipo auxiliar sugere que estas células estejam ativamente envolvidas neste processo patológico.

Na infecção experimental, induzida em camundongos por via endovenosa, DEFAVERI (1999) mostrou que linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ estavam presentes durante todo o período experimental (até a 12^a semana) no halo linfóide perigranuloma, reforçando a idéia de que ambas as populações são importantes na formação do granuloma paracoccidióidico. Neste sentido, CANO *et al.* (2000), demonstraram que a depleção de linfócitos T $CD8^+$, na Pbmicose murina, induziu doença mais grave e/ou disseminada em animais resistentes (A/Sn) e susceptíveis (B10.A). Nos animais susceptíveis, linfócitos T $CD8^+$ foram importantes para o clareamento da infecção. E, embora sua depleção não alterasse o padrão histológico da resposta granulomatosa, concluíram que linfócitos T $CD8^+$ parecem estar envolvidos na proteção contra a infecção pelo *Pb* e sugeriram, que o padrão genético do hospedeiro é um determinante da intensidade da ativação destes.

Passo importante para a compreensão da resistência contra agentes infecciosos e da morfogênese e modulação da resposta inflamatória granulomatosa foi a descoberta da existência de diferentes padrões de secreção de citocinas por distintas subpopulações de linfócitos T auxiliares $CD4^+$ (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

Como diversos tipos celulares estão envolvidos na inflamação granulomatosa, faz-se necessária a existência de um meio de comunicação entre eles. Essa comunicação é provida por complexa rede de mediadores

moleculares denominados citocinas, que dirigem todas as etapas dessa resposta, da iniciação ao reparo.

Citocinas são moléculas de natureza glicopeptídica, de baixo peso molecular (8-80 KDa), produzidas, em geral, de maneira transitória e altamente regulada por células ativadas. Possuem capacidade de alterar funções das células alvo, atuando em concentrações picomolares, a nível autócrino, parácrino ou endócrino. As populações leucocitárias utilizam-nas como moléculas reguladoras e efetoras na mediação das respostas imunes protetoras naturais e antígeno-específicas. São, freqüentemente, pleiotrópicas e funcionalmente redundantes, o que torna difícil estabelecer a atividade biológica específica e a participação de cada uma delas nos diversos eventos inflamatórios e imunológicos. A síntese e função de muitas citocinas são muito variáveis no decorrer do processo inflamatório, podendo ser inibidas ou estimuladas por outras citocinas, hormônios, neuropeptídeos, neurotransmissores, moduladores de citocinas (antagonistas, receptores solúveis) e interações célula/célula ou célula/matriz extracelular (CHENSUE & WARD, 1996; PAUL & SEDER, 1992; LICINIO, 1997; SPORN, 1997).

Com base nos diferentes padrões de citocinas produzidas, os linfócitos T $CD4^+$ murinos podem ser agrupados em diferentes subtipos: células T auxiliares tipo 1 (Th1) produzem predominantemente interleucina 2 (IL-2), interferon gama ($IFN-\gamma$) e fator de necrose tumoral beta ($TNF-\beta$) e, células Th2 sintetizam IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Os fenótipos Th1 e Th2 parecem representar estágios finais na maturação de linfócitos T auxiliares, com estágio precursor denominado Th0, no qual, são produzidas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e

IFN- γ (MOSMANN & COFFMAN, 1989; CLERICI & SHERER, 1992; COX & LIEW, 1993). Mais recentemente foi identificado o subtipo Th3 produzindo altos níveis de fator transformador do crescimento beta (TGF- β) e quantidades variáveis de IL-4 e IL-10 (CHEN *et al.*, 1994).

IL-2 e IFN- γ atuam na ativação de macrófagos, células NK (“natural killer”) e linfócitos T citotóxicos, produção de anticorpos opsonizantes e fixadores de complemento e reações de hipersensibilidade tardia, e tem sido descrito que a resposta Th1 é a mais eficiente no combate a infecções causadas por parasitas intracelulares (FINKELMAN & URBAN, 1992). IL-4 e IL-5 induzem eosinofilia, produção de imunoglobulina E (IgE) e expansão de mastócitos, relacionando o padrão Th2 com resposta imune efetiva contra infecções por nematódeos (SHER & COLLEY, 1992). Já o padrão Th3 tem efeito imunossupressor em modelos experimentais de tolerância oral e autoimunidade (MILLER *et al.*, 1992; KOURILSKY & TRUFFA-BACHI, 2001).

Células Th1 e Th2 humanas mostram propriedades funcionais comparáveis às células Th1 e Th2 murinas (ROMAGNANI, 1994). Os subtipos Th1 e Th2 parecem se desenvolver a partir de uma mesma célula T precursora (SEDER & PAUL, 1994). Esse linfócito precursor seria um linfócito T CD4⁺ virgem que, após contato com o antígeno, produziria principalmente IL-2. Citocinas atuando sobre esse linfócito precursor induziriam sua diferenciação: IL-12, produzida por macrófagos ativados e células dendríticas, induziria diferenciação Th1 via ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (Stat4); e IL-4, diferenciação Th2 via ativação do Stat6 (MAGRAM *et al.*, 1996; LEDERER *et al.*, 1996). Assim, estímulos imunológicos que ativam

macrófagos ou células dendríticas e induzem produção de IL-12 tendem a iniciar respostas Th1 e, estímulos que não induzem grandes quantidades de IL-12, respostas Th2 (ABBAS *et al.*, 1996). Existem evidências de que, além das citocinas, outros fatores intrínsecos à interação patógeno-célula apresentadora de antígeno (APC) influenciam a diferenciação Th, como a dose ou concentração de antígenos (BRESTCHER *et al.*, 1992) e a atuação de co-estimuladores (LENSCHOW *et al.*, 1996).

As citocinas produzidas pelos subtipos Th1 e Th2 inibem a proliferação e/ou função um do outro. Dessa maneira, IFN- γ , produzido por linfócitos Th1, amplifica o desenvolvimento Th1 e inibe a proliferação de linfócitos Th2 (FITCH *et al.*, 1993). Já, IL-10 produzida por linfócitos Th2, bloqueia a ativação de células Th1 (FIORENTINO *et al.*, 1989).

Em grande número de doenças infecciosas ou parasitárias, o padrão de resposta Th1 está relacionado a proteção e o Th2 a susceptibilidade. Assim, em camundongos infectados com *Leishmania major*, IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) promovem ativação de macrófagos com produção de óxido nítrico (NO) e conseqüente destruição dos amastigotas. Quando os camundongos são tratados com anticorpos anti-IFN- γ ao tempo da infecção, ocorre aumento da produção de IL-4, predomínio de IgE e baixa ativação de macrófagos, resultando em infecção disseminada e fatal (LOKSLEY & SCOTT, 1991).

Observações realizadas na Pbmicoose experimental, utilizando o modelo murino isogênico, sugerem possível explicação para a resistência ou susceptibilidade à doença baseada no tipo de resposta imune predominante,

Th1 ou Th2, montada pelo hospedeiro frente ao Pb. Assim, animais resistentes à infecção por este agente, desviariam a resposta imune para padrão de ativação do tipo Th1 com desenvolvimento e manutenção das reações de hipersensibilidade tardia, ativação eficiente de macrófagos e baixos níveis de produção de anticorpos específicos. Já os animais susceptíveis desenvolveriam padrão de resposta predominantemente do tipo Th2 com ativação deficiente de macrófagos, depressão das reações de hipersensibilidade tardia, produção de altos títulos de anticorpos específicos e ativação policlonal de linfócitos B (MURPHY *et al.*, 1994). De acordo com esta visão, CALICH & KASHINO (1998) sugerem, que no modelo experimental murino isogênico da Pbmicose, resistência à infecção pelo Pb está associada à produção inicial de altos níveis de TNF- α e IFN- γ acompanhada de secreção persistente de IL-2 e IFN- γ , enquanto que susceptibilidade, levando a doença progressiva, se caracteriza por secreção inicial efêmera de baixos níveis de TNF- α e IFN- γ seguida da produção de IL-5, IL-10 e TGF- β .

A atuação das citocinas *in vivo* é regulada em níveis diversos por diferentes mecanismos, muitos deles inespecíficos. IL-10 e TGF- β são exemplos interessantes de regulação por antagonismo de função. Assim, IL-10 inibe a produção de citocinas por parte de linfócitos Th1 e de macrófagos, bem como as funções acessórias dos macrófagos na ativação dos linfócitos T (MOORE *et al.*, 1993). TGF- β apresenta ações que podem antagonizar a função do TNF- α , interferir com a produção de IFN- γ , reduzir a blastogênese dependente de IL-1, antagonizar a indução do receptor de IL-2 e interferir com a proliferação de linfócitos B (WILLIAMS *et al.*, 1996). MORAES *et al.* (1996)

mostraram que na Pbmicose experimental murina, animais susceptíveis produzem níveis mais altos de TGF- β quando comparados aos animais resistentes.

A utilização de diferentes modelos experimentais e estudos da doença humana têm demonstrado a participação ativa de diversas citocinas na morfogenese da resposta granulomatosa. CHENSUE *et al.* (1994) estudando granulomas pulmonares induzidos por esferas de *Sepharose* recobertas com antígenos derivados de *M. tuberculosis* e de ovos do *S. mansoni*, introduzidas por embolização endovenosa em camundongos previamente sensibilizados, concluíram que a reação granulomatosa de tipo hipersensibilidade é resposta heterogênea, influenciada por diferentes citocinas. Sugeriram, então, a classificação dos granulomas em IFN- γ /TNF dominantes (tipo Th1) e IL-4/IL-5 dominantes (tipo Th2), o que permitiria intervenção terapêutica dirigida às citocinas específicas a cada processo.

DEFAVERI (1999), em estudo imuno-histoquímico do granuloma paracoccidióidico na infecção (endovenosa e intratraqueal) murina, observou que TNF- α estava distribuído nos granulomas epitelióides bem formados (infecção endovenosa) ou presente no interior de macrófagos distribuídos difusamente (alveolite macrofágica específica) no interior de alvéolos pulmonares (infecção intratraqueal). Em ambos os padrões lesionais, TNF- α foi detectado ao redor de fungos, com intensidade maior em granulomas maiores, com maior número de fungos, indicando que esta citocina participa de modo importante na formação e regulação do granuloma paracoccidióidico. Células IL-4 positivas foram identificadas desde as fases iniciais de infecção

corroborando a importância da resposta imune humoral na cinética do granuloma. Já células IFN- γ positivas foram identificadas na periferia da lesão, a partir da 4^a semana de infecção e estavam presentes sempre em pequeno número.

CAMPANELLI (1998) analisando a expressão *in situ* de diferentes citocinas em granulomas pulmonares de camundongos C57B1/6 infectados pela via endovenosa com leveduras do Pb, notou predomínio do perfil Th1/Th0 na fase inicial da infecção e do perfil Th2 na fase tardia. Concluiu então, que tanto o padrão Th1 como o Th2 parecem estar envolvidos na formação e modulação da resposta granulomatosa ao Pb.

Em relação à Pbmicose humana, ainda há muito que esclarecer sobre a participação das diversas citocinas na sua patogênese. Mesmo assim, alguns estudos já realizados mostram que, células mononucleares obtidas do sangue periférico de pacientes portadores da doença, quando estimuladas *in vitro* com IL-2, produzem baixas concentrações de IFN- γ e TNF- α (BAVA *et al.*, 1991); além disso, menor número de linfócitos T expressa receptores para IL-2 (RESKALLAH-IWASSO *et al.*, 1989). A redução do número total de linfócitos T CD4⁺ circulantes, observada na doença, parece decorrer, provavelmente, de desequilíbrio na produção de IL-1 e IL-2 (MOTA *et al.*, 1988).

SILVA *et al.* (1995) estudando os níveis de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- α no soro de pacientes com as formas disseminada e crônica da doença e de controles sadios, observaram que as concentrações séricas de IL-1, IL-6 e TNF- α , em pacientes com a forma disseminada, eram significativamente mais altas quando comparadas às dos controles. Não notaram alterações

significativas nas concentrações de IL-4 dos pacientes em relação aos controles e a produção de IL-2 foi substancialmente menor em pacientes com a forma crônica quando comparada com os controles sadios. Sugeriram então, a importância da estrutura somática do Pb na indução da síntese de potentes mediadores da inflamação, como IL-6, TNF- α e IL-1, que seriam capazes de promover ativação policlonal de linfócitos B levando aos distúrbios imunorregulatórios comuns da doença, provavelmente de maneira não dependente de Th2.

FORNARI *et al.* (2001) estudando os níveis séricos de TNF- α , IL-10 e IL-2 em pacientes portadores da forma crônica da paracoccidiodomicose relataram níveis de TNF- α e de IL-10 mais altos e de IL-2 mais baixos em comparação aos observados em indivíduos sadios. Em relação à produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios e portadores das formas aguda e crônica da micose, BERNARD *et al.* (2001) notaram que estimulação pela gp43 levou a secreção de quantidades substanciais de IL-2, IL-10 e INF- γ nos indivíduos sadios e de baixos níveis de IL-2 e INF- γ e níveis significativos de IL-10 em portadores da forma aguda e crônica. Sugeriram então, que o desequilíbrio na produção de citocinas manifestado nas formas aguda e crônica da doença seria importante no desencadeamento da resposta diminuída à gp43 e da alta produção de anticorpos não protetora observadas nos indivíduos doentes.

Existe ainda uma grande lacuna na compreensão dos mecanismos imunorregulatórios operantes na Pbmicose, bem como dos fatores que determinam a resistência à infecção, gravidade e extensão da doença. Um

conhecimento mais sólido desses aspectos passa necessariamente pela caracterização dos perfis de citocinas responsáveis pelas diversas facetas da imunidade celular e humoral observadas durante o curso da moléstia.

2. OBJETIVOS

Estudar em biópsias cutâneo-mucosas e em soros de indivíduos portadores da forma crônica da Pbmicose:

1. A microanatomia do granuloma paracoccidióidico pela caracterização das subpopulações linfocitárias T e B e de suas características morfológicas;
2. A presença *in situ* nas lesões de citocinas de padrão Th1 e Th2;
3. Os níveis séricos de citocinas de padrão Th1 e Th2;
4. Correlacionar esses parâmetros entre si e com os níveis de competência imunológica e gravidade clínica apresentados pelos pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram estudados 27 pacientes portadores de Pbmicoose atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, cujo diagnóstico foi confirmado pela realização de exame anátomo-patológico. Estes apresentaram idades variando entre 22 e 68 anos, sendo que 85,2% estavam na faixa etária compreendida entre 35 e 65 anos, 7,4% tinham menos de 35 anos e 2,4% mais de 65 anos. Vinte e cinco pacientes (92,6%) eram do sexo masculino e dois (7,4%) do sexo feminino. Todos eram portadores da forma crônica multifocal da doença de localização oro-pulmonar em 06 pacientes (22,2%), cutâneo-pulmonar em 10 (37,1%), oro-cutâneo-pulmonar em 09 (33,3%), gânglio-cutâneo-pulmonar em 01 (3,7%) e cutâneo-gânglio-pulmonar-hepato-esplênica em 01 (3,7%). A gravidade clínica variou de moderada em 13 pacientes (50,0%), moderada/grave em 08 (30,8%) a grave em 05 (18,5%) e não avaliada em 01 paciente. A determinação da gravidade clínica foi realizada por facultativo utilizando os parâmetros recomendados por MENDES (1996) e que estão delineados na tabela 01.

A Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu emitiu parecer favorável à realização deste estudo e a inclusão dos pacientes nele esteve vinculada a consentimento prévio dos mesmos.

Material e Métodos

Tabela 01: Classificação da forma crônica da Paracoccidioidomicose segundo a gravidade clínica.

Parâmetros	*GRAVIDADE	
	LEVE (todos os parâmetros)	GRAVE (3 ou mais parâmetros)
Comprometimento pulmonar e/ou tegumentar	Ausente ou presente (leve)	Presente (intenso)
Tipo de linfadenopatia	Inflamatório não supurativo (pescoço)	Tumoral ou supurativo (qualquer localização)
Comprometimento do estado geral e nutritivo	Ausente ou presente (leve)	Intenso
Comprometimento clínico de outros órgãos	Ausente	Presente (por exemplo, supra-renais, SNC, aparelho digestivo, ossos)
Reação intradérmica à paracoccidioidina	Forte	Leve ou negativa
Título de anticorpos séricos em imunodifusão	Baixo	Elevado

* A forma moderada ocupa posição intermediária entre os pólos leve e grave. Os indivíduos apresentando um ou dois dos três critérios necessários para serem considerados portadores da forma grave são classificados como pertencendo à forma moderada grave.

Adaptado de MENDES (1996).

3.2. Coleta de biópsias, sangue e realização do teste cutâneo da paracoccidioidina

Na fase pré-tratamento, foram coletadas biópsias de pele ou mucosa comprometidas pela doença, amostras de sangue venoso e realizado o teste cutâneo da paracoccidioidina para cada paciente.

Vinte e sete espécimes de biópsia por “punch” foram obtidos. Desses, 10 compreenderam lesões de mucosa oral e 17 de pele. Das lesões de pele, 12 eram provenientes da face, 01 de calcâneo, 01 de dorso, 01 da face anterior do tórax, 01 da região glútea e 01 de região não especificada. As de mucosa foram retiradas de lábio, assoalho da boca, bochechas, palato mole, epiglote, língua e gengivas. Todos os espécimes foram fixados em formalina 10% por período de 10 a 18 horas e, posteriormente, desidratados, diafanizados e incluídos em parafina.

Amostras de sangue foram colhidas por punção venosa e colocadas em tubo seco e esterilizado. Após coagulação, o soro foi obtido por centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Alíquotas do soro foram congeladas e estocadas a -70°C para posterior dosagem de anticorpos anti-Pb e de citocinas. O mesmo procedimento foi adotado para a coleta de amostras de sangue de indivíduos sadios pertencentes ao quadro de doadores de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Estes indivíduos apresentavam faixas etárias similares às dos pacientes com paracoccidioidomicose e se constituíram no grupo controle para a dosagem de citocinas.

3.3. Estudo histopatológico

O material incluído em parafina foi seccionado em micrótomo, obtendo-se de cada bloco vários cortes consecutivos de 3 μm , que foram colocados sobre lâmina histológica e corados pelos métodos da Hematoxilina-Eosina (HE) e de Grocott ou reservados para estudo imuno-histoquímico.

Nos cortes corados em HE foram analisadas as alterações do epitélio estratificado que cobria as lesões, as características do infiltrado inflamatório presente no epitélio e na derme/cório, a morfologia dos granulomas e a presença e intensidade de fibrose. Foi realizada também a contagem de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes multinucleadas e plasmócitos.

Nos cortes corados pelo método de Grocott foi realizada a contagem de fungos.

3.3.1. Contagens de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes e plasmócitos e fungos

Para a realização das contagens de elementos celulares do infiltrado inflamatório e dos fungos presentes nas lesões teciduais utilizou-se ocular integradora com gradícula em forma de quadrilátero. Toda a extensão da biópsia foi examinada sob o aumento de 400X e como a área ocupada pela gradícula nesse aumento correspondia a 0,25 mm^2 , a contagem do número de células dentro da gradícula permitiu estimar a densidade celular como número de células/ mm^2 de biópsia (MOSCARDI-BACCHI *et al.*, 1989). Foram

analisados entre 12 e 57 campos, na dependência do tamanho da biópsia. Os campos foram examinados de maneira sistemática, independentemente do seu conteúdo. Como houve grande variação no número de células, de campo para campo, os resultados foram expressos como mediana.

3.4. Estudo imuno-histoquímico das populações linfocitárias

A imunofenotipagem das populações de linfócitos T CD3⁺ e CD8⁺, linfócitos B CD20⁺ e células NK das lesões, foi realizada empregando-se a marcação pela imunoperoxidase segundo o método do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) descrito por HSU *et al.* (1981). Os anticorpos utilizados e suas respectivas diluições estão especificados na tabela 02.

Cortes histológicos dos espécimes de biópsia incluídos em parafina, com espessura aproximada de 3 µm, foram colocados sobre lâminas histológicas previamente tratadas com Silano (SIGMA, Chemical Co., USA) e a seguir desparafinizados em xilol (2 banhos de 20 minutos cada), hidratados em concentrações decrescentes de etanol e lavados em água corrente. Foram então, submetidos ao seguinte tratamento:

1. Resgate antigênico em forno de microondas, à temperatura máxima, durante dois ciclos de 5 minutos, utilizando-se a solução 1 mM EDTA-NaOH pH 8.0 (PILERI *et al.*, 1997).
2. Incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS pH 7.4 (4 banhos de 3 minutos cada) para bloqueio da peroxidase endógena.

Material e Métodos

3. Lavagem em água corrente por 10 minutos.
4. Imersão em tampão PBS pH 7.4 por 5 minutos.
5. Incubação com anticorpo primário diluído em tampão PBS pH 7.4, SBA 1% e azida sódica 0,1% durante 18 horas à temperatura ambiente em câmara úmida.
6. Imersão em tampão PBS pH 7.4 (3 banhos de 3 minutos cada).
7. Incubação com anticorpo secundário biotinilado durante 30 minutos a 37°C.
8. Imersão em tampão PBS pH 7.4 (3 banhos de 3 minutos cada).
9. Incubação com o Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Kit ABC Elite, PK6100, VECTOR) durante 40 minutos a 37°C.
10. Imersão em tampão PBS pH 7.4 (3 banhos de 3 minutos cada).
11. Incubação durante 5 minutos com solução de 3,3 diaminobenzidina (DAB) 0,06% em PBS pH 7.4 à qual foi adicionado 0,3% de peróxido de hidrogênio.
12. Lavagem em água corrente durante 10 minutos.
13. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris seguida de lavagem em água corrente, desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e montagem das lâminas em Entellan.

No controle negativo foram omitidos os anticorpos primários. As células marcadas positivamente apresentaram coloração marrom de padrão membrana e foram contadas utilizando-se a mesma técnica descrita para a contagem de fungos e os resultados expressos como mediana.

Material e Métodos

Tabela 02. Anticorpos primários e secundários utilizados para a imunomarcção das populações linfocitárias em biópsias de pele ou mucosa de pacientes portadores de paracoccidioidomicose e suas respectivas diluições.

Anticorpo	Diluição	Clone	Código	Fabricante
Anticorpo policlonal anticélula T humana, anti-CD3, produzido em coelho	1:5000	-	A0452	DAKO
Anticorpo monoclonal anticélula T CD8	1:15000	C8/144B	M7103	DAKO
Anticorpo monoclonal anticélula B humana, anti-CD20cy	1:800	L26	M0755	DAKO
Anticorpo monoclonal anti-natural killer cell-like humana	1:200	NK1	M1014	DAKO
Anticorpo policlonal biotinilado anti-IgG de camundongo/coelho produzido em cabra	1:800	-	K0492	DAKO
Anticorpo policlonal biotinilado anti-IgM de camundongo produzido em cabra	1:300	-	BA-2020	VECTOR

3.5. Detecção imuno-histoquímica das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α e TGF- β 1

Para a detecção imuno-histoquímica das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α e TGF- β 1 em lesões de pele ou mucosa de pacientes portadores de paracoccidiodomicose também foi utilizado o método do Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC). Os anticorpos empregados estão descritos na tabela 03.

Cortes histológicos, dos espécimes de biópsia incluídos em parafina, com espessura aproximada de 3 μ m foram colocados sobre lâminas histológicas previamente tratadas com Silano (SIGMA, Chemical Co., USA) e a seguir desparafinizados em xilol (2 banhos de 20 minutos cada), hidratados em concentrações decrescentes de etanol e lavados em água corrente. Foram então, submetidos ao seguinte tratamento:

1. Digestão com solução de tripsina 0,4% (SIGMA, Chemical Co., USA) em tampão PBS pH 7.4 a 37°C durante 4 minutos.
2. Incubação com peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS pH 7.4 (8 banhos de 5 minutos cada) para bloqueio da peroxidase endógena.
3. Lavagem em água corrente por 15 minutos.
4. Imersão em tampão PBS pH 7.4 por 5 minutos.
5. Incubação com anticorpo primário diluído em tampão PBS pH 7.4, SBA 1%, azida sódica 0,1% e saponina 0,1% (SIGMA, Chemical Co., USA) durante 24 horas à temperatura ambiente em câmara úmida.
6. Imersão em tampão PBS pH 7.4 (3 banhos de 3 minutos cada).

Material e Métodos

7. Incubação com anticorpo secundário biotinilado diluído em tampão PBS pH 7.4 e saponina 0,1% durante 30 minutos a 37°C.
8. Imersão em tampão PBS pH 7.4 (3 banhos de 3 minutos cada).
9. Incubação com o Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Kit ABC Elite, PK6100, VECTOR) durante 40 minutos a 37°C.
10. Imersão em tampão PBS pH 7.4 (3 banhos de 3 minutos cada).
11. Incubação com solução de 3,3 diaminobenzidina (DAB) 0,06% em PBS pH 7.4 à qual foi adicionada 0,3% de peróxido de hidrogênio, durante 5 minutos.
12. Lavagem em água corrente durante 10 minutos.
13. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris seguida de lavagem em água corrente, desidratação em concentrações crescentes de etanol, diafanização em xilol e montagem das lâminas em Entellan.

Na detecção de IL-10 e TNF- α foram feitas algumas modificações no protocolo descrito acima. Assim no passo 1, em vez da digestão com tripsina foi realizado resgate antigênico em forno de microondas à temperatura máxima durante 20 minutos, em tampão citrato 10mM pH 6.0. E, especificamente, para o TNF- α o passo 9 foi substituído por processo de amplificação catalizada do sinal com o substrato tiramida-peroxidase (WENER *et al.*,1996) realizando-se o seguinte procedimento:

- Incubação com Strepto-ABC (Kit CSA, DAKO) diluído 1:500 em tampão diluente a 37°C durante 15 minutos.
- Lavagem em tampão PBS (3 banhos de 5 minutos cada).

Material e Métodos

- Incubação com Biotinil-Tiramida (Kit CSA, DAKO) a 37°C durante 5 minutos.
- Lavagem em tampão PBS (3 banhos de 5 minutos cada).
- Incubação com Strepto-Peroxidase (Kit CSA, DAKO) a 37°C durante minutos.

O restante da sequência foi mantido.

No controle negativo foram omitidos os anticorpos primários. A marcação positiva foi detectada como coloração marrom de padrão citoplasmático.

As células marcadas para IL-4 e IFN- γ foram contadas utilizando-se ocular integradora e a contagem expressa como número de células positivas/mm². Para IL-10, TNF- α e TGF- β utilizou-se análise semiquantitativa expressa em cruzes, levando-se em consideração o número de células marcadas positivamente e a intensidade da marcação como delineado no quadro a seguir:

Material e Métodos

Classificação	Nº de células marcadas e intensidade da marcação
0	Ausência de células marcadas
+	Poucas células fraca ou moderadamente marcadas
++	Poucas células marcadas intensamente ou número moderado ou grande de células marcadas fracamente
+++	Número moderado de células marcadas moderada ou intensamente ou grande número marcadas moderadamente
++++	Grande número de células marcadas intensamente

Material e Métodos

Tabela 03. Anticorpos primários e secundários utilizados para a imunomarcagem de IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α e TGF- β 1 em biópsias de pele ou mucosa de pacientes portadores de paracoccidiodomicose e respectivas diluições.

Anticorpo	Diluição	Código	Fabricante
Anticorpo monoclonal anti-IL2	1:20 a 1:800	MAB602	R & D Systems
Anticorpo monoclonal anti-IL-4 humana	1:400	MAB604	R & D Systems
Anticorpo monoclonal anti-IFN- γ humano	1:200	MAB285	R & D Systems
Anticorpo monoclonal anti-IL-10 humana	1:50	MAB217	R & D Systems
Anticorpo monoclonal anti-TNF- α humano	1:400	MAB610	R & D Systems
Anticorpo policlonal anti-TGF- β 1 humano produzido em galinha	1:100	BAF240	R & D Systems
Anticorpo policlonal anti-IgG de camundongo/coelho biotinilado produzido em cabra	1:600	K0492	DAKO
Anticorpo policlonal anti-IgM de galinha biotinilado produzido em cabra	1:400	BA-9010	VECTOR

3.6. Avaliação da imunidade humoral e celular

3.6.1. Determinação dos níveis séricos de anticorpos específicos anti-Pb

Para a avaliação da resposta imune humoral dos pacientes foi realizada a determinação dos níveis séricos de anticorpos específicos anti-Pb pelo método imunoenzimático (ELISA).

3.6.1.1. Preparação do antígeno do Pb (Ag Pb)

O antígeno do Pb (AgPb) foi preparado a partir de formas leveduriformes de *pool* de culturas das cepas 18, 192, 265, 113, BT1, BT2 e BT3 cultivadas a 37°C em ágar *Sabouraud* por 7 dias. Uma suspensão dos fungos foi centrifugada, lavada 3 vezes em SSE, suspensa em igual volume de SSE e sonicada em disruptor ultrassônico de células por 20 vezes durante 2 minutos a 60-70 ciclos/segundo. O material resultante foi centrifugado 1200 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante (AgPb) foi esterilizado em pré-filtro e em filtro *Milipore*. A concentração protéica foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951).

3.6.1.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Placa de poliestireno de fundo plano com 96 orifícios (CORNING – ZX24882J) foi sensibilizada com 100 µl de suspensão do AgPb (75 µl do

Material e Métodos

antígeno em 10 ml de tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6) e incubada à temperatura ambiente por aproximadamente 18 horas. A seguir os poços foram bloqueados com solução de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (solução PBS-MOLICO) à temperatura ambiente por 1 hora. As amostras dos soros foram diluídas em PBS-MOLICO (diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 e 1:12800), sendo distribuídos 100 µl das diluições pelos orifícios da placa (exceto no branco), que foi incubada por 2 horas a 37°C. Foi então, lavada com solução PBS-Tween (PBS contendo Tween 20 a 0,05%) e incubada com 100 µl do anticorpo anti-IgG humana conjugado a peroxidase (SIGMA, Chemical Co., USA) e diluído 1:40.000 em PBS-MOLICO durante 2 horas a 37°C. Foi realizada nova lavagem em PBS-Tween. Para revelação foi utilizado em cada orifício 100 µl da solução de ortofenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio (10 mg de OPD em 25 ml de tampão citrato-fosfato pH 5.0 e 10 µl de peróxido de hidrogênio) com incubação de 5 minutos em local escuro. A reação foi interrompida com 50 µl de H₂SO₄ 4N para cada orifício.

A leitura foi efetuada em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan MCC/340) em comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos como a média das leituras das diluições dos soros com valores acima do controle negativo da reação.

3.6.2. Teste cutâneo da paracoccidioidina

O teste cutâneo da paracoccidioidina foi utilizado para a avaliação da imunidade celular dos pacientes. Para sua realização, antígeno do Pb (Agpb) foi preparado segundo a metodologia descrita por FAVA NETTO (1961). Cada indivíduo foi inoculado, pela via intradérmica, no dorso, com 0,1 ml do antígeno. Após 48 horas a zona de induração foi mensurada e as mensurações anotadas. O teste foi considerado positivo, quando a zona de induração media 5 mm ou mais.

3.7. Determinação dos níveis séricos de citocinas

A determinação dos níveis séricos das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α , e TGF- β 1 nos soros de pacientes portadores de Pbmicose e de indivíduos sadios foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os anticorpos utilizados estão apresentados na tabela 04. Para a realização da curva padrão foram empregadas as seguintes citocinas recombinantes provenientes da R&D Systems: IL-2 (202-IL), IL-4 (204-IL), IL-10 (217-IL), TNF- α (210-TA), IFN- γ (285-IF) e TGF- β (240-B).

