

ÉRIKA PEREIRA DE MORAES NEWORAL

**ESTUDO DA PRODUÇÃO LOCAL DE CITOCINAS E ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS) EM LESÕES DE MUCOSA
ORAL E LINFONODOS DE PACIENTES COM
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Campinas

2002

ÉRIKA PEREIRA DE MORAES NEWORAL

**“ESTUDO DA PRODUÇÃO LOCAL DE CITOCINAS E ÓXIDO
NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS) EM LESÕES DE MUCOSA
ORAL E LINFONODOS DE PACIENTES COM
PARACOCCIDIOIDOMICOSE”**

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

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Albina Altemani

Campinas

2002

Banca examinadora da Tese de Mestrado

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

Membros:

1.

2.

3.

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

Data:

DEDICATÓRIA

*A Deus, por me presentear com todas as
pessoas que contribuíram para esta conquista.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta, por sua confiança, orientação e amizade em todos os momentos.

À Dra. Albina Altemani, pela co-orientação, apoio e amizade durante o projeto.

Aos meu pais, que sempre me apoiaram e ajudaram, permitindo esta conquista.

Ao meu marido, que sempre me apoiou e me incentivou, estando presente, principalmente, nos momentos mais difíceis.

À minha família, principalmente minha avó, meu avô e minha querida Ivone, que sempre torceram e rezaram por mim.

À Sara de Jesus Oliveira, responsável por meu ingresso na pós-graduação e, que desde o início acreditou e apostou em mim.

Ao querido amigo Ronei Luciano Mamoni, que sempre me respeitou, apoiou e incentivou, e que considero um dos maiores responsáveis por esta realização, meu muito obrigada!

Às amigas Andréa, Andréia Neves, Cláudia, Concília, Edilma, Lisandra e Márcia pelo carinho, apoio e amizade.

Aos amigos do Departamento de Nefrologia da Faculdade de Medicina da USP, em especial à Dra. Irene Noronha, Ivone, Terezinha e Sabrina, que me receberam e me ajudaram em todos os momentos.

Aos amigos do departamento de Anatomia Patológica da Unicamp, em especial Léa, Priscila e Paulo que sempre me ajudaram.

Aos amigos do Departamento de Patologia Experimental da Unicamp, em especial ao Cris pelo apoio constante.

À equipe do ambulatório de Otorrinolaringologia, em especial ao Dr. Chone e Dr. Flávio, por terem contribuído com a obtenção das amostras utilizadas.

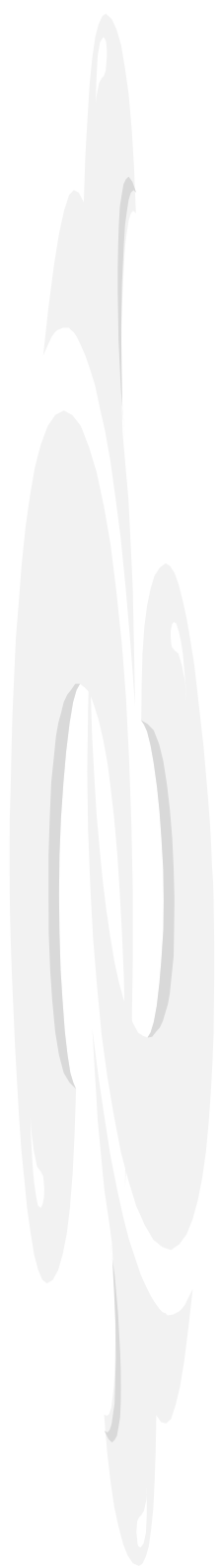
Ao Dr. Bruno e à equipe do ambulatório de Laser, pela colaboração na obtenção das amostras.

À Maria de Lourdes Shikama e à equipe do Instituto Adolfo Lutz – Sorocaba, pelo apoio dispensado desde o início.

À amiga Cyntia pela amizade e incentivo em todos os momentos. Saudades.

A todos, meu muito obrigada.

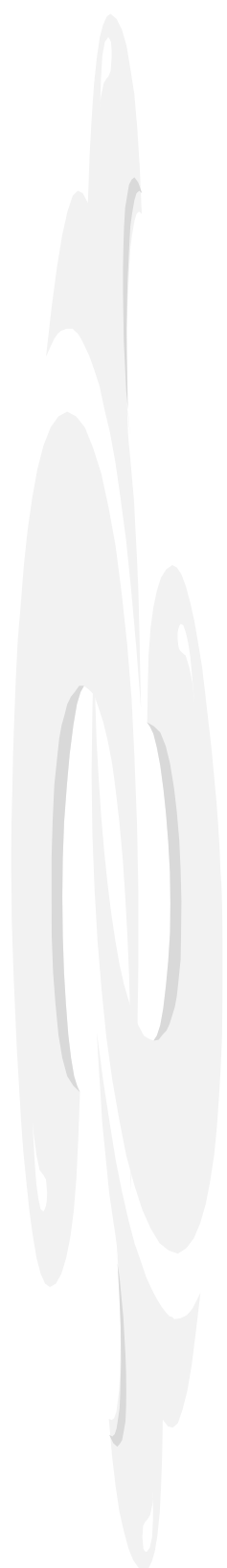
	PÁG.
RESUMO.....	<i>vii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ARTIGO.....	20
Abstract.....	22
Introduction.....	23
Results.....	26
Discussion.....	29
Material and Methods.....	32
References.....	35
Figures.....	39
Tables.....	43
4. DISCUSSÃO.....	45
5. CONCLUSÕES	52
6. SUMMARY.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
8. APÊNDICE.....	76



RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é a micose sistêmica de maior prevalência na América Latina. Apresenta duas formas clínicas principais: a forma Adulta (FA) e a forma Juvenil (FJ). Com o objetivo de caracterizar a resposta inflamatória local na PCM, analisamos por imunoistoquímica, a população celular (CD4, CD8, CD15 e CD68), a expressão das citocinas TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), TGF- β (transforming growth factor beta), IL-10 (interleucina 10) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), em biópsias de mucosa oral de pacientes com a FA e linfonodos de pacientes com a FJ da PCM. De modo geral, as lesões caracterizaram-se pela presença de granulomas formados por células epitelióides e células gigantes (CD68+) circundados e permeados por linfócitos TCD4+ e TCD8+. Enquanto que em lesões de pacientes com a FJ da PCM havia predominância de células CD68+ (macrófagos, células epitelióides e gigantes), em pacientes com a FA foi observado infiltrado misto, composto por macrófagos, plasmócitos e neutrófilos. O número de células fúngicas encontradas nas lesões de linfonodos de pacientes com a FJ foi mais elevado do que em mucosa oral de pacientes com a FA da PCM. O número de células expressando TNF- α (macrófagos, neutrófilos e células gigantes) e iNOS (macrófagos) foi semelhante tanto em linfonodos, como em mucosa oral. Por outro lado, em linfonodos o número de células positivas para TGF- β e IL-10 foi acentuadamente maior. Em biópsias de pacientes com FA a expressão de iNOS foi observada em um número pequeno de macrófagos, distribuídos na periferia dos granulomas, e em pacientes

com a FJ a expressão desta enzima foi observada em células gigantes e em macrófagos esparsos e em contato com as células do fungo. Os resultados obtidos sugerem que a produção aumentada de citocinas supressoras da ativação de macrófagos em lesões de pacientes com FJ da PCM pode estar contribuindo para a forma mais grave e disseminada da doença.



1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo dimórfico imperfeito, de habitat natural desconhecido, que cresce na forma de levedura nos tecidos do hospedeiro ou em cultura a 37° C, e na forma filamentosa (micélio) em temperaturas mais baixas (FRANCO, 1987; FRANCO *et al*, 1989; BRUMER, CASTANEDA & RESTREPO, 1993; SAN-BLAS, 1993). É a doença fúngica de maior prevalência na América Latina, principalmente no Brasil, acometendo, em sua grande maioria, homens na faixa etária de 30 a 50 anos. A PCM é a 8ª causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias, sendo as regiões Sul e Sudeste do Brasil endêmicas para a doença (FRANCO, 1987; FRANCO *et al*, 1989; LACAZ, 1956; MARQUES *et al*, 1983; BLOTTA *et al*, 1999; TRAVASSOS, 2000; BORGES-WALMSLEY *et al*, 2002).

A infecção pelo *P. brasiliensis* se dá por via respiratória, através da inalação de propágulos do fungo, afetando primeiro os pulmões, e então se disseminando para outros órgãos e sistemas (FRANCO *et al*, 1989; BRUMER, CASTANEDA & RESTREPO, 1993). Nos pulmões, ocorre a passagem do fungo da forma miceliana para leveduriforme, resultante de mudanças na síntese de constituintes celulares (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1982; SALAZAR & RESTREPO, 1984; SAN-BLAS *et al*, 1987).

Duas formas clínicas principais da PCM são reconhecidas: forma aguda ou juvenil (FJ) e a forma crônica ou adulta (FA). A forma juvenil representa apenas 3 a 5% de todos os casos, é de curso rápido (semanas a meses) e acomete o

sistema fagocítico mononuclear (linfonodos, placas de Peyer, baço, fígado, medula óssea). Ocorre em crianças e adultos jovens, dissemina-se rapidamente, apresentando-se de maneira grave e com pior prognóstico (MONTENEGRO, 1986; FRANCO *et al*, 1987).

Em estudos anteriores, mostramos que pacientes com a FJ da PCM apresentam resposta imune do tipo Th2 (T helper 2) com a produção preferencial de IL-4, IL-5, TGF- β e anticorpos específicos do tipo IgG4 e IgE, contribuindo para um padrão de doença mais grave (MAMONI *et al*, 2002, OLIVEIRA *et al*. 2002). Outro achado característico nesta forma clínica é o elevado número de eosinófilos no sangue periférico, no início da doença (OLIVEIRA *et al*. 2002). Pacientes com a FJ da PCM, virgens de tratamento, apresentam resposta imune celular suprimida, caracterizada por teste cutâneo negativo e resposta linfoproliferativa reduzida a antígenos do fungo (paracoccidioidina ou gp43) (Benard *et al*. 1996, Oliveira *et al*. 2002).

A forma adulta da PCM representa mais de 90% dos casos, a maioria homens adultos, envolvidos com o trabalho na lavoura. As manifestações clínicas da doença podem ocorrer de forma localizada (unifocal), sendo o pulmão o principal órgão acometido, ou comprometendo vários órgãos (forma crônica multifocal), como pulmões, pele, mucosas e adrenais (MONTENEGRO, 1986; MOTA *et al*, 1985; BRUMMER, CASTANEDA & RESTREPO, 1993).

A resposta imune nos pacientes com a forma adulta da PCM, varia dentro de um espectro com extremos de alta e baixa resistência. Desta forma, pacientes

podem apresentar resposta celular preservada, com baixos níveis de IL-4 e IL-5, produção de anticorpos da classe IgG1 e resposta proliferativa a antígenos do fungo, compatível com a forma unifocal mais branda da doença. Por outro lado, pacientes com a forma adulta disseminada evoluem para uma imunossupressão da resposta imune celular, com alta produção de anticorpos específicos do tipo IgE, IgG4 e IgA, e de citocinas Th2, semelhante ao que ocorre na forma juvenil da doença (FRANCO *et al*, 1987; FRANCO *et al*, 1989; MAMONI *et al*, 2002; OLIVEIRA *et al*, 2002).

É importante salientar que, mesmo em contato com o fungo, a maioria dos indivíduos consegue conter a infecção, não desenvolvendo a doença. Isso é evidenciado pela elevada incidência de testes cutâneos de hipersensibilidade tardia positivo em moradores de regiões endêmicas. Esses indivíduos não apresentam qualquer sinal da doença, sendo essa condição denominada de PCM infecção (CAMPOS & FAVA-NETO, 1978; MOK & FAVA-NETO, 1978; ANDRADE *et al*, 1984; ZEMBRZUSKI *et al*, 1996). Indivíduos com PCM infecção apresentam, intensa resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo, ausência de anticorpos específicos e padrão de resposta Th1 (T helper 1), com produção de IFN- γ (interferon gama), TNF- α e IL-2, e baixos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 (OLIVEIRA *et al*, 2002; OLIVEIRA, MAMONI & BLOTTA, 2002).

O desenvolvimento de modelos experimentais de resistência ou suscetibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis* permitiu grande avanço no conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na doença (CALICH *et al*,

1985). Camundongos suscetíveis ao *P. brasiliensis* (B10.A), desafiados com gp43, demonstram elevada produção *in vitro* de IL-10, e baixos níveis de IL-2 e IFN- γ . Esses camundongos, apresentam resposta imune celular suprimida e produção de altos níveis de anticorpos, semelhante à forma juvenil humana. Por outro lado, camundongos resistentes (A/Sn) produzem, após estímulo, IL-2 e IFN- γ , mas não IL-10, observando-se baixos níveis de anticorpos específicos, resposta cutânea positiva a antígenos do fungo e macrófagos ativados (CALICH & KASHINO, 1998).

Em camundongos resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis*, as células apresentadoras de antígenos (APCs) são preferencialmente macrófagos, produtores de IL-12, que induzem células Th1, enquanto que em camundongos suscetíveis a apresentação de antígeno se dá por intermédio de células B, que estimulam linfócitos Th2 produtores de IL-4 e IL-10 (ALMEIDA *et al*, 1998).

Estudos experimentais e em pacientes com PCM estabeleceram que a resistência contra o fungo é baseada principalmente nas atividades das células T e macrófagos, mediadas por IFN- γ e outras citocinas Th1. Macrófagos atuam como a primeira linha de defesa do hospedeiro (CANO *et al*, 1995; BOCCA *et al*, 1998). Foi demonstrado que a estimulação de macrófagos com IFN- γ *in vitro* leva a fagocitose eficiente das células fúngicas, não ocorrendo o mesmo na ausência da citocina (CANO *et al*, 1992, CALICH & KASHINO, 1998; RODRIGUES *et al*, 1999).

Tanto em camundongos resistentes como suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis*, a depleção de IFN- γ exacerba a infecção pulmonar levando a

disseminação precoce do fungo para vários tecidos. Estes achados foram confirmados em estudos com camundongos knockout para IFN- γ (CANO *et al*, 1998; SOUTO *et al*, 2000; DEEPE *et al*, 2000).

O IFN- γ ativa os macrófagos estimulando seu metabolismo oxidativo (NATHAN *et al*, 1983) e sua capacidade de produzir TNF- α (LAKE *et al*, 1994). Assim como na infecção experimental (SOUTO *et al*, 2000, KASHINO *et al*, 2000, GONZALEZ *et al*, 2000), na PCM humana o IFN- γ possui importante papel protetor provavelmente estimulando a ativação de macrófagos e inibindo a replicação do *P. brasiliensis* (MOSCARDI-BACCHI *et al*, 1994; KARHAWI *et al*, 2000, OLIVEIRA *et al*, 2002). Também estimula leucócitos polimorfonucleares (PMNs), que atuam na destruição do fungo (BOCCA *et al*, 1998; GONZALEZ *et al*, 2000).

Atuando de modo sinérgico ao IFN- γ , o TNF- α estimula macrófagos e células T, sendo essencial para a resistência do hospedeiro contra infecções por microrganismos intracelulares. O TNF- α é citocina produzida principalmente por células mononucleares em resposta a estímulos infecciosos ou imunológicos (MARTIM-OROZCO *et al*, 2001).

CALICH e KASHINO (1998) observaram que camundongos resistentes à infecção por *P. brasiliensis* produzem mais TNF- α e menos TGF- β em resposta ao fungo. Da mesma forma, camundongos inoculados com isolados avirulentos do *P. brasiliensis* produzem níveis elevados de TNF- α , quando comparado com camundongos infectados por isolados virulentos, sugerindo que esta citocina

possa ter papel na modulação da resposta ao fungo (FIGUEIREDO, ALVES & SILVA, 1993).

Assim como na PCM experimental, na doença humana, o TNF- α participa da ativação de macrófagos independente da célula T e da produção de IFN- γ (SILVA & FIGUEIREDO, 1991). Células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a FA e indivíduos PCM-infecção produzem níveis mais elevados, tanto de TNF- α como de IFN- γ , do que pacientes com a FJ da PCM, o que poderia estar associado a uma maior resistência à doença (OLIVEIRA *et al*, 2002; OLIVEIRA, MAMONI & BLOTTA, 2002). Por outro lado, citocinas inibidoras da produção de TNF- α e IFN- γ , como o TGF- β e a IL-4, são encontradas em maior concentração em pacientes com a forma juvenil, geralmente mais grave e disseminada (MAMONI *et al*, 2002; OLIVEIRA *et al*, 2002). Níveis elevados de TNF- α também foram encontrados no soro de pacientes com paracoccidioidomicose (SILVA & FIGUEIREDO, 1991; SILVA *et al*, 1995)

A resposta inflamatória mediada por citocinas como IL-1, TNF- α e IFN- γ , em resposta a produtos liberados por microrganismos (lipopolissacarídeo - LPS), desencadeia a produção de diversas enzimas (fosfolipase A 2, cicloxigenase 2, óxido nítrico sintase induzível), quimiocinas e moléculas de adesão. Essas enzimas por sua vez induzem a produção de substâncias inflamatórias, como fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrienos, prostaglandinas e óxido nítrico, enquanto que o aumento da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas participam da migração e ativação de células para o sítio inflamatório. Esses

fatores em conjunto levam a destruição tecidual e a perda de função observada na resposta inflamatória (DINARELLO, 2000).(Figura 1)

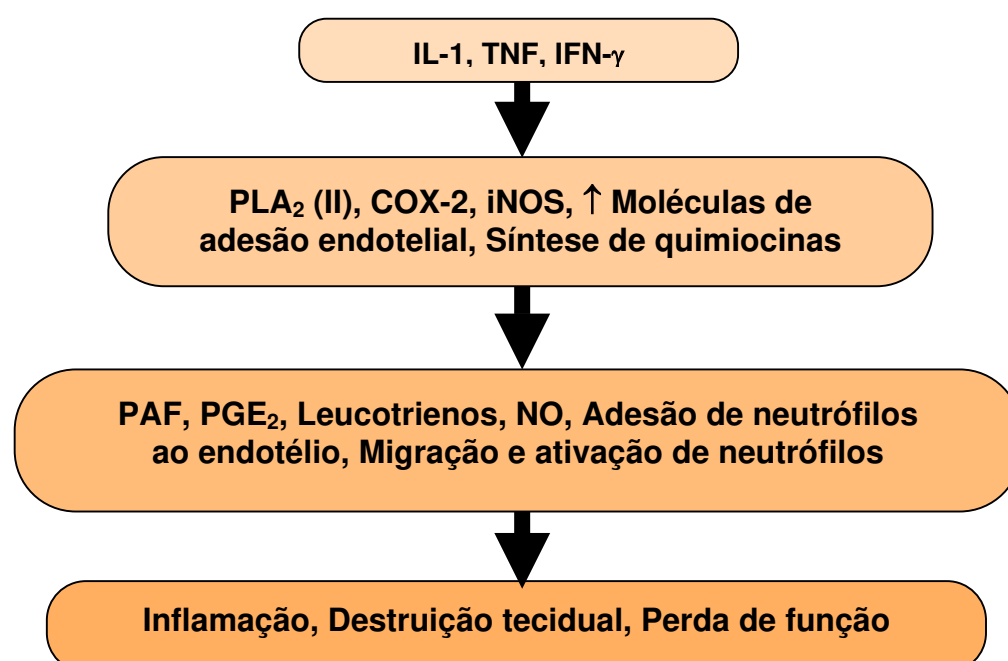


Figura 1: Representação esquemática da cascata inflamatória induzida por citocinas. Abreviações: PLA₂ (II) - fosfolipase A II; COX-2- ciclooxigenase-2; iNOS- óxido nítrico sintase induzível; PAF- fator ativador de plaquetas; PGE₂ – prostaglandina E 2; NO-óxido nítrico.

DINARELLO, C.A. – Chest, 118 (2): 503-508, 2000.

O NO é um mediador essencial para uma variedade de funções biológicas, incluindo a defesa contra patógenos, agregação de plaquetas, citotoxicidade, entre outras (LIEW, 1994). É produzido a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que apresenta três isoformas distintas codificadas por genes separados. As isoformas expressas constitutivamente, em baixas concentrações, são a NOS1 ou nNOS, sintetizada por neurônios, e a NOS3 ou eNOS produzida em células endoteliais (HARRISON, 1997; NATHAN, 1997).

A terceira isoforma (iNOS/NOS2 - óxido nítrico sintase induzível), é produzida apenas após estímulos imunológicos, em macrófagos e hepatócitos, em quantidades superiores aos níveis constitutivos. *In vitro*, a expressão desta enzima está associada à produção de NO e à liberação de seus metabólitos, como nitrato, nitrito e peroxinitrito (SHEFFLER *et al*, 1995; MACMICKING, XIE & NATHAN, 1997). Os efeitos citostático e citotóxico do NO dependem da indução da enzima óxido nítrico sintase (NOS), após ativação de macrófagos por LPS, IFN- γ e TNF- α . A NOS catalisa a síntese de NO pela conversão de L-arginina em L-citrulina. Na célula-alvo, o NO combina-se com grupos metais de enzimas responsáveis pela síntese de DNA e pelo ciclo respiratório, levando à morte celular. A indução da enzima NOS é inibida pela administração de glicocorticóides (MONCADA & HIGGS, 1993). (Figura 2)

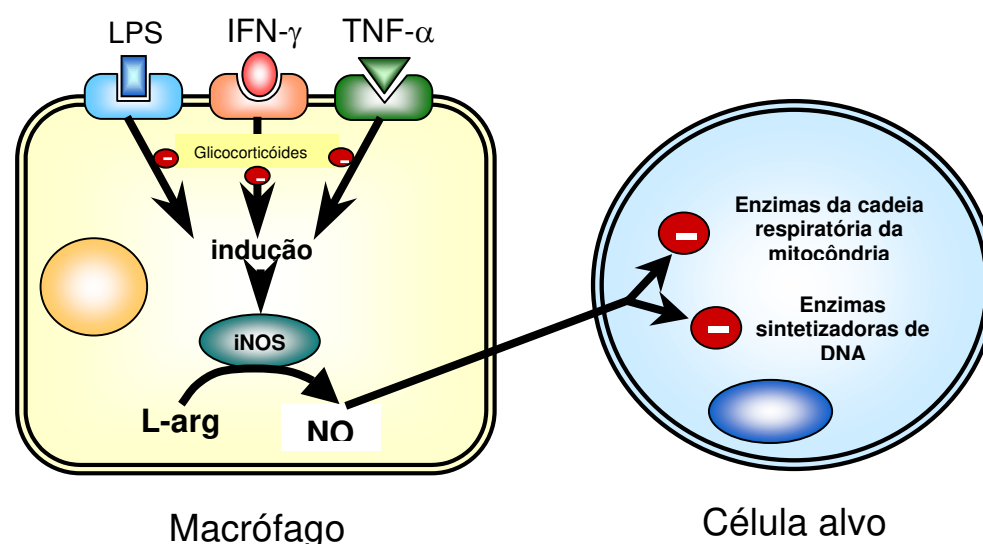


Figura 2: Mecanismos de ação do NO na célula-alvo. Abreviações: LPS-lipopolissacarídeo; L-arg-L-arginina; NO- óxido nítrico; iNOS - óxido nítrico sintase induzível.