3.7.1. Determinação das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α

Placas de poliestireno com 96 orifícios e fundo plano, de alta afinidade (MaxSorp, Nunc, Life Tech. Inc, Maryland, USA), foram sensibilizadas por 18

Material e Métodos

horas a 4°C com anticorpo monoclonal anticitocinas humanas IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α (R & D Systems) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,2 M, pH 7.2 contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). O bloqueio dos sítios livres foi realizado com solução de PBS-T contendo leite em pó desnatado na concentração de 5% durante 2 horas a 37°C. Após lavagem das placas foram adicionados 100 μ l das citocinas humanas recombinantes IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α , nas concentrações apropriadas, para obtenção da curva padrão. Nos demais orifícios foram distribuídos 100 μ l dos soros com posterior incubação por 4 horas a 37°C. Após este período e lavagem das placas, foi adicionado o anticorpo anticitocinas biotinilado diluído em PBS-T, nas concentrações apropriadas, com incubação por 4 horas a 37°C. Em seguida a nova lavagem das placas, foram adicionados 100 μ l de estreptavidina na diluição de 1:10.000 em PBS-T. Foi realizada outra lavagem e foram adicionados 100 μ l de substrato constituído por 10 μ l de peróxido de hidrogênio a 30% diluídos em 10 ml de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5.0 contendo 10 μ g do revelador ortodifenilenodiamina (SIGMA, Chemical Co., USA). A reação foi interrompida pela adição de 50 μ l de solução de ácido sulfúrico 2N e as densidades ópticas avaliadas em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan) em comprimento de onda de 492 nm. As concentrações das citocinas nos soros foram calculadas sobre curva padrão obtida com diferentes concentrações das citocinas humanas recombinantes.

3.7.2. Determinação de TGF- β 1

De acordo com as recomendações do fabricante para a dosagem de TGF- β 1, os soros de pacientes com paracoccidioidomicose e de indivíduos sadios foram previamente submetidos à ativação com uréia seguida de neutralização com NaOH/Hepes pH 7.0. A seguir, placa de poliestireno com 96 orifícios e fundo plano, de alta afinidade (MaxSorp, Nunc, Life Tech. Inc, Maryland, USA), foi sensibilizada por 18 horas a 4°C com anticorpo monoclonal anti-TGF- β 1 humano (R & D Systems) diluído em tampão PBS pH 7.2 contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T).

O bloqueio dos sítios livres da placa foi realizado com solução de PBS adicionado de 5% de sacarose, 0,05% de azida sódica (NaN_3) e 5% de Tween 20 durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem, foram adicionados 100 μ l de TGF- β 1 recombinante na concentração inicial de 8.000 pg/ml para obtenção da curva padrão. O recombinante foi diluído em “opticlear” (soro dilipidado) de acordo com a recomendação do fabricante (R&D Systems). Os demais orifícios da placa foram utilizados para dosagem da citocina nas amostras de soro. Seguiu-se período de incubação de 4 horas à temperatura ambiente. Após isso, procedeu-se novamente à lavagem por 3 vezes com PBS-T e incubação com anticorpo biotinilado diluído em PBS-T, na concentração de 100 ng/ml por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida a nova lavagem, foi adicionada avidina-peroxidase diluída em PBS-T na concentração de 1:10.000 por 2 horas à temperatura ambiente. Decorrido este período e, posteriormente, à lavagem da placa, adicionou-se 100 μ l de

substrato constituído por 10 µl de H₂O₂ a 30%, diluídos em 10 ml de tampão citrato fosfato 0,1M pH 5.0, contendo 10 µg do revelador ortofenilenodiamina (SIGMA Chemical Co., USA). A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de solução de ácido sulfúrico 2N e as densidades ópticas avaliadas em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan) em comprimento de onda de 492 nm. A concentração de TGF-β1 no soro foi calculada sobre a curva padrão obtida com diferentes concentrações da citocina recombinante.

3.7.3. Determinação de IL-10

Placa de poliestireno com 96 orifícios e fundo plano, de alta afinidade (MaxSorp, Nunc, Life Tech. Inc, Maryland, USA), foi sensibilizada por 18 horas a 4°C com anticorpo monoclonal anti-IL-10 humana (R & D Systems) na concentração de 4µg/ml diluído em PBS pH 7.2 contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). O bloqueio dos sítios livres da placa foi realizado com solução de PBS adicionado de 1% de BSA, 5% de sacarose e 0,05% de azida sódica (NaN₃) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem da placa, foram adicionados 100 µl de IL-10 recombinante nas concentrações apropriadas para obtenção da curva padrão. O recombinante foi diluído em 0,1% de BSA, 0,05% de Tween e Tris-salina (20 mM de trizma e 150 mM de NaCl). Nos demais orifícios foram distribuídos 100 µl dos soros com posterior incubação por 4 horas à temperatura ambiente. A seguir, novamente procedeu-se a lavagem da placa por 3 vezes com PBS-T e foi adicionado o anticorpo anti-IL-10 biotinilado diluído em PBS-T, na concentração de 250 ng/ml com incubação por 4 horas à

Material e Métodos

temperatura ambiente. Após nova lavagem foram adicionados 100 µl de avidina na concentração de 1:10.000 em PBS-T com incubação de 1 hora em temperatura ambiente. Decorrido este período e, posteriormente a lavagem, adicionaram-se 100 µl de substrato constituído por 10 µl de H₂O₂ a 30%, diluídos em 10 ml de tampão citrato fosfato 0,1M pH 5.0 contendo 10 µg do revelador ortofenilenodiamina (SIGMA Chemical Co., USA). A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de solução de ácido sulfúrico 2N. As densidades ópticas foram avaliadas em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan) em comprimento de onda de 492 nm e as concentrações de IL-10 nos soros foram calculadas sobre a curva padrão obtida com diferentes concentrações da citocina recombinante.

Material e Métodos

Tabela 04. Anticorpos empregados no ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas no soro de pacientes portadores de paracoccidiodomicose e de indivíduos saudáveis.

Citocinas	Anticorpo Primário	Código	Anticorpo Secundário Biotinilado	Código	Fabricante
IL-2	Mouse anti-human IL-2	MAB602	Goat anti-human IL-2	BAF202	R&D Systems
IL-4	Mouse anti-human IL-4	MAB604	Goat anti-human IL-4	BAF204	R&D Systems
INF-γ	Mouse anti-human IFN- γ	MAB285	Goat anti-human IFN- γ	BAF285	R&D Systems
IL-10	Mouse anti-human IL-10	MAB217	Goat anti-human IL-10	BAF217	R&D Systems
TNF-α	Mouse anti-human TNF- α	MAB610	Goat anti-human TNF- α	BAF210	R&D Systems
TGF-β1	Mouse anti-human TGF- β 1	MAB240	Chicken anti- human TGF- β 1	BAF240	R&D Systems

3.8. Análise estatística

Os dados referentes às concentrações de citocinas no soro de pacientes portadores de Pbmicose e de indivíduos sadios e, de células do infiltrado inflamatório em biópsias de pele e de mucosa, foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann Whitney para comparação de duas amostras independentes.

Foram utilizados os testes não paramétricos de Wilcoxon (comparação de duas amostras dependentes) e de Friedman (comparação de mais de duas amostras relacionadas) para os dados referentes, respectivamente, à presença de IL-4 e IFN- γ e de IL-10, TGF- β e TNF- α nas lesões teciduais.

Para análise da correlação entre os níveis séricos de citocinas, níveis séricos de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, contagens celulares, citocinas nos granulomas, resposta ao teste da paracoccidioidina e gravidade clínica utilizou-se o teste da correlação de postos de Spearman.

O nível de significância adotado para todos os testes empregados foi de 5%. Foram utilizados os programas estatísticos *Winks – Statistical Data Analysis and Graphs* e *Jandel Sigma Stat*.

4. RESULTADOS

4.1. Histopatologia

O exame histopatológico dos cortes corados em HE demonstrou o mesmo padrão de achados morfológicos em biópsias de pele e de mucosa, por isso os resultados serão analisados conjuntamente.

Em relação às alterações observadas no epitélio estratificado, hiperplasia epitelial, variando, em geral, de moderada a acentuada e freqüentemente exibindo aspecto pseudo-epiteliomatoso, esteve presente em praticamente todas as biópsias. Hiper e paraqueratose, espongiose, formação de microvesículas e microabcessos foram visualizados freqüentemente. Células do exsudato inflamatório incluindo neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e células gigantes permeavam o epitélio. Plasmócitos foram vistos em número reduzido nesta localização. Fungos também estiveram presentes em número variável (Figura 01).

A derme/cório, exibiu inflamação crônica granulomatosa e supurativa característica. Os granulomas eram constituídos por agregados focais de macrófagos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas, tanto do tipo corpo estranho como do tipo Langhans, muitas delas continham leveduras do fungo, algumas de aspecto degenerado. Freqüentemente, áreas de supuração, com número variável de neutrófilos, estavam presentes no interior dos granulomas. Estes eram circundados por quantidade variável de

Resultados

linfócitos, macrófagos, plasmócitos e eosinófilos. Muitas vezes, mostravam arranjo frouxo, desorganizado, sendo que na mesma biópsia, era possível observar áreas com granulomas compactos, bem formados, lado a lado com áreas exibindo granulomas frouxos, mal organizados e edema e congestão vascular. Fibrose, em geral discreta e raras vezes chegando a moderada, em torno dos granulomas, foi achado freqüente. Fungos, livres ou no interior de células gigantes, viáveis ou não, foram vistos em número variável, em geral associados a exsudato neutrofílico com formação de microabcessos. Necrose praticamente não foi observada e poucas biópsias mostraram presença de vasculite comprometendo a parede de arteríolas ou vênulas (Figuras 02 e 03).

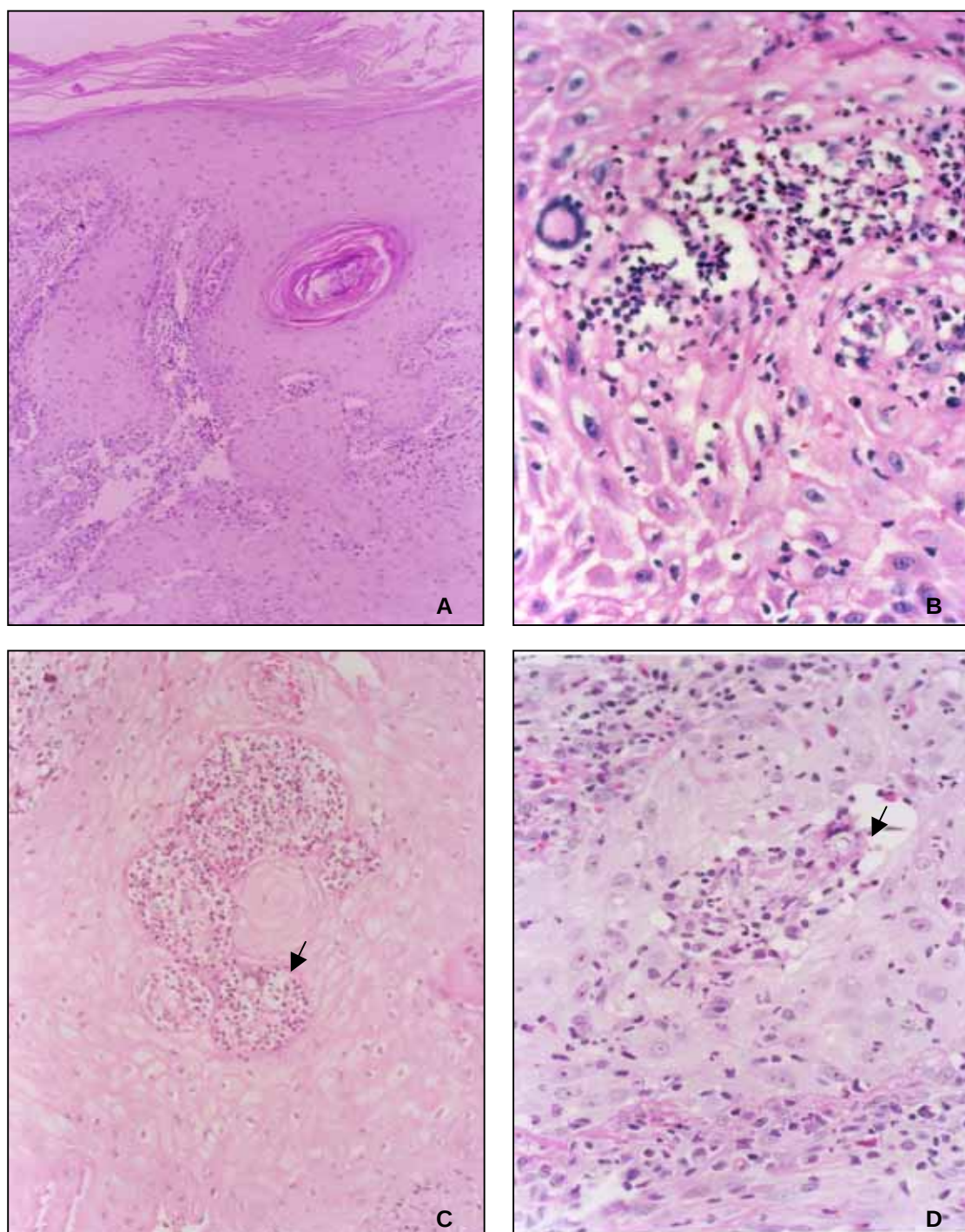


Figura 01: **A)** Epiderme exibindo hiperqueratose e hiperplasia pseudo-epiteliomatosa. HE - 100X. **B)** Espongiose e permeação do epitélio por exsudato inflamatório com formação de microabscessos e presença de célula gigante de tipo Langhans. HE - 400X. **C)** Microabscessos intra-epiteliais contendo leveduras do Pb (seta). HE - 200X. **D)** Permeação do epitélio pavimentoso por exsudato inflamatório com muitos eosinófilos e formação de granuloma epitelióide contendo o fungo (seta). HE - 400X.

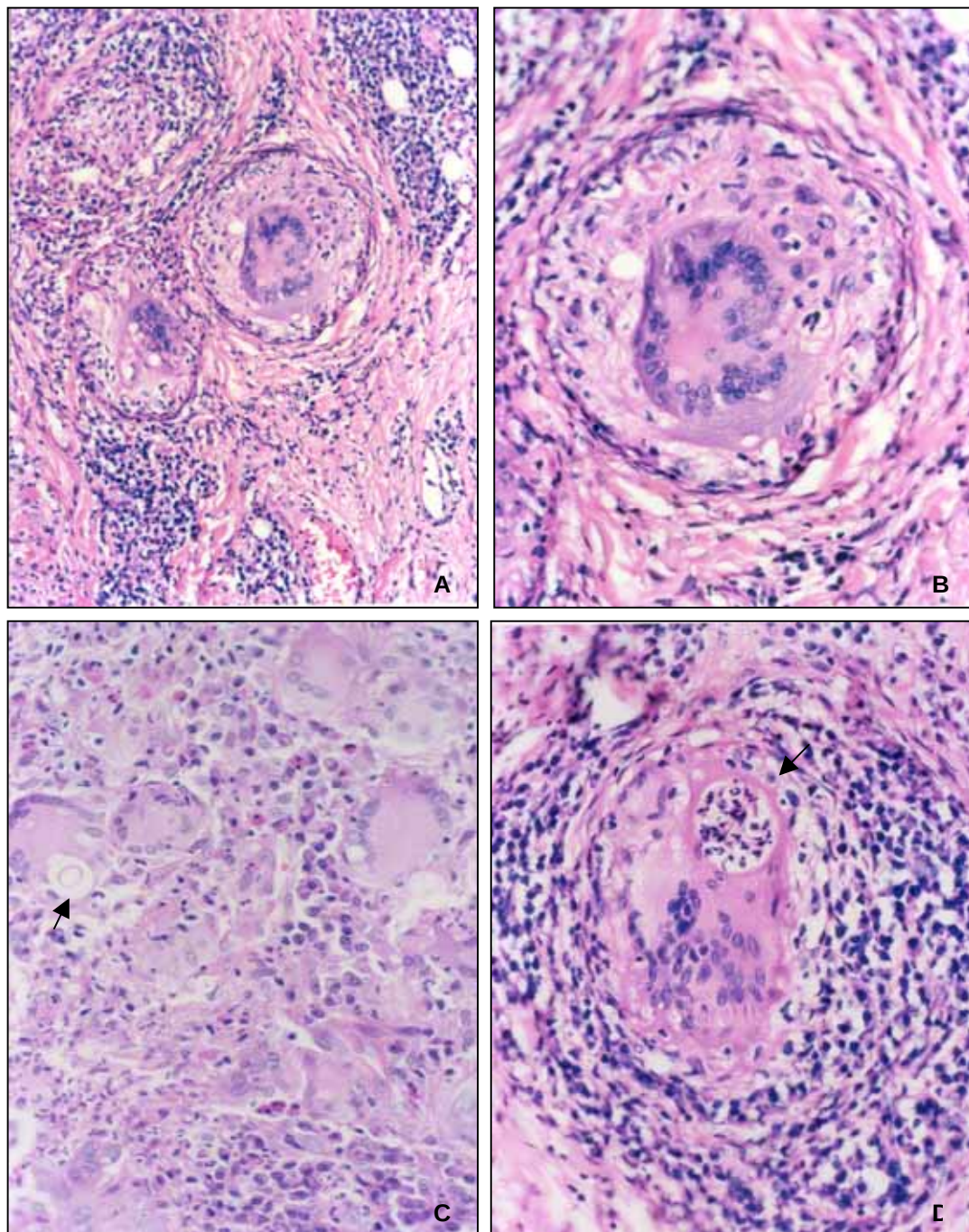


Figura 02: A) Derme/cório mostrando granulomas epitelióides compactos, bem delimitados e infiltrado intersticial de mononucleares. HE – 200X. B) Detalhe: granuloma epitelióide, compacto, circundado por fibrose discreta. HE – 400X. C) Granuloma paracoccidióidico frouxo, com reação epitelióide mal definida, numerosas células gigantes, algumas contendo fungo (seta) e permeação por infiltrado de plasmócitos, eosinófilos, histiócitos, linfócitos e neutrófilos. HE – 400X. D) Detalhe de granuloma mostrando área de supuração (seta) no interior de célula gigante e halo de mononucleares bem definido. HE – 400X.

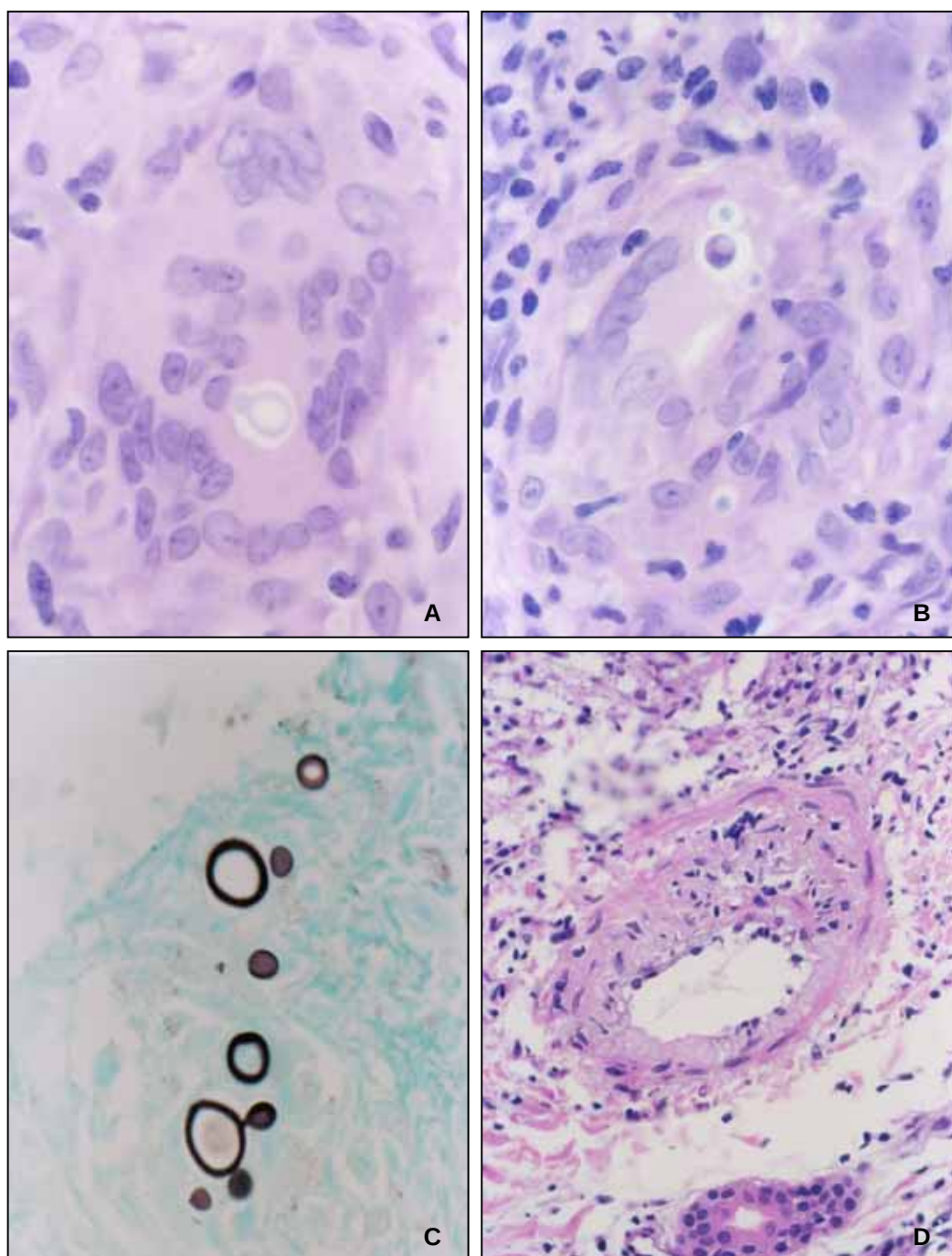


Figura 03: A e B) Células gigantes contendo leveduras do Pb, algumas delas exibindo brotamento. HE – 1000X. **C)** Leveduras do fungo impregnadas pela prata e exibindo morfologia característica. Grocott – 1000X. **D)** Pequeno vaso da derme/cório exibindo vasculite. HE – 400X.

4.1.1. Contagens de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes multinucleadas (CGM), plasmócitos e fungos

As contagens de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes, plasmócitos e fungos foram realizadas em biópsias cutâneo-mucosas de 25 pacientes e seus resultados expressos como mediana do n^o de células/mm² (Tabela 01).

Neutrófilos foram observados em 24 das 25 biópsias (96%) e se destacaram como o tipo celular mais numeroso em 18 biópsias, representando, no total, 71,6% dessas células. Plasmócitos predominaram em 06 espécimes (4%) dos 24 em que foram pesquisados, e representaram 26,6% das células. Eosinófilos estiveram presentes sempre em número menor em relação aos neutrófilos, e em 01 biópsia (4%) não foram visualizados, compreendendo 1,8% das células analisadas. Células gigantes foram encontradas em 100% das biópsias variando em número de caso para caso, mas sempre em quantidades bem inferiores às de neutrófilos (Figura 04).

A presença de fungos foi avaliada em 22 biópsias e variou amplamente, de escassa a abundante (Tabela 02).

Em relação às biópsias de pele ou de mucosa, observamos presença de número significativamente maior de plasmócitos nos espécimes de mucosa. Para neutrófilos, eosinófilos, células gigantes e fungos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 03 e Figura 05).

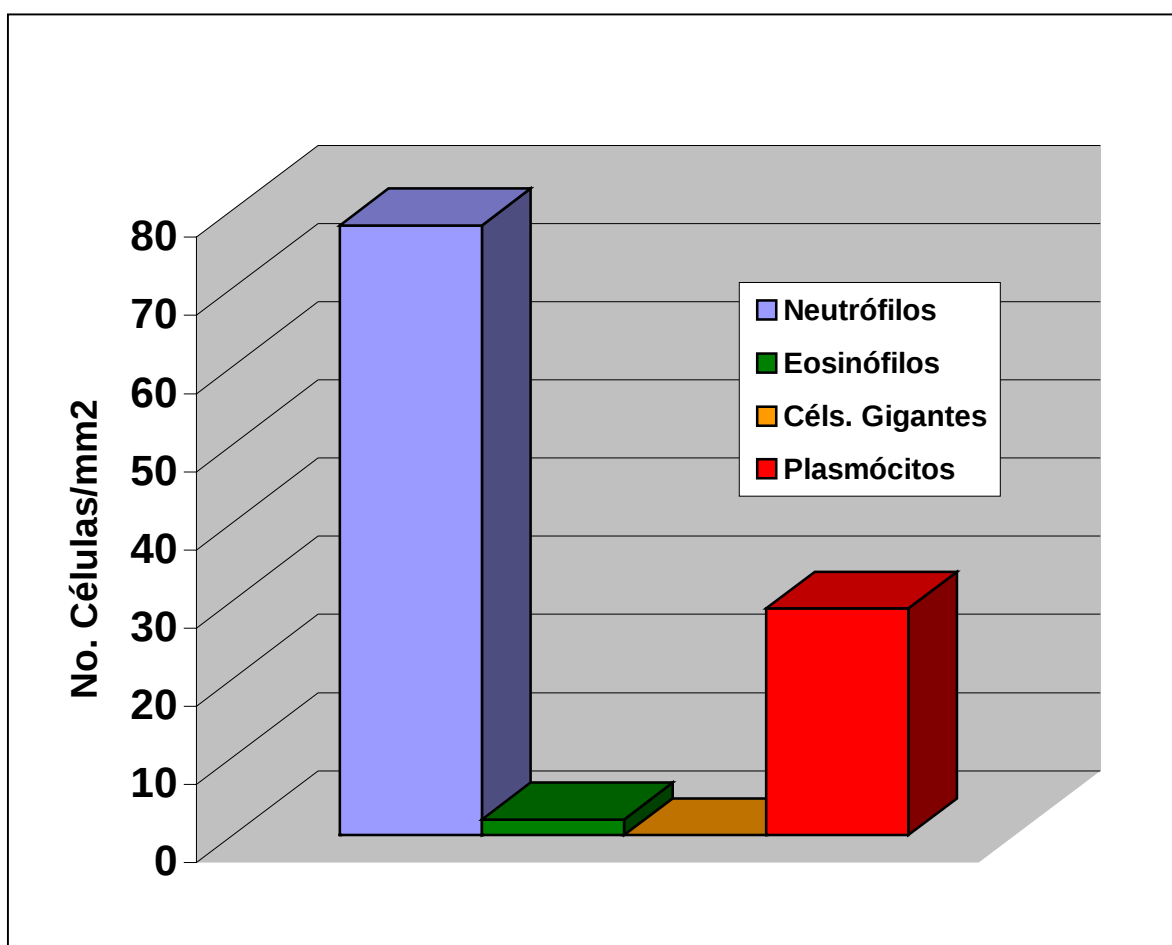


Figura 04: Medianas das contagens de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes multinucleadas e plasmócitos em biópsias cutâneo-mucosas de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

Tabela 01: Distribuição das biópsias cutâneo-mucosas de portadores da forma crônica multifocal da pbmicose em relação à quantidade (mediana do nº de células/mm²) de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes e plasmócitos.

<i>Nº de células/mm²</i> <i>(mediana)</i>	<i>Biópsias</i>			
	<i>N (%)</i>			
	Neutrófilos	Eosinófilos	Céls. Gigantes	Plasmócitos
0 ┤ 15	4 (16,0)	22 (88,0)	25 (100,0)	9 (37,5)
15 ┤ 30	1 (4,0)	1 (4,0)	0 (0,0)	3 (12,5)
30 ┤ 60	1 (4,0)	2 (8,0)	0 (0,0)	4 (16,6)
60 ┤ 120	13 (52,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (8,3)
120 ┤ 240	4 (16,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (25,0)
240 ┤ 480	2 (8,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	25 (100,0)	25 (100,0)	25 (100,0)	24(100,0)

Tabela 02: Distribuição das biópsias em relação à quantidade de fungos (mediana n^o de fungos/ mm²).

<i>N^o de fungos/mm² (mediana)</i>	<i>Biópsias</i>
	<i>N (%)</i>
0 ┤ 10	16 (72,73)
10 ┤ 20	2 (9,09)
20 ┤ 40	0 (0,00)
40 ┤ 80	2 (9,09)
80 ┤ 160	1 (4,55)
160 ┤ 330	1 (4,55)
Total	22 (100,01)

Resultados

Tabela 03: Medianas das contagens de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes e plasmócitos em biópsias de pele e mucosa em portadores de forma crônica multifocal da Pbmicose.

<i>Local da biópsia</i>	Células (n ^o /mm ²)			
	Neutrófilos	Eosinófilos	Células Gigantes	Plasmócitos
Mucosa (n = 9)	80 (0 – 314)	4 (0 – 56)	0 (0 – 8)	120* (0 – 262)
Pele (n = 15)	76 (4 – 286)	2 (0 – 20)	0 (0 – 4)	12* (0 – 164)

() Valor mínimo e máximo.

* p = 0,007 (Teste U de Mann Whitney

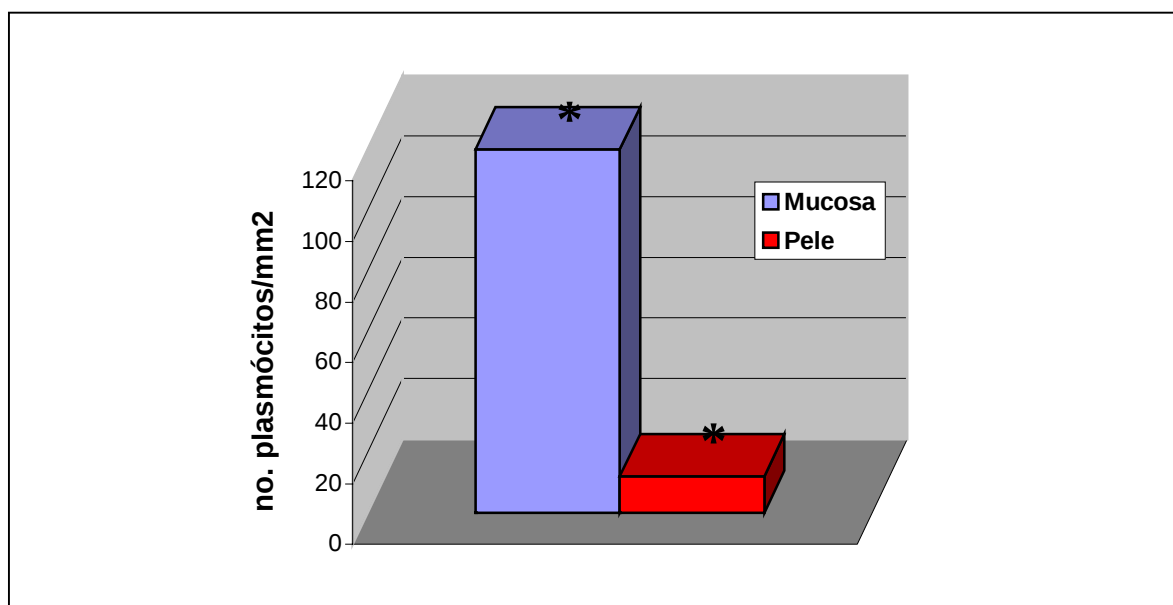


Figura 05: Medianas das contagens de plasmócitos em biópsias de pele e mucosa de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose. * p = 0,007

4.2. Estudo imuno-histoquímico das populações linfocitárias

Resultados

Linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD20⁺ e células NK foram identificados em 26 biópsias e linfócitos T CD8⁺ em 24.