Adaptado de MONCADA & HIGGS, N. Engl. J. Med. 30: 2002-2012, 1993.

A ação citotóxica do NO em humanos é controversa. Alguns autores sugerem que macrófagos humanos necessitam de sinais adicionais para a indução de iNOS (SCHOEDON *et al*, 1987; WERNER *et al*, 1989), como a ação conjunta de TNF- α e IFN- γ com LPS (DINARELLO, 2000); outros acreditam que as células humanas produzem inibidores autócrinos ou mesmo moléculas tóxicas que estariam suprimindo a indução de iNOS (OSWALD *et al*, 1992), como as citocinas imunossupressoras IL-10 e TGF- β (GAZZINELLI *et al*, 1992; VODOVOTZ, 1997).

A atividade microbicida dos macrófagos através da produção de óxido nítrico (NO) ou outros óxidos de nitrogênio, tem sido demonstrada em resposta a diferentes agentes infecciosos como *Leishmania major*, *Mycobacterium bovis*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* (GREEN *et al*, 1990; GREEN & NACY, 1993; LIEW, 1993; VESPA *et al*, 1994, BOCCA *et al*, 1998).

Na criptococose experimental, a expressão de iNOS está associada com resposta celular protetora. GOLDMAN *et al* (1996) verificaram que a expressão desta enzima coincide com a formação de granulomas e precede à diminuição da carga fúngica nos pulmões, sugerindo a participação do NO no combate ao fungo. Observaram também que citocinas promotoras e inibidoras da expressão de iNOS por macrófagos (IFN- γ e TGF- β , respectivamente) podem ser detectadas por imunistoquímica ao redor do granuloma iNOS positivo.

Assim como na criptococose, na tuberculose experimental o NO tem importante papel na morte da micobactéria, principalmente na fase inicial da infecção. Entretanto, sua participação também foi relacionada ao dano tecidual observado durante a fase tardia da doença (HERNANDEZ-PANDO *et al*, 2001).

Na histoplasmose murina, a atividade microbicida dos macrófagos é dependente da expressão de iNOS e da produção de NO. Durante a infecção por *Histoplasma*, macrófagos são ativados para produzirem NO, o qual regula negativamente a expansão de linfócitos T pela indução da apoptose dessas células, controlando o crescimento do fungo (LANE *et al*, 1994; NAKAMURA, WU-HSEH & HOWARD, 1994). O NO, além de participar da morte do fungo, participa da manutenção da homeostase (WU-HSHIEH *et al*, 1998).

Resultados obtidos tanto *in vivo* (BOCCA *et al*, 1998) como *in vitro* (GONZALEZ *et al*, 2000) apontam a produção de NO como um mecanismo de defesa utilizado por macrófagos ativados contra a infecção por *P. brasiliensis*. Macrófagos de camundongos infectados por *P. brasiliensis* são capazes de controlar a multiplicação do fungo, através da produção de NO induzido por IFN- γ , indicando ser este um mecanismo importante na contenção da infecção (GONZALEZ *et al*, 2000). A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) relacionada com a resistência em algumas infecções, como tuberculose (DENIS *et al*, 1988) e leishmaniose (BLACKWELL *et al*, 1988), parece não estar envolvida na resposta de defesa na PCM experimental. NASCIMENTO *et al* (2002) não observaram diferenças na produção de H₂O₂ tanto em camundongos resistentes

como suscetíveis, sugerindo que a morte do fungo na PCM experimental é independente deste fator.

NASCIMENTO *et al* (2002), em estudo experimental com camundongos resistentes e suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis*, também verificaram que macrófagos de camundongos suscetíveis produzem níveis elevados e constantes de NO, enquanto que a produção de TNF- α foi predominante em camundongos resistentes. Estes resultados indicam que a produção de TNF- α está associada com a resistência à infecção, enquanto a produção de NO, em altos níveis, pode estar relacionada à suscetibilidade.

Apesar de representar um mecanismo de defesa contra a infecção por *P. brasiliensis* (GONZALEZ *et al*, 2000; NASCIMENTO *et al*, 2002), o NO parece estar envolvido na imunossupressão, observada em modelos experimentais, por inibir a linfoproliferação, a produção de TNF- α e a expressão de moléculas do MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe II por APCs (BOCCA *et al*, 1998, 1999). De fato foi observado que o tratamento de camundongos infectados por *P. brasiliensis* com nitro-arg (inibidor de NO) preveniu a diminuição da resposta celular, confirmando seu papel na imunossupressão observada durante a doença (BOCCA *et al*, 1998; NASCIMENTO *et al*, 2002).

A indução de NO é regulada positivamente por citocinas Th1 (IFN- γ , e TNF- α) (DINARELLO, 2000) e negativamente por citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β (VODOVOTZ, 1997) e a IL-10 (MOORE *et al*, 2001).

O TGF- β é produzido por polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos e apresenta inúmeras funções, muitas delas antagônicas (MACCARTNEY-FRANCIS & WAHL, 1994). Suprime a proliferação e diferenciação de células T e B, e limita a produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α , além de atuar em monócitos e macrófagos inibindo a produção de iNOS (CLARK & COKER, 1998; CERWENKA & SWAIN, 1999; OPAL & DEPALO, 2000). Tem ação sobre a expressão de moléculas de adesão e apresenta atividade quimiotática para células inflamatórias, interferindo na migração celular.

In vitro, o TGF- β influencia a diferenciação dos precursores da célula T em Th1 ou Th2 (NAGELKERKEN *et al*, 1993; PAWELEE *et al*, 1996), além de regular negativamente funções dos macrófagos, como a produção de IL-12 e NO (VODOVOTZ *et al*, 1993; TAKEUCHI *et al*, 1998). *In vivo*, o TGF- β desempenha papel regulador no controle da patogênese de muitas doenças autoimunes e inflamatórias, por inibir tanto a resposta Th1 como Th2 (SANTAMBROGIO *et al*, 1993; POWRIE *et al*, 1996).

Em estudos anteriores, detectamos níveis elevados de TGF- β em soro de pacientes com a forma juvenil da PCM. Esta citocina participa do switch de IgA, justificando níveis elevados dessa imunoglobulina nesses pacientes. Além disso, a alta produção de uma citocina com atividade inibidora da resposta imune celular, como o TGF- β , poderia estar contribuindo para a maior gravidade da doença observada no grupo estudado (MAMONI *et al*, 2002). Estes resultados estão de acordo com CALICH & KASHINO (1998), que verificaram intensa produção de

TGF- β por macrófagos peritoneais de camundongos suscetíveis, cultivados *in vitro* na presença e na ausência de antígenos do fungo quando comparado a macrófagos de camundongos resistentes.

Na tuberculose, níveis elevados de TGF- β também foram detectados em pacientes com formas graves e avançadas da doença, estando relacionado ao desenvolvimento de fibrose pulmonar (TOOSSI *et al*, 1995; DLUGOVITZKY *et al*, 1999).

Na infecção experimental por *Cryptococcus neoformans*, a incapacidade em controlar a infecção pulmonar foi atribuída a produção insuficiente de citocinas Th1 e iNOS, revertida pela administração de IL-12. Conhecida como um potente ativador da produção de IFN- γ por células T e *natural killer*, a IL-12 tem sido amplamente utilizada tanto em estudos experimentais como clínicos, com o objetivo de induzir proteção em infecções causadas por microrganismos intracelulares (HEINZEL *et al*, 1993; GAZZINELLI *et al*, 1994; KAWAKAMI *et al*, 1996).

A inibição da produção de NO mediada pelo TGF- β é resultado de seus efeitos sobre a transcrição de numerosos fatores que modulam a expressão da iNOS. Dentre esses, pode-se destacar a inibição de promotores de transcrição do gene da iNOS, como o NFkB e a diminuição da estabilidade do RNAm e de sua tradução. Além disso, o TGF- β pode interferir na síntese de cofatores, como a tetrahidrobiopterina (BH4) resultando na diminuição da atividade enzimática da iNOS (VODOVOTZ, 1997) (Figura 3).

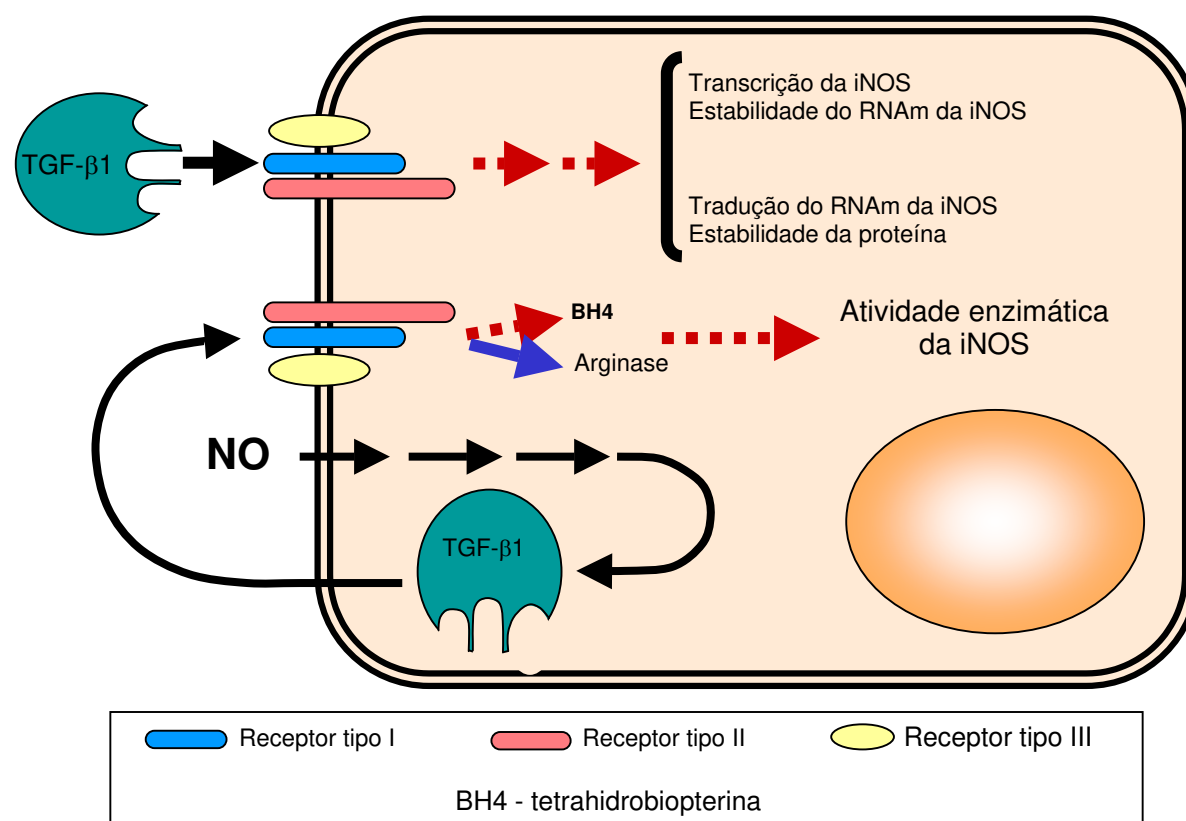


Figura 3: Mecanismo de regulação negativa da produção de NO por TGF- β .

VODOVOTZ, Y. - Nitric Oxide: Biol. Chem. 1(1): 3-17, 1997.

Assim como o TGF- β , a interleucina-10 (IL-10) regula negativamente a produção de citocinas Th1 (principalmente IL-2 e IFN- γ), TNF- α , IL-1 e IL-6, além de inibir a formação de NO e desativar APCs como monócitos e macrófagos (OPAL, WHERRY & GRINT, 1998). A IL-10 é mediador anti-inflamatório produzido por macrófagos, linfócitos Th2 e células B (OPAL & DEPALO, 2000). A exposição à IL-10 leva à diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II e de moléculas coestimulatórias, como B7.1, B7.2 e ICAM (molécula de adesão intercelular) em APCs (OPAL, WHERRY & GRINT, 1998). O tratamento com IL-10

inibe o desenvolvimento da atividade citotóxica de macrófagos estimulados por IFN- γ contra parasitas intra e extracelulares, devido ao bloqueio da produção de NO se dar por mecanismo indireto, envolvendo a inibição da síntese de TNF, sinal co-estimulatório autócrino para a produção do NO (MONCADA & HIGGS, 1993) (figura 2).

BENARD *et al* (2001) verificaram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a FA e FJ da PCM produzem baixos níveis de IL-2 e IFN- γ , em contraste com níveis elevados de IL-10. Em trabalhos prévios, nosso grupo observou que, embora não houvesse diferença entre a FJ e FA da PCM quanto a produção de IL-10 *in vitro*, células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com PCM-infecção secretam quantidades muito pequena dessa citocina. Os baixos níveis de IL-10, associados à presença de TNF- α e IFN- γ , poderiam estar contribuindo para a maior resistência à infecção observada neste grupo (OLIVEIRA *et al*, 2002).

Tem sido demonstrado que IL-10 e TGF- β atuam em conjunto na supressão da síntese de NO por macrófagos ativados, inibindo a capacidade microbicida destas células (GAZZINELLI *et al*, 1992, OSWALD *et al*, 1992).

Os estudos descritos demonstram que o perfil de citocinas produzidas durante uma infecção exerce influência importante no tipo de resposta imune que irá se desenvolver. Estes perfis podem ser determinantes de proteção ou suscetibilidade, bem como decidem a natureza da destruição celular no sítio da infecção (O'GARRA, 1996).

Nos tecidos, a resposta ao *P. brasiliensis* é caracterizada pela formação de granulomas, com participação ativa de células T, atuando no recrutamento e na ativação dos macrófagos. Evidências diretas e indiretas indicam que o granuloma causado pelo *P. brasiliensis* está relacionado com a resposta imune do hospedeiro, na tentativa de destruir, bloquear e limitar o fungo prevenindo sua multiplicação (FRANCO, 1986).

A presença do fungo sensibiliza os linfócitos do hospedeiro, os quais se concentram no sítio de interação com o patógeno, e secretam diferentes citocinas (FRANCO, 1986). A formação dos granulomas se deve principalmente a produção de TNF- α em resposta aos componentes da parede do fungo (FIGUEIREDO *et al*, 1993; de BRITO & FRANCO, 1994). A secreção das citocinas é acompanhada de edema local e vasodilatação, ativação de macrófagos, diferenciação e maturação em células epitelióides, ativação de fibroblastos e aumento na síntese de colágeno (FRANCO, 1986).

Esses granulomas são constituídos por macrófagos e linfócitos, sendo que os primeiros localizam-se na porção central e os últimos ao redor destes. Células gigantes, formadas a partir da fusão de macrófagos, são caracteristicamente encontradas no interior dos granulomas (FRANCO *et al*, 1989).

Técnica de imunoistoquímica usando anticorpo monoclonal específico para células T (CD4 e CD8), revelaram uma predominância de células TCD4+ em biópsias de tecido (pele, mucosa e linfonodos) de pacientes com formas aguda e crônica da PCM (MOSCHARDI-BACHI *et al*, 1989).

DEFAVERI *et al* (1999), estudando biópsias de pulmões de camundongos, infectados com *P. brasiliensis* por via intratraqueal, verificaram inicialmente a presença de muitos focos inflamatórios contendo fungos e neutrófilos, formando granulomas frouxos. Os linfócitos localizados ao redor de vasos do interstício peribronquiolar eram principalmente do tipo B. Os fungos presentes nos granulomas estavam envolvidos por células expressando IL-2 e IFN- γ . Além destas citocinas, os autores também detectaram IL-4 e TNF- α no foco inflamatório.

TNF- α e TGF- β foram detectadas em pulmões de camundongos com fibrose decorrente da infecção por *P. brasiliensis* (FRANCO *et al* 1998). Na leishmaniose experimental e humana, o TNF- α foi associado à resistência à infecção e o TGF- β à suscetibilidade à doença, devido a sua capacidade de inibir o metabolismo oxidativo dos macrófagos (BARRAL-NETO *et al*, 1991; BARRAL-NETO *et al*, 1992; CORRADIN *et al*, 1993).

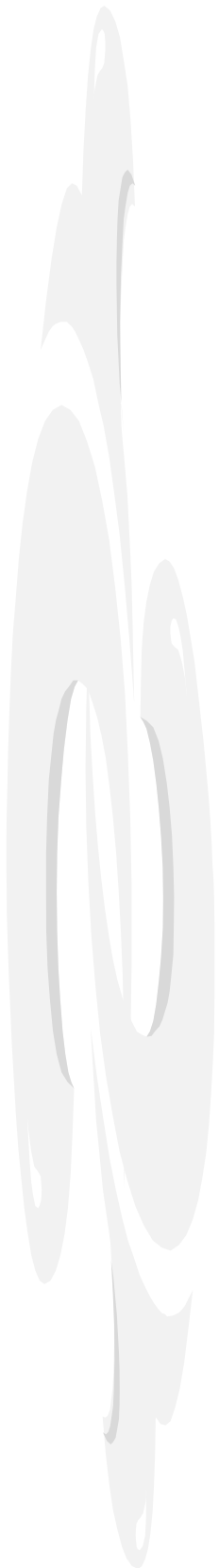
Os poucos trabalhos, que analisaram a produção local de citocinas em tecidos de camundongos infectados por *P. brasiliensis*, mostram a presença concomitante de citocinas Th1 e Th2 (DEFAVERI *et al*, 1999) assim como citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (FRANCO *et al*, 1998).

A concepção de doença polar e espectral, como a hanseníase e leishmaniose, pode ser aplicada em menor escala a PCM. Lesões sistêmicas ou generalizadas com grande número de fungos associada a importante comprometimento da imunidade mediada por células, representa o pólo negativo ou anérgico, enquanto lesões localizadas, compostas de granulomas epitelióides

bem formados, com pequeno número de fungos e resposta mediada por células preservada, caracterizam o pólo positivo ou hiperérgico. Entre os dois extremos ocorre uma gama de manifestações clínicas e imunológicas (MUSSATI *et al*, 1976; FRANCO, 1987, BORGES-WALMSLEY *et al*, 2002).

Em estudos anteriores verificamos que respostas imunológicas específicas caracterizam diferentes formas clínicas da PCM humana. Os trabalhos foram realizados em nível sistêmico, por meio da análise de mediadores presentes no soro ou sobrenadante de culturas de células mononucleares de sangue periférico. Em pacientes, não existem trabalhos mostrando a natureza das citocinas produzidas localmente, no sítio de infecção pelo *P. brasiliensis*.

Com base nestes dados e com o intuito de melhor caracterizar a resposta inflamatória local na PCM, estudamos a expressão das citocinas TNF- α , TGF- β e IL-10, assim como da enzima iNOS em linfonodos de pacientes com a FJ e na mucosa oral de pacientes com a FA da PCM. As populações celulares presentes no infiltrado inflamatório também foram determinadas.



2. ARTIGO

**IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF CYTOKINES AND INDUCIBLE
NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS) IN ORAL MUCOSA AND LYMPH NODES
OF PATIENTS WITH PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS.**

Neworal EPM¹, Altemani A², Mamoni RL¹, Noronha IL³, Blotta MHSL¹.

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

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

3 Department of Nephrology, University of São Paulo (USP) Medical School, São
Paulo, SP, Brazil

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

Short title: Immunocytochemical detection of cytokines and iNOS in
paracoccidioidomycosis

Key words: IL-10 - iNOS – paracoccidioidomycosis - TGF- β – TNF- α

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, with high incidence in Brazil. In order to examine the immune response in lesional tissue of patients with PCM, we analyzed cytokines as well as the phenotype of cellular infiltrate. Paraffin-embedded tissue from oral mucosa of 8 patients with the localized adult form (AF) of PCM and lymph nodes of 10 patients with the juvenile form (JF) of PCM was analyzed by immunohistochemistry to detect tumor necrosis factor- α (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), transforming growth factor- β (TGF- β), and interleukin-10 (IL-10). In the lymph nodes the majority of inflammatory cells was CD68+ (macrophages, epithelioid and giant cells) while in the oral mucosa a mixed infiltrate with macrophages, plasma cells and neutrophils was detected. TNF- α as well as iNOS expression was similar in lymph nodes and oral mucosa, whereas TGF- β and IL-10 were observed in a higher number of macrophages, epithelioid and giant cells in the lymph nodes, where numerous yeast cells were visualized. The higher expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β) in lesions of patients with the JF of PCM (lymph nodes) may represent a mechanism by which the fungus evade the host immune response, contributing for a more severe and disseminated form of the disease.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis caused by *P. brasiliensis*, a dimorphic fungi, restricted to Latin America, with high incidence in Brazil.¹

According to the current classification, PCM may be considered a disease with two main clinical forms: Acute or Juvenile Form (JF) and Chronic or Adult Form (AF).¹ The AF mainly affects adult males, who show a high frequency of pulmonary, skin, mucosal and visceral involvement. The JF is characterized by a systemic lymph node involvement, hepatosplenomegaly and bone marrow dysfunction. From the immunopathological point of view, the JF tends to show necrotizing lesions with abundant fungal cells, impairment of cell mediated immunity and high titers of circulating antibodies. In the AF, the lesions are seldom disseminated, and are associated with tuberculoid granulomas, and a small number of fungal cells.²

Experimental and human histopathologic findings showed that *P. brasiliensis* in contact with host tissue provoke a non-specific inflammatory response, characterized by vascular congestion, edema and accumulation of polymorphonuclear cells. A few hours after the inoculation, the number of PMNs decrease and mononuclear cells increase in number and after that, the first multinuclear giant cells appears, forming the granuloma.³ Activation of reactive cells with *P. brasiliensis* antigens result in the release of cytokines which play a major role in regulating replication and hence control the overall fungal load.^{4, 5, 6}