Os linfócitos T CD3⁺ foram as células predominantes e representaram 62,03% dos linfócitos imunomarcados. Achavam-se distribuídos pelas lesões da derme/cório em dois padrões básicos concomitantes, faziam parte do manto que circundava os granulomas, com alguns poucos permeando o arranjo central de fagócitos mononucleares e do infiltrado difuso da derme/cório, inclusive, com permeação do epitélio pavimentoso estratificado superficial (Figuras 06 e Tabela 04).

Os linfócitos T CD8⁺ representaram 33,2% da população de linfócitos T CD3⁺, com porcentagens variando entre 15,8% e 66,7% (Figura 06).

Linfócitos B CD20⁺ e células NK representaram, respectivamente, 5,4% e 12,0% da população linfocitária. Eram encontrados no manto em torno dos granulomas e sobretudo em arranjo difuso pela derme/córion com presença de alguns deles no epitélio superficial (Figura 07).

Os linfócitos T CD8⁺ foram encontrados em número significativamente maior em biópsias de mucosa em relação às de pele. Em relação aos linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD20⁺ e células NK não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Tabela 05).

No geral, linfócitos T CD3⁺ representaram 54,1% de todas as células analisadas, linfócitos B CD20⁺ 4,9%, células NK 11,1%, neutrófilos 19,2%, eosinófilos 0,5%, células gigantes 0% e plasmócitos 7,1% (Figura 08).

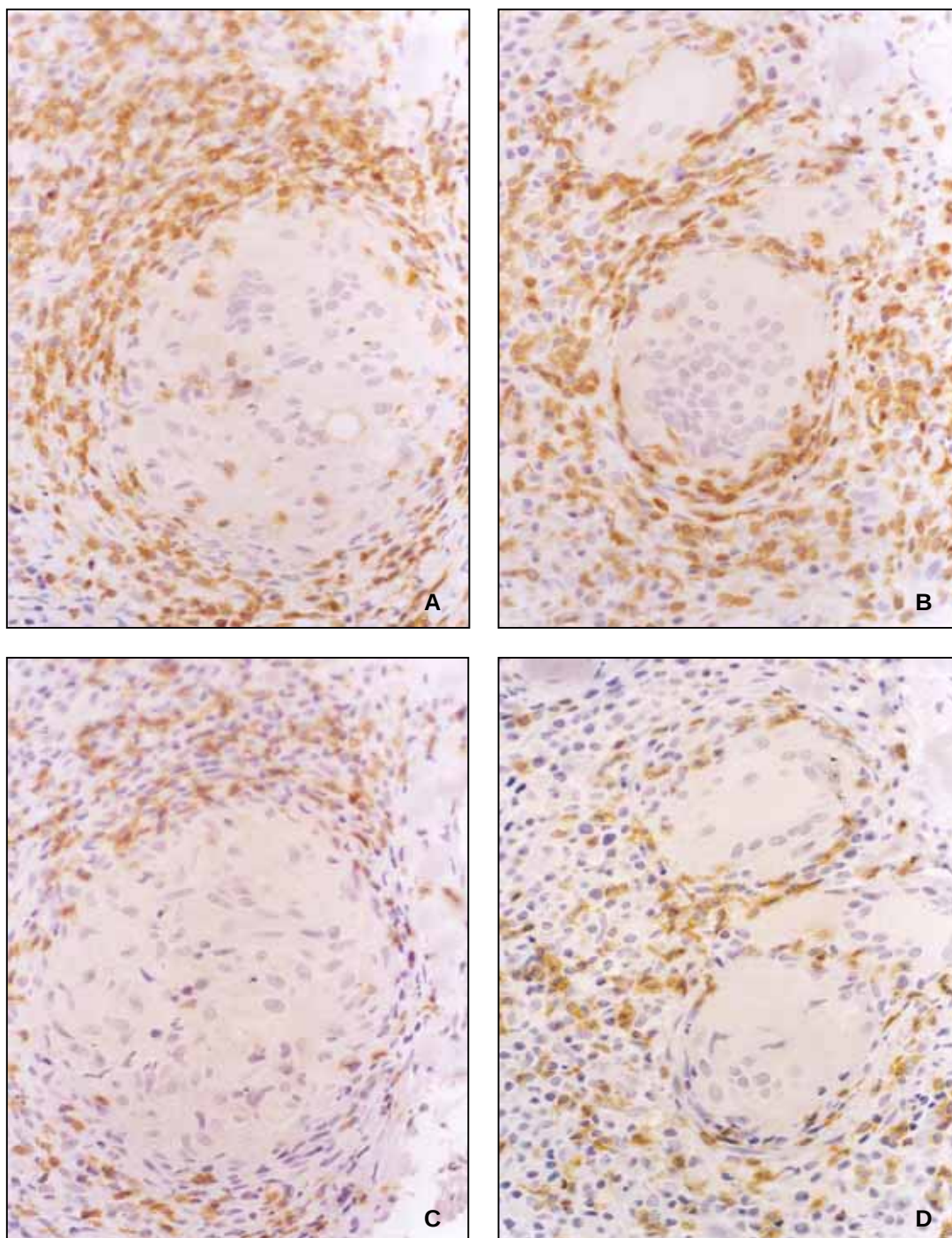


Figura 06: **A e B)** Granulomas paracoccidioidicos com numerosos linfócitos T CD3⁺ no halo periférico e alguns poucos permeando o agregado central de fagócitos mononucleares. IH – 400X. **C e D)** Linfócitos T CD8⁺ distribuídos na periferia de arranjos granulomatosos. IH – 400X.

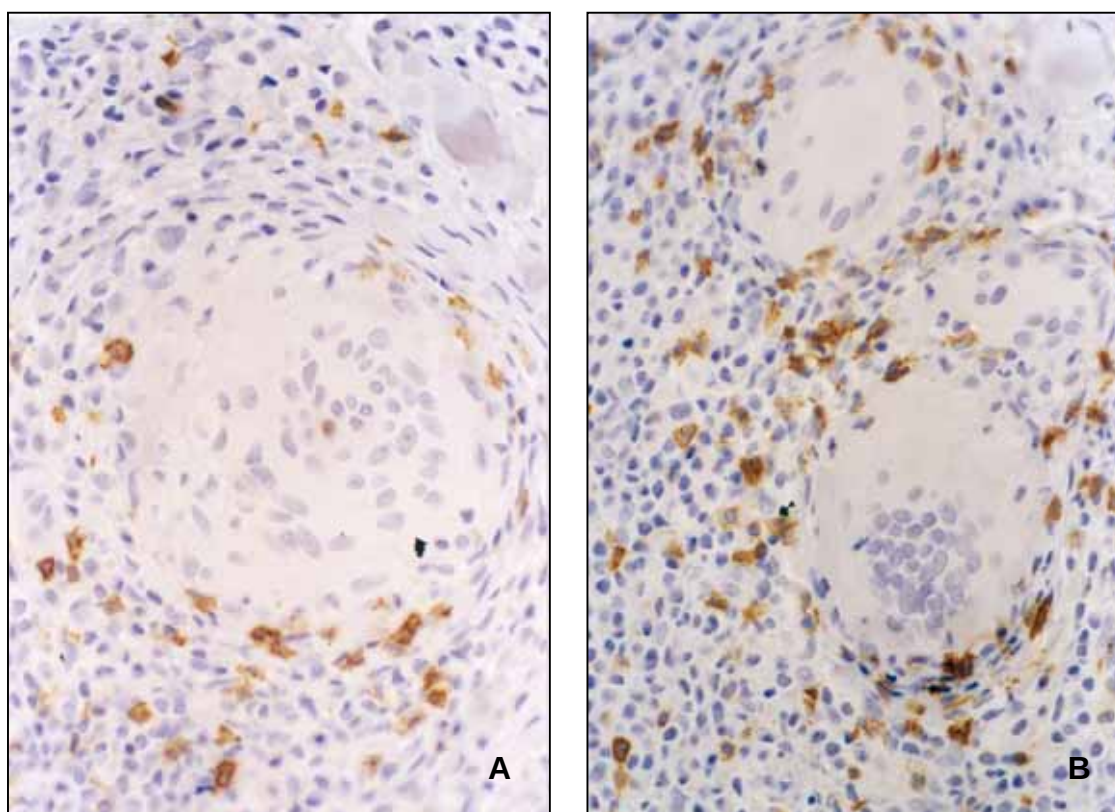


Figura 07: A) Linfócitos B CD20+ na periferia de granuloma paracoccidióidico. IH – 400X.
B) Células NK em torno de arranjo granulomatoso. IH – 400X.

Tabela 04: Distribuição das biópsias cutâneo-mucosas em relação à quantidade (mediana do n^o de células/mm²) de linfócitos TCD3+, linfócitos B CD20+, linfócitos T CD8+ e células NK.

N^o de células/mm² (mediana)	Biópsias			
	N (%)			
	CD3+	CD20+	CD8+	NK
0 ┤ 30	1 (3,9)	17 (65,4)	4 (16,7)	9 (34,7)
30 ┤ 60	0 (0,0)	6 (23,1)	6 (25,0)	7 (26,9)
60 ┤ 120	4 (15,4)	2 (7,7)	5 (20,8)	8 (30,8)
120 ┤ 240	9 (34,6)	1 (3,9)	8 (33,3)	2 (7,7)
240 ┤ 480	6 (23,1)	0 (0,0)	1 (4,2)	0 (0,0)
480 ┤ 960	6 (23,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	26 (100, 1)	26 (100,1)	24 (100,0)	26(100,1)

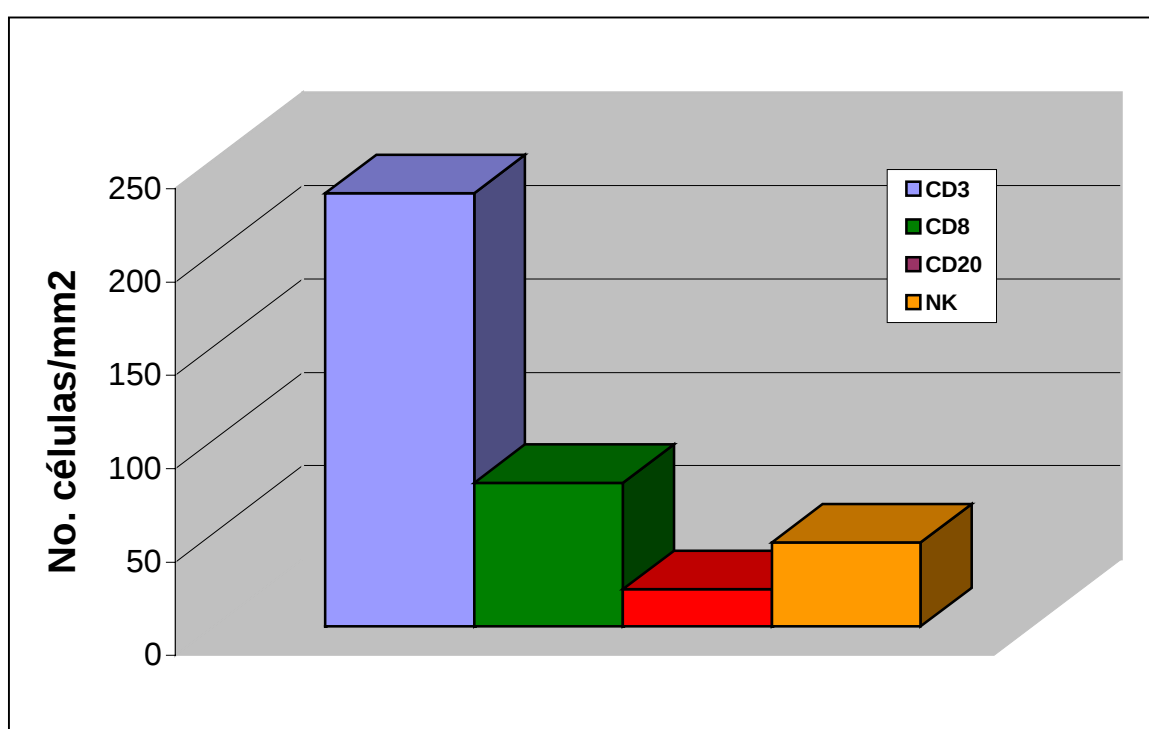


Figura 08: Medianas das contagens de linfócitos T CD3⁺, linfócitos T CD8⁺, linfócitos B CD20⁺ e células NK em biópsias cutâneo-mucosas de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

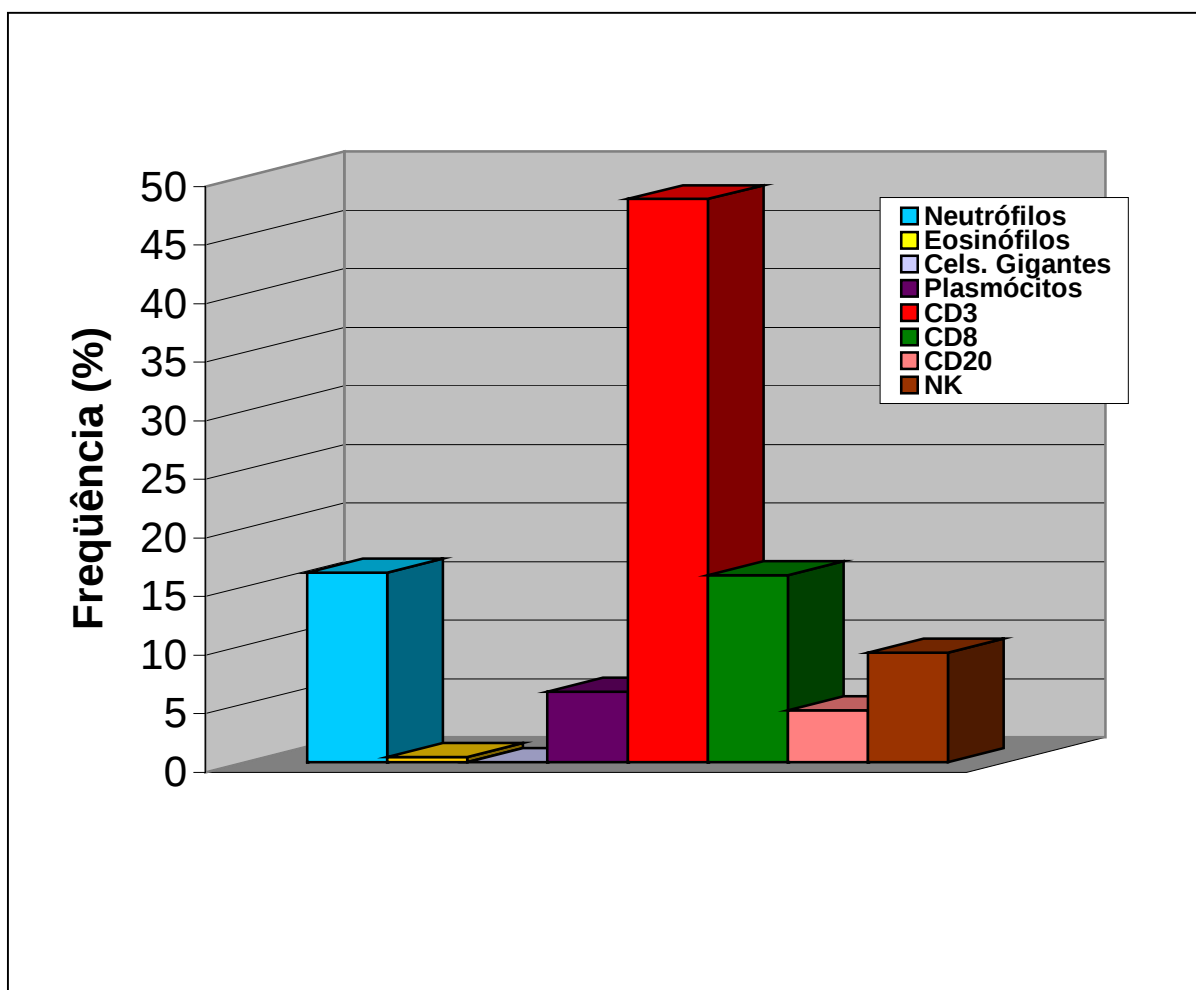


Figura 09: Frequência de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes, plasmócitos, linfócitos T $CD3^{+}$ e $CD8^{+}$, linfócitos B $CD20^{+}$ e células NK em biópsias cutâneo-mucosas de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

Tabela 05: Medianas das contagens das populações linfocitárias em biópsias de pele e de mucosa de pacientes portadores de paracoccidioidomicose.

<i>Local da biópsia</i>	<i>T CD3+</i>	<i>T CD8+</i>	<i>B CD20+</i>	<i>NK</i>
Mucosa (n = 10)	408 (116 – 596)	144 * (24 – 256)	29 (12 – 44)	62 (4 – 152)
Pele (n = 16)	214 (24 – 786)	54* (12 – 176)	19 (4 – 124)	38 (4 - -84)

() Valor mínimo e máximo.

* p = 0,038 (Teste U de Mann Whitney).

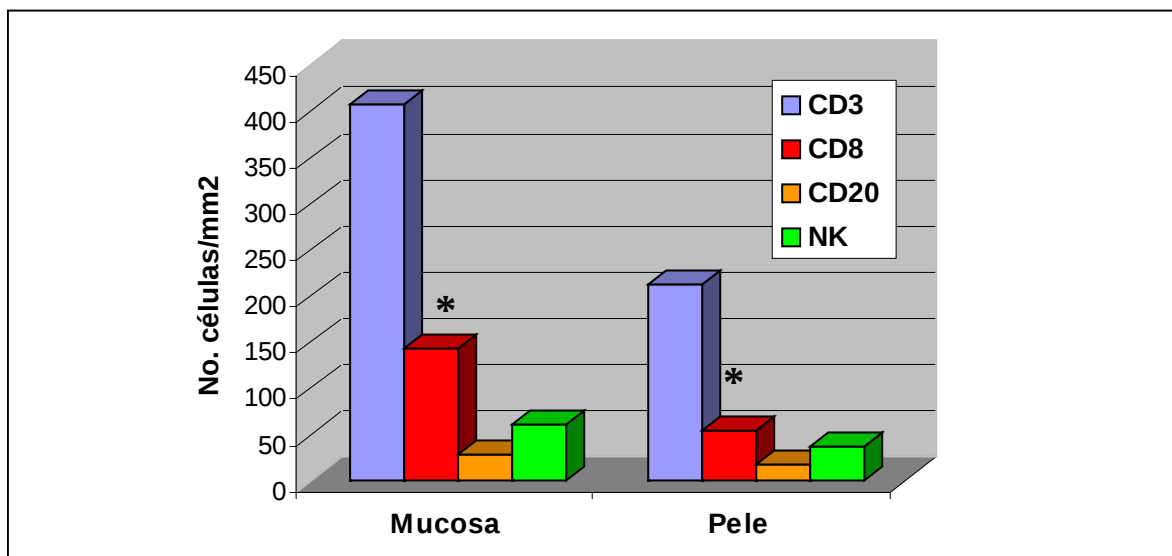


Figura 10: Medianas das contagens das populações linfocitárias em biópsias de mucosa e de pele de pacientes portadores da forma crônica multifocal da Pbmicoose. * $p = 0,038$

4.3. Detecção imuno-histoquímica das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α e TGF- β 1

Entre 21 e 24 espécimes de biópsias de lesões cutâneo-mucosas de pacientes portadores da forma crônica multifocal da paracoccidiodomicose, fixados em formalina e incluídos em parafina, foram submetidos ao método imuno-histoquímico para detecção *in situ* das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α e TGF- β 1. Não obtivemos sucesso nas tentativas de imunomarcacão de IL-2.

4.3.1. IL-4 e IFN- γ

IL-4 e IFN- γ foram detectados no citoplasma de pequenas células mononucleares com aspecto morfológico de linfócitos. Em geral, para ambas as citocinas, as células positivas apresentavam coloração com intensidade de moderada a acentuada, estavam presentes em pequeno número e se distribuíam de maneira difusa no infiltrado em torno dos granulomas (Figura 11).

Foram observados quatro padrões de imunomarcacão (Tabela 06 e 07) para as duas citocinas: algumas biópsias apresentaram células positivas para as duas citocinas (IL-4+/IFN- γ +); outras para apenas uma delas (IL-4+ / IFN- γ ⁻ ou IL-4⁻ / IFN- γ +) e algumas não apresentaram células positivas para nenhuma delas (IL-4⁻ / IFN- γ ⁻) (Figura 12).

Não detectamos diferenças estatisticamente significativas em relação à presença de IL-4 e IFN- γ em lesões de pele e de mucosa.

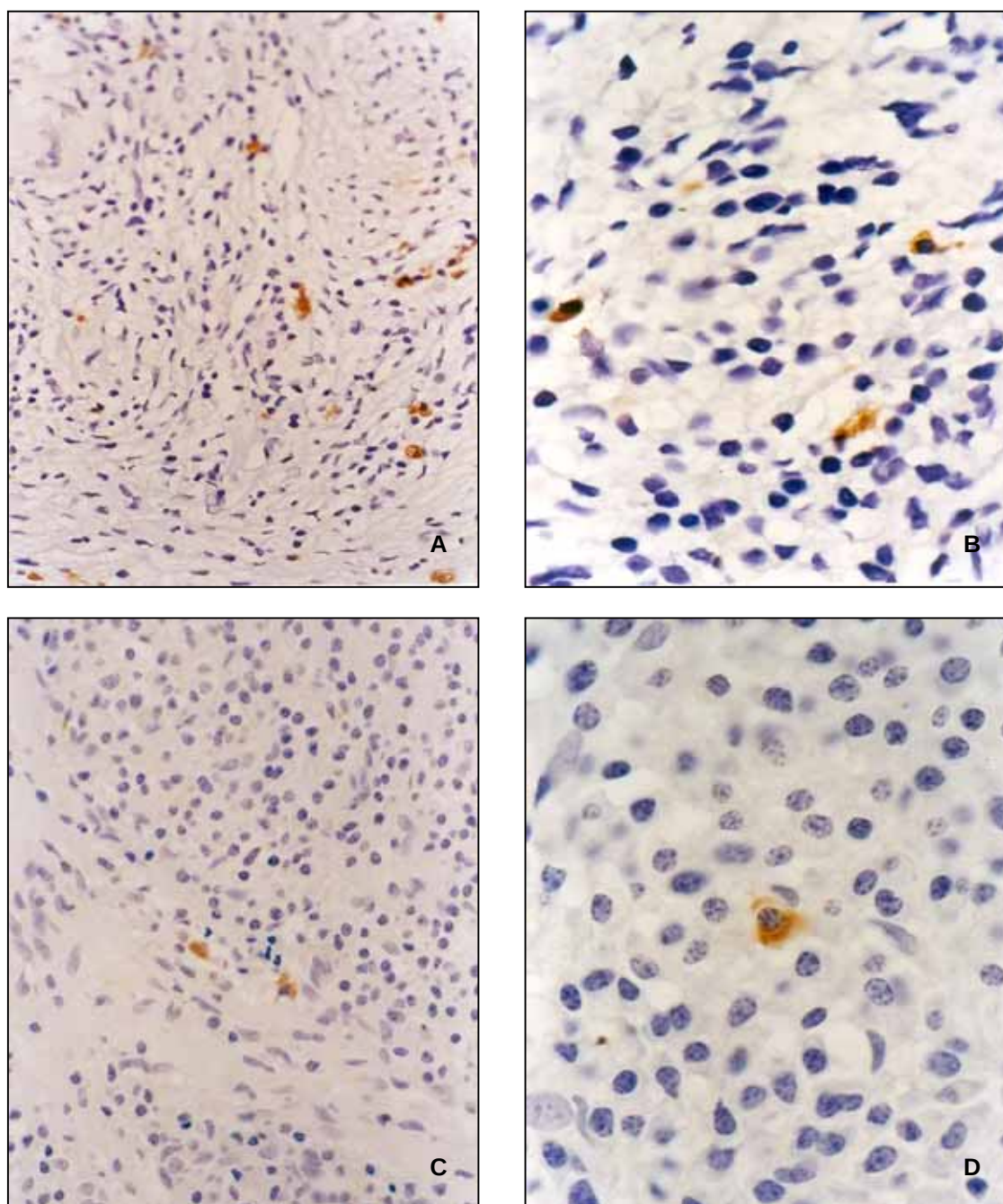


Figura 11: **A)** Derme/cório mostrando várias células marcadas para IL-4 no infiltrado inflamatório próximo à periferia de granulomas paracoccidióicos. IH – 400X. **B)** Detalhe das pequenas células mononucleares marcadas para IL-4. IH – 1000X. **C)** Escassas células marcadas para IFN-gama. IH – 400X. **D)** Detalhe de célula mononuclear marcada para IFN-gama. IH – 1000X.

Tabela 06: Distribuição dos quatro padrões de reatividade para as citocinas IL-4 e INF- γ em biópsias de pele e de mucosa de pacientes portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

<i>Padrões de Reatividade para IL-4 e IFN-γ</i>	<i>Mucosa</i>	<i>Pele</i>	<i>Total</i>
	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>
IL-4 + / IFN-γ +	5 (50,0)	4 (30,8)	9 (39,1)
IL-4 + / IFN-γ –	2 (20,0)	3 (23,1)	5 (21,7)
IL-4 – / IFN-γ +	2 (20,0)	2 (15,4)	4 (17,4)
IL-4 – / IFN-γ –	1 (10,0)	4 (30,8)	5 (21,7)
Total	10(100,0)	13 (100,1)	23 (100,0)

Tabela 07: Distribuição do número de células marcadas para IL-4 e IFN- γ nas lesões cutâneo-mucosas de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

<i>N^o de células/mm²</i>	<i>IL-4</i> <i>N (%)</i>	<i>IFN-γ</i> <i>N (%)</i>
0 $\pm$ 0,2	12 (56,3)	13 (56,6)
0,2 $\pm$ 0,4	3 (13,0)	1 (4,4)
0,4 $\pm$ 0,8	3 (13,0)	5 (21,5)
0,8 $\pm$ 1,6	2 (8,7)	4 (17,5)
1,6 $\pm$ 3,3	3 (13,0)	0 (0,0)
Total	23 (100,0)	23 (100,0)

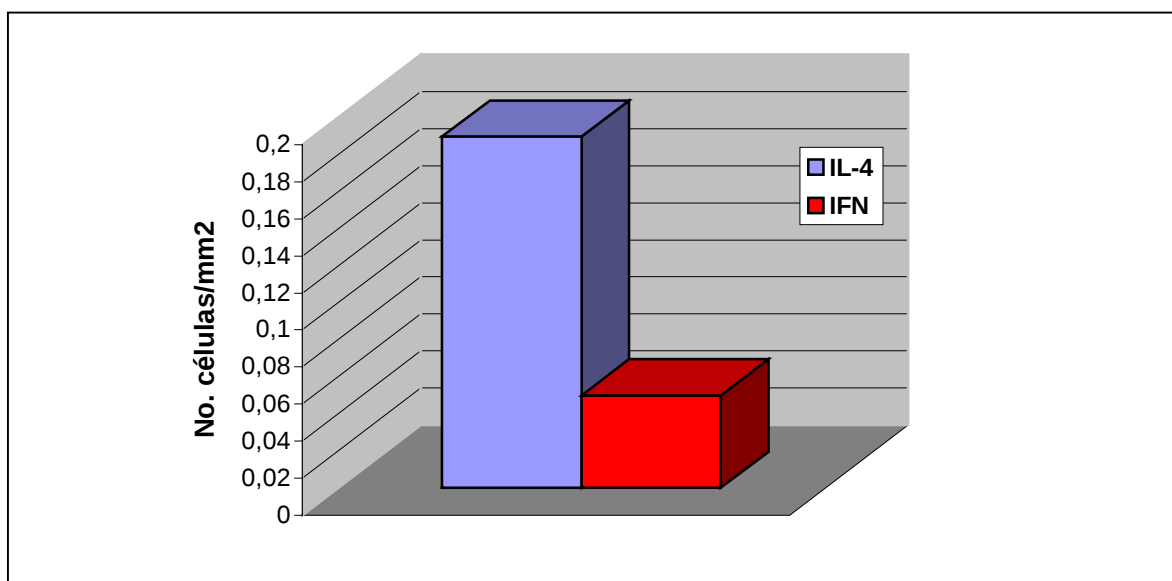


Figura 12: Expressão de IL-4 e IFN- γ em lesões cutâneo-mucosas da forma crônica multifocal da paracoccidioidomicose.

4.3.2. IL-10, TNF- α e TGF- β 1

IL-10, TNF- α e TGF- β 1 foram detectados em todas as lesões cutâneo-mucosas de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicosse analisadas, num total de 24 biópsias para IL-10 e TNF- α e 21 para TGF- β 1. Para as três citocinas, observou-se imunomarcção positiva de células epitelióides, células gigantes e macrófagos dos granulomas, bem como de pequenas células mononucleares do infiltrado em torno destes e de células do epitélio pavimentoso estratificado superficial. Para TGF- β 1 também foram marcados fibroblastos e células musculares esqueléticas e para TNF- α , células endoteliais e leucócitos polimorfonucleares (Figuras 13 e 14).