In previous studies we showed a preferential Th2 type immune response in patients with the FJ of PCM, characterized by IL-4, IL-10, and IL-5 production, elevated levels of anti-*P. brasiliensis* IgG4 and IgE antibodies, and a markedly eosinophilia.^{7,8} These mediators associated with low IFN- γ and lymphocyte proliferation levels correlated to a more severe manifestation of the disease. In contrast, healthy individuals who live in endemic areas and are positive to the paracoccidioidin skin test showed a typical Th1 pattern, with a substantial IFN- γ , TNF- α and IL-2 but little or no IL-4, IL-5 and IL-10. As a result, these individuals probably develop an efficient immune response able to prevent the outcome of the disease. Intermediate immune responses were observed in AF patients, in which the IFN- γ and IL-10 production did not differ from the JF group, although IL-4 and IL-5 levels were significantly lower.⁸

Inflammatory cytokines play an important role in the genesis and control of PCM. Increased levels of IL-6, IL-1 TNF- α as well as the chemokine MIP-1 α were detected in sera of adult patients with the disseminated form of the disease.^{7, 9, 10,}

TNF- α , a monocyte/macrophage derived factor, is involved in the recruitment and activation of inflammatory cells and in granuloma formation.¹¹ Interferon- γ (IFN- γ) activate macrophages to secrete TNF- α and to inhibit *P. brasiliensis* replication.^{5,12} Inducible nitric oxide synthase (iNOS), responsible for synthesis of nitric oxide (NO) is induced during macrophage activation by IFN- γ and TNF- α .¹³ In vitro studies have demonstrated a direct correlation between NO production and the microbicidal activity of macrophages in the presence of

intracellular microorganisms such as *L. major*, *M. bovis*, and *T. cruzi*.^{14,15} In murine models of PCM it was shown that NO is involved in protective^{16,17} as well as in immunosuppressive response to the fungus.^{5,18,19} Transforming growth factor-beta (TGF- β) and interleukin-10 (IL-10) are anti-inflammatory cytokines which antagonizes Th1-mediated activation of macrophages. Studies with several cell types in vitro indicate that TGF- β and IL-10 negatively control the expression of iNOS, responsible for the prolonged production of large amounts of NO.^{20, 21}

In this study we proposed to examine the pattern of cytokines (TNF- α , TGF- β and IL-10) and iNOS expression in lesions of patients with the JF (lymph nodes) and AF (oral mucosa) of PCM, in order to clarify the dynamics of the immune response occurring in the site of the inflammation.

RESULTS

A granulomatous inflammatory reaction was observed in all specimens with routine stains (HE) and confirmed with a panel of antibodies against lymphocytes, macrophages and neutrophils. The oral mucosa (OM) lesions comprised compact granulomas with epithelioid and giant cells aggregates surrounded by a lymphocytic halo. Some granuloma presented purulent exsudate in the central area. The number of yeast cells was lower in OM than in lymph nodes (Table 1). The yeast cells were intensely stained with anti-TGF- β monoclonal antibody. This antibody reacted nonspecifically with the fungal wall probably due to carbohydrate epitopes.

In the lymph nodes the granulomatous reaction was more extensive, looser and giant cells were more numerous than in OM. Some granulomas showed purulent foci. Large areas of necrosis were observed in association with numerous yeast cells. Approximately 80% of the lymph nodes from patients with the JF of PCM showed more than 50 yeast cells per field (Table 1).

No difference was observed among the tissues concerning the yeast cells viability, that was over 80%. Areas with a small number of shell-like empty cells (non-viable) were observed in lymph nodes and OM (table 2).

CD4+ and CD8+ T cells were observed in a localized pattern related to granulomas as well as in a diffuse arrangement. The number and localization of CD4+ and CD8+ T cells was very similar in all specimens (JF and AF of PCM) (Table 3).

Neutrophils (CD15+) were found around or forming micro-abscesses in the central areas of the granuloma and there was no significant difference among the tissues examined (Table 3).

The number of macrophages, epithelioid and giant cells showing strong positive staining by anti-CD68 was greater in lymph nodes than in the OM (Table 3). In lymph nodes, macrophages CD68+ constituted the majority of the cells (80-100%) of the inflammatory infiltrate, whereas in OM it was observed a more polymorphic cellular population. In this, macrophages (CD68+) represented 20-80% of the inflammatory cells.

Antibodies to cytokines produced a diffuse staining of the extracellular matrix, however it was possible to discern alterations in cellular distribution of the cytokines analyzed. The intracellular cytokine-staining pattern was predominantly cytoplasmic.

TNF- α reactivity was detected in sparse macrophages, neutrophils and giant cells. Similar number of positive cells was observed in both, lymph nodes and OM (table 4, fig. 1).

To confirm the production of NO, we examined iNOS expression in lymph nodes and OM of patients with PCM. A small number of iNOS positive cells, identified as macrophages, was detected in the inflammatory sites (table 4). CD4+ and CD8+ T cells around the granulomas did not express iNOS. In lymph nodes besides in sparse macrophages, iNOS was expressed also in giant cells. An interesting difference was consistently observed in relation to the localization of the

iNOS positive cells. In the OM the iNOS expression was restricted to few macrophages around the granuloma (Fig. 2a), while in lymph nodes a positive staining was observed in giant cells, as well as in macrophages close to the yeast cells (Fig. 2b).

Macrophages, neutrophils, epithelioid and giant cells were positive for TGF- β . The number of TGF- β positive cells was markedly higher in lymph nodes than in OM (table 4, figure 3).

IL-10 expression was observed in epithelioid and giant cells in the granulomas, and in lymphocytes. The number of IL-10 positive cells was markedly higher in lymph nodes as compared to OM (table 4, figure 4). Some neutrophils in the OM also stained positive for IL-10.

No specific staining was observed when isotype controls were used in place of primary antibodies.

Discussion

The granulomatous inflammatory response in PCM represents an immune specific tissue response of the host to the fungus in an attempt to destroy, block, and circumscribe the parasite and to prevent its multiplication. The inflammatory response present in lymph nodes of patients with the JF of PCM was characterized by numerous yeast cells inside macrophages and giant cells expressing TNF- α . In the OM, the number of TNF- α positive cells was slightly smaller, consistent with the low number of *P. brasiliensis* cells in the inflamed area. Entry of monocytes, neutrophils, and, lymphocytes from systemic circulation into the tissues is facilitated by TNF- α and other inflammatory cytokines, which induce expression of adhesion molecules, such as ICAM-1, on the surface of endothelial cells.²² TNF- α also stimulates endothelial cells and macrophages to secrete chemokines that induce leukocyte chemotaxis and recruitment of inflammatory cells.²²

TNF- α is required for the granuloma formation¹¹ and, together with IFN- γ , activates macrophages to kill *P. brasiliensis*.¹² The microbicidal activity of macrophages is related to the production of reactive oxygen and nitrogen intermediates, being NO one of the most potent cytotoxic agent.¹³ Since NO synthesis is induced by proinflammatory cytokines such as TNF- α , we analyzed iNOS expression in lesional tissues of PCM patients. In lymph node infiltrates we observed a small number of macrophages and giant cells expressing iNOS, some of them close to *P. brasiliensis* yeast cells. We expected to find an elevated

expression of iNOS in lymph nodes in response to the presence of considerable amounts of TNF- α and numerous yeast cells. iNOS immunoreactivity to a smaller degree was also detected in macrophages around granulomas in OM.

The role of NO in *P. brasiliensis* infection has not been clearly defined. Gonzalez *et al*¹⁶ showed that cytokine induced production of NO by macrophages inhibited the conidium to yeast transformation, a crucial step for the establishment of the infection. The expression of iNOS by macrophages within granulomas is consistent with a role for NO in fungistasis/killing. NO may be protective, acting as an effector molecule of macrophage cytotoxicity and as a regulator of inflammatory responses, but probably it has a secondary effect of causing immunosuppression.^{17,19} In a recent paper Nascimento *et al*¹⁸ demonstrated that NO is essential for resistance since iNOS-deficient mice were extremely susceptible to *P. brasiliensis* infection. Additionally, it was shown that high and persistent NO production is associated with susceptibility to *P. brasiliensis* infection.¹⁸

Inhibitory cytokines are important mediators in controlling the inflammatory response. In order to address the role of these cytokines we analyzed TGF- β and IL-10 expression by the infiltrating cells. TGF- β and IL-10 were greatly detected in lymph nodes from patients with the JF of PCM, probably promoting a local anti-inflammatory response. IL-10 is reported to inhibit Th1 cell-mediated responses mostly by downregulating expression of major histocompatibility complex class II and B7-1 (CD80) on antigen-presenting macrophages.²¹ The resistance of mice to

infection with various microorganisms is also impaired by the administration of recombinant IL-10.²¹ In previous studies of our group we showed that resistance to *P. brasiliensis*, observed in individuals living in endemic areas for PCM, is associated to a Th1 immune response and little or no IL-10 production.⁸ In the present study the detection of great amounts of IL-10 as well as TGF- β in the inflammatory lesions of patients with the JF of PCM is in agreement with the severe and disseminated outcome observed in this form of the disease. TGF- β has been shown to exert profound negative regulatory effect on iNOS expression in murine macrophages.²⁰ Therefore, it is possible that the low expression iNOS in the lesions of PCM, may represent a parasite-induced evasive mechanism allowing the survival inside the host tissues.

We have demonstrated that TNF- α , TGF- β and IL-10 are expressed simultaneously during the inflammatory response in both, lymph nodes (JF) and OM (AF). Coordinate expression of cytokines that upregulate or downregulate NO production may provide means of protecting host tissue from the damaging effects of NO.

In conclusion, our findings suggest that high expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β) in lesions of patients with the JF of PCM (lymph nodes) may represent a mechanism by which the fungus evade the host immune response, contributing for a more severe and disseminated form of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Biopsies specimens were taken from 18 patients with paracoccidioidomycosis cared for at the Clinical Hospital of State University of Campinas, São Paulo, Brazil. Due to different tissue localization of the lesions in different clinical forms of the disease, OM (OM) were obtained from patients with the adult localized form (n=8, 5 male and 3 female, age ranging from 40 to 70 years) and lymph node from patients with the juvenile form (n=10, 6 males and 4 female, age ranging from 6 to 30 years) of PCM. The biopsies were obtained before the beginning of treatment, for diagnosis purpose.

Light microscopy

Biopsies were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and, histological sections stained with hematoxylin-eosin (HE). In all cases the magnitude of the inflammatory infiltrate, the number of fungi and, the percentage of viable fungi were analyzed. The fungus was considered non-viable when it had the appearance of a shell-like empty cell.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed in paraffin-section according to the streptavidin-biotin technique. Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated in a growing alcohol series, placed in Tris-buffer (TBS) and then

submitted to antigen retrieval by boiling at 95°C in citrate buffer pH 6.0 for 30 minutes, except those incubated with the primary anti-CD4, which were additionally submitted to digestion with proteinase K (1.5mg/ml -Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) for 15 minutes at 37°C, according to manufacturer's instructions. The slides were incubated with avidin-biotin blocking kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Nonspecific protein binding was blocked by incubating the material with horse serum (Vector) or protein block serum-free (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) according to the secondary antibody for 30 minutes. After the slides were incubated with the primary anti-CD4 (NeoMarkers, Inc, Fremont, CA, USA), anti-CD8 (Dako), anti-CD15 (Dako), and anti-CD68 (Dako), anti-TGF- β 1 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA), anti-iNOS (BD Transduction Laboratories, USA), anti-TNF- α (Serotec, Oxford, UK) and anti-IL-10 (Santa Cruz) monoclonal and polyclonal antibodies, for 1 hour at 37°C and overnight at 4°C in a humidifying chamber. The following step was an intermediate incubation with biotinylated anti-mouse IgG H+L (Vector) or anti-rabbit IgG H+L (Vector) for 45 minutes at 37°C in a humidifying chamber, and subsequently with streptavidin complex (StreptABComplex/AP - Dako), for 30 minutes at 37°C in a humidifying chamber. Finally the slides were incubated with a freshly prepared substrate, consisting of naphthol AS-MX-Phosphate (Sigma) and fast red dye (Sigma). The slides were counterstained with Mayer's haemalaum (Merck, Darmstadt, Germany) and covered with glycerin-gelatin (Merck). For control

preparations, the primary antibodies were replaced by Mouse normal serum or Rabbit immunoglobulin Fraction (Dako).

Analysis of positive cells

Serial tissue sections were used and each of the eight different antibodies was applied on a different section from the same block, yielding eight stained sections per case. The analysis of positive cells was semiquantitative. The stained cells were expressed as percentage of all inflammatory cells seen for each stained section as follows: 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% and 80-100%.

Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grants 99/10264-6 and 00/00129-3.

References

1. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS (1987) Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop 20: 129-132.
2. Del Negro G, Lacaz CS, Zamith VA, Siqueira AM (1994) General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds) Paracoccidioidomycosis, CRC Press, Boca Raton, pp 225-232.
3. Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi, Rezkallah-Iwasso M, Montenegro MR (1989) Paracoccidioidomycosis. Baillière's Clin Trop Med Commun Dis 4: 185-219.
4. Calich VL, Kashino SS (1998) Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Braz J Med Biol Res 31:615-623.
5. Souto JT, Figueiredo F, Furlanetto A, Pfeffer K, Rossi MA, Silva JS (2000) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alfa determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. Am J Pathol 156:1811-1820.
6. Cano LE, Kashino SS, Arruda C, Andre D, Xidieh CF, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Burger E, Calich VL (1998) Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. Infect Immun 66:800-806.
7. Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHSL (2002) Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera

from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 40:153-159.

8. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaioordanou PMO, Blotta MHSL (2002) Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* 4:139-144.

9. Fornari MC, Bava AJ, Guereño MT, Berardi VE, Silaf MR, Negroni R, Diez RA (2001) High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. *Clin Diag Lab Immunol* 8:1036-1038.

10. Silva CL, Silva MF, Faccioli LH, Pietro RC, Cortez AS, Foss NT (1995) Differential correlation between interleukin pattern in disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol* 101: 314-320.

11. Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassali P (1989) The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 56: 731-740.

12. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA (1988) *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophage by IFN- γ for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Blastomyces dermatidis*. *J Immunol* 140:2786-2789.

13. MacMicking J, Xie Q, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350.

14. Green SJ, Scheller LF, Marletta MA, Seguin MC, Klots FW, Slayter M, Nelson BJ, Nacy CA (1994) Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Letters* 43:87-94.
15. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin 10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* 22:2501-2506.
16. Gonzalez A, Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE (2000) Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect Immun* 68:2546-2552.
17. Bocca AL, Silva MF, Silva CL, Cunha FQ, Figueiredo F (1999) Macrophages expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 61:280-287.
18. Nascimento FRF, Calich VLG, Rodriguez D, Russo M (2002) Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. *J Immunol* 168: 593-4600.
19. Bocca AL, Hayashi EE, Pinheiro AG, Furlanetto AB, Campanelli AP, Cunha FQ, Figueiredo F (1998) Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. *J Immunol* 161:3056-3063.

20. Letterio JJ, Roberts AB (1998) Regulation of immune responses by TGF- β . Annu Rev Immunol 16:137-161.
21. Moore KW, Malefyt RW, Coffman RL, O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol 19:683-765.
22. Imhof BA, Dunon D (1993) Leukocyte migration and adhesion. Adv Immunol 58:345-416.

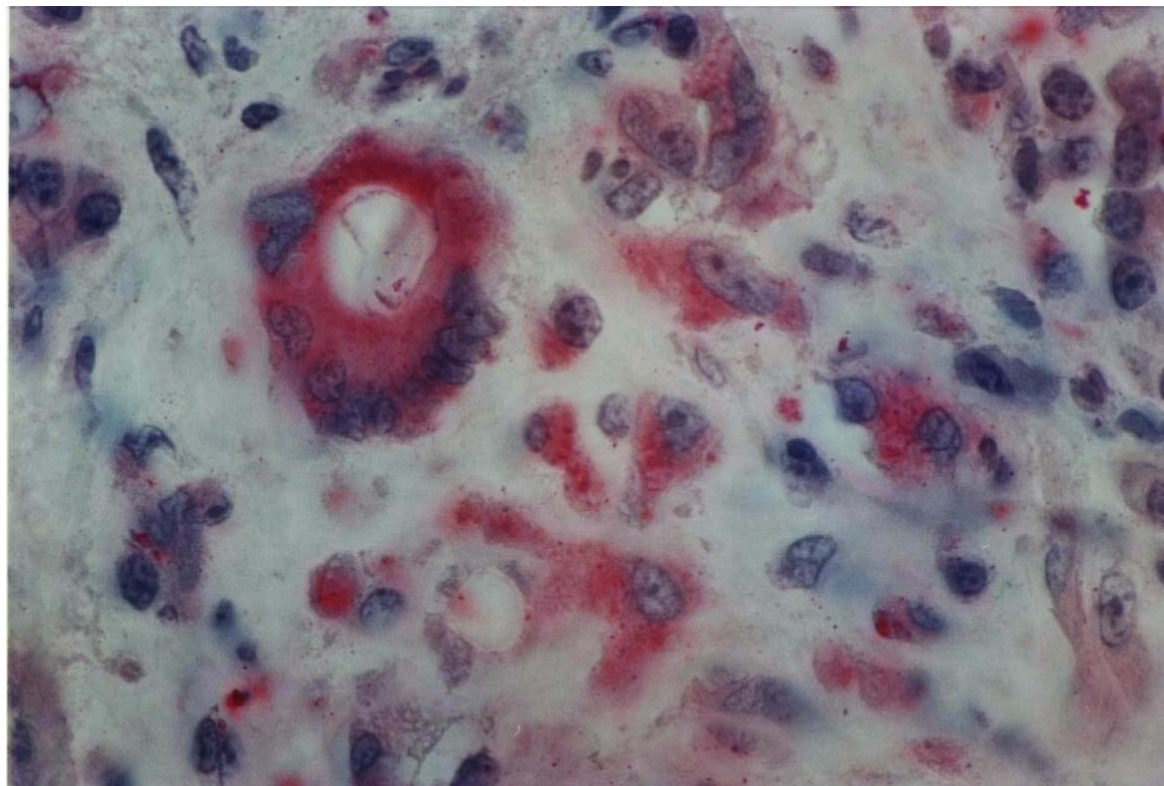


Figure 1: Lymph node - TNF- α expressed in macrophages and multinucleated giant cell (Streptavidin-biotin-AP method, X 1,250).

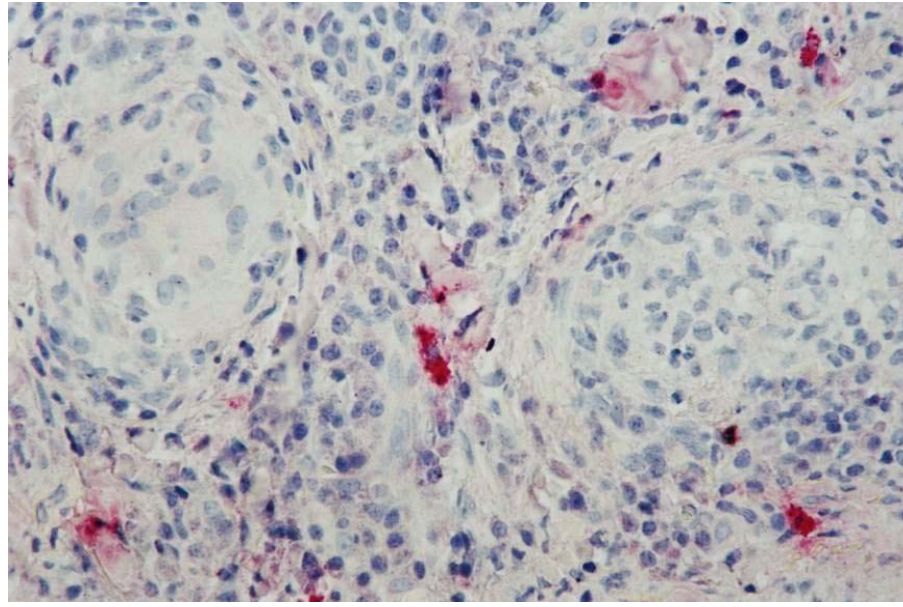


Figure 2a: Oral mucosa - There is a small number of iNOS positive macrophages around the granuloma (Streptavidin-biotin-AP method, X 330)

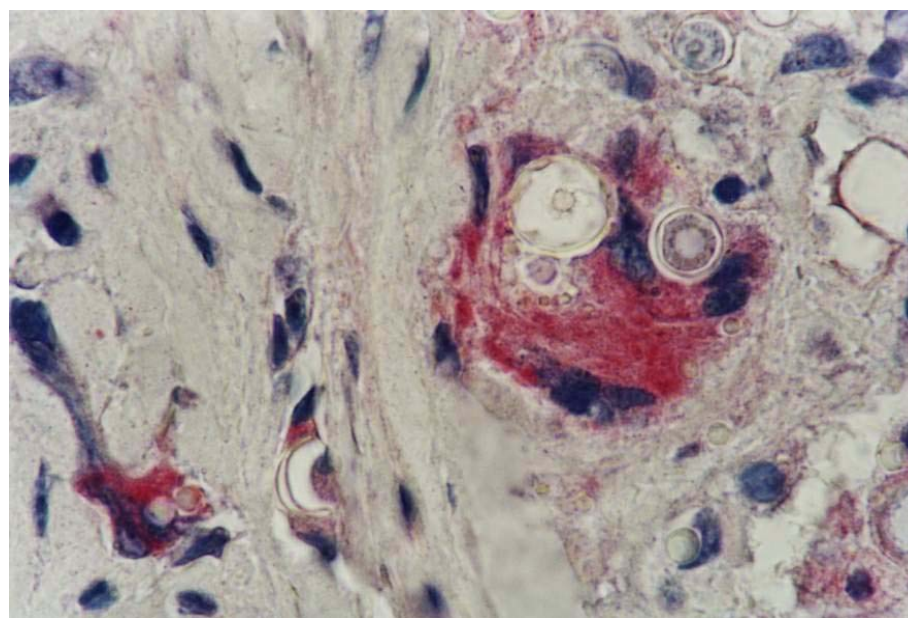


Figure 2b: Lymph node - Multinucleated giant cell iNOS positive with fungi in its cytoplasm. (Streptavidin-biotin-AP method, X 1,250)