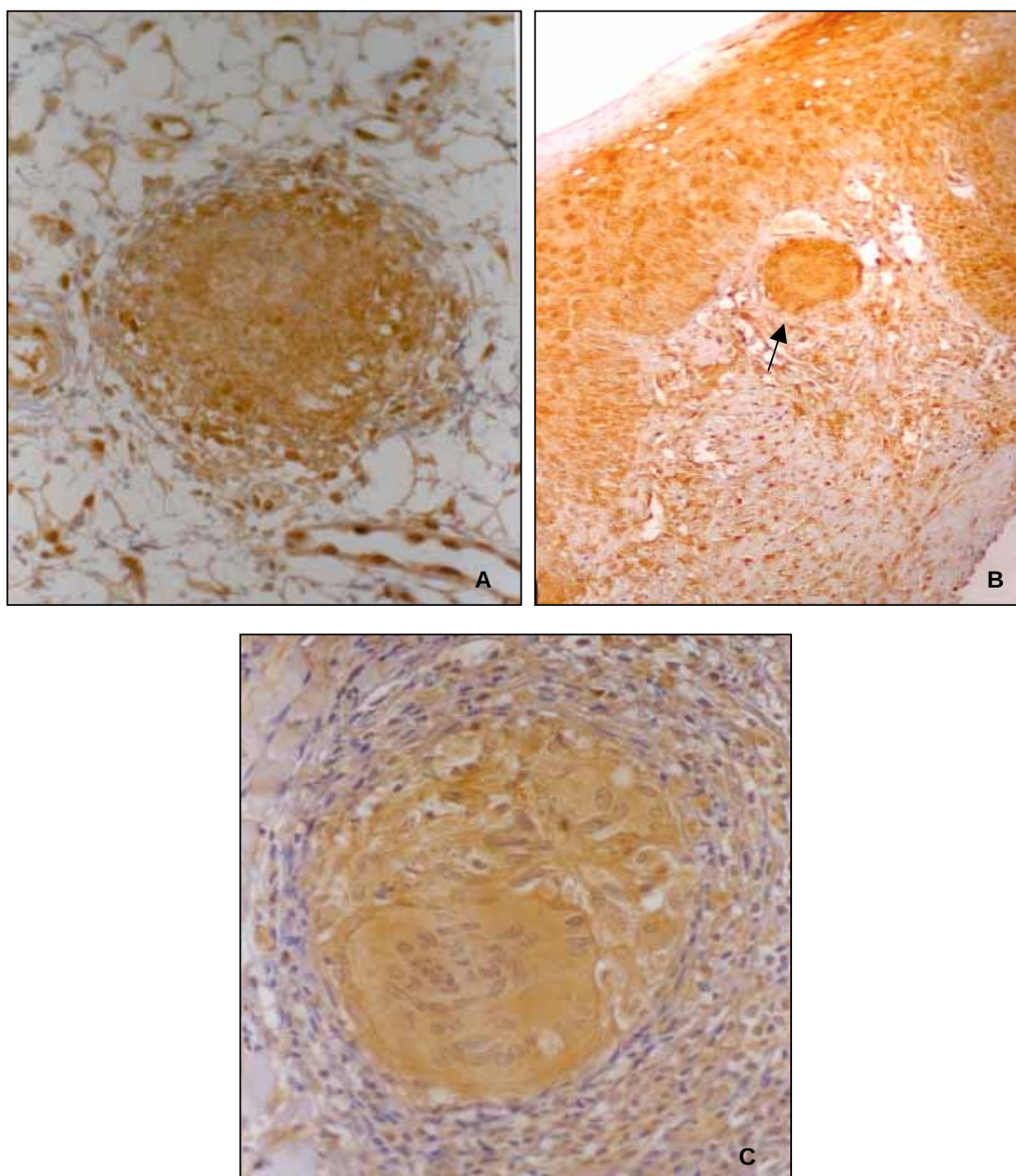


Figura 13: **A)** Granuloma epitelióide mostrando marcação para TNF-alfa, que também corou células endoteliais. IH – 400X. **B)** Epitélio pavimentoso estratificado, granuloma epitelióide (seta) e células do infiltrado inflamatório difuso da derme/cório mostrando intensa imunomarcação para TNF-alfa. IH – 100X. **C)** Granuloma paracoccidióidico mostrando células gigantes e células epitelióides marcadas para IL-10, numerosas células mononucleares do halo também se coraram positivamente. IH – 400X.

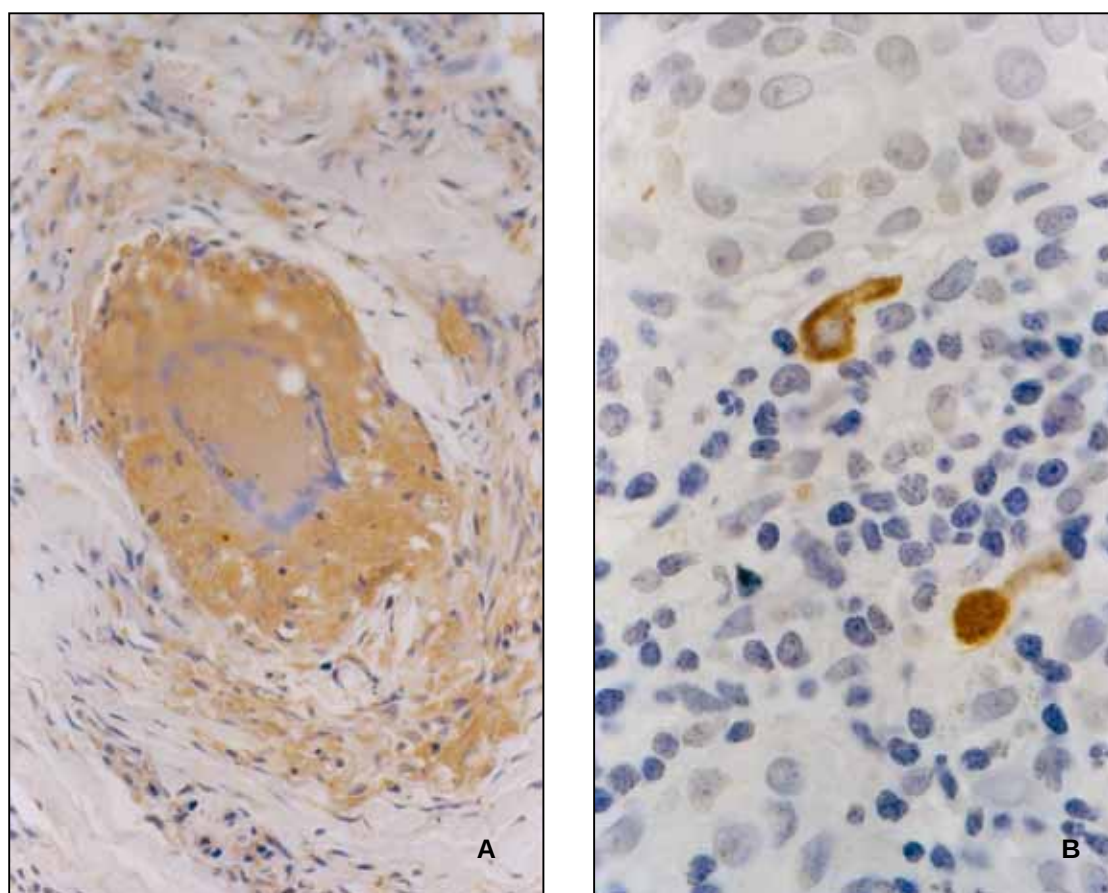


Figura 14: **A)** Granuloma paracoccidióidico mostrando imunomarcagem de células epitelióides e de célula gigante para TGF-beta. IH – 400X. **B)** Células do infiltrado inflamatório da derme/cório, com aspecto morfológico de macrófagos, apresentando marcação positiva para TGF-beta. IH – 1000X.

Resultados

A tabela 08 e a figura 15 mostram o perfil de expressão das três citocinas de acordo com os escores de imunomarcacão adotados. A presença de TGF- β 1 nas lesões teciduais foi significativamente menor em relação à de IL-10 e TNF- α , sendo que a expressão das duas últimas não mostrou diferença estatisticamente significativa (tabela 09).

Lesões de mucosa e pele mostraram diferenças significativas apenas em relação à presença de IL-10, que foi mais acentuada nas biópsias de mucosa (tabela 10).

Tabela 08: Distribuição de IL-10, TGF- β 1 e TNF- α nas lesões cutâneo-mucosas de pacientes portadores da forma crônica multifocal da paracoccidiodomicose.

<i>Escores de imunomarcção</i>	<i>IL-10 N (%)</i>	<i>TNF-α N (%)</i>	<i>TGF-β1 N (%)</i>
+	1 (4,2)	0 (0,0)	1 (4,8)
+ / + +	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,8)
+ +	2 (8,3)	3 (12,5)	4 (19,1)
+ + / + + +	7 (29,2)	2 (8,3)	12 (57,1)
+ + +	8 (33,3)	8 (33,3)	3 (14,3)
+ + + / + + + +	5 (20,8)	8 (33,3)	0 (0,0)
+ + + +	1 (4,2)	3 (12,5)	0 (0,0)
Total	24 (100,0)	24 (99,9)	21 (100,0)

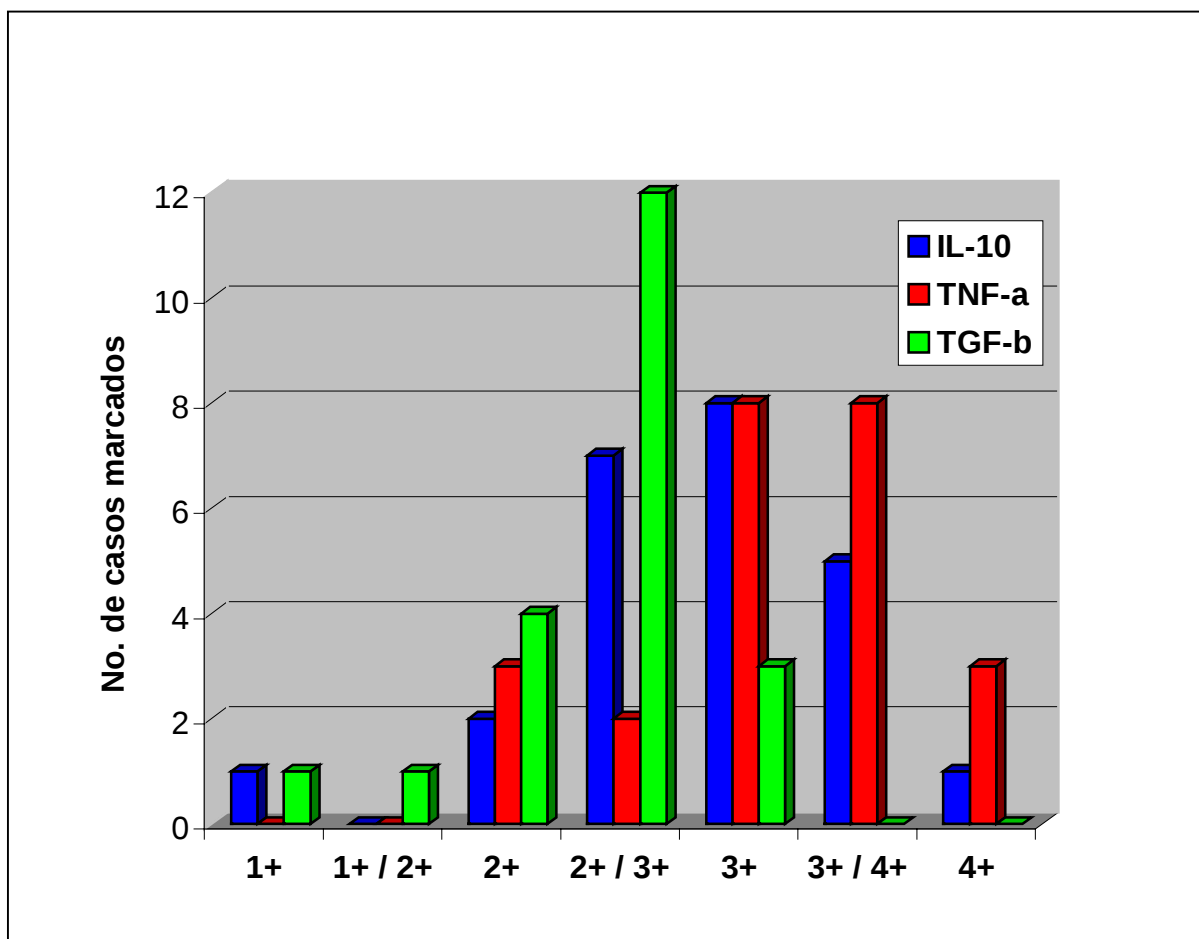


Figura 15: Distribuição de IL-10, TGF- β e TNF- α nas lesões cutâneo-mucosas de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

Tabela 09: Expressão de IL-10, TNF- α e TGF- β nas lesões cutâneo-mucosas de portadores da forma crônica da Pbmicose.

	<i>IL-10</i>	<i>TNF-α</i>	<i>TGF-β1</i>	<i>Significância*</i>
	<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>	
Escore				
da	+++	+++ / +++++	++ / +++	p < 0,001
imunomarcacão	(1+ — 4+)	(2+ — 4+)	(1+ — 3+)	
Significância**		G3 < G1 = G2		

Os resultados estão expressos como mediana, com escores mínimo e máximo entre parênteses.

* Teste de Friedman para mais de duas amostras dependentes.

** (p < 0,05) Teste de Tukey para múltiplas comparações.

Resultados

Tabela 10: Expressão de IL-10, TNF- α e TGF- β 1 em lesões de mucosa e de pele de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

<i>Local da biópsia</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-α</i>	<i>TGF-β1</i>
Mucosa			
(n = 10)	+++*	+++	++/+++
	(2+/ 3+ — 4+)	(2+/3+ — 4+)	(2+ — 3+)
Pele	++ / +++*	+++ /++++	++/+++
(n = 14)	(1+ — 3+/4+)	(2+ — 4+)	(1+ — 3+)

Resultados expressos como moda, com escores mínimo e máximo entre parênteses.

*p = 0,005 (Teste U de Mann Whitney).

4.4. Avaliação da imunidade humoral e celular

4.4.1. Determinação dos níveis séricos de anticorpos específicos anti-Pb

Anticorpos anti-Pb foram detectados em todos os pacientes. A distribuição dos títulos de anticorpos no soro dos pacientes está representada na tabela 11. O menor título observado foi 1:200 e o maior 1:204.800. Observamos dois picos de frequência, 33% dos pacientes apresentaram títulos entre 1:12.000 e 1:24.000 e 23,82% entre 1:48.000 e 1:96.000.

Tabela 11: Distribuição dos títulos de anticorpos séricos anti-Pb em portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

<i>Inverso da diluição dos soros</i>	<i>Pacientes com paracoccidioidomicose</i>
	<i>N (%)</i>
200 ┤ 6.000	1 (4,8)
6.000 ┤ 12.000	3 (14,3)
12.000 ┤ 24.000	7(33,3)
24.000 ┤ 48.000	2 (9,5)
48.000 ┤ 96.000	5 (23,8)
96.000 ┤ 192.000	2 (9,5)
192.000 ┤ 384.000	1 (4,8)
Total	21 (100,0)

4.4.2. Teste cutâneo da paracoccidioidina

A tabela 12 mostra a distribuição das respostas dos pacientes ao teste cutâneo da paracoccidioidina. A maioria dos pacientes (62,5%) respondeu positivamente.

Tabela 12: Distribuição das respostas ao teste cutâneo da paracoccidioidina em portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose.

Resposta ao teste da paracoccidioidina	Pacientes com paracoccidioidomicose N (%)
Positiva ($\geq 5\text{mm}$)	13 (61,9)
Negativa ($\leq 5\text{mm}$)	8 (38,1)
Total	21 (100,0)

4.5. Determinação dos níveis séricos de citocinas

Os níveis de IL-2 e IL-4 no soro de 13 pacientes e de 30 indivíduos sadios estão representados na tabela 15 e nas figuras 0 a 0. TGF- β 1 e IL-10 foram dosados no soro de 21 pacientes e de 22 indivíduos sadios (tabela 13 e figuras 16 a 18).

Não obtivemos sucesso na determinação dos níveis séricos de IFN- γ e TNF- α . Apesar de terem sido seguidas técnicas padronizadas nos laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de

Resultados

Biociências da UNESP e as recomendações do fabricante, a análise dos resultados referentes a essas duas citocinas no soro dos pacientes com paracoccidiodomicose e de indivíduos sadios faz considerar que os anticorpos utilizados não se encontravam em perfeito estado de conservação. Os referidos resultados destoaram de resultados prévios recentemente encontrados nesses mesmos laboratórios e de resultados da literatura. A falta de amostras adicionais de soro impossibilitou a repetição dos ensaios para averiguação dos resultados e checagem da sensibilidade e especificidade do método.

Os portadores da forma crônica multifocal da paracoccidiodomicose apresentaram níveis séricos de IL-2 significativamente reduzidos, e de TGF- β 1 significativamente elevados em relação aos dos indivíduos sadios. As concentrações séricas de IL-10 e IL-4 foram semelhantes em indivíduos doentes e controles sadios, não sendo observada nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Resultados

Tabela 13: Medianas das dosagens obtidas por ELISA de IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β 1 no soro de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose e de indivíduos saudáveis.

Citocinas (pg / ml)	Pacientes com Pb	Indivíduos saudáveis
IL-2	9,72* (0 – 413,0)	34,20 (0 – 2022,1)
IL-4	105,4 (77,4 – 457,1)	119,3 (71,80 – 1707,9)
IL-10	0 (0 – 4,4)	0 (0 – 4,0)
TGF- β	5447,9* (3706,9 – 8590,4)	4481,6 (2602,1 – 7717,5)

() Valores mínimo e máximo.

* $p < 0,05$ (Teste U de Mann Whitney)

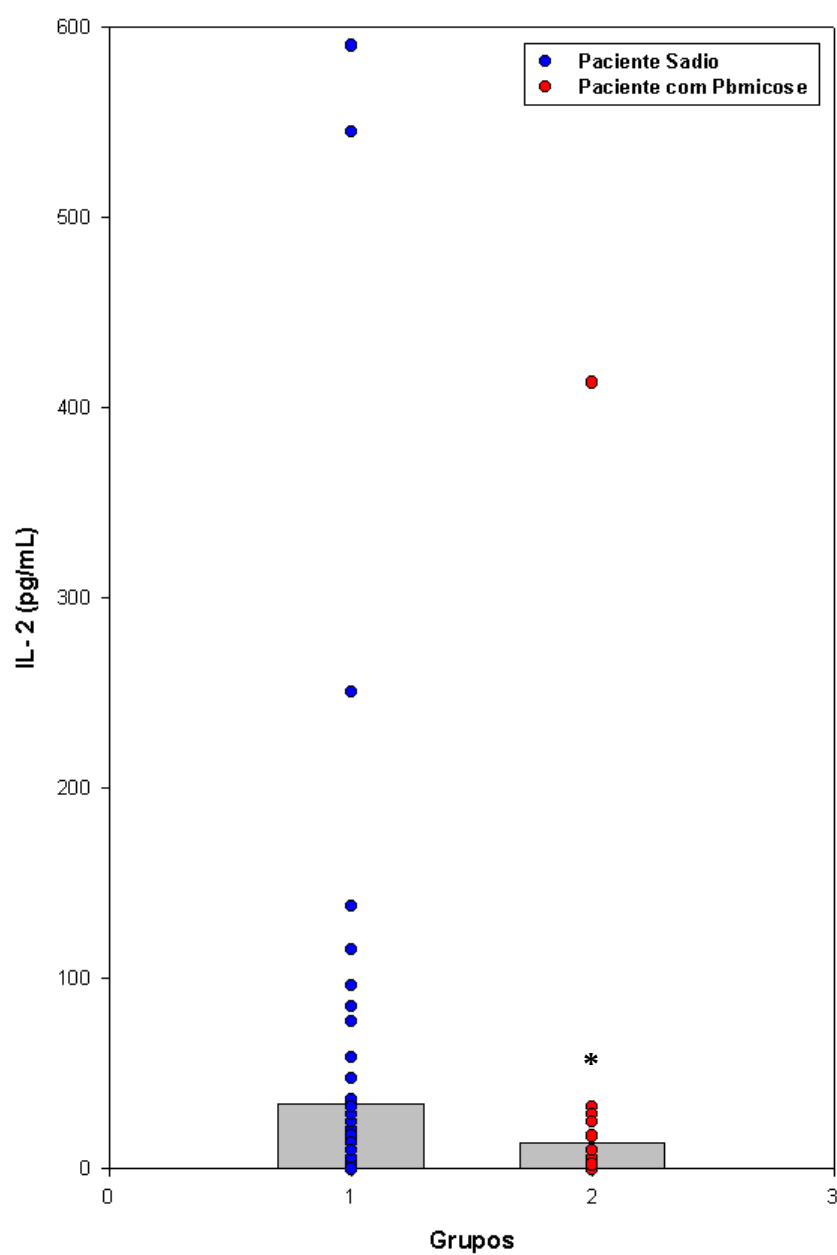


Figura 16: Valores de IL-2 e suas respectivas medianas (indicadas pelas barras) obtidos por ELISA no soro de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicos e de indivíduos sadios. * $p < 0,05$.

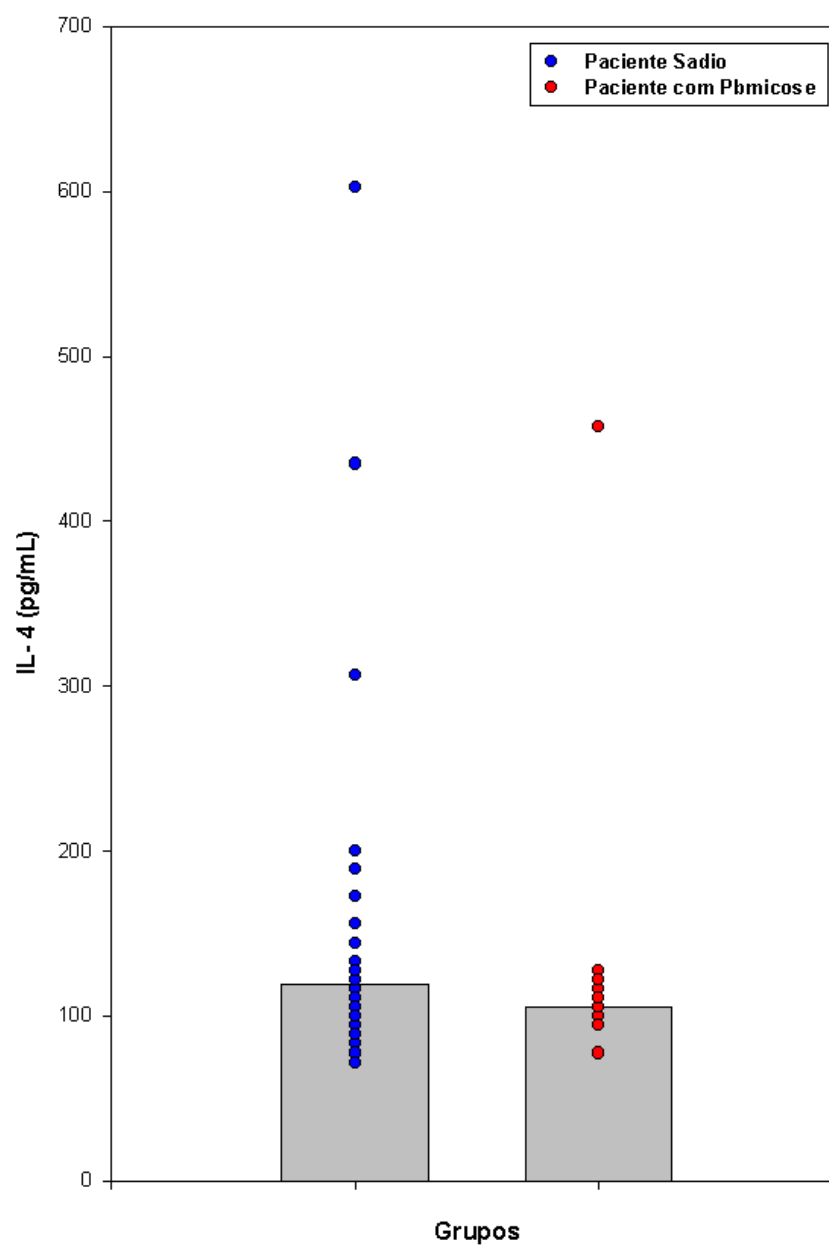


Figura 17: Valores de IL-4 e suas respectivas medianas (indicadas pelas barras) obtidos por ELISA no soro de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicosose e de indivíduos sadios.

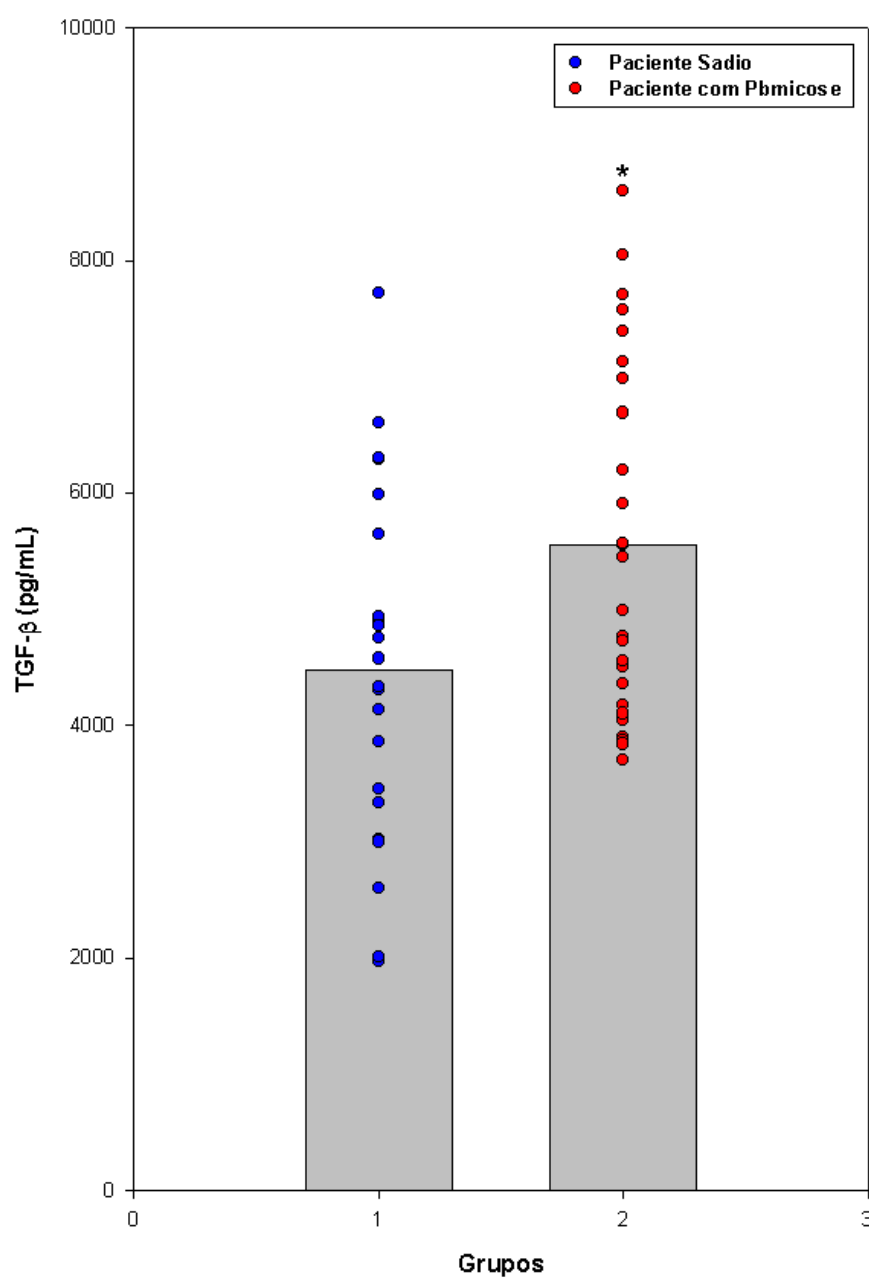


Figura 18: Valores de TGF- β 1 e suas respectivas medianas (indicadas pelas barras) obtidos por ELISA no soro de portadores da forma crônica multifocal da Pbmicosose e de indivíduos sadios. * p < 0,05.

4.6. Correlação entre gravidade clínica, níveis séricos das diversas citocinas, sua presença nos granulomas, imunidade humoral e celular, populações celulares e número de fungos presentes nas lesões granulomatosas

Utilizando o teste de correlação dos postos Spearman para análise dos diversos parâmetros abordados neste estudo, observamos:

- Correlação negativa entre gravidade clínica e a resposta ao teste cutâneo da paracoccidioidina ($r = - 0,4700$; $p = 0,032$).
- Correlação positiva entre gravidade clínica e níveis séricos de anticorpos específicos anti-Pb ($r = 0,9061$; $p < 0,001$).
- Correlação negativa entre a resposta ao teste cutâneo da paracoccidioidina e níveis séricos de anticorpos específicos anti-Pb ($r = - 0,5895$; $p = 0,030$).
- Correlação positiva entre a quantidade de fungos nas lesões e os níveis séricos de anticorpos específicos ($r = 0,5967$; $p = 0,019$).
- Correlação positiva entre os níveis séricos de IL-4 e IL-10 ($r = 0,4674$; $p = 0,047$).
- Correlação positiva entre os níveis séricos de IL-2 e a presença de IFN- γ nas lesões teciduais ($r = 0,6000$; $p = 0,032$).
- Correlação positiva entre a presença de IL-4 e a de IL-10 nas lesões teciduais ($r = 0,5114$; $p = 0,015$).

Resultados

- Correlação positiva entre a quantidade neutrófilos e a de fungos nas lesões teciduais ($r = 0,4279$; $p = 0,047$).
- Correlação positiva entre a quantidade de linfócitos B CD20+ e a presença de IL-10 nas lesões teciduais ($r = 0,5738$; $p = 0,004$).
- Correlação negativa entre os níveis séricos de IL-10 e o número de células NK nas lesões teciduais ($r = -0,4885$; $p = 0,047$).
- Correlação positiva entre o número de linfócitos T CD3+ e a expressão tecidual de IL-4 e IL-10 ($r = 0,4494$; $p = 0,031$ e $r = 0,5021$; $p = 0,015$, respectivamente).
- Correlação positiva entre o número de linfócitos T CD8+ e a expressão tecidual de IL-10 ($r = 0,7035$; $p = 0,004$).
- Correlação positiva entre o número de células NK e a expressão tecidual de IL-4 e IL-10 ($r = 0,5852$; $p = 0,003$ e $r = 0,5628$; $p = 0,005$, respectivamente).
- Ausência de correlação entre gravidade clínica e citocinas no soro ou nas lesões.
- Ausência de correlação entre os níveis séricos de anticorpos e citocinas no soro ou nas lesões.
- Ausência de correlação entre a resposta ao teste cutâneo da paracoccidioidina e citocinas no soro ou nas lesões.
- Ausência de correlação entre o número de fungos nas lesões e a gravidade clínica ou a resposta ao teste cutâneo da paracoccidioidina.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho estudamos em pacientes portadores da forma crônica pulmonar multifocal da Pbmicose, na fase pré-tratamento, as características da resposta granulomatosa em lesões de pele e mucosa, considerando suas populações celulares e a presença *in situ* de citocinas de padrão Th1 e Th2. Estes achados foram correlacionados com a gravidade clínica, níveis de competência imunológica humoral e celular e níveis séricos dessas mesmas citocinas.

Na sua forma crônica, a paracoccidioidomicose é doença que evolui lentamente, envolvendo número menor de sistemas orgânicos e afetando com maior frequência adultos do sexo masculino (FRANCO *et al.*, 1987). De maneira geral isto foi observado em nossa casuística. Constatamos predomínio do sexo masculino (92,6%), idades variando entre 22 e 68 anos, com idade média em torno de 48 anos.

Todos os pacientes apresentavam comprometimento pulmonar justificando o pulmão como porta de entrada para o fungo (WANKE & LONDERO, 1994). Comprometimento do tegumento cutâneo-mucoso também foi observado em todos os pacientes, com lesões envolvendo ora, apenas mucosa ou pele ora, os dois sítios simultaneamente. Envolvimento ganglionar e hepato-esplênico foi observado com frequência muito baixa. Esses dados são semelhantes aos relatos da literatura (DEL NEGRO, 1961; BRASS, 1969; FRANCO & MONTENEGRO, 1982).

As lesões de pele e mucosa estavam situadas nas localizações comumente descritas (MOTTA & PUPPO, 1936; PUPO, 1965). Em algumas dessas lesões constatamos a presença de vasculite sugerindo disseminação hematogênica da infecção.

5.1. HISTOPATOLOGIA

O estudo histopatológico das lesões do tegumento cutâneo-mucoso demonstrou as alterações histopatológicas clássicas já descritas por vários autores (BRITO *et al.*, 1973; FRANCO & MONTENEGRO, 1982; URIBE *et al.*, 1987). Em termos morfológicos, as lesões de pele e mucosa eram semelhantes e caracterizadas pela presença na derme/cório de inflamação crônica granulomatosa associada à inflamação inespecífica caracterizada por infiltrado difuso de linfócitos, plasmócitos, histiócitos, eosinófilos e neutrófilos. A resposta granulomatosa apesar de se manifestar, algumas vezes, pela presença de granulomas compactos e bem delimitados, freqüentemente exibia, em associação, granulomas desorganizados, frouxos, mal definidos. Esse aspecto foi explicado por FRANCO & MONTENEGRO (1982) como possivelmente decorrente da textura frouxa da derme/cório. Em virtude desta característica morfológica, não foi possível observar, como já descrito na Pbmicose (MOTA *et al.*, 1985), correlação entre morfologia do granuloma (se compacto e bem constituído ou frouxo e desorganizado) e aspectos da resposta imune-celular do paciente.

No epitélio estratificado chamaram a atenção a queratinização, hiperplasia epitelial, espongiose, presença de fungos e de células inflamatórias com formação de microabscessos e de alguns granulomas. cremos que essas alterações sejam decorrentes da presença do fungo com possível contribuição de citocinas e outros mediadores. Queratinócitos tornam-se ativados em resposta à injúria epidérmica, e assim, produzem e respondem a fatores de crescimento e citocinas (*apud* JIANG *et al.*, 1993). O fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator transformador do crescimento α (TGF- α) e o fator de crescimento epidérmico ligante de heparina (HB-EGF) atuam sobre queratinócitos induzindo proliferação e conferindo-lhes a capacidade de migração. Essa resposta é induzida não apenas durante a morfogênese normal das estruturas epiteliais, mas também sob condições patológicas, sendo que os três fatores são liberados em abundância após injúria (*apud* JIANG *et al.*, 1993; MARTIN, 1997). É possível que esses fatores estejam envolvidos na hiperplasia epitelial, que foi encontrada com tanta freqüência nas lesões cutâneo-mucosas. Constatamos também em nosso estudo, marcação positiva para TNF- α , IL-10 e TGF- β nas células epiteliais levando a suposição de que estas citocinas estejam de alguma forma envolvidas nessas alterações. TNF- α por exemplo, em culturas de queratinócitos, induz diminuição da proliferação, aumento da diferenciação, mas também incremento na produção de TGF- α (*apud* VASSALLI, 1992). TGF- β parece estimular a expressão de algumas subunidades de integrina facilitando a migração de queratinócitos (*apud* MARTIN, 1997). Talvez, o balanço entre ações pró e antiproliferativas possa

contribuir para a espessura epitelial nas lesões pbmicóticas. De qualquer forma, são necessárias mais investigações para obtenção de informações seguras sobre o assunto.

5.2. Fenotipagem e quantificação das populações celulares nas lesões granulomatosas

Em relação aos componentes celulares do granuloma paracoccidióidico, analisamos o número e o padrão de distribuição de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes, plasmócitos, linfócitos T CD3⁺ e CD8⁺, linfócitos B e células NK, estes três últimos caracterizados pela imuno-histoquímica. Neutrófilos foram elementos quase constantes da composição celular dos granulomas, sendo inferior em número apenas aos linfócitos T CD3⁺. Muitas vezes, se mostravam em íntima associação com as leveduras do Pb e, em algumas áreas, eram bastante numerosos. As lesões cutâneo-mucosas, como salientaram FRANCO & MONTENEGRO (1982), se comunicam com a superfície, resultando em infecção bacteriana secundária. Realmente, observamos, em alguns casos, colônias bacterianas sobre o epitélio superficial. É possível, portanto, que infecção bacteriana secundária também tenha contribuído para o número de neutrófilos nas lesões.

Experimentalmente, verificou-se na Pbmicose que o fluxo e acúmulo local de neutrófilos é uma das respostas iniciais do organismo à presença do fungo (IABUKI & MONTENEGRO, 1979; DEFAVERI *et al.*, 1982). Os

mecanismos responsáveis por esse recrutamento ainda não estão completamente elucidados, mas componentes do fungo provavelmente estão envolvidos. SILVA *et al.* (1994) investigando o papel dos carboidratos da parede celular do *Pb* no recrutamento de leucócitos, demonstraram que beta-glucana da fração F1 tem a capacidade de atrair neutrófilos e também macrófagos. Esse dado é compatível com os nossos achados de correlação positiva entre o número de fungos e o de neutrófilos presentes nas lesões teciduais. CALICH *et al.* (1985b) descreveram que a inoculação de leveduras do *Pb* na cavidade peritoneal de camundongos, induzia rica exsudação de neutrófilos (40-50% das células do exsudato). Depleção prévia de serotonina, prostaglandina, histamina e complemento não alteravam o curso da inflamação. Quando macrófagos peritoneais eram incubados com o fungo, liberavam fator solúvel que induzia quimiotaxia de neutrófilos *in vivo*. Esse fator foi caracterizado como de natureza protéica e com peso molecular abaixo de 15 KDa. Considerando que a fração F1 da parede celular do *Pb* induz *in vitro* secreção de TNF por macrófagos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993), podemos supor que o TNF- α é forte candidato para a lista dos possíveis mediadores envolvidos na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório na *Pbmicose*. Características do TNF- α , que o recomendam para essa função, são a capacidade de induzir expressão de ELAM-1 (poderoso indutor da marginação de neutrófilos) na superfície de células endoteliais, da proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP-2) e do fator quimiotático para neutrófilos induzido por citocina (KC), duas quimiocinas C-X-C envolvidas nos processos de rolagem,

adesão ao endotélio e migração de neutrófilos (LO *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 2001). Reforçando esta suposição, estão os achados de PINTO *et al.* (1997) em relação à ação da talidomida (um inibidor da síntese de TNF- α) sobre o influxo inflamatório pulmonar em camundongos infectados pela via intratraqueal com conídios do Pb. Verificaram que, 72 horas após a infecção, os animais tratados com talidomida, apresentaram substancial redução dos níveis de TNF- α e do influxo inflamatório no lavado bronco-alveolar, sugerindo que a migração de neutrófilos é influenciada pela produção local de TNF- α .

O neutrófilo é célula efetora da imunidade inata que desempenha importante papel na fagocitose e destruição de microorganismos, principalmente bactérias. Produz intermediários reativos do oxigênio importantes para sua ação microbicida e também, como foi recentemente demonstrado, óxido nítrico (NO) (*apud* DEL FABRO *et al.*, 2000). Esse fagócito e suas propriedades fungicidas parecem ser essenciais na prevenção da infecção por fungos oportunistas (LEHRER, 1972). No entanto, estudo comparativo *in vitro* sobre a susceptibilidade à destruição por neutrófilos de espécies fúngicas oportunistas e patogênicas, entre elas o Pb, demonstrou que espécies patogênicas eram resistentes à digestão por neutrófilos, ao contrário das oportunistas (SCHAFFNER *et al.*, 1986). Neutrófilos do sangue periférico de indivíduos portadores de Pbmicose parecem apresentar deficiência na capacidade digestiva das leveduras do Pb (GOIHMAN-YAHR *et al.*, 1980). Estudos em camundongos, normais ou imunizados com antígenos do fungo, mostraram que apenas os neutrófilos dos camundongos sensibilizados

apresentaram a capacidade de destruir o fungo, sugerindo que a imunização resulta em ativação de neutrófilos para destruição significativa desse patógeno (MCEWN *et al.*, 1987). Recentemente, KURITA *et al.* (1999 a, 1999 b e 2000) estudaram *in vitro* a capacidade fungicida de neutrófilos murinos e humanos contra o *Pb*. Suas observações demonstraram que esta é variável na dependência do isolado fúngico, requer contato entre neutrófilo e fungo e é intensificada por INF- γ e pelo fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), mas não por TNF ou IL-8. A combinação de INF- γ com GM-CSF ou IL-1 β exerceu efeito sinérgico na intensificação dessa resposta. Sugeriram então, que a participação de neutrófilos ativados ou não por IFN- γ , GM-CSF e/ou IL-1 β pode ser importante para a defesa do hospedeiro nas fases iniciais da infecção, seja pela atividade antifúngica aumentada ou por prover tempo para o desenvolvimento de respostas mais eficientes.

Devemos também considerar que neutrófilos parecem participar no desenvolvimento da resposta imune adaptativa. Foi demonstrado que defensinas e outros peptídeos presentes nos seus grânulos atraem monócitos, células dendríticas e linfócitos T. A liberação desses peptídeos poderia funcionar como elo de ligação entre a imunidade inata e a adaptativa (YAMASHIRO *et al.*, 2001). Além disso, neutrófilos são fonte de várias quimiocinas, fatores de crescimento e das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-8, cuja produção é modulada por INF- γ , IL-10, IL-4 e IL-13 (*apud* WITKO-SARSAT *et al.*, 2000). Assim, neutrófilos nas lesões teciduais da *Pbm*icose, poderiam participar dos processos de fagocitose e destruição do fungo, da indução de

resposta imune Th1 ou Th2, da formação do granuloma, terem suas funções moduladas tanto por células Th1 como Th2 e também contribuírem para a destruição tecidual.

Outra célula freqüentemente presente na inflamação granulomatosa pbmicótica são os eosinófilos. Em nosso material foram observados praticamente em todos os casos, porém em número pouco expressivo (0,5% do total de células). Eram encontrados no infiltrado em torno dos granulomas ou algumas vezes, permeando-os. Os eosinófilos estão presentes no sítio inflamatório de numerosos processos infecciosos, particularmente nas infecções por helmintos e também fúngicas (FINKELMAN *et al.*, 1997; ANDERSON *et al.*, 1985; ECHOLS *et al.*, 1982; DE CAMPOS *et al.*, 1992). Acredita-se que, nas infestações por helmintos, contribuam para a destruição extracelular do parasita mediada por anticorpos ou complemento (DAVID *et al.*, 1980; ANWAR *et al.*, 1979). Nas infecções fúngicas, particularmente na Pbmicose, sua função ainda é desconhecida. WAGNER *et al.* (1998) detectaram, na Pbmicose, a proteína básica principal (MBP) dos grânulos de eosinófilos no interstício das lesões micóticas, documentando assim, que eosinófilos liberam seus grânulos no micro-ambiente inflamatório. Sugeriram então, que eosinófilos através de produtos tóxicos como a MBP, participariam na fisiopatologia da Pbmicose. Questiona-se, também, se a eosinofilia transitória, observada em alguns pacientes portadores da forma aguda ou crônica da doença (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1986 e 1992), teria o mesmo

significado clínico de indicador de mau prognóstico como observado na coccidioidomicose (SCHERMOLY & HINTHORN, 1988).

O eosinófilo apresenta várias habilidades: capacidade de apresentação de antígenos (MAWHORTER *et al.*, 1994); capacidade de destruição extracelular de parasitas (ANWAR *et al.*, 1979; SHAW *et al.*, 1985); de fagocitose de complexos imunes antígeno-anticorpo (LITT, 1964); de fagocitose *in vitro* de vários microorganismos incluindo *Cândida albicans* (ISHIKAWA *et al.*, 1972), *Cryptococcus neoformans* (FELDMESSER & CASADEVALL, 1997) e micobactérias (CASTRO *et al.*, 1991). Além disso, participa no processo de remodelação tecidual (TODD *et al.*, 1991); produz uma grande variedade de citocinas: IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, TGF- α/β , GM-CSF, TNF- α e IFN- γ , podendo influenciar, entre outros processos, a proliferação e função de linfócitos (*apud* ROTHENBERG *et al.*, 2001) e induzir dano tecidual e disfunção pela liberação de mediadores lipídicos (fator ativador de plaquetas – PAF e leucotrieno C4), proteínas tóxicas dos grânulos como MBP, proteína catiônica, peroxidase e neurotoxina (ROTHENBERG, 1998).

Linfócitos Th2 e seus produtos, principalmente IL-5, mas também IL-4 e IL-13, regulam o desenvolvimento de eosinofilia e infiltração pulmonar por eosinófilos após desafio com alérgeno. IL-5, produzida por linfócitos T ativados, induz proliferação e diferenciação de precursores na medula óssea e promove a sobrevivência, ativação e quimiotaxia destas células (*apud* ROTHENBERG *et al.*, 2001). Na criptococose experimental murina, há relatos de que o recrutamento

de eosinófilos é dependente da presença de linfócitos T CD4⁺ (HUFFNAGLE *et al.*, 1994).

Tomando esses dados em conjunto, podemos inferir que, na Pbmicose, a presença de eosinófilos nas lesões granulomatosas é concomitante à de células Th2 ativadas e que o eosinófilo poderia exercer funções efetoras importantes não somente na proteção contra o fungo, mas também contribuindo para ou limitando o dano tecidual, cuja comprovação requer estudos adicionais. Não observamos correlação entre o número de eosinófilos e qualquer dos outros parâmetros analisados.

Células gigantes multinucleadas (CGM) do tipo Langhans ou corpo estranho foram vistas em todas as biópsias, ou fazendo parte do agregado central, que juntamente com as células epitelióides, constituía o granuloma, ou dispersas de forma desorganizada pelo infiltrado de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos e neutrófilos. Frequentemente, no seu citoplasma, eram encontrados fungos, restos do fungo ou outros leucócitos, principalmente, neutrófilos. Têm origem a partir da fusão de monócitos ou macrófagos (MÖST *et al.*, 1997), não sendo ainda bem conhecidos os mecanismos responsáveis por esse processo. Em culturas de monócitos de longa duração, pode haver aparecimento espontâneo, em graus variáveis, de CGM (DOUGHERTY & MCBRIDE, 1989). Pode haver várias maneiras de induzir sua formação *in vitro*: uso de anticorpos ou de acetato miristato de phorbol (PMA) isolada ou associadamente (PTAK *et al.*, 1970; CHAMBERS, 1978; HASSAN *et al.*, 1989); de meios condicionados (KREIPE *et al.*, 1988; POSLETHWAITE *et al.* 1982) ou

de citocinas como IFN- γ , IL-3, IL-4 e GM-CSF (ABE *et al.*, 1991; ENELOW *et al.*, 1992a; FAIS *et al.*, 1994; KAZAZI *et al.*, 1994) e de lectinas isoladamente ou em combinação com IFN- γ (CHAMBERS, 1978; TAKASHIMA *et al.*, 1993). Experimentos *in vivo* fornecem fortes evidências de que IFN- γ é fator importante na geração de GCM (BELOSEVIC *et al.*, 1989; CHENSUE *et al.*, 1992). Existem controvérsias quanto à sua função. MARIANO & SPECTOR (1976) sugeriram que são constituintes do granuloma praticamente sem nenhuma utilidade. HILL (1992) estudando a participação delas na criptococose experimental murina, considerou-as de vital importância para a seqüestração e contenção da disseminação do *C. neoformans*. ENELOW *et al.* (1992b) acreditam que a formação das CGM é adaptação que intensifica a atividade fagocítica capacitando para degradação e eliminação de agentes resistentes à destruição por macrófagos. A presença freqüente de leveduras do *Pb*, muitas vezes parcial ou quase completamente destruídas, no interior de células gigantes, sugere que elas sejam importantes efetores na seqüestração e destruição do fungo.

Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que CGM produzem diversas citocinas como IL-1 α e β , TNF- α , IL-6 e TGF- β e devem ser, portanto, elementos celulares ativamente envolvidos na formação e renovação (*turnover*) do granuloma, na destruição do agente infeccioso e na indução do processo de fibrose ou cicatrização (SEITZER *et al.*, 1997; HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 2000). Células gigantes nas lesões granulomatosas da *Pbm*icose

apresentaram imunomarcagem para TNF- α , IL-10 e TGF- β sugerindo que essas células podem ser fontes dessas citocinas.

A presença de linfócitos B e plasmócitos foi detectada em todas as lesões, fazendo parte do halo peri-granuloma e/ou do infiltrado difuso da derme/cório. O papel dessas células na resistência aos patógenos fúngicos ainda não está esclarecido. Relatos da literatura ora, sugerem sua participação ora, negam. Assim, existem observações de que camundongos CBA/N com linfócitos B defeituosos (baixa produção de imunoglobulina M [IgM] e IgG) montaram respostas à *C. albicans* comparáveis às de camundongos imunocompetentes CBA/J (CARROW *et al.*, 1984). Outro estudo, no entanto, descreve que camundongos com depressão de linfócitos B apresentaram maior número de CFU nos tecidos após infecção cutânea em comparação com os controles, sugerindo a participação de linfócitos B na imunidade protetora contra a *C. albicans* (MOSER & DOMER, 1980). AGUIRRE & JOHNSON (1997) estudaram o papel de linfócitos B na imunidade contra o *C. neoformans*, e na opinião deles, linfócitos B poderiam ser importantes na defesa do hospedeiro contra este fungo quando a imunidade mediada por células está prejudicada.

Em lesões de pacientes portadores de Pbmicose foram detectados plasmócitos IgG, IgM e IgA. Plasmócitos IgG eram numericamente superiores e plasmócitos IgA foram mais encontrados nas lesões de tegumento (MOTA *et al.*, 1979). Nas lesões teciduais da Pbmicose murina, MOSCARDI-BACHI (1988) não detectou plasmócitos IgM e observou que plasmócitos IgG

aumentaram significativamente com a evolução da infecção. A presença de plasmócitos e linfócitos B em lesões de várias doenças granulomatosas, inclusive na Pbmicose, sugere a sua participação nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Um provável mecanismo seria a secreção local de imunoglobulinas específicas, que atuariam bloqueando a difusão dos antígenos do fungo (BIAGIONI *et al.*, 1987). Evidenciamos correlação entre o número de linfócitos B e a expressão *in situ* de IL-10, que pode ser coerente com os achados de ROUSSET *et al.* (1992) de que IL-10 induz proliferação de linfócitos B e secreção de grandes quantidades de IgG, IgA e IgM por essas células, quando ativadas. O que faz supor que essa citocina desempenhe importante papel na amplificação das respostas humorais.

Linfócitos T foram as células predominantes em praticamente todas as lesões granulomatosas, sugerindo que sejam importantes neste tipo de resposta. A principal célula efetora na defesa contra o Pb parece ser o fagócito mononuclear (BRUMMER *et al.*, 1990; KASHINO *et al.*, 1995). Algumas das suas funções efetoras, além de fagocitose, incluem produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) e limitação da disponibilidade de ferro intracitoplasmático. Em geral, esses mecanismos só são induzidos ou realizados com eficiência após ativação apropriada. Fagócitos mononucleares e suas células derivadas são também os elementos essenciais da resposta granulomatosa. Na pbmicose, linfócitos T sensibilizados estão profundamente envolvidos tanto na ativação dos fagócitos mononucleares para destruição do Pb como na formação e modulação das lesões granulomatosas (BRITO &

FRANCO, 1994; DEFAVERI *et al.* 1984). A importância dos linfócitos T na defesa contra o Pb foi demonstrada na infecção experimental de camundongos atímicos, onde foi possível constatar o papel dessas células no controle da disseminação do fungo e na prevenção da morte precoce dos animais (BURGER *et al.*, 1996). A correlação positiva entre o número de linfócitos T CD3⁺ e a expressão de IL-10 e de IL-4 nas lesões teciduais sugere que estas células possam estar contribuindo para a produção das duas citocinas e que, portanto, células Th2 ou Th0 ativadas estejam presentes nas lesões pbmicóticas.

A avaliação da contribuição relativa das sub-populações de linfócitos T na resistência contra patógenos tem demonstrado algumas diferenças na dependência do microorganismo envolvido. Na tuberculose, linfócitos T CD4⁺ parecem exercer papel dominante com alguma contribuição de linfócitos T CD8⁺ (PEDRAZZINI *et al.*, 1987; ORME *et al.*, 1992). Ao contrário, na listeriose linfócitos T CD8⁺ são mais importantes com um papel menor dos linfócitos T CD4⁺ (MIELKE *et al.*, 1989). Essas diferenças parecem se relacionar, basicamente, com o reconhecimento diferencial da célula alvo: o bacilo da tuberculose parasita apenas fagócitos mononucleares positivos para o MHC de classe II e são altamente resistentes à destruição intracelular, assim proteção depende principalmente de linfócitos T CD4⁺; por outro lado, *L. monocytogenes* é rapidamente destruída por fagócitos profissionais, mas também parasita fagócitos não profissionais negativos para o MHC de classe II, o que torna a proteção dependente de linfócitos T CD8⁺. Como a tuberculose apresenta

evolução crônica isso indica que a proporção de linfócitos T CD4 > CD8 é sub-ótima e uma forte participação de linfócitos T CD8⁺ poderia ser benéfica (KAUFMANN, 1993). Acreditamos, que na Pbmicose, se verifique situação similar à tuberculose. O trabalho de MOSCARDI-BACHI *et al.*, (1988) caracterizando as sub-populações linfocitárias nas lesões teciduais da Pbmicose humana, evidenciou predominância de linfócitos T CD4⁺ com poucos linfócitos T CD8⁺. Em nosso estudo, em que caracterizamos a população T CD8⁺, observamos que sua participação nas lesões granulomatosas foi razoavelmente expressiva, representando 15,8% a 66,7% da população de linfócitos T totais, com uma média geral de 33,2%. Verificamos forte correlação positiva entre a expressão de IL-10 e o número de linfócitos T CD8⁺, que pode ser explicada pelo efeito quimiotático da IL-10 sobre linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico (*apud* MOORE *et al.*, 1993) e também que essas células possam estar contribuindo para a produção local da citocina.

Linfócitos T CD8⁺ desempenham papel na redução do crescimento de vários patógenos intracelulares como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* e *Micobacterium tuberculosis*. Na infecção experimental murina pelo *T. cruzi*, linfócitos T CD8⁺ parecem ser críticos para iniciação das respostas inflamatórias locais que levarão à eliminação do parasita (*apud* MILON & LOUIS, 1993). Na Pbmicose experimental murina de animais susceptíveis e resistentes, a depleção *in vivo* de linfócitos T CD8⁺ não alterou a organização das lesões granulomatosas ou a produção de anticorpos específicos, mas aumentou a disseminação fúngica para tecidos

extrapulmonares embora sem alterar o número de fungos no pulmão de camundongos resistentes. Nos animais susceptíveis prejudicou o clareamento do fungo no pulmão e aumentou a disseminação do patógeno para baço e fígado. Assim, linfócitos T CD8⁺ parecem contribuir para a destruição do Pb em camundongos infectados, sendo que em animais susceptíveis a atividade protetora pareceu mais proeminente (CANO *et al.*, 2000). Em nosso estudo não observamos correlação do número de linfócitos T CD8⁺ com o número de fungos nas lesões, sugerindo que o papel dos linfócitos T CD8⁺ não seja tão importante na forma crônica da doença humana, talvez por contribuírem mais nas fases iniciais da infecção, ou porque o número de casos analisados não foi suficiente para demonstrar diferenças estatisticamente significativas.

Estudos prévios da distribuição de linfócitos nas lesões granulomatosas da Pbmicose concordam com os nossos achados (MOSCARDI-BACHI, 1988; MOSCARDI-BACHI *et al.*, 1989; DEFAVERI, 1999; CAMPANELLI, 1998): linfócitos T distribuídos no halo periférico ao redor do agregado de células epiteloídes e células gigantes com permeação por poucos deles. A subpopulação CD8⁺ fazia parte do halo periférico, exceto nos granulomas mal organizados, em que toda a população T se distribuía difusamente entre os fagócitos mononucleares. Segundo MODLIN *et al.* (1983 e 1985), nesse último padrão há perda da capacidade de regulação dos mecanismos responsáveis pela contenção do patógeno.

Células NK foram detectadas nas lesões em proporções inferiores às de linfócitos T CD8⁺ mas superiores às de linfócitos B e plasmócitos. Células NK

são uma terceira população de linfócitos (grandes linfócitos granulares), sendo definidas fenotipicamente pela ausência de expressão de CD3 e expressão positiva de CD56. Participam da imunidade inata e parecem ser importantes nos estágios iniciais da infecção (SCOTT & TRINCHIERI, 1995). São capazes de determinar efeitos citotóxicos sobre células alvo e prover precocemente, durante o curso da infecção, uma fonte de citocinas imunorreguladoras podendo, portanto, contribuir para a regulação da imunidade adquirida (NAGLER *et al.*, 1990). Considerando a densidade de expressão superficial de CD56, as células NK humanas podem ser subdivididas em dois subconjuntos: CD56^{bright} e CD56^{dim} com distintas propriedades fenotípicas. Assim, CD56^{bright} apresentam acentuada resposta proliferativa a baixas doses de IL-2; são capazes, em seguida à ativação por monócitos, de abundante produção de citocinas incluindo INF- γ , TNF- β , IL-10, IL-13 e GM-CSF, mas possuem baixa citotoxicidade natural. Já CD56^{dim} não apresentam *in vitro* quase nenhuma resposta proliferativa a altas doses de IL-2, são naturalmente mais citotóxicas com produção desprezível de citocinas quando estimuladas *in vitro* com monocinas recombinantes (*apud* COOPER *et al.*, 2001). Células NK expressam receptores para várias monocinas incluindo IL-1, IL-10, IL-12, IL-15 e IL-18. A combinação adequada de monocinas parece ser importante para induzir células NK a produzir citocinas específicas. Dessa maneira, enquanto a combinação de IL-12 e IL-18 estimula a produção de IFN- γ por parte das células NK, IL-15 e IL-18 resultam na produção de GM-CSF e, IL-12 e IL-15 induzem expressão de níveis mais altos de IL-10. Esses dados sugerem que as

monocinas produzidas na fase inicial da infecção são provavelmente importantes na determinação da resposta das células NK (*apud* COOPER *et al.*, 2001).

A produção de IFN- γ por células NK parece ser importante para eliminação efetiva por monócitos de parasitas intracelulares obrigatórios como *L. monocytogenes*, *T. gondii* e *L. major* (BANCROFT *et al.*, 1991; BIRON & GAZZINELLI, 1995). Vários estudos demonstraram que células NK são importantes efetores na defesa contra fungos como *C. neoformans* e *C. albicans* (*apud* LEVITZ *et al.*, 1995; BISTONI *et al.*, 1983). Em relação a Pbmicose, JIMENEZ & MURPHY (1984) descreveram que células NK murinas eram capazes de limitar o crescimento *in vitro* do Pb. PERAÇOLI *et al.* (1991) estudaram o número e atividade de células NK em pacientes portadores da forma crônica e aguda da Pbmicose. Detectaram, nos dois grupos, número aumentado de células NK circulantes e diminuição da sua atividade citotóxica em relação aos controles sadios. Também foi avaliada a atividade de células NK durante o curso da infecção experimental Pbmicótica em hamsters. Esses animais mostraram atividade NK significativamente aumentada durante as primeiras 4 semanas de infecção, que diminuiu da 8^a semana em diante. A diminuição da atividade citotóxica associou-se com a depressão da imunidade mediada por células e com a maior extensão das lesões e mostrou correlação inversa com os níveis de anticorpos específicos. Os autores sugeriram que após a ativação inicial, as células NK foram incapazes de controlar a disseminação fúngica e que a sua atividade diminuída nos estágios tardios da

infecção, deveria estar relacionada aos distúrbios imunorregulatórios associados com a Pbmicose (PERAÇOLI *et al.*, 1995). Em nosso estudo, a correlação negativa entre níveis séricos de IL-10 e número de células NK nas lesões sugere que IL-10 possa ter efeito inibitório sobre a proliferação de células NK ou de seus precursores na medula óssea. Observamos também correlação positiva entre a expressão de IL-10 e IL-4 e o número de células NK nas lesões, sugerindo que estas células possam estar contribuindo para a produção local dessas citocinas. Não houve, em nosso estudo, correlação entre gravidade clínica e número de células NK nas lesões, sugerindo que o papel delas seja mais importante nas fases iniciais da infecção.

5.3 Detecção de citocinas nas lesões granulomatosas

A imunomarcagem para as citocinas IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e TGF- β foi realizada pelo método imuno-histoquímico em material fixado em formalina 10% e incluído em parafina. Consideramos vantajosa a realização da técnica em material incluído em parafina e não em material congelado, uma vez que possibilita melhores detalhes morfológicos e também seu emprego em material de arquivo.

Com relação à expressão das citocinas IFN- γ e IL-4, nas lesões de pele e mucosa, observamos perfis sugestivos de resposta Th0 ou mistura Th1/Th2 em alguns casos, e Th2 predominante em outros. Assim, IFN- γ e IL-4 foram detectados em pequenas células mononucleares presentes em pequeno

número e distribuídas no infiltrado em torno dos granulomas. Foram vistos quatro padrões de reatividade: IL-4 + / INF- γ +; IL-4+ / INF- γ -; IL-4 - / INF- γ + e IL-4 - / INF- γ - . O padrão IL-4 + / INF- γ + foi o mais freqüente, e esteve presente em 39,1% das biópsias. Embora, a quantidade de células marcadas para IL-4 aparentasse ser maior que a de células marcadas para IFN- γ não foram observadas diferenças significativas estatisticamente.

INF- γ é citocina produzida por linfócitos Th1 ativados, linfócitos T CD8⁺ ativados do fenótipo Tc1, células NK ativadas e macrófagos (MOSMANN & COFFMAN, 1989; *apud* BOEHM *et al.*, 1997 e WANG, *et al.*, 1999). Tem a capacidade de regular vários aspectos da resposta imune incluindo: estimulação das propriedades microbidas de fagócitos; estimulação da apresentação de antígenos através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II; regulação da interação leucócitos/endotélio; etc. A resposta ao INF- γ é regulada pela interação com outras citocinas, entre elas IL-4 (*apud* BOEHM *et al.*, 1997).

INF- γ e IL-4 exercem várias ações antagônicas. Assim, IL-4 inibe ações efetoras do INF- γ mediadas pela resposta Th1, como por exemplo, a ativação de macrófagos, a indução da explosão respiratória (LEHN *et al.*, 1989) e da sintase induzida de óxido nítrico (iNOS) (LIEW *et al.*, 1991). Da mesma maneira, INF- γ inibe manifestações efetoras da modalidade Th2 como a indução do receptor Fc ϵ RII ou do MHC de classe II em linfócitos B em repouso (ROUSSET *et al.* 1988).

Vários experimentos *in vitro* demonstraram que macrófagos murinos peritoneais e pulmonares e também monócitos/macrófagos humanos, são permissivos ao crescimento intracelular do *Pb*, sendo ativados por INF- γ para destruição do fungo (MOSCARDI-BACHI *et al.*, 1994; BRUMMER *et al.* 1988a,b e 1989). Confirmação *in vivo* desse dado foi verificada quando camundongos congenitamente deficientes em INF- γ foram infectados i.v. pelo *Pb* 18. Foi observada 100% de mortalidade após 16 dias de infecção devido à disseminação precoce do fungo para fígado, baço e pulmões. Os animais além de se mostrarem incapazes de controlar a infecção, apresentaram também intensa reação inflamatória com formação de granulomas incipientes contendo numerosas leveduras fúngicas (SOUTO *et al.*, 2000). Esses achados sugerem também uma possível participação do IFN- γ na formação dos granulomas.

CANO *et al.* (1998) utilizando modelo murino de pbmicose pulmonar, induzida por via intratraqueal, em animais resistentes e susceptíveis, estudaram o perfil de citocinas produzidas no sítio da infecção. Não observaram um padrão de resposta polarizado Th1 ou Th2, mas em vez disso uma mistura de citocinas, com níveis mais altos de INF- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pulmões dos animais susceptíveis. Inferiram então, que em camundongos resistentes, os baixos níveis de citocinas de tipo 2, no sítio da infecção, resultaram em efeito prevalente do INF- γ . Já nos animais susceptíveis, apesar dos altos níveis de INF- γ , os níveis também altos de citocinas do tipo 2 foram suficientes para modular negativamente a ativação de macrófagos e respostas

de hipersensibilidade tardia (DTH), resultando em disseminação do fungo para sítios extrapulmonares.