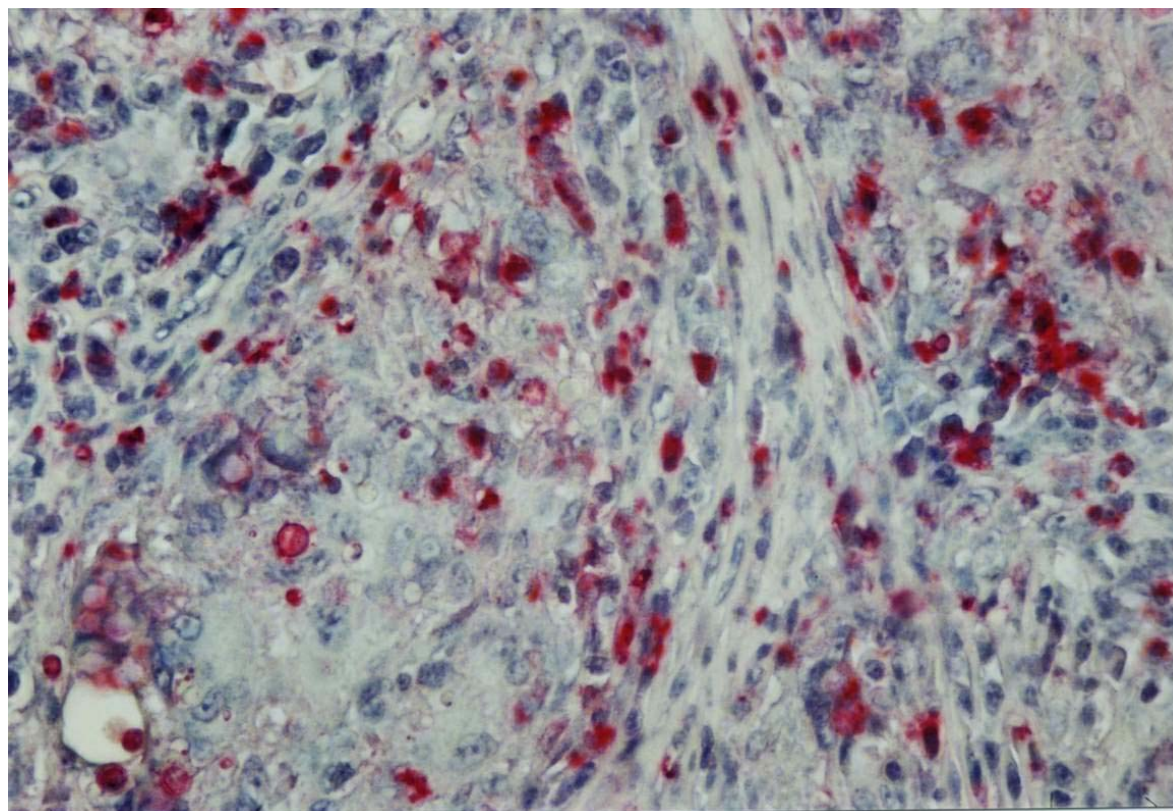


Figure 3: Lymph node - TGF- β expressed in numerous macrophages around the granuloma (Streptavidin-biotin-AP method, X 330).

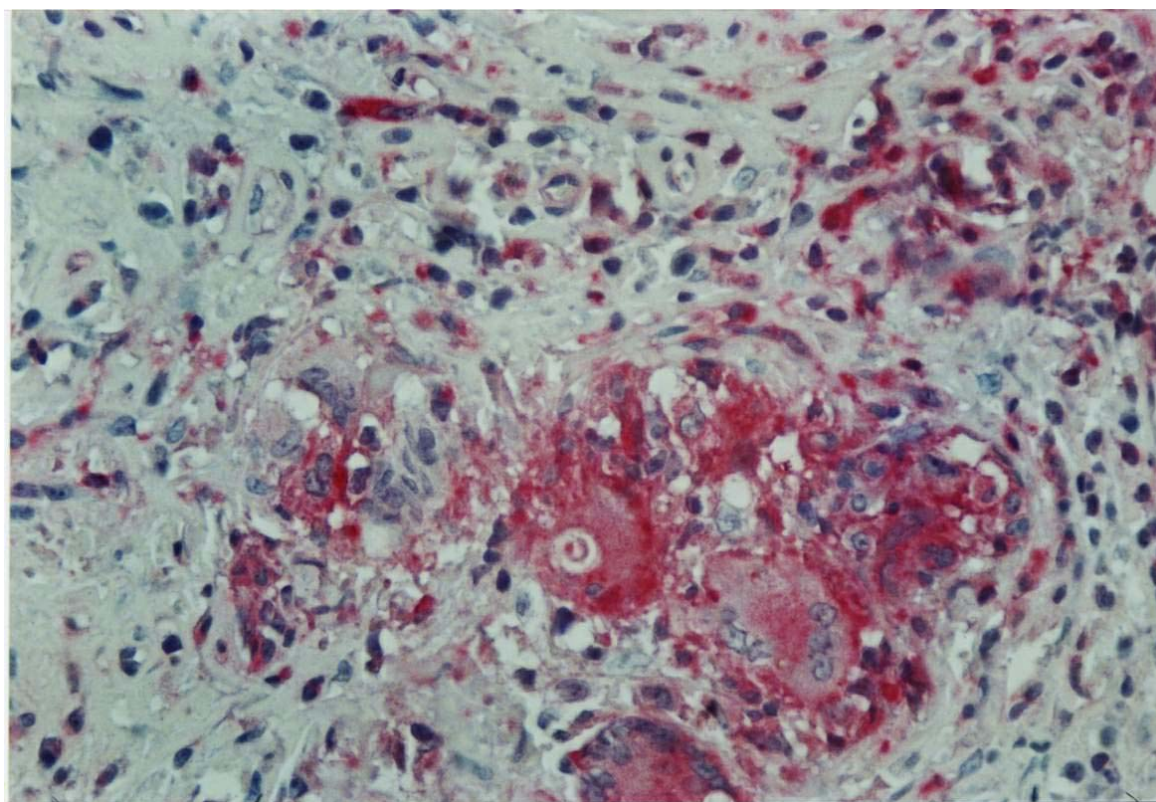


Figure 4: Lymph node - IL-10 expressed in multinucleated giant cells of the granuloma, macrophages and peripheral lymphocytes. (Streptavidin-biotin-AP method, X 330).

Table 1: Percentage distribution of biopsies presenting 1 to 25, 26 to 50 and more than 50 *P. brasiliensis* yeast cells /field.

	<i>1-25 yeast cells/ field</i>	<i>26-50 yeast cells/ field</i>	<i>> 50 yeast cells/field</i>
<i>Lymph node</i>	1 (10%)	1 (10%)	8 (80%)
<i>Oral mucosa</i>	2 (25%)	4 (50%)	2 (25%)

Table 2: Number of biopsies showing 40, 50, 60, or 80% of viable *P. brasiliensis* yeast cells/field.

	<i>40%</i>	<i>50%</i>	<i>60%</i>	<i>80%</i>
<i>Lymph node</i>	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	6 (60%)
<i>Oral mucosa</i>		1 (12.5%)	2 (25%)	5 (62,5%)

Table 3: Percentage of CD4+, CD8+, CD15+ and CD68+ cells in the inflammatory infiltrate of lymph nodes and oral mucosa of patients with PCM.

	CD4		CD8		CD15		CD68	
	LN	OM	LN	OM	LN	OM	LN	OM
0-20%	7(100%)	1 (20%)	6 (60%	1 (14%)	7 (70%	5 (62.5%)		1 (12.5%)
20-40%		3 (60%)	3 (30%)	4 (57%)	3 (30%)	1 (12.5%)		3 (37.5%)
40-60%		1 (20%)	1 (10%)	2 (29%)		1 (12.5%)	1 (10%)	2 (25%)
60-80%								2 (25%)
80-100%						1 (12.5%)	9 (90%)	

Table 4: Percentage of cytokine-positive cells in the inflammatory infiltrate of lymph nodes and oral mucosa of patients with PCM.

	TGF-β		iNOS		TNF-α		IL-10	
	LN	OM	LN	OM	LN	OM	LN	OM
0-20%	1 (10%)		10 (100%)	8 (100%)	5 (50%)	6 (100 %)	3 (30%)	5 (62.5%)
20-40%					1 (10%)		2 (20%)	3 (37.5%)
40-60%		3 (37.5%)					1 (10%)	
60-80%	2 (20%)	2 (25%)			4 (40%)		3 (30%)	
80-100%	7 (70%)	3 (37.5%)					1 (10%)	



4. DISCUSSÃO

Em trabalhos anteriores, caracterizamos a resposta imune de pacientes com a forma juvenil da PCM como tipo Th2, com a produção de anticorpos específicos IgG4 e IgE e das citocinas IL-4, IL-5 e TGF- β (MAMONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; MAMONI *et al.*, 2002). A baixa resposta linfoproliferativa a antígenos do fungo e teste cutâneo negativo foram associados a resposta imune celular deficiente, compatível com a forma mais grave e disseminada da doença.

Analisando cortes histológicos de linfonodos de pacientes com a FJ da PCM, observamos reação inflamatória com grande número de leveduras de *P. brasiliensis*, a maioria viável (parede celular e conteúdo íntegros). Neste tipo de tecido, a reação inflamatória era composta de granulomas frouxos e células gigantes. Áreas de necrose com abundantes células fúngicas foram observadas mais freqüentemente em linfonodos.

A avaliação de lesões de mucosa oral de pacientes com a forma adulta da doença mostrou granulomas mais organizados, contendo menor número de leveduras viáveis.

O granuloma na paracoccidioidomicose parece representar a resposta imune específica do fungo nos tecidos do hospedeiro, na tentativa de destruir, conter e prevenir a multiplicação do parasita (FRANCO, 1987).

A FA da PCM é caracterizada por infecção localizada, com a formação de granulomas epitelióides compactos com número pequeno de fungos, enquanto a FJ caracteriza-se por infecção disseminada, inflamação granulomatosa frouxa e

supurativa, com extensas áreas de necrose e um grande número de fungos (FAVA NETTO, 1961). Os padrões de granuloma descritos na doença humana têm sido correlacionados em infecções experimentais com camundongos normais e atímicos (nu/nu) (BURGER *et al*, 1996).

MOSCARDI-BACCHI *et al.* (1989) descreveram predomínio de linfócitos T CD4⁺ ao redor dos granulomas, quando analisaram cortes de tecido de pacientes com PCM, pela técnica de imunoistoquímica. Em contraste, não observamos diferenças em relação ao número de células TCD4⁺ e TCD8⁺, tanto nas biópsias de linfonodos, quanto nas biópsias de mucosa oral.

Macrófagos ativados por linfócitos T, participam da morte dos fungos, além de diferenciarem-se em células epitelióides e gigantes. Além dos macrófagos, neutrófilos que se concentram ao redor das células do fungo, contribuem para a morte do parasita através da liberação de produtos citotóxicos e citocinas inflamatórias no local. Em adição, os granulomas na PCM mostram número variado de células natural killer e eosinófilos que também participam da morte do fungo (WAGNER *et al*, 1998).