Nossos achados também mostraram essa mistura de citocinas de tipo 1 e 2 e, corresponderam, em muitos aspectos, aos observados por DEFAVERI (1999) e CAMPANELLI (1998) na pbmicose pulmonar experimental murina, também utilizando o método imuno-histoquímico. CAMPANELLI descreveu a expressão de INF- γ durante todo o curso da infecção experimental sendo maior nas fases iniciais. Sugeriu então, que a produção de INF- γ resultaria em ativação de macrófagos contribuindo para a eliminação do fungo, o que foi corroborado pela demonstração de que, no período em que maior número de células expressavam a citocina houve também redução na recuperação de colônias fúngicas. Em relação a IL-4, relatou expressão da citocina em níveis basais do sétimo ao vigésimo primeiro dia com aumento significativo no percentual de células positivas a partir daí, o que interpretou como indicação de padrão de resposta Th2 na fase tardia da infecção.

DEFAVERI identificou células IL-4 positivas desde as fases iniciais da infecção sugerindo que isto corroborava a importância da resposta imune humoral na cinética do granuloma, enquanto que células positivas para INF- γ foram identificadas sempre em pequeno número, na periferia das lesões, a partir da 4^a semana de infecção.

HOSTETLER *et al.* (1993) estudaram a presença de IL-4 e INF- γ em sobrenadantes de culturas de células de linfonodos (LNC) de camundongos infectados com *Pb* em modelo de infecção progressiva e em modelo de

infecção não progressiva. No modelo de infecção não progressiva observaram produção de IL-4 e IFN- γ associada com doença em processo de lenta resolução. No modelo de infecção progressiva, houve produção de IL-4, mas não de IFN- γ associada a níveis séricos elevados de IgE. Sugeriram então, que a resposta do hospedeiro à infecção pode ser parcialmente mediada por balanço das respostas Th1 e Th2, estando a progressão associada com predominância da resposta Th2.

Não observamos correlação entre a expressão de IL-4 e IFN- γ nas lesões e a gravidade clínica do paciente. Esse achado foi similar ao observado por FENHALLS *et al.* (2000) estudando a expressão de RNAm de IL-4 e de IFN- γ em granulomas pulmonares de pacientes com tuberculose. Esses autores sugerem que a presença de IL-4 nas lesões pode não ser um indicador de mau prognóstico, mas em vez disso, um achado integral da formação do granuloma tuberculoso, desempenhando papel no controle do dano tecidual.

TNF- α , IL-10 e TGF- β foram expressas por diferentes tipos celulares nas lesões cutâneo-mucosas da Pbmicoze. Apenas estudos de biologia molecular poderão confirmar quais tipos realmente produzem as citocinas e quais apenas as endocitaram.

TNF- α foi expresso nos granulomas por células epitelióides e células gigantes e também por células do epitélio superficial, células endoteliais, macrófagos, pequenas células mononucleares e polimorfonucleares. IL-10 foi expressa pelos mesmos tipos acima descritos com exceção de células

endoteliais e polimorfonucleares. E, TGF- β pelas mesmas células que expressaram IL-10 acrescidas de fibroblastos e fibras musculares esqueléticas.

A presença de TGF- β foi significativamente menor quando comparada à de TNF- α e de IL-10. A expressão das duas últimas não apresentou diferenças com significado estatístico.

Estudos *in vitro* demonstraram a produção de TNF- α por macrófagos de hamsters e camundongos e monócitos humanos induzida pelo Pb, mais precisamente, por constituintes da parede celular do fungo ricos em β -glucana (*apud* PERAÇOLI, 2000; FIGUEIREDO, 1993). Em várias doenças granulomatosas como tuberculose e esquistossomose, TNF- α é considerado fundamental para a formação, organização e manutenção da resposta granulomatosa (BEAN *et al.*, 1999; CHENSUE *et al.*, 1995; LUKACKS *et al.*, 1994). Esse papel é consistente com as potentes atividades do TNF- α relacionadas ao recrutamento de monócitos, linfócitos e neutrófilos, através da indução de moléculas de adesão (POBER *et al.*, 1986) e aumento da produção de quimiocinas (KUNKEL, 1990). Essas quimiocinas atraem monócitos para o sítio infeccioso, estimulam seu desenvolvimento em macrófagos maduros, sua diferenciação em células epitelióides e a formação de células gigantes (SUGA *et al.*, 1997). CALVI *et al.* (1996) demonstraram, em experimento *in vitro*, que TNF- α contribui também para a maior atividade fungicida de monócitos humanos contra o Pb, atuando sinergicamente com IFN- γ . SOUTO *et al.* (2000) relataram que na Pbmicose experimental de camundongos apresentando deficiência congênita do receptor de TNF- α p55 (p55KO), não houve formação

de granulomas. Em vez disso, observou-se nos pulmões dos animais, infiltração mononuclear difusa com numerosas leveduras fúngicas. Demonstraram assim, que TNF- α , atuando através do receptor p55, é importante para o controle da disseminação e crescimento do fungo e da resposta inflamatória.

PARISE-FORTES *et al.* (2000), em estudo da Pbmicosse experimental do hamster, reforçaram o papel do TNF- α na resistência contra o Pb, mas chamaram também a atenção para uma outra faceta da atuação desta citocina. Observaram que, os animais em estágio tardio da infecção, mostraram altos níveis de TNF- α associados à diminuição da atividade fungicida de macrófagos e perda da vitalidade e morte. Dados obtidos da tuberculose experimental murina sugerem que o efeito do TNF- α é influenciado pelas citocinas do meio. Assim, presença de TNF- α em um sítio de resposta Th1 é benéfica e aumenta o controle da infecção. Entretanto, em sítio de resposta Th0 ou Th2, TNF- α provoca aumento significativo na patologia tecidual (HERNANDEZ-PANDO & ROOK, 1994). Como demonstramos neste trabalho, há expressão concomitante de citocinas Th2 e de TNF- α nas lesões paracoccidióidicas, assim eventos semelhantes aos acima descritos na tuberculose poderiam também ter lugar na patogênese da Pbmicosse. SHEA & ROOK (2001) observaram que a apoptose de linfócitos T mediada pelo TNF- α é influenciada positivamente pela expressão de IL-4. Lembrando que, a apoptose de linfócitos T está relacionada a defeitos na função efetora da imunidade mediada por células em várias doenças infecciosas e que a depressão da imunidade

mediada por células é freqüentemente observada durante o curso da Pbmicose, não é impossível que a apoptose de linfócitos T mediada pelo TNF- α seja um dos mecanismos envolvidos nessas alterações. Ainda mais, resultados de vários estudos sugerem que as conseqüências da expressão de TNF- α , em diferentes modelos de doença, depende de vários parâmetros, incluindo o sítio de expressão e a duração da exposição: aumento da expressão de TNF em sítios locais de inflamação pode induzir efeitos muito diferentes daqueles induzidos por exposição sistêmica e os efeitos agudos do TNF podem diferir daqueles derivados da exposição crônica. E, exposição crônica ao TNF- α suprime respostas *in vitro* e *in vivo* de linfócitos Th1 e Th2 pela atenuação da sinalização do receptor de linfócitos T e esse efeito se torna mais pronunciado na doença inflamatória crônica (*apud* COPE *et al.*, 1997).

Portanto, na Pbmicose, TNF- α parece estar envolvido não apenas na proteção contra o fungo através da contribuição para a atividade fungicida de fagócitos mononucleares e iniciação e manutenção da resposta granulomatosa, mas também na sua imunopatogênese.

IL-10 e TGF- β são duas potentes citocinas imunorreguladoras, com propriedades antiinflamatórias e que não podem ser estritamente classificadas como citocinas específicas Th1 ou Th2, pois são produzidas por diversos tipos celulares, e na maioria dos processos inflamatórios, células da linhagem monocítica são as principais fontes de ambas (PRETOLANI, 1999; LETTERIO & ROBERTS, 1998).

Em humanos, IL-10 é produzida por linfócitos T CD4⁺, clones Th0, Th1 e Th2, linfócitos T CD8⁺, monócitos/macrófagos, queratinócitos e linfócitos B ativados. Suas propriedades antiinflamatórias são devidas à sua capacidade de suprimir a produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF e quimiocinas como IL-8 e a proteína inflamatória de macrófagos α (MIP- α) (FIORENTINO *et al.*, 1991; BOGDAN *et al.*, 1991; MOORE *et al.*, 1993). Essas citocinas e quimiocinas são muito importantes para a ativação de granulócitos, monócitos/macrófagos, células NK, linfócitos T e B, bem como para o seu recrutamento para o sítio inflamatório. Com relação aos macrófagos, IL-10 apresenta uma vasta amplitude de efeitos sobre sua função: regula a função acessória de macrófagos como APCs levando à supressão da síntese de citocinas Th1, além de inibir a produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e de intermediários reativos do oxigênio e do nitrogênio. Disso resulta inibição de todas as funções efetoras microbidas conhecidas de macrófagos ativados (*apud* GAZZINELI *et al.*, 1992).

Na infecção micobacteriana, a produção de IL-10 é induzida juntamente com a de TNF- α e IL-12. Utilizando camundongos deficientes em IL-10, JACOBS *et al.* (2000) demonstraram que esses animais eliminavam o *M. bovis* mais rapidamente que os controles selvagens, formavam granulomas significativamente maiores contendo mais APCs e linfócitos T e maior expressão de moléculas do MHC de classe II e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Além disso, os macrófagos dos granulomas expressavam altos níveis de TNF- α , fosfatase ácida e iNOS e a resposta do

teste cutâneo aos antígenos micobacterianos foi mais acentuada. Concluíram então, que a imunidade mediada por células está aumentada na ausência de IL-10, resultando em resposta granulomatosa mais robusta, que acelera o clareamento da micobactéria e que, portanto, IL-10 endógena atenua a imunidade contra a micobactéria.

MONARI *et al.* (1997) observaram que IL-10 exógena foi capaz de regular negativamente a capacidade de apresentação de antígenos de monócitos parasitados pelo *C. neoformans*. Isso aconteceu como consequência de redução da expressão de moléculas do MHC de classe II e refletiu numa proliferação reduzida de linfócitos T antígenos específicos e numa marcante inibição da produção de IL-2.

DINIZ *et al.* (2001) estudando modelo de formação *in vitro* do granuloma paracoccidióidico, descreveram que uma das frações antigênicas do Pb levou a diminuição significativa da proliferação celular e da formação do granuloma, ao mesmo tempo em que induziu significativa elevação da produção de IL-10. Sugeriram então, que IL-10 pode ser importante na regulação da formação do granuloma paracoccidióidico *in vitro*.

Do exposto, IL- 10 parece atuar na forma crônica multifocal da Pbmicose regulando a resposta inflamatória tecidual ao Pb, principalmente através da inibição das funções efetoras Th1. Dependendo do balanço dessa ação, resultaria ou redução do dano tecidual ou aumento da susceptibilidade ao patógeno. IL-10 estimula a proliferação e diferenciação de linfócitos B (ROUSSET *et al.*, 1992), o que justifica nossa observação de forte correlação

positiva entre a expressão de IL-10 nas lesões granulomatosas e o número de linfócitos B e sugere que o micro-ambiente dessas lesões favorece a resposta imune humoral.

Observamos correlação positiva entre a expressão intra-lesional de IL-10 e IL-4, sugerindo que a produção dessas duas citocinas esteja relacionada.

A expressão de TGF- β na resposta granulomatosa ao Pb parecer ter significado semelhante ao da IL-10: regular a resposta inflamatória e imune ao fungo. TGF- β é citocina pleiotrópica, multifuncional, com ações complexas incluindo inibição e estimulação dependendo, entre outros fatores, do seu gradiente de concentração, do meio de citocinas e do estado de diferenciação celular (McCARTNEY & WAHL, 1994; WAHL, 1994).

A isoforma TGF- β 1 é a mais abundante nos sítios de inflamação/injúria, e é a principal isoforma secretada por monócitos circulantes e macrófagos teciduais (ASSOIAN *et al.*, 1987). TGF- β recém liberado é inativo devido a sua associação com o peptídeo de latência associado (LAP) e a proteína ligante de TGF- β latente (LTBP). Mecanismos de ativação incluem baixo pH, ligação a trombospondina e proteólise envolvendo a plasmina e a manose-6-fosfatase (M-6-P) (*apud* ASHCROFT, 1999). TGF- β pode modular a expressão de moléculas de adesão, prover gradiente quimiotático para leucócitos e outras células participantes da resposta inflamatória, e inibi-las uma vez que se tornem ativadas (LETTERIO & ROBERTS, 1998). Pode determinar efeitos supressores da imunidade mediada por células em vários níveis: inibição da proliferação e função de linfócitos T (a inibição é mais considerável sobre

linfócitos CD4⁺ em relação aos CD8⁺) através, principalmente, da regulação negativa dos sinais proliferativos mediados pela IL-2; regulação negativa da expressão de HLA-DR nas APCs; redução da produção de IL-1 e TNF- α por monócitos; inibição da expressão de IFN- γ pelos linfócitos T em resposta a estímulo; etc (*apud* TOOSSI & ELLNER, 1998).

Em contraste com efeitos ativadores sobre monócitos do sangue periférico, TGF- β exerce ações, geralmente, supressoras sobre os macrófagos teciduais contribuindo para a resolução da resposta inflamatória (LETTERIO & ROBERTS, 1998). A desativação de macrófagos é tanto direta, pela inibição da geração de intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio, como indireta, antagonizando os efeitos das citocinas ativadoras de macrófagos, IFN- γ e TNF- α (DING *et al.*, 1990).

Em várias doenças infecciosas por patógenos intracelulares, a produção excessiva de TGF- β durante o seu curso está associada à susceptibilidade. Assim estudos da infecção murina pelo *T. cruzi* ou *in vitro* de macrófagos, mostraram produção de TGF- β na forma ativa, dentro de horas após a infecção, que inibia de maneira potente a destruição intracelular do parasita mediada pelo IFN- γ . A produção de TGF- β ativo *in vivo* durante a infecção de animais susceptíveis explicou porque, apesar desses animais apresentarem grande quantidade de IFN- γ circulante, evoluíam de maneira fatal. A observação de que camundongos geneticamente resistentes se tornavam susceptíveis quando TGF- β exógeno era administrado após a infecção,

reforçou a correlação entre aumento de TGF- β e susceptibilidade (*apud* REED, 1999).

Em relação à leishmaniose achados semelhantes foram relatados: isolados mais virulentos do parasita induzem maior produção de TGF- β *in vitro*; adição de TGF- β exógeno em culturas de macrófagos eliminou a habilidade dessas células de destruir *L. major* intracelular após tratamento com IFN- γ ; camundongos susceptíveis tratados com anticorpos monoclonais neutralizantes anti-TGF- β , após a infecção, desenvolveram fenótipo resistente à doença com lesões moderadas, tendendo à cura e baixos níveis de IL-4 (NELSON *et al.*, 1991; BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1999).

MORAES *et al.* (1996) estudaram a produção de TGF- β por células peritoneais de camundongos susceptíveis e resistentes após infecção *i. p.* com Pb 265 avirulento. Observaram que, TGF- β ativo foi produzido pelas duas cepas de camundongos um dia após a infecção, mas os animais susceptíveis produziram níveis maiores que os resistentes. No começo da infecção quase todo o TGF- β produzido estava na forma ativa e, com o progredir desta, a concentração relativa da citocina inativa aumentou, sugerindo que a sua ativação era altamente regulada.

Estudos adicionais mostraram que macrófagos peritoneais de camundongos resistentes desafiados com antígenos do Pb produziram altos níveis de TNF- α e pequena produção de TGF- β , ao passo que macrófagos de camundongos susceptíveis mostram um perfil oposto com altos níveis de TGF- β e baixos de TNF- α (*apud* CALICH & KASHINO, 1998).

Assim, acreditamos que a presença de TGF- β nas lesões da Pbmicose, como já foi mencionado, represente mecanismo regulador da resposta inflamatória ao fungo, podendo contribuir para menor dano tecidual ou, quando produzido em excesso, para a susceptibilidade ao patógeno. Nos nossos casos observamos que, a expressão de TNF- α nas lesões, foi significativamente maior que a de TGF- β , o que poderia representar um balanço entre a ação das duas citocinas favorecendo de certo modo as do TNF- α .

Um aspecto chama a atenção na Pbmicose: o freqüente desenvolvimento de seqüelas fibróticas, que quando acometem pulmão podem até implicar em limitações da capacidade respiratória dos pacientes (TUDER *et al.*, 1985; RESTREPO *et al.*, 1992). Nas nossas biópsias observamos presença de fibrose, em geral, discreta, excepcionalmente, mais importante em torno dos granulomas. A gênese desse processo ainda não está esclarecida, mas existem evidências sugerindo que citocinas possam contribuir promovendo ou inibindo a síntese de colágeno. Baseados em dados da literatura acreditamos que, das citocinas analisadas neste trabalho, TNF- α , TGF- β e IFN- γ possam estar envolvidos no processo de fibrose das lesões paracoccidióidicas.

Assim, TNF- α é quimiotático para fibroblastos e estimula o seu crescimento (POSTELTHWAITE & SEYER, 1990; BEUTLER & CERAMI, 1988). Além disso, a expressão exagerada da citocina em camundongos transgênicos é caracterizada por fibrose pulmonar (MIYAZAKI *et al.*, 1995) e receptores solúveis de TNF- α reduzem a fibrose pulmonar em modelos murinos (PIGUET & VESIN, 1994).

TNF- α poderia atuar em sinergia com TGF- β , que estimula a produção de várias proteínas da matriz extracelular, ao mesmo tempo, que inibe a degradação delas. TGF- β não somente está envolvido nos processos normais de cicatrização e remodelação tecidual bem como contribui para a patogênese da fibrose tecidual na maioria dos órgãos (*apud* BRANTON & KOPP, 1999). FRANCO *et al.* (1998) estudando modelo experimental de Pbmicose murina pela inoculação intranasal de conídios do Pb, relataram associação entre níveis persistentemente elevados de TNF- α e TGF- β com produção de granulomas e desenvolvimento de fibrose. IFN- γ inibe a síntese de colágeno por fibroblastos (ROSENBLOOM *et al.*, 1984), sugerindo assim, que o balanço dessas citocinas poderia contribuir para a modulação da fibrose na Pbmicose.

5.4. Pele *versus* Mucosa

Embora o padrão morfológico geral tenha sido semelhante em lesões de pele e mucosa, observamos algumas diferenças muito interessantes em relação aos dois sítios: a intensidade do processo inflamatório, às custas, principalmente, do número de plasmócitos e linfócitos T CD8⁺ e a expressão *in situ* de IL-10 foram significativamente maiores nas lesões de mucosa.

Acreditamos que esses achados sejam decorrentes dos diferentes tipos de células dendríticas (DCs) envolvidos na apresentação de antígenos nesses dois locais. As superfícies mucosas constituem um ambiente singular para a apresentação de antígenos. Em face do desafio antigênico presente de

maneira constante nessas áreas e da necessidade de manutenção de um micro-ambiente antiinflamatório, as DCs dessas superfícies apresentam capacidades imuno-indutivas também singulares (*apud* NAGLER-ANDERSON *et al.*, 2001). IAWASAKI & KELSALL (1999) demonstraram que em comparação com DCs de sítios não relacionados a mucosas, as DCs da placa de Peyre, de origem mielóide, são capazes de produzir IL-10 e induzir linfócitos T a secretarem altos níveis de IL-4 e IL-10. É muito provável que esse mesmo tipo de DC da placa de Peyre também esteja presente em mucosa da cavidade oral e, portanto, isso explicaria a expressão maior de IL-10 neste local em relação à pele.

IL-10 é citocina que induz de maneira potente a diferenciação de linfócitos B ativados e a produção de grandes quantidades de IgM, IgG e IgA (ROUSSET *et al.*, 1992) e, portanto, isso justificaria a presença de maior número de plasmócitos nas lesões mucosas. Em culturas, IL-10 tem a capacidade de aumentar de maneira substancial o número de células produtoras de imunoglobulinas e, a presença associada de TGF- β provê estímulo adicional à formação de células produtoras de IgA e à produção de IgA secretora (DEFrance *et al.*, 1992). Como ficou demonstrado pelos nossos resultados, que TGF- β também está presente nas lesões teciduais da forma crônica multifocal da Pbmicose, esses achados corroboram a descrição de MOTA *et al.* (1979), de plasmócitos IgA em lesões paracoccidióidicas de tegumento.

Finalmente, como já mencionado IL-10 é quimiotático para linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico, mas não para linfócitos TCD4⁺ (*apud* MOORE *et al.*, 1993) explicando assim a maior concentração dos primeiros nas lesões de mucosa.

5.5. Imunidade celular

O teste cutâneo da paracoccidioidina é utilizado para avaliar a resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) aos antígenos do Pb, produzindo nos casos responsivos, induração que é máxima no período de 24 – 48 horas e se caracteriza histologicamente, pela presença de infiltração mononuclear perivascular (BRITO *et al.*, 1961). Considerando que a ocorrência de reações de hipersensibilidade tardia depende de sensibilização prévia e da integridade da imunidade mediada por células, a resposta negativa ao teste poderia ser explicada ou pela inadequação dos antígenos utilizados ou por comprometimento da imunidade celular (MUSATI, 1982). No presente estudo utilizamos o antígeno de Fava Netto (FAVA NETTO, 1961). SARAIVA *et al.* (1996) demonstraram que a utilização da Gp43 nos testes cutâneos produz respostas significativamente maiores que aquelas obtidas pelo antígeno de Fava Netto. No entanto, existem numerosas evidências de que, na Pbmicose, a anergia ao teste reflete a depressão da imunidade celular (MENDES *et al.*, 1971), embora ainda não se saiba até que ponto a reação de hipersensibilidade tardia esteja relacionada com a imunidade protetora contra o fungo. Em relação

a este último aspecto, CANO *et al.* (2000) estudando a pbmicose experimental murina em animais resistentes e susceptíveis, observaram que a depleção *in vivo* de linfócitos T CD8⁺ não alterou a DTH específica em camundongos resistentes, mas a aumentou significativamente em camundongos susceptíveis. Sugeriram então, que em camundongos susceptíveis linfócitos T CD8⁺ possam estar envolvidos tanto na proteção como na regulação negativa das respostas de DTH e, que nesses animais, a imunidade protetora e a resposta de DTH estejam dissociadas. É provável, que isto também possa ocorrer em alguns dos indivíduos portadores de Pbmicose.

Em nosso estudo, resposta negativa ao teste foi observada em apenas 38,1% dos pacientes, que poderiam, portanto, estar apresentando algum distúrbio imunorregulatório que contribuísse para a imunodepressão. Observamos correlação negativa entre a resposta ao teste e a gravidade clínica reforçando a já bem estabelecida correlação entre a gravidade da doença e imunossupressão (MOTA *et al.*, 1985; PERAÇOLI *et al.*, 1982) e salientando a importância da imunidade mediada por células na proteção contra o Pb.

5.5. Imunidade humoral

Todos os pacientes avaliados apresentaram anticorpoespecífica com títulos séricos variados, concordando com o que, geralmente, é descrito para a forma crônica da Pbmicose (FRANCO *et al.*, 1987; MENDES, 1996).

Se anticorpos contribuem ou não para a defesa do hospedeiro contra agentes fúngicos é questão ainda não bem elucidada. Esse aspecto foi estudado mais intensamente em relação às infecções por *C. albicans* e *C. neoformans* (CASADEVALL, 1995) e os dados obtidos sugerem a existência de anticorpos protetores e não protetores e que a mistura deles reduz a eficácia dos protetores (HAN & CUTLER, 1995; DROMER *et al.*, 1987; MUKHERJEE *et al.*, 1992). Além disso, a eficácia protetora parece estar relacionada ao isotipo produzido (MUKHERJEE *et al.*, 1995a; YUAN *et al.*, 1995). Na criptococose experimental murina anticorpos da classe IgG3 não são protetores e a mudança desse isotipo para IgG1 se torna protetora. Promoção da opsonização do fungo (MUKHERJEE *et al.*, 1995b), da destruição deste por macrófagos e células da micróglia (MUKHERJEE *et al.*, 1995b), redução de antígenos (CASADEVALL, 1995), efeito fungicida direto (POLONELLI *et al.*, 1994), ativação do sistema complemento e neutralização de produtos fúngicos (CASADEVALL, 1995) são alguns dos mecanismos pelos quais os anticorpos atuariam de maneira benéfica na proteção contra o fungo.

Na Pbmicose, existem evidências de correlação positiva entre aumento da anticorpopogênese e disseminação da doença (PERAÇOLI *et al.*, 1982; BIAGIONI, 1984), que reforçam os nossos achados de correlação positiva entre os níveis de anticorpos séricos e o número de fungos nas lesões e sugerindo que fatores induzidos ou liberados pelo fungo contribuam para a amplificação da resposta humoral. Também existem evidências sugerindo que anticorpos anti-Pb podem ser protetores. Por exemplo, os experimentos de CARVALHAES

et al. (1986), utilizando camundongos bons e maus produtores de anticorpos infectados com o fungo, mostraram que maus produtores apresentaram mortalidade mais elevada e doença mais disseminada. SILVA (1993) injetando, por via intraperitoneal, componentes da parede celular do Pb em camundongos, relatou que principalmente a beta-glucana da fração F1 possui a capacidade de modular positivamente a produção de anticorpos e de interferir com a quantidade e padrão de secreção de diferentes classes de imunoglobulinas, principalmente da classe IgM e IgG3. No modelo murino isogênico da Pbmicose, camundongos resistentes apresentaram produção de IgG2a como principal isotipo de imunoglobulina associada à resposta preferencial do tipo Th1 determinando secreção de TNF- α , IFN- γ e IL-2 durante as fases iniciais da infecção. Já os animais susceptíveis, mostraram produção aumentada de anticorpos específicos das classes IgG2b e IgA acompanhada de secreção precoce de TGF- β , IL-10 e IL-5 (*apud* CALICH & KASHINO, 1998). Esses dados corroboram a idéia de que também na Pbmicose, o padrão de secreção de citocinas determina o padrão de produção dos isotipos de anticorpos específicos podendo, portanto, contribuir através desse mecanismo para a proteção ou susceptibilidade do hospedeiro (FINKELMAN *et al.*, 1990).

Observamos correlação positiva entre os níveis séricos de anticorpos específicos e a gravidade clínica sugerindo que a imunidade humoral não está sendo eficaz na proteção contra o Pb e correlação negativa com os resultados do teste cutâneo da paracoccidioidina. Este último achado reforça as evidências (CANO *et al.*, 1995) de que a disfunção de linfócitos T parece estar

associada à produção excessiva de imunoglobulinas e sugere a presença na doença, de fatores que ao mesmo tempo deprimem a imunidade mediada por células e exacerbam a resposta humoral.

5.7. Citocinas no soro

O perfil das citocinas analisadas no soro dos pacientes portadores da forma crônica multifocal da Pbmicose, na fase pré-tratamento, sugere um desequilíbrio no balanço delas, que poderia ser responsável, pelo menos em parte, pelos distúrbios imunorregulatórios comumente observados na doença. Assim, observamos níveis significativamente reduzidos de IL-2 em relação aos de indivíduos sadios. Esse resultado é concordante com o de estudos anteriores demonstrando que a produção de IL-2 por células mononucleares do sangue periférico está diminuída, bem como os níveis plasmáticos da citocina, a expressão de receptores CD25 e a resposta proliferativa de linfócitos em pacientes portadores da micose antes do tratamento (PERAÇOLI, 2000; BAVA *et al*, 1991; BERNARD *et al.*, 2001). IL-2 é produzida em condições fisiológicas principalmente por linfócitos T CD4⁺ ativados, mas também pode ser produzida por linfócitos T e B transformados, células assassinas ativadas por linfocinas (células LAK) e células NK. Exerce papel fundamental na regulação imune devido a sua capacidade de induzir proliferação antígeno inespecífica de linfócitos T, promover juntamente com IL-4 a proliferação de linfócitos B ativados e induzir a síntese em leucócitos periféricos de IFN- γ , IL-1

e TNF- α e β (SMITH, 1988). Portanto, estes dados em conjunto, parecem sugerir que a baixa produção de IL-2 possa contribuir para a depressão imune observada na Pbmicose, que estaria relacionada ao comprometimento do mecanismo de ativação de linfócitos T. Não observamos correlação dos níveis séricos de IL-2 com qualquer dos outros parâmetros analisados, exceto uma correlação positiva com a expressão de IFN- γ nas lesões que poderia ser compatível com a capacidade da IL-2 de induzir a síntese desta citocina.

Um dos possíveis fatores relacionados à inibição da produção de IL-2 nesses pacientes poderia ser a presença níveis séricos significativamente aumentados de TGF- β , como observado em nosso estudo. TGF- β inibe a proliferação de linfócitos T principalmente através da regulação negativa dos sinais proliferativos mediados pela IL-2. Também inibe a função citotóxica de células NK, linfócitos T citotóxicos e a proliferação LAK induzidas por IFN- γ . Influencia também a secreção de imunoglobulinas por linfócitos B, inibindo a síntese de IgG e IgM e estimulando a de IgA (LETTERIO, 2000; LETTERIO & ROBERTS, 1998). Resumindo, TGF- β inibe vários eventos da ativação e função de linfócitos T levando a baixa produção e/ou função defeituosa de citocinas como IL-2 e IFN- γ , importantes para uma resposta imune eficiente contra vários patógenos. Produção excessiva de TGF- β está implicada na patogênese de várias doenças infecciosas como leishmaniose, doença de Chagas e tuberculose (BARRAL *et al*, 1993; SILVA *et al*, 1991; ELNER, 1997). Na tuberculose, IL-2 é fundamental para a expansão clonal de linfócitos T reativos ao *M. tuberculosis* e IFN- γ ativa macrófagos contra a micobactéria.

Pacientes tuberculosos apresentam baixa produção de IL-2, baixas respostas blastogênicas e baixa indução de receptores para IL-2 em células mononucleares do sangue periférico, portanto um quadro bastante similar ao observado na Pbmicose. Existem poucas evidências de que a produção excessiva de citocinas Th2 esteja envolvidas na patogênese da tuberculose, mas ao contrário é sugestiva a participação de produção excessiva de monocinas. Monócitos de pacientes com tuberculose produzem TGF- β na forma ativa e o uso de anticorpos neutralizantes ou de inibidores naturais para TGF- β corrige as baixas respostas de linfócitos T induzidas pelo *M. tuberculosis* e reduz o crescimento intracelular da bactéria. Dessa maneira, *M. tuberculosis* e seus antígenos estimulando fagócitos mononucleares a produzir quantidades excessivas de TGF- β , parecem conduzir a um meio de citocinas onde a supressão de linfócitos T, a desativação de macrófagos e a destruição tecidual estão aumentados e a infecção menos contida, com tendência à amplificação do perfil deletério de citocinas (*apud* TOOSSI & ELLNER, 1998). Portanto, é possível que TGF- β debilitando a resposta imune na Pbmicose possa contribuir para os vários distúrbios imunorregulatórios que se manifestam durante o curso da moléstia.

Observamos também níveis séricos de IL-4 e IL-10 nos pacientes pbmicóticos similares aos de indivíduos sadios. Em relação a IL-4, esse achado é semelhante ao observado por SILVA et al. (1995). Em relação a IL-10, concorda com o de KARHAWI et al. (2000), que relataram que células mononucleares do sangue periférico de portadores da Pbmicose, quando

estimulados por PHA, produziram níveis de IL-10 similares aos de indivíduos saudáveis. Outros estudos relatam níveis séricos aumentados de IL-10 e produção aumentada por células mononucleares do sangue periférico de indivíduos doentes (FORNARI *et al.*, 2001; BERNARD *et al.*, 2001). De qualquer forma, acreditamos que esse achado represente que a capacidade de produção de IL-4 e de IL-10 está preservada em pacientes com a forma crônica da Pbmicose. O teste de correlação dos postos de Spearman mostrou correlação positiva entre os níveis séricos dessas duas citocinas, sugerindo que a produção delas esteja associada.

Embora, não tenhamos detectado correlação dos níveis de citocinas no soro dos pacientes com gravidade clínica, resposta ao teste cutâneo da paracoccidioidina ou níveis séricos de anticorpos específicos, a análise geral desses achados sugere que o desequilíbrio no balanço de citocinas em pacientes com a forma crônica multifocal da pbmicose, representado principalmente pelos baixos níveis de IL-2 e níveis aumentados de TGF- β , possa contribuir para a patogênese da doença.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A paracoccidioidomicose (Pbmicosse) é micose sistêmica na qual complexos eventos inflamatórios e imunológicos são desencadeados pela interação fungo-hospedeiro, resultando em duas características importantes da doença: freqüente instalação de distúrbios imunorregulatórios e reação inflamatória granulomatosa. Este trabalho teve por objetivo estudar em pacientes portadores da forma crônica multifocal da Pbmicosse, na fase pré-tratamento, as características da resposta granulomatosa em lesões de pele e mucosa, considerando suas populações celulares e a presença *in situ* de citocinas de padrão Th1 e Th2. Estes achados foram correlacionados com a gravidade clínica, níveis de competência imunológica humoral e celular e níveis séricos dessas mesmas citocinas. Foram estudados 27 pacientes com gravidade clínica moderada (13 pacientes), moderada/grave (8 pacientes), grave (5 pacientes) e não avaliada (1 paciente). As biópsias foram realizadas por *punch* de lesões de pele ou mucosa. Os soros foram separados de sangue obtido por punção venosa, e o teste cutâneo realizado pela paracoccidioidina. Nas biópsias foram analisados o número e padrão de distribuição de neutrófilos, eosinófilos, células gigantes, plasmócitos, linfócitos T CD3⁺ e CD8⁺, linfócitos B e células NK (estes três últimos caracterizados pela imuno-histoquímica), contagem de fungos e a detecção imuno-histoquímica de IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α e TGF- β . No soro dos pacientes foram realizadas dosagens de IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- β e de anticorpos específicos anti-Pb por ensaio imunoenzimático (ELISA).

Resumo e Conclusões

Do presente trabalho, foram obtidos os seguintes resultados e conclusões:

1. A histopatologia das lesões de pele e mucosa demonstrou lesões granulomatosas compostas por granulomas epitelióides bem e mal organizados, na mesma lesão. Neutrófilos, eosinófilos, plasmócitos, linfócitos B, linfócitos T CD3⁺ e CD8⁺ e células NK foram elementos acessórios presentes em diferentes proporções e com padrões de distribuição particulares.
2. O número de fungos variou de escasso a abundante em diferentes biópsias e mostrou associação com a quantidade de neutrófilos nas lesões, reforçando dados prévios de que componentes do fungo contribuem para a sua migração para os tecidos. Houve, também, correlação positiva esperada entre o número de fungos e níveis séricos de anticorpos específicos.
3. Linfócitos T estavam distribuídos no halo perigranuloma e difusamente pela lesão, e foram as células predominantes, reforçando a idéia de que a imunidade celular é elemento importante na formação e regulação da resposta granulomatosa. Parte desta regulação é efetuada por linfócitos T CD8⁺, que representaram 33,2% dos linfócitos T totais.
4. Os perfis de citocinas nas lesões granulomatosas foram compatíveis com padrões de resposta Th0 ou mistura Th1/Th2 em algumas lesões,

Resumo e Conclusões

com predominância Th2 em outras. Este dado indica que citocinas Th1 e Th2 coexistem na formação e regulação da resposta inflamatória granulomatosa, e que a formação de granulomas epitelióides compactos ou epitelióides frouxos não depende da predominância local de citocinas Th1 ou Th2 respectivamente.

5. Células marcadas para IL-4 e IFN- γ foram identificadas em pequeno número no infiltrado em torno dos granuloma, e morfologicamente eram representadas por pequenas células mononucleares. Foram observados quatro padrões de reatividade: IFN- γ^+ / IL-4⁺, IFN- γ^+ / IL-4⁻, IFN- γ^- / IL-4⁺ e IFN- γ^- / IL-4⁻ e o primeiro foi o mais freqüente. A ausência de associação entre a expressão de IL-4 e a gravidade clínica, ou o padrão morfológico do granuloma, sugere que a presença dessa citocina nas lesões não seja um indicador de mau prognóstico, mas ao contrário, um achado integral da formação do granuloma, desempenhando papel no controle do dano tecidual.
6. TNF- α foi detectado em quantidades expressivas e em diferentes tipos celulares: células epitelióides, células gigantes, macrófagos, células do epitélio estratificado, células endoteliais, pequenas células mononucleares e polimorfonucleares. Esta produção ubíqua e intensa do TNF- α reforça a idéia que esta citocina é de grande importância na inflamação granulomatosa paracoccidioidomicótica, e que, como descrito para a tuberculose, dependendo da quantidade local, possa

Resumo e Conclusões

desempenhar função dualística, seja com atividade protetora, ativando macrófagos e atuando positivamente na formação e modulação da resposta granulomatosa quando em pequena quantidade, seja contribuindo para o dano tecidual e para o processo de fibrose, quando em grande quantidade.

7. IL-10 e TGF- β foram identificados em todas as lesões. Marcação positiva para as duas citocinas foi observada em células epitelióides, células gigantes, macrófagos, células do epitélio estratificado e pequenas células mononucleares. Fibroblastos e células musculares esqueléticas mostraram positividade apenas para TGF- β . À semelhança do TNF- α , a produção destas duas citocinas por vários tipos de células sugere serem mediadores importantes do granuloma paracoccidióidico, podendo, em pequena quantidade, diminuir a intensidade da inflamação com conseqüente menor lesão tecidual, através da diminuição da resposta Th1, ou, em quantidade excessiva, contribuírem para o aumento da susceptibilidade ao fungo.
8. O epitélio estratificado superficial apresentou alterações caracterizadas por hiperplasia, queratinização, espongiose, microvesículas, microabcessos, permeação por infiltrado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, histiócitos e células NK, formação de granulomas e presença do fungo. A imunomarcação positiva para TNF- α , IL-10 e

Resumo e Conclusões

TGF- β das células epiteliais sugere, que além do fungo, essas citocinas possam também contribuir para as alterações observadas.

9. A associação entre o número de linfócitos T CD3⁺ e células NK e a expressão *in situ* de IL-10 e IL-4, sugere que linfócitos T CD3⁺ e células NK contribuem para a produção dessas citocinas.
10. A associação entre o número de linfócitos B e a expressão *in situ* de IL-10 sugere que esta citocina possa contribuir para a amplificação da resposta imune humoral.
11. Lesões de mucosa apresentaram expressão de IL-10 e intensidade do processo inflamatório, principalmente às custas de plasmócitos e linfócitos T CD8⁺, significativamente maiores em relação às lesões de pele. Este resultado documenta e reforça dados da literatura de que a resposta inflamatória é qualitativamente diferente de local para local no organismo. Esta diferença de resposta inflamatória entre pele e mucosa se deve, pelo menos em parte, a que, nestas localizações, existem células dendríticas apresentadoras de antígenos fenotípica e funcionalmente diferentes, levando a apresentação qualitativa e quantitativamente diferenciada de antígenos do Pb ao sistema imune das duas localizações. Nesse contexto, a maior expressão de IL-10 estaria contribuindo para o maior número de plasmócitos e linfócitos T CD8⁺ nas mucosas.

Resumo e Conclusões

12. Houve correlação negativa entre a gravidade clínica e a resposta ao teste cutâneo da paracoccidioidina. Este dado era esperado, e reforça a já bem estabelecida correlação positiva entre gravidade da doença e imunossupressão, indicando a grande importância da imunidade mediada por células na resistência contra o Pb.
13. Houve, também, correlação negativa entre gravidade clínica e níveis séricos de anticorpos específicos, aspecto bastante documentado na literatura, e que põe em cheque o papel da imunidade humoral na proteção contra o fungo, aspecto ainda não resolvido na Pbmicose.
14. Houve correlação negativa entre os níveis séricos de anticorpos específicos e a resposta ao teste cutâneo da paracoccidioidina. Este resultado sugere a ocorrência, na Pbmicose, de fatores que ao mesmo tempo deprimem a resposta imune mediada por células e exacerbam a resposta humoral.

OBSERVAÇÕES FINAIS

No presente trabalho não foi possível detectar associação entre a gravidade clínica e níveis séricos ou a expressão tecidual das citocinas. Estes resultados podem ser devidos ao número relativamente pequeno de pacientes que apresentavam a mesma forma clínica da doença (forma crônica multifocal) e com parâmetros de gravidade clínica próximos (moderada, moderada/grave e

Resumo e Conclusões

grave). É provável que um estudo com pacientes apresentando formas clínicas polares ou com número maior de casos possa elucidar esses aspectos.

Na formação e modulação da resposta granulomatosa paracoccidióidica parece necessária à participação *in situ* das citocinas do padrão Th1 e Th2, não havendo, portanto, dicotomia entre estes dois padrões de citocinas na Pbmicose crônica multifocal.

Os achados de níveis séricos e/ou teciduais elevados de TGF- β e IL-10, indicam que a imunossupressão (documentada pelos níveis baixos de IL-2) observada na Pbmicose crônica multifocal se deve, pelo menos em parte, aos níveis elevados destas duas citocinas.

Estudos futuros dirigidos são necessários para uma melhor avaliação da ação e inter-relação dos vários mediadores pró e antiinflamatórios (citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, etc) envolvidos na patogenia da Pbmicose. O adequado conhecimento da patogênese permitirá a instituição de imunoterapia que possa beneficiar os pacientes.

7. ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (Pbmycosis) is a systemic mycosis in which a complex inflammatory and immunological events are unchained by the interaction of the fungus (Pb) with the host tissues, resulting in two important characteristics of the disease: frequent immunoregulatory disturbances and a granulomatous inflammation. The aim of this work was to study in patients with the chronic multifocal form of Pbmycosis, before treatment, the characteristics of the granulomatous response in skin and mucosal lesions, considering the cellular populations and the presence *in situ* of Th1 and Th2 cytokines patterns. These results were correlated with the clinical severity, the levels of humoral and cellular immune competence and serum levels of those cytokines. Twenty seven patients were studied, distributed accordingly to clinical severity: moderate (13 patients), moderate/severe (8 patients), severe (5 patients), and not evaluated (1 patient). Punch biopsies were collected from skin or mucosal lesions, the serum obtained from venous blood samples to measured antibodies levels, and the skin test accomplished by the paracoccidioidin. In biopsies the following parameters were evaluated: the number and distribution pattern of neutrophils, eosinophils, giant cells, plasma cells, T CD3⁺ and CD8⁺ cells, B cells and NK cells (the last three characterized by immunohistochemistry), number of fungi, and detection of IL-4, IFN- γ , IL-10, TNF- α and TGF- β by immunohistochemistry. It was also measured the serum levels of IL-2, IL-4, IL-10 and TGF- β and the level of specific antibodies anti-Pb by ELISA test.

Specific granulomatous lesions, composed with epithelioid, well organized granuloma together with epithelioid loose, ill organized granuloma were observed in the same lesion of the dermis and submucosa. Neutrophils, eosinophils, plasma cells, B cells, T CD3⁺ and CD8⁺ cells and NK cells were accessory elements present in different proportions and in a singular patterns of distribution, with predominance of T CD3⁺ cells. The number of fungi varied from case to case and correlated with the number of neutrophils. The analysis of the IL-4 and IFN- γ *in situ* expression demonstrated four immunostaining patterns: IL-4⁺ / IFN- γ ⁺, IL-4⁺ / IFN- γ ⁻, IL-4⁻ / IFN- γ ⁺ and IL-4⁻ / IFN- γ ⁻. IL-10, TNF- α and TGF- β were detected in several cellular types, with expression of TGF- β being significantly smaller than the other two cytokines. IL-10 in the lesions correlated with the number of B cells, T CD3⁺ cells, CD8⁺ and NK cells, and with the expression of IL-4. Mucosal lesions showed larger expression of IL-10 and larger inflammatory reaction, mainly due to T CD8⁺ and plasma cells, than that observed in skin lesion. In the patients with Pbmycosis, the serum levels of IL-2 were significantly smaller, the TGF- β significantly larger than normal individuals; IL-10 and IL-4 were similar in both group. There was positive correlation between serum levels of IL-2 and the *in situ* expression of IFN- γ , but it was not demonstrated correlation among the levels of any of the cytokines, the clinical severity of disease, and the humoral and cellular immune responses. All the patients demonstrated variable levels of specific antibodies that correlated with the severity of the disease, and with the paracoccidioidin skin test. Only 38,1% of the patients presented negative reactions to the paracoccidioidin skin test and the response to this test didn't show correlation

with the number of fungi and cytokines serum levels or tissue expression. Taking all these results together, we can stated that in the chronic multifocal form of Pbmycosis as a whole, and in the granulomatous inflammatory pattern observed in the skin and in the mucosa, there was no dichotomy in the expression of Th1 and Th2 pattern of cytokines, but, on the contrary, it seems that these cytokines and other pro and anti-inflammatory mediators, acting together, are necessary to orchestrate the highly complex phenomenon represented by the persistence of Pb inside human tissues.

The immunoregulatory disturbances, frequently observed in the chronic form of Pbmycosis, is a very complex phenomenon, in which, certainly, many pro and anti-inflammatory mediators are involved. Considering ours results, it is conceivable that the immunossupression (documented in part by the low serum level of IL-2) is due, at least in part, to the high TGF- β and IL-10 levels here observed. It is clear that many other controlled studies are necessary to unravel all the complex aspects that permit the fungus survive and multiply, for many years, inside the human body, characterizing, ultimately, the chronic multifocal Pbmycosis disease.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

- Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787.
- Abe, E., Y. Ishimi, C. H. Jin, M. H. Hong, T. Sato, and T. Suda. 1991. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a major macrophage fusion factor present in conditioned medium of concanavalin A-stimulated spleen cell cultures. *J. Immunol.* 147: 1810.
- Adams, D. O. 1976. The granulomatous inflammatory response. A review. *Am. J. Pathol.* 76: 17.
- Adams, D. O., and L. A. Hamilton. 1989. The activated macrophage and granulomatous inflammation. *Curr. Top. Pathol.* 79: 151.
- Aguirre, K. M., and L. L. Johnson. 1997. A role for B cells in resistance to *Cryptococcus neoformans* in mice. *Infect. Immun.* 65: 525.
- Anderson, P., J. Macklis, Brown M., and D. Ory. 1985. Eosinophilic cerebrospinal fluid pleocytosis and cryptococcal meningitis. *Ann. Intern. Med.* 103: 306.
- Anwar, A. R. E., S. R. Smithers, and A. B. Kay. 1979. Killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* coated with antibody and/or complement by human leukocytes *in vitro*: requirement for complement in preferential killing by eosinophils. *J. Immunol.* 122: 628.
- Ashcroft, G. S. 1999. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microb. Infect.* 1: 1275.
- Assoian, R. K., B. E. Fleurdelys, H. C. Stevenson, P. J. Miller, D. K. Madres, E. W. Raines, R. Ross, and M. B. Sporn. 1987. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6020.
- Banchereau, J., and Steinman R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y-J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18: 767.
- Bancroft, G. J., R. D. Schreiber, and E. R. Unanue. 1991. Natural immunity: A T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol. Rev.* 124: 5.
- Barral, A., M. Barral-Neto, C. E. Young, C. E. Brownell, D. R. Twardzik, and S. G. Reed. 1993. Transforming growth factor b as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3442.
- Barral-Netto, M., A. Barral, C. E. Brownell, Y. A. Skeiky, L. R. Ellingsworth, D. R. Twarddzik, and S. G. Reed. 1992. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545.

* Referências bibliográficas apresentadas segundo as normas do The Journal of Immunology/The American Association of Immunologists.

Referências Bibliográficas

- Bava, A. J., A. S. Mistchenko, M. F. Palacios, M. E. Estevez, N. I. Tiraboschi, L. Sen, R. Negroni, and R. A. Diez. 1991. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol. Immunol.* 35:167.
- Bean, A. G. D., D. R. Roach, H. Briscoe, M. P. France, H. Korner, J. D. Sedgwick, and W. J. Britton. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-target mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection which is not compensated by limphotoxin. *J. Immunol.* 162: 3504.
- Belosevic, M., D. S. Finbloom, P. H. Van Der Meide, M. V. Slayter, and C. A. Nacy. 1989. Administration of monoclonal anti-IFN- γ antibodies *in vivo* abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 14: 266.
- Bernard, G., C. C. Romano, C. R. Cacere, Juvenale M., Mendes-Giannini M. J., and Duarte A. J. 2001. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 13: 248.
- Beutler, B., and A. Cerami. 1989. The biology of cachectin TNF - a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. immunol.* 7: 625.
- Biagioni, L., M. J. Souza, L. G. Chamma, R. P. Mendes, S. A. Marques, N. G. S. Mota, and M. F. Franco. 1984. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 78:617.
- Biagioni, L., S. Orsi, L. G. Chamma, T. Sadatsune, and M. Franco. 1987. Imunoglobulinas e C3 no granuloma paracoccidióidico. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 29: 97.
- Biron, C. A., and Gazzinelli R. T. 1995. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: A key mediator in regulating disease outcome. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 485, 1995.
- Bistoni, F., M. Baccarini, E. Blasi, P. Marconi, P. Pugetti, and E. Garaci. 1983. Correlation between *in vivo* and *in vitro* studies of modulation of resistance of experimental *Candida albicans* infection by cyclophosphamide in mice. *Infect. Immun.* 40: 46.
- Blotta, M. M. S. L., and Z. P. Camargo. 1993. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 671.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to Interferon- γ . *Annu. Rev. Immunol.* 15:749.
- Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Natan. 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174: 1549.
- Boros, D. L. 1978. Granulomatous inflammation. *Progr. Allergy* 24: 183.
- Branton, M. H., and J. B. Kopp. 1999. TGF- β and fibrosis. *Microb. Infec.* 1: 1349.
- Brass, K. 1969. Observaciones sobre la anatomía patológica, patogéneses y evolución de la paracoccidioidomicosis. *Mycopathologia (Den Haag)* 37: 119.
- Brestcher, P. A., G. Wei, J. N. Menon, and H. Bielefeldt-Ohmann. 1992. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 257: 539.

Referências Bibliográficas

- Brito, T., J. S. Furtado, R. M. Castro, and M. Manini. 1973. Intraepithelial parasitism as an infection mechanism in human paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis). *Virchows Arch. Abt. A path. Anat.* 361: 129.
- Brito, T., A. Raphael, C. Fava-Netto, and S. A. P. Sampaio. 1961. Histopathology of skin test using a polysaccharide antigen of the *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Invest. Dermatol.* 37: 29.
- Brito, T., and M. F. Franco. 1994. View point: Granulomatous inflammation. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 36: 185.
- Brummer, E., L. H. Hanson, A. Restrepo, and D. A. Stevens. 1988b. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN-gamma for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blastomyces dermatitidis*. *J. Immunol.* 140: 2786.
- Brummer, E., L. H. Hanson, A. Restrepo, and D. A. Stevens. 1989. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect. Immun.* 57: 2289.
- Brummer, E., L. H. Hanson, and D. A. Stevens. 1988a. Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. *Int. J. Immunopharmacol.* 10: 945.
- Brummer, E., S. H. Sun, J. L. Harrison, A. M. Perlman, D. E. Philpott, and D. A. Stevens. 1990. Ultrastructure of phagocytosed *Paracoccidioides brasiliensis* in nonactivated or activated macrophages. *Infect. Immun.* 58: 2628.
- Burger, E., C. C. Vaz, A. Sano, V. L. Calich, L. M. Singer-Vermes, C. F. Xidieh, S. S. Kashino, K. Nishimura, and M. Miyaji. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55: 391.
- Cai, G., T. Radzanowski, E.N. Villegas, R. Kastelein, and C.A. Hunter. 2000. Identification of Stat4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 165: 2619.
- Calich V. L., C. A. Coppi Vaz, and E. Burger. 1985b. PMN chemotactic factor produced by glass-adherent cells in the acute inflammation caused by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 66: 57.
- Calich, V. L. G., E. Burger, S. S. Kashino, R. Fazioli, and L. M. Singer-Vermes. 1987. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. *Infect. Immun.* 55: 1919.
- Calich, V. L. G., and S. S. Kashino. 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31: 615.
- Calich, V. L. G., L. M. Pusinger-Vermes, A. M. Siqueira, and E. Burger. 1985a. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 66, 585.
- Caligiuri, M.A., C. Murray, M. J. Robertson, E. Wang, K. Cochran, C. Cameron, P. Schow, M. E. Ross, T. R. Klumpp, R. J. Soiffer, et al. 1993. Selective modulation of human killer cells *in vitro* after prolonged infusion of low-dose recombinant interleukin-2. *J. Clin. Invest.* 91: 123.

Referências Bibliográficas

- Calvi A., M. T. S. Peraçoli, R. P. Mendes, J. M. Machado, S. A. Marques, and A. M. V. Soares. 1996. Correlation between TNF-alpha production and fungicidal activity in monocytes from paracoccidioidomycosis patients. In: *Resumos da XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia*, Angra dos Reis; p. 1.35.
- Campanelli, A. P. 1998. Subpopulações de células T e citocinas da paracoccidioidomicose experimental. *Dissertação de Mestrado* – USP, Ribeirão Preto.
- Canaday, D. H., C. Zielbold, E. H. Noss, K. A. Chervenak, C. V. Harding, and W. H. Boom. 1999. Activation of human CD8⁺ [alpha][beta] TCR⁺ cells by Mycobacterium tuberculosis via an alternate class I MHC antigen processing pathway. *J Immunol* 162: 372.
- Cano, L. E., L. M. Singer-Vermes, C. A. C Vaz, M. Russo, and V. L. G. Calich. 1995. 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.
- Cano, L. E., L. M. Singer-Vermes, T. A. Costa, J. O. Mengel, C. F. Xidieh, C. Arruda, D. C. André, C. A. C. Vaz, E. Burger, and V. L. G. Calich. 2000. Depletion of CD8⁺ T cells *in vivo* impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 68: 352.
- Cano, L. E., S. S. Kashino, C. Arruda, D. André, C. F. Xidieh, L. M. Singer-Vermes, C. A. A. Vaz, E. Burger, and V. L. G. Calich. 1998. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 66: 800.
- Carrow, E. W., R. F. Hector, and J. E. Domer. 1984. Immunodeficient CBA/N mice respond effectively to *Candida albicans*. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 33: 371.
- Carvalhoes, M. S., W. D. Silva, E. G. Birman, O. A. Sant'Anna, P. Abrahamsohn, and T. L. Kipnis. 1986. Experimental paracoccidioidomycosis in high and low antibody-producer mice. I. Evolution of the disease, its correlation with the humoral immune response and the patterns of tissue lesions. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 2: 127.
- Casadevall, A. 1995. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect. Immun.* 63: 4211.
- Casadevall, A. 1995. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect. Immun.* 63: 4211.
- Castro, A. G., N. Esaguy, P. M. Macedo, A. P. Aguas, and M. T. Silva. 1991. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils *in vivo* and are ingested by the attracted granulocytes. *Infect. Immun.* 59: 3009.
- Chambers, T. J. 1978. Multinucleate giant cells. *J. Pathol.* 126: 125.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265: 1237.
- Chensue, S. W., K. Warmington, J. Ruth, P. Lincoln, M-C. Kuo, and Kunkel, S. L. 1994. Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. *Am. J. Pathol.* 145:1105.

Referências Bibliográficas

- Chensue, S. W., and P. A. Ward. 1996. Inflammation. *In*: Damjanov, I., and Linder J. *Anderson's Pathology*. Saint Louis, Missouri, Mosby-Year Book, Inc., p. 399.
- Chensue, S. W., K. Warmington, J. Ruth, P. Lincoln, and S. L. Kunkel. 1995. Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Local and regional participation of INF- γ , IL-10 e TNF. *J. Immunol.* 154: 5969.
- Chensue, S. W., P. D. Terebuh, S. Warmington K. S. D. Hershey, H. L. Evanoff, S. L. Kunkel, and G. I. Higashi. 1992. Role of IL-4 and IFN- γ in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. *J. Immunol.* 148: 900.
- Chequer-Bou-Habib, D., C. Daniel-Ribeiro, D. M. Banic, A. C. F. Valle, and B. Galvão-Castro. 1989. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. *Micopathologia* 108: 89.
- Clerici, M., and G. Sherer. 1993. A Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 14: 107.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633.
- Cope, A. P., R. S. Liblau, X-D. Yang, M. Congia, C. Laudanna, R. D. Schreiber, L. Probert, G. Kollias, and H. O. Mcdevitt. 1997. Chronic tumor necrosis factor alters responses by attenuating T cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* 185: 1573.
- Cox, F. E. G. and F. Y. Liew. 1992. T cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol. Today*, 13: 445.
- David, J R., A. E. Butterworth, and M. A. Vadas. 1980. Mechanism of the interaction mediating killing of *Schistosoma mansoni* by human eosinophils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 842.
- De Campos, E. P., C. J. Bertoli, and K. S. Barbosa. 1992. Pulmonary lymph node in acute juvenile paracoccidioidomycosis (a case report). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 25: 195.
- Defaveri, J. 1999. Citocinas Th1/Th2 e subpopulações de linfócitos T e B no granuloma pulmonar da paracoccidioidina murina modelos intra-traqueal e endovenoso. *Tese Livre Docência*, Faculdade de Medicina do Campus de Botucatu-UNESP, Departamento de Patologia.
- Defaveri, J., J. Tamanini, L. Tonolli, and M. Franco. 1984. Skin and pulmonary models using coated bentonite particles for the study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides braziliensis* in previously immunized mice. *Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.* 22:477.
- Defaveri, J., M. T. Rezkallah-Iwasso, and M. F. Franco. 1989. Experimental paracoccidioidomycosis in mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. *Mycopathologia* 77: 3.
- Defrance, T., B. Vanbervliet, F. Briere, I. Durand, F. Rousset, and J. Banchereau. 1992. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naïve human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* 175: 671.

Referências Bibliográficas

- Defrance, T., et al. 1992. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* 175: 671.
- Del Fabro, M., L. Francetti, Pizzoni L., R. Rozza, and R. L. Weinstein. 2000. Neutrophil physiology: role and mechanism of action in the immune response at gingival level. *Minerva Stomatol.* 49: 227.
- Del Negro, G. 1961. Localização supra-renal da blastomicose sul-americana. *Tese de Livre Docência*. São Paulo.
- Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, and S. Romagnani. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones, and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J. Immunol.* 150: 353.
- Ding, A., C. Nathan, and S. Srima. 1990. Macrophage deactivating factor and TGF- β inhibit of macrophage nitrogen oxid synthesis by IFN- γ . *J. Immunol.* 145: 940.
- Diniz, S. N., P. S. Cisalpino, A. T. Freire, D. N. Silva-Teixeira, C. Contigli, V. Rodrigues Junior, and A. M. Góes. 2001. *In vitro* granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Hum. Immunol.* 62: 799.
- Dougherty, G. J., and W. H. McBride. 1989. Monocyte differentiation *in vitro*. In: Zembala, M. and G. L. Asherson. (Eds.) *Human Monocytes*. London, UK, Academic, p. 49.
- Dromer, F., J. Charreire, A. Contrepois, C. Carbon, and P. Yeni. 1987. Protection of mice against experimental cryptococcosis by anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 55: 749.
- Echols, R. M., D. L. Palmer, and G. W. Long. 1982. Tissue eosinophilia in human coccidioidomycosis. *Rev. Infect. Dis.* 4: 656.
- Ellner, J. J. 1997. Review: The immune response in human tuberculosis-implications for tuberculosis control. *J. Infect. Dis.* 176: 1351.
- Enelow, R. I., G. W. Sullivan, H. T. Carper, and G. L. Mandell. 1992a. Induction of multinucleated giant cell formation from *in vitro* culture of human monocytes with interleukin-3 and interferon- γ : Comparison with other stimulating factors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 6: 57.
- Enelow, R. I., G. W. Sullivan, H. T. Carper, and G. L. Mandell. 1992b. Cytokine-induced human multinucleated giant cells have enhanced candidacidal activity and oxidative capacity compared with macrophages. *J. Infect. Dis.* 166: 664.
- Fais, S., V. L. Burgio, M. Silvestri, M. R. Capobianchi, A. Pacchiarotti, and F. Pallone. 1994. Multinucleated giant cells generation induced by interferon- γ . Changes in the expression and distribution of the intercellular adhesion molecule-1 during macrophages fusion and multinucleated cell formation. *Lab. Invest.* 71: 737.
- Fava Netto, C. Contribuição ao estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). 1961. *Rev. Inst. Adolpho Lutz*, 21: 99.
- Feldmesser, M., and Casadevall A. 1997. Effect of serum IgG1 to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan on murine pulmonary infection. *J. Immunol.* 158: 790.

Referências Bibliográficas

- Fenhalls, G., A. Wong, J. Bezuidenhout, P. Van Helden, P. Bardini, and P. T. Lukey. In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infect. Immun.* 68: 2827.
- Figueiredo, F., C. L. Silva, and L. M. C. Alves. 1986. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. *Brazilian Med. Biol. Res.* 19: 651.
- Figueiredo, F., L. M. Alves, and C. L. Silva. 1993. 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.
- Finkelman, F. D., and D. J. Urban. 1992. Cytokines: making the right choice. *Parasitol. Today*, 8: 311.
- Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, M. P. Beckman, L. S. Park, K. A. schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, and W. E. Paul. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 303.
- Finkelman, F. D., T. Shea-Donohue, J. Goldhill, C. A. Sullivan, S. C. Morris, K. B. Madden, W. C. Gause, and J. F. J. Urban. 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 505.
- Fiorentino D. F., A. Zlotnik; P. Vieira, T. R Mosmann, M. Howard and K. W. Moore. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146: 3444.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, and T. R. Mosmann. 1989. Two types of mouse T helper cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170: 2081.
- Fitch, F. W., M. D. Mckisick, D. W. Lancki, and T. F. Gajewski. 1993. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.*, 11: 29.
- Fornari, M. C., A. J. Bava, M. T. Guerenio, V. E. Berardi, M. R. Silaf, R. Negroni, and R. A. Diez. 2001. High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 8: 1036.
- Franco, L., L. Najvar, B. L. Gomez, S. Restrepo, J. R. Graybill, and A. Restrepo. 1998. Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 58: 424.
- Franco, M. F. 1987. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 25: 5.
- Franco, M. F., and M. R. G. Montenegro. 1982. Anatomia Patológica. In: Del Negro G., C. S. Lacaz, and A. M. Fiorillo. *Paracoccidioidomycose: Blastomycose sul-americana*. São Paulo, Sarvier. cap. 9, p. 97-117.
- Franco, M., M. R. Montenegro, R. P. Mendes, S. A. Marques, N. L. Dillon, and N. G. S. Mota. 1987. Paracoccidioidomycosis: a recent proposed classification of its clinical forms. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 20: 129.
- Gazzineli, R. T., I. P. Oswald, S. L. James, and A. Sher. 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ activated macrophages. *J. Immunol.* 148: 1792.

Referências Bibliográficas

- Giannini, M. J., J. P. Bueno, M. A. Shikanai-Yasuda, A. M. Stolf, A. Masuda, V. Amato Neto, and A. W. Ferreira. 1990. Antibody response to the 43 KDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43: 200.
- Goyhman-Yahr, M., E. Essenfild-Yahr, M. C. Albornoz, L. Yarzabal, M. H. Gimenez, B. San-Martin, A. Ocanto, F. Gil, and J. Convit. 1980. Defect of *in vitro* digestive ability of polymorphonuclear leukocytes in paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 28: 557.
- Han, Y., and Cutler. 1995. Antibody response that protects against disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* 63: 2714.
- Hassan, N. F., N. Kamani, M. M. Meszaros, and S. D. Douglas. 1989. Induction of multinucleated giant cell formation from peripheral blood monocytes by phorbol myristate acetate in *in vitro* culture. *J. Immunol.* 143: 2179.
- Hernandez-Pando, R., and G. A. Rook. 1994. The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 82: 591.
- Hernandez-Pando, R., Q. L. Bornstein, L. D. Aguilar, E. H. Orozco, V. K. Madrigal and C. E. Martinez. 2000. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology* 100: 352.
- Hill, J. O. 1992. CD4+ T cells cause multinucleated giant cells to form around *Cryptococcus neoformans* and confine the yeast within the primary site of infection in the respiratory tract. *J. Exp. Med.* 175:1685.
- Horwitz, D. A., J. D. Gray, and K. Ohtsuka. 1999. Role of NK cells and TGF- β in the regulation of T-cell-dependent antibody production in health and autoimmune disease. *Microb. Infect.* 1: 1305.
- Hostetler, J. S., E. Brummer, R. L. Coffman, and D. A. Stevens. 1993. Effect of anti-IL-4, interferon-gamma and antifungal triazole (SCH 42427) in paracoccidioidomycosis: correlation of IgE levels with outcome. *Clin. Exp. Immunol.* 94: 11.
- Hsu, S. M., L. Raine, and N. Fanger. 1981. The use of anti-avidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase techniques. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 75:816.
- Huffnagle, G. B., M. F. Lipscomb, J. A. Lovchik, K. A. Hoag, and N. E. Street. 1994. The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. *J. Leukocyte Biol.* 55: 35.
- Iabuki, K., and M. R. G. Montenegro, 1979. Experimental paracoccidioidomycosis in mice: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathologia (Den Haag)* 67: 131.
- Iwasaki, A., and B.L. Kelsall. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen dendritic cells produce IL-10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J. Exp. Med.* 190: 229.
- Ishikawa, T., A. C. Dalton, and C. E. Arbesman. 1972. Phagocytosis of *Candida albicans* by eosinophilic leukocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 49: 311.
- Jacobs, M., N. Brown, N. Allie, R. Gulert, and B. Ryffel. 2000. Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10. *Immunol.* 100: 494.

Referências Bibliográficas

- Jiang, C. K., T. Magnaldo, M. Ohtsuki, I. M. Freedberg, F. Bernerd, and M. Blumenberg. 1993. Epidermal growth factor and transforming growth factor α specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6786.
- Jimenez B. E., and J. W. Murphy. 1984. *In vitro* effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect. Immun.* 46: 552.
- Jimenez-Finkel, B. E., and Murphy J. W. 1988. Induction of antigen-specific T supressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. *Infect. Immun.* 56: 734.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. 2000. Induction on IL-10 producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192: 1213.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T cell priming by type 1 and type 2 polarized dendritic cells; the concept of a third signal. *Immunol Today* 20: 561.
- Kanetsuna, F., L. M. Carbonell, I. Azuma, and Y. Yamamura. 1972. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol.* 110: 208.
- Kanetsuna, F., L. M. Carbonell, R. E. Moreno, and J. Rodriguez. 1987. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Mycopathol.* 99: 119.
- Karhawi, A. S., A. L. Colombo, and R. Salomao. 2000. Production of impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active and is restored after clinical remission. *Med. Mycol.* 38: 225.
- Kashino, S. S., R. D. Fazioli, M. Moscardi-Bachi, M. Franco, L. M. Singer-Vermes, E. Burger, and V. L. Calich. 1995. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia* 130: 131.
- Kaufmann, S. H. E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 129.
- Kazazi, F., J. Chang, A. Lopez, M. Vadas, and A. L. Cunningham. 1994. Interleukin 4 and human immunodeficiency virus stimulate LFA-1-ICAM-1-mediated aggregation of monocytes and subsequent giant cell formation. *J. Gen. Virol.* 75: 2795.
- Kourilsky, P., and P. Truffa-Bachi. 2001. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol.* 22: 502.
- Kreip, H., H. J. Radzun, P. Rudolph, J. Barth. M. Hansmann, K. Heidorn, and M. R. Parwaresch. 1988. Multinucleated giant cells generated *in vitro*. Terminally diferentiated macrophages with down-regulated c-fms expression. *Am. J. Pathol.* 130: 232.
- Kunkel, S. L., R. M. Strieter, S. W. Chensue, M. Basha, T. Standiford, J. Ham, and D. G. Remick. 1990. Tumor necrosis factor- α , interleukin-8, and chemotatic cytokines. *Prog. Clin. Biol. Res.* 349: 433.
- Kurita, N., M. Oarada, E. Ito, and M. Miyaji. 1999b. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 37: 261.

Referências Bibliográficas

- Kurita, N., M. Oarada, M. Miyaji, and E. Ito. 2000. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 38: 177.
- Kurita, N., S. K. Biswas, M. Oarada, A. Sano, K. Nishimura, and M. Miyaji. 1999a. Fungistatic and fungicidal activities of murine polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 37: 19.
- Lammas, D. A., C. Stober, C. J. Harvey, N. Kendrick, S. Panchaligam, and D. S. Kumararatne. 1997. ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z (P2X7) receptors. *Immunity* 7: 433.
- Lederer, J. A., V. L. Perez, L. DesRoches, S. M. Kim, A. K. Abbas, and A. H. Lichtman. 1996. Cytokine transcriptional events during helper T cell subset differentiation. *J. Exp. Med.* 184: 397.
- Lehn, M., W. Y. Weiser, S. Engelhorn, S. Gillis, and H. G. Remold. 1989. IL-4 inhibits H₂O₂ production and anti-Leishmanial capacity of human cultured monocytes mediated by INF- γ . *J. Immunol.* 21: 3020.
- Lehrer R. I. 1972. Functional aspects of a second mechanism of candidacidal activity by human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 51: 2566.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 233.
- Letterio, J. J. 2000. Murine models define role of TGF- β as a master regulator of immune cell function. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 11: 81.
- Letterio, J. J., and A. B. Roberts. 1998. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.* 16: 137.
- Levitz, S. M., E. A. North, M. P. Dupont, and T. S. Harrison. 1995. Mechanisms of inhibition of *Cryptococcus neoformans* by human lymphocytes. *Infect. Immun.* 63: 3550.
- Li, J., C. A. Hunter, and J. P. Farrell. 1999. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *J. Immunol.* 162: 974.
- Licinio, J. 1997. Central nervous system cytokines and their relevance for neurotoxicity and apoptosis. *J. Neural Trans.* 49:169.
- Liébana, E., A. Aranaz, M. Welsh, S. D. Neill, and J.M. Pollock. 2000. In vitro T-cell activation of monocyte-derived macrophages by soluble messengers or cell-to-cell contact in bovine tuberculosis. *Immunology* 100: 194.
- Liew, F. Y., Y. Li, A. Severn, S. Millot, J. Schmidt, M. Salter, and S. Moncada. 1991. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via modulation of nitric synthase on macrophages. *Eur. J. Immunol.* 21: 2489.
- Litt M. 1964. Eosinophils and antigen-antibody reactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 116: 964.
- Lo, S. K., P. A. Detmers, S. M. Levin, and S. D. Wright. 1989. Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *J. Exp. Med.* 169: 1779.
- Loksley, R. M., and P. Scott. 1991. Helper T subsets in mouse leishmaniasis: induction expansion and effector function. *Immunol. Today*, 12: A58.

Referências Bibliográficas

- Londero, A. T., Epidemiologia. 1982. In: Del Negro, G., C. S. Lacaz, and A. M. Fiorillo. *Paracoccidioidomicose: Blastomicose sul-americana*. São Paulo, Sarvier, cap. 7, p. 85-90.
- Lowry, O. H., et al. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265.
- Lukacks, N. W.; S. W. Chensue, R. M. Strieter, K. Warmington, and S. L. Kunkel. 1994. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- α -inducible intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.*, 152: 5883.
- Magram, J., S. E. Connaughton, R. R. Warrier, D. M. Carvajal, C-Y. Wu, J. Ferrante, C. Stewart, U. Sarmiento, D. A. Faherty, and M. K. Gately. 1996. IL-12-deficient mice are defective in IFN- γ production and type 1 cytokine responses. *Immunity*, 4: 471.
- Mariano, M. 1995. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 37: 161.
- Mariano, M., and W. G. Spector. 1976. The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). *J. Pathol.* 122: 185.
- Marques, S. A., M. F. Franco, R. P. Mendes, N. C. A. Silva, C. Baccilli, R. D. Curcelli, A. C. M. Ferracin, C. S. Oliveira, J. V. Tagliarini, and N. L. Dillon. 1983. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 25: 87.
- Martin, P. 1997. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75.
- Mawhorter, S. D., J. W. Kazura, and W. H. Boom. 1994. Human eosinophils as antigen-presenting cells : relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4⁺ T-cell proliferation. *Immunology*, 81: 584.
- McCartney, F. N., and S. M. Wahl. 1994. Transforming growth factor- β a matter of life and death. *J. Leukoc. Biol.* 55: 401.
- Mcewn, J., A. Sugar, E. Brummer, A. Restrepo, and D. A. Stevens. 1987. Effect of murine polymorphonuclear leukocytes on the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.* 36: 603.
- Mendes, R. P. 1996. Paracoccidioidomicose: Quadro clínico. In: Veronesi, R., and R. Focaccia. *Veronesi: Tratado de Infectologia*. São Paulo, Editora Atheneu, p. 1087-1095.
- Mendes-Giannini, M. J., J. P. Bueno, M. A. Shikanai-Yasuda, A. W. Ferreira, and A. Masuda. 1989. Detection of 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 2842.
- Mendes-Giannini, M. J., R. A. Moraes, and T. A. Ricci. 1990. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 32: 384.
- Miyazaki, Y., K. Araki, C. Vesin et al. 1995. Expression of a tumor necrosis factor- α transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. *J. Clin. Invest.* 96: 250.
- Mielke, M. E. A., C. Peters and H. Hahn. 1997. Cytokines in the induction and expression of T-cell mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol. Rev.* 158, 79.
- Mielke, M. E. A., G. Niedobitek, H. Stein, and H. Han. 1989. Acquired resistance to *Listeria monocytogenes* is mediated by Lyt-2⁺ T cells

Referências Bibliográficas

- independently of the influx of monocytes into granulomatous lesions. *J. Exp. Med.* 170: 589.
- Miller, A., O. Lider, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and H. L. Weiner. 1992. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 421.
- Milon, G., and J. Louis. 1993. CD8+ T cells and immunity to intracellular pathogens. *Parasitol. Today* 9: 196.
- Modlin, R. L., F. M. Hofman, P. R. Meyer, O. P. Sharma, C. R. Taylor, and T. H. Rea. 1983. *In situ* demonstration of T lymphocyte subsets in granulomatous inflammation: leprosy, rhinoscleroma and sarcoidosis. *Clin. exp. Immunol.* 51: 430.
- Modlin, R. L., G. P. Segal, F. M. Hofman, M. S. Walley, R. Johnson, C. R. Taylor, and T. H. Rea. 1985. *In situ* localization of T lymphocytes in disseminated coccidioidomycosis. *J. Infect. Dis.* 151, 314.
- Mok, P. W. J., and D. L. Greer. 1977. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.* 28: 89.
- Monari, C., C. Retini, B. Palazzetti, F. Bistoni, and Vecchiarelle. 1997. Regulatory role of exogenous IL-10 in the development of immune response versus *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Exp. Immunol.* 109: 242.
- Moore, K. W., A. O'Garra, R. W. Malefyt, P. Vieira, and T. R. Mosmann. 1993. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 165.
- Moraes, S. M. D., V. L. G. Calich, and E. Burger. 1996. Susceptible mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection produce higher levels of TGF- β than resistant animals. In: Abstracts da XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia: International Meeting on Cytokines, Angra dos Reis, p.44.
- Moscardi-Bacchi, M. 1988. Imunopatologia do granuloma da paracoccidioidomicose murina: composição celular e distribuição de antígenos. Tese de Doutorado – UNESP, Botucatu.
- Moscardi-Bacchi, M., A. Soares, R.P. Mendes, S. A. Marques, and M. Franco. 1989. *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 27: 149.
- Moscardi-Bacchi M., E. Brummer, and D. A. Stevens. 1994. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. *J. Med. Microbiol.* 40: 159.
- Moser, S. A., and J. E. Dörmel. 1980. Effects of cyclophosphamide on murine candidiasis. *Infect. Immun.* 27: 376.
- Mosmann, T. R., and R. Coffman. 1989. Heterogeneity of secretion patterns and function of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46: 111.
- Möst, J., L. Spötl, G. Mayr, A. Gasser, A. Sarti, and M. Dierich. 1997. Formation of multinucleated giant cells *in vitro* is dependent on the stage of monocyte to macrophage maturation. *Blood* 89: 662.
- Mota N. G., M. T. Peraçoli, R. P. Mendes, C. R. Gatass, S. A. Marques, A. M. Soares, I. C. Izatto, and M. T., Rezkallah-Iwasso. 1988. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 26: 105.

Referências Bibliográficas

- Mota, F. T., W. V. Fabio, L. G. Chamma, and M. Franco. 1979. Contribuição ao conceito de atividade na paracoccidioidomicose; estudo clínico-histoimunológico. In: *Anais do Encontro sobre Paracoccidioidomicose*, Barra Bonita, p.16-7.
- Mota, L. C., and J. A. Pupo. 1936. Granulomatose paracoccidióidica. (Blastomycose brasileira). *An. Fac. Med. S. Paulo* 12: 407.
- Mota, N. G. S., M. T. Rezkallah-Iwasso, M. T. S. Peraçoli, R. C. Audi, R. P. Mendes, J. Marcondes, S. A. Marques, N. L. Dillon, and M. F. Franco. 1985. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 79: 765.
- Mukherjee, J., G. Nussbaum, M. D. Scharff, and A. Cadevall. 1995a. Protective and non-protective monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B-cell. *J. Exp. Med.* 181: 405.
- Mukherjee, J., M. D. Scharff, and A. Casadevall. 1992. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 60: 4534.
- Mukherjee, J., M. Feldmesser, M. D. Scarff, and A. Casadevall. 1995b. Monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan enhance fluconazole activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1398.
- Murphy, J. W., B. A. Wu-Hsieh, L. M. Singer-Vermes, A. Ferrante, S. Moser, M. Russo, C. A. Vaz, E. Burger, V. L. Calich, I. C., Kowanko, et al. 1994. Cytokines in the host response to mycotic agents. *J. Med. Vet. Mycol.*, 32(Suppl 1):203.
- Musatti, C. C. 1982. Imunidade celular. In: Del Negro G., C. S. Lacaz, and A. M. Fiorillo. *Paracoccidioidomicose: Blastomycose sul-americana*. São Paulo, Sarvier. cap. 10, p. 119-133.
- Musatti, C. C., M. T. Rezkallah-Iwasso, E. Mendes, and N. F. Mendes. 1976. *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.* 24: 365.
- Nagler, A., L. L. Lanier, and J. H. Phillips. 1990. Constitutive expression of high-affinity interleukin-2 receptors on human CD16 natural killer cells *in vivo*. *J. Exp. Med.* 171: 1527.
- Nagler-Anderson, C., C. Terhorst, A. K. Bhan, and D. Podolsky. 2001. Mucosal antigen presentation and the control of tolerance and immunity. *Trends Immunol.* 22: 120.
- Nelson, B. J., P. Ralph, S. J. Green, and C. A. Nacy. 1991. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1. *J. Immunol.* 146: 1849.
- Orme, I. M., E. S. Miller, A. D. Roberts, S. K. Furney, J. P. Griffin, K. M. Dobos, D. Chi, B. Rivoire, and P. J. Brennan. 1992. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 148: 189.
- Parise-Fortes, M. R., M. F. Silva, M. F. Sugizaki, J. Defaveri, M. R. Montenegro, A. M. Soares, and M. T. Peraçoli, M. T. 2000. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med. Mycol.* 38: 51.

Referências Bibliográficas

- Paul, W. E., and F. Y. Seder 1992. T cells subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol. Today* 13: 445.
- Pedrazzini, T. K. Hug, and J. A. Louis. 1987. Importance of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ cells in the immunologic control of infection with *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guérin in mice. Assessment by elimination of T cell subsets *in vivo*. *J. Immunol.* 139: 2032.
- Peraçoli, M. T. S. 2000. Paracoccidioidomycose: imunidade inata e adquirida na interação parasita-hospedeiro. 158p. *Tese Livre Docência*, Instituto de Biociências do Campus de Botucatu-UNESP, Departamento de Imunologia.
- Peraçoli, M. T. S., A. M. V. C. Soares, R. P. Mendes, S. A. Marques, P. C. M. Pereira, and M. T. Rezkallah-Iwasso. 1991. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 29: 373.
- Peraçoli, M. T. S., M. R. Parise-Fortes, M. F. Pereira da Silva, and M. R. Montenegro. 1995. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of syrian hamster. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 37: 129.
- Peraçoli, M. T. S., N. G. S. Mota, and M. R. Montenegro. 1982. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. *Mycopathologia (Den Haag)* 79: 7.
- Piguet, P. F., and C. Vesin. 1994. Treatment by human recombinant soluble TNF receptor of pulmonary fibrosis induced by bleomycin or silica in mice. *Eur. Respir. J.* 7: 515.
- Pileri, S. A., 1997. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: Comparison of different methods. *J. Pathol.*, 183: 116.
- Pinto, F. G., T. M. Alcântara, and J. Defaveri. 1997. Pulmonary acute inflammation induced in mice by conidia of *Paracoccidioides brasiliensis*: modulation of tumor necrosis factor by talidomide. In: *Abstracts do XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia*, Mangaratiba - RJ, p.87.
- Pober, J. S., M. A. Gimbrone, L. A. Lapierre, D. L. Mendrick, W. Fiers, R. Rothlein, and T. A. Springer. 1986. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J. Immunol.* 137: 1893.
- Polonelli, L., M. Gertoni, S. Conti, P. Fisicarp, C. Cantelli, P. Portincasa, F. Almondo, P. L. Barea, F. L. Hernandao, and J. Ponton. 1994. Heat-shock mannoproteins as targets of secretory IgA in *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* 169: 1401.
- Postelthwaite, A. E., and J. M. Seyer. 1990. Stimulation of fibroblast chemotaxis by human recombinant tumor necrosis factor- α (TNF- α) and a synthetic TNF- α 31-68 peptide. *J. Exp. Med.* 172: 1749.
- Postlethwaite, A. E., B. K. Jackson, E. H. Beachey, and A. H. Kang. 1982. Formation of multinucleated giant cells from human monocyte precursors. Mediation by a soluble protein from antigen- and mitogen-stimulated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155: 168.
- Pretolani, M. 1999. Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. *Clin. Exp. Allergy*, 29: 1164.
- Ptak, W., Z. Porwit-Bòbr, and Z. Chlap. 1970. Transformation of hamster macrophages into giant cells with antimacrophage serum. *Nature* 225: 655.

Referências Bibliográficas

- Puledran, B., E. Maraskovsky, J. Banchereau, and C. Maliszewski. 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol.* 22: 41.
- Pupo, J. A. 1965. Evolução e formas clínicas da blastomicose sul-americana (paracoccidioidomicose). *J. Bras. Med.* 9: 967.
- Ratto, O. R. 1982. Lesões pulmonares. Aspectos clínicos e funcionais. In: Del Negro, G., C. S. Lacaz, and A. M. Fiorillo. *Paracoccidioidomicose: Blastomicose sul-americana*. São Paulo, Sarvier. cap. 16, p. 161.
- Reed, S. G. 1999. TGF- β in infections and infectious diseases. *Microb. Infect.* 1: 1313.
- Restrepo, A. 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 23: 323.
- Restrepo, A., 1988a. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Curr. Top. Med. Micol.* 2: 239.
- Restrepo, A., 1988b. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. In: McGinnis, M. *Current Topics in Medical Microbiology*, New York, Springer-Verlag., B. vol. 2, p. 239-277.
- Restrepo, A., M. Restrepo, F. Restrepo, L. H. Aristizabal, L. H. Moncada, and H. Velez. 1978. Immune responses in paracoccidioidomycosis. A controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia* 16: 151.
- Restrepo, S., A. M. Tobón, J. Trujillo, and A. Restrepo. 1992. Development of pulmonary fibrosis in mice during infection with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *J. med. vet. Mycol.* 30: 173.
- Rezkallah-Iwasso, M. T., M. T. S. Peraçoli, R. P. Mendes, H. A. Guastale, S. A. Marques, and A. M. V. Soares. 1989. Defective expression of interleukin-2 receptors in patients with paracoccidioidomycosis. In: *Resúmenes del IV Encuentro Internacional sobre paracoccidioidomycosis*, Caracas, p.121.
- Robertson, M.J., and J. Ritz. 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76: 2421.
- Romagnani, S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 227.
- Rosenbloom, J., G. Feldman, B. Freundlich, and S. A. Jimenez. 1984. Transcriptional control of human diploid fibroblast collagen synthesis by gamma-interferon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123: 365.
- Rothenberg, M. E. 1998. Eosinophilia. *N. Engl. J. Med.* 338: 1592.
- Rothenberg, M. E., A. Mishra, E. B. Brandt, and Hogan S. P. 2001. Gastrointestinal eosinophils. *Immunol. Rev.* 179: 139.
- Rousset, F., E. Garcia, T. Defrance, C. Péronne, N. Vezzio, D-H. Hsu, R. Kastelein, K. W. Moore, and J. Banchereau. 1992. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Sci. USA* 89: 1890.
- Rousset, F., R. de Waal Malefijt, B. Sliereendregt, J-P. Aubry, J-Y. Bonnefoy, T. Defrance, J. Banchereau, and J. E. de Vries. 1988. Regulation of Fc receptor for IgE (CD23) and class II MHC antigen expression on Burkitt's lymphoma cell lines by human IL-4 and INF- γ . *J. Immunol.* 140: 2625.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells maintained by

Referências Bibliográficas

- granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179: 1109.
- San-Blas, F., and San-Blas, G. 1982. Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Del Negro, G.; Lacaz, C. S.; Fiorillo, A. M. *Paracoccidioidomycose: Blastomycose sul-americana*. São Paulo, Sarvier, cap. 4, p. 35.
- San-Blas, G., A. Restrepo, K. Clemons, D. A. Stevens, F. San-Blas, R. Puccia, L. R. Travassos, J. I. Figueroa, A. J. Hamilton, M. A. Bartholomew, T. Harada, L. Fenelon, and R. J. Hay. 1992. Paracoccidioidomycosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 30(suppl.1): 59.
- San-Blas, G., and F. San-Blas. 1977. *Paracoccidioides brasiliensis*. Cell wall structure and virulence. A review. *Mycopathologia* 62: 77.
- Saraiva, E. C. O., A. Altemani, M. F. Franco, C. S. Unterkircher, and Z. P. Camargo. 1996. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. *J. Med. Vet. Mycol.*, 34:155.
- Schaffner, A., C. E. Davis, T. Schaffner, H. D. Market, and A. Braude. In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenecity and opportunism. *J. Clin. Invest.* 78: 511.
- Schermoly, M. J., and D. R. Hinthorn. 1988. Eosinophilia in coccidioidomycosis. *Arch. Intern. Med.* 148: 895.
- Scott, P., and G. Trinchieri. 1995. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 34.
- Seder, R. A., and W. E. Paul. 1994. Acquisition of lymphokine-production phenotype by CD4+ T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 635.
- Seitzer, U., D. Scheel-Toellner, N. Reiling, H. Haas, J. Galle, H. D. Flad, and J. Gerdes. 1997. Properties of multinucleated giant cells in a new *in vitro* model for human granuloma formation. *J. Pathol.* 182: 99.
- Shaw R. J., G. M. Walsh, O. Cromwell, R. Moqbel, C. J. F. Spry, and A. B. Kay. 1985. Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG-dependent stimulation. *Nature* 316: 150.
- Shea, G. T., and G. A. Rook. 2001. IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF-alpha. *J. Immunol.* 167: 1230.
- Sher, A., and R.L. Coffman. 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 385.
- Shikanay-Yasuda, M. A., Higaki Y., D. E. Uip, N. S. Mori, G. Del Negro, N. T. Melo, R. U. Hutzler, and V. Amato Neto. 1992. Comprometimento da medula óssea e eosinofilia na paracoccidioidomycose. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 34: 85.
- Shikanay-Yasuda, M. A., Y. Higaki, M. H. Lopes, D. E. Uip, W. P. A. C. Pinto, J. Nicodemo Correa, E. L. Nicodemo, N. S. Mori, A. S. Shafferman, and V. Amato Neto. 1986. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomycose. III. Presença de eosinofilia. In: *Colóquio Int. sobre la paracoccidioidomycosis*. Recinto de Quirama, Rio Negro, Colômbia, p. 76.
- Silva, C. L., 1985. Granulomatous reaction induced by lipids isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 70.

Referências Bibliográficas

- Silva, C. L., and R. A. Fazioli. 1985. *Paracoccidioides brasiliensis* polysaccharide having granuloma-inducing, toxic and macrophage-stimulating activity. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1497.
- Silva, J. S., D. R. Twardzik, and S. Reed. 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor β (TGF- β). *J. Exp. Med.* 174: 539.
- Silva, J. S., M. F. Silva, L. H. Faccioli, R. C. L. Pietro, S. A. E. Cortez, and N. T. Foss. 1995. Differential correlation between interleukin patterns in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. *Clin. Exp. Immunol.* 101: 314.
- Silva, M. F. 1993. Papel dos componentes da parede celular do fungo paracoccidioides brasiliensis na modulação da produção de anticorpos. *Dissertação de Mestrado – USP, Ribeirão Preto.*
- Silva-Teixeira, D. N., C. Contigli, and A.M. Goes. 1998. Cytokine profile associated to effector functions of human T cell clones specific for *Schistosoma mansoni* antigens. *Human Immunol.* 59: 219.
- Smith, K. 1988. Interleukin 2: inception, impact, and implications. *Science* 240: 1169.
- Souto, J. T., F. Figueiredo, A. Furlanetto, K. Pfeffer, M. A. Rossi, and J. S. Silva. 2000. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. *Am. J. Pathol.* 156: 1811.
- Sporn, M. B. 1997. The importance of context in cytokine action. *Kidney Int.* 51:1352.
- Stambuk, B. U., R. Puccia, M. L. Almeida, L. R. Travassos, and S. Schenckman. 1988. Secretion of the 43 KDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 26: 367.
- Stamm, L.M., A. A. Satoskar, S. K.Ghosh, J. R. David, and A. R. Satoskar. 1999. STAT-4 mediated IL-12 signaling pathway is critical for the development of protective immunity in cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 29: 2524.
- Suga, M., H. Yamasaki, K. Nakagawa, H. Kohrogi, and M. Ando. 1997. Mechanisms accounting for granulomatous responses in hypersensitivity pneumonitis. *Sarcoidosis Vasculitis Diffuse Lung Dis.* 14: 131.
- Takashima, T., K. Ohnishi, I. Tsuyuguchi, and S. Kishimoto, 1993. Differential regulation of formation of multinucleated giant cells from concanavalin A-stimulated human blood monocytes by IFN- γ and IL-4. *J. Immunol.* 150: 3002.
- Tarleton, R. L., M.J. Grusby, and L. Zhang. 2000. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 165: 1520.
- Todd, R., B. R. Donoff, T. Chiang, M. Y. Chou, A. Elovic, G. T. Gallagher, and D. T. W. Wong. 1991. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wound. *Am. J. Pathol.* 138: 1313.
- Toossi, Z., and J. J. Ellner. 1998. Short analytical review: The role of TGF- β in the pathogenesis of human tuberculosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 87: 107.

Referências Bibliográficas

- Tuder, R. M., R. El Ibrahim, C. E. Godoy, and T. De Britto. 1985. Pathology of the human pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia (Den Haag)* 92: 179.
- Uribe, F., A. I. Zuluaga, W. León, and A. Restrepo. 1987. Histopathology of cutaneous and mucosal lesions in human paracoccidioidomycosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 29: 90.
- Vassalli, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 411.
- Vicentini, A. P., J-L. Gesztes, M. F. Franco, W. Souza, J. Z. Moraes, L. R. Travassos, and J. D. Lopes. 1994 Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect. Immun.* 62: 1465.
- Wagner, J. M., M. Franco, G. M. Kephart, and G. J. Gleich. 1998. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 66.
- Wahl, S. M. 1994. Transforming growth factor beta: the good, the bad and the ugly. *J. Exp. Med.* 180: 1587.
- Wang, J., J. Wakeham, R. Harkness, and Z. Xing. 1999. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* 103: 1023.
- Wanke, B., and A. T. Londero. 1994. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco, M., C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G. Del Negro. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, Flórida, CRC Press, p.109-120.
- Warren, K. S. A. 1976. Functional classification of granulomatous inflammation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 287: 7.
- Werner, M., R. Von Wasielewski, and P. Kommith. 1996. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem. Cell. Biol.*, 105: 253.
- Williams, D. M., B. G. Grubbs, S. Park-Snyder, R. G. Rank, and L. F. Bonewald. 1996. Activation of latent transforming growth factor beta during *Chlamydia trachomatis*-induced murine pneumonia. *Res. Microbiol.* 147:251.
- Williams, G. T., and W. J. Williams. 1983. Granulomatous inflammation - a review. *J. Clin. Pathol.* 36: 723.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 80: 617.
- Yamashiro, S., H. Kamohara, J. M. Wang, D. Yang, W. H. Gong, and T. Yoshimura. 2001. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immunity responses. *J. Leukoc. Biol.* 69: 698.
- Yankovic, D., Sher A. and Yap G. 2001. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr Op Immunol* 13: 403.
- Yuan, R., A. Casadevall, G. Spira, and M. D. Scharff. 1995. Isotype switching from IgG3 to IgG1 converts a non-protective murine antibody to *C. neoformans* into a protective antibody. *J. immunol.* 154: 1810.
- Zang, X. W., Y. Wang, Q. Liu, and H. Thorlacius. 2001. Redundant function of macrophage inflammatory protein-2 and KC in tumor necrosis factor-alpha-induced extravasation of neutrophils *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 427: 277.