Em nosso estudo, observamos que a expressão de TNF- α em neutrófilos, macrófagos isolados e células gigantes foi similar em linfonodos e mucosa oral. O TNF- α é necessário para a expressão de RNAm para quimiocinas e o recrutamento inicial de macrófagos e linfócitos para o sítio de infecção. Em camundongos, cujo gene que codifica para a produção de TNF- α foi bloqueado (TNF- α γ), a expressão tardia de quimiocinas leva à formação de granulomas

frouxos, incapazes de controlar a infecção por microrganismos intracelulares. Por outro lado, a produção sustentada de TNF- α por macrófagos infectados, juntamente com sua deficiente ativação, poderia causar o recrutamento contínuo de células inflamatórias para as lesões, levando a destruição do tecido. Em nosso estudo, verificamos extensas áreas de necrose em linfonodos de pacientes com a forma juvenil da doença, embora o número de células positivas para esta citocina tenha sido semelhante ao encontrado na mucosa oral. TNF- α tem sido proposto como o principal mediador da necrose em tecidos infectados por *M. tuberculosis*, quando citocinas Th1 são dominadas por Th2 (FLYNN & CHAN, 2001).

Citocinas inflamatórias como o TNF- α e IFN- γ induzem a transcrição da enzima iNOS, responsável pela produção de NO. Em nosso estudo, a expressão de iNOS na reação inflamatória da mucosa oral ficou restrita a pequeno número de macrófagos localizados na periferia dos granulomas, não sendo encontradas células positivas próximas aos fungos. Já nos linfonodos, observamos expressão um pouco maior de iNOS em macrófagos esparsos ao redor dos granulomas e em células gigantes.

A produção de NO parece ser crucial para que os macrófagos possam exercer sua função microbicida, entretanto, em várias situações um efeito imunossupressor foi observado. Macrófagos esplênicos de animais infectados com *Histoplasma capsulatum* expressam iNOS, tanto mRNA como proteína. Esplenócitos isolados durante a fase aguda morrem mais rapidamente em cultura e não respondem a estímulo com o antígeno específico, sendo estes dois fatos

associados a produção de NO (WU-HSIEH, CHEN & LEE, 1998). BOCCA *et al.* (1998, 1999) também descreveram um efeito imunossupressor do NO durante a infecção experimental por *P. brasiliensis*, evidenciada pela diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II e inibição da resposta proliferativa de células esplênicas.

O TGF- β inibe a produção de iNOS induzida por IFN- γ e TNF- α em macrófagos de camundongos infectados por *P. brasiliensis* (GONZALEZ *et al.*, 2000). Em nosso estudo, a expressão de TGF- β tanto em lesões de mucosa oral (granulomas) como em linfonodos (células gigantes) sugere que esta citocina tem importante papel na regulação da resposta imune local em ambas as formas da doença. Entretanto, um maior número de células expressando TGF- β foi observado em linfonodos de pacientes com a FJ da doença, o que poderia estar levando a uma redução da iNOS nas lesões. Este achado está em concordância com trabalho anterior no qual detectamos níveis elevados de TGF- β no soro de pacientes com a forma juvenil da PCM (MAMONI *et al.*, 2002).

FRANCO e col. (1998) detectaram TGF- β em lesões pulmonares fibróticas de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. A participação do TGF- β na cicatrização e reparo tecidual tem sido descrita por vários autores (LETTERIO & ROBERTS, 1998).

Além do TGF- β , a ativação da capacidade microbicida de macrófagos parece ser anulada pelo excesso de IL-10. Foi descrito que a IL-10 pode

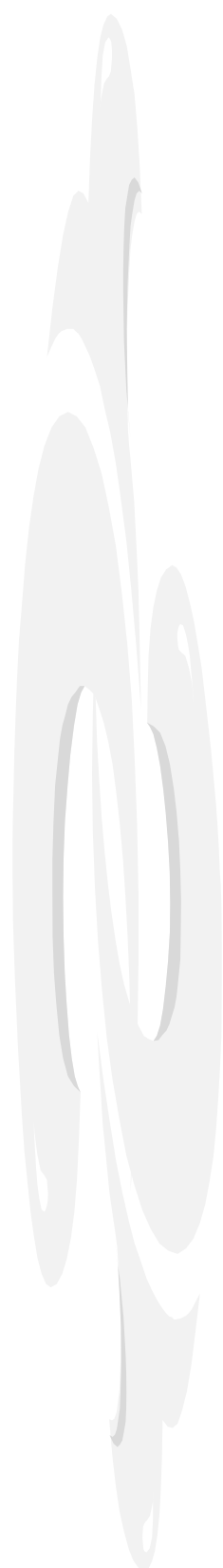
neutralizar os efeitos do TNF- α por meio da indução do seu receptor solúvel (sTNF- α R) (BALCEWICZ-SABLINSKA *et al*, 1998).

Nossos achados mostraram maior número de células positivas para IL-10 em linfonodos de pacientes com a FJ da doença. Esta citocina, com potente atividade anti-inflamatória, tem ação inibitória sobre macrófagos, no que concerne a atividade microbicida e a capacidade de apresentação de antígeno. Como resultado, a resposta imune celular do hospedeiro ficaria prejudicada resultando em uma forma mais grave da doença. Em trabalho utilizando células mononucleares de sangue periférico de pacientes com PCM, observamos que a estimulação com antígeno de *P. brasiliensis* leva a produção consistente de IL-10 *in vitro*. Entretanto, em indivíduos com PCM-infecção, que não desenvolvem a doença, uma vigorosa resposta imune celular (linfoproliferação, teste cutâneo positivo, produção de IFN- γ e TNF- α) é acompanhada de níveis basais de IL-10. Este achado associado a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 indica que a ausência de IL-10 pode estar desviando a resposta para Th1, resultando em maior proteção para o hospedeiro.

Concluindo, a análise histopatológica de lesões de pacientes com a forma adulta (mucosa oral) e juvenil (linfonodos) mostrou que na reação inflamatória da FJ da PCM há tendência à maior produção de TGF- β e IL-10 do que na FA da doença, o que está de acordo com nossos achados anteriores de níveis elevados de TGF- β e IL-10 no soro e sobrenadante de cultura de linfócitos, respectivamente, de indivíduos com esta forma clínica. Com relação ao TNF- α ,

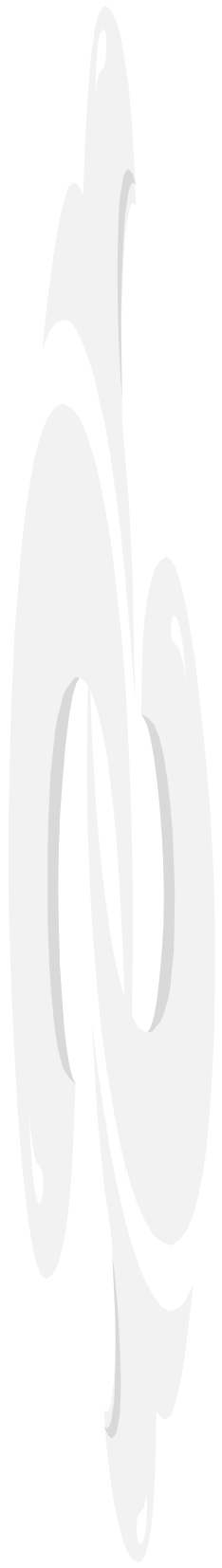
números similares de células expressando esta citocina foram observados, não sendo possível correlacionar com achados sistêmicos, nos quais níveis mais elevados foram detectados nas formas de resistência da doença, associados a uma resposta protetora do tipo Th1. A presença de pequeno número de células iNOS⁺ tanto em linfonodos como na mucosa oral poderia ser resultante da inibição por TGF- β e IL-10, detectados consistentemente em ambos os tecidos. A indução destas citocinas inibitórias poderia ser interpretada como um mecanismo de evasão do fungo à resposta imune do hospedeiro.

Em resumo, a análise da produção de citocinas e do infiltrado celular presente nas lesões teciduais de pacientes com diferentes formas clínicas da PCM mostrou que a resposta imune não é tão polarizada como descrito para a hanseníase (forma lepromatosa vs. tuberculóide) (GOULARD *et al.*, 1996, KANOLKAR-YOUNG, SNOWDON & LOCKWOOD, 1998) e leishmaniose (STENGER *et al.*, 1994). Entretanto, foi possível observar diferenças entre os dois tipos de tecidos estudados, principalmente no que concerne a expressão de TGF- β e IL-10, maior em linfonodos. A presença de níveis mais elevados de citocinas inibitórias da resposta imune celular poderia ser responsável pela forma mais grave e disseminada da doença.



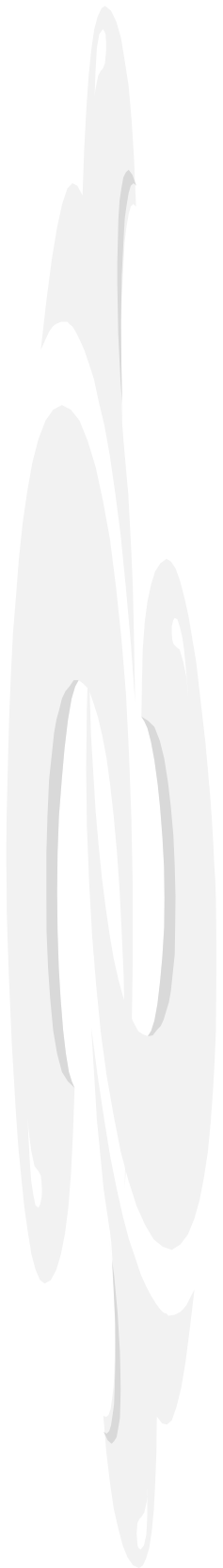
5. CONCLUSÃO

- O elevado número de macrófagos em linfonodos sugere uma maior ativação destas células em resposta ao grande número de fungos observados nas lesões de pacientes com a FJ da doença.
- A formação de granulomas frouxos e a detecção de um maior número de células expressando citocinas imunossupressoras (TGF- β e IL-10), em lesões de pacientes com a FJ da PCM, estariam contribuindo para uma forma mais grave e disseminada da doença.



6. SUMMARY

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, with high incidence in Brazil. In order to examine the immune response in lesional tissue of patients with PCM, we analyzed cytokines as well as the phenotype of cellular infiltrate. Paraffin-embedded tissue from oral mucosa of 8 patients with the localized adult form (AF) of PCM and lymph nodes of 10 patients with the juvenile form (JF) of PCM was analyzed by immunohistochemistry to detect tumor necrosis factor- α (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), transforming growth factor- β (TGF- β), and interleukin-10 (IL-10). In the lymph nodes the majority of inflammatory cells was CD68+ (macrophages, epithelioid and giant cells) while in the oral mucosa a mixed infiltrate with macrophages, plasma cells and neutrophils was detected. TNF- α as well as iNOS expression was similar in lymph nodes and oral mucosa, whereas TGF- β and IL-10 were observed in a higher number of macrophages, epithelioid and giant cells in the lymph nodes, where numerous yeast cells were visualized. The higher expression of anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β) in lesions of patients with the JF of PCM (lymph nodes) may represent a mechanism by which the fungus evade the host immune response, contributing for a more severe and disseminated form of the disease.



7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S.R.; MORAES, J.Z.; CAMARGO, Z.P.; GESZTESI, J.L.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. - Pattern of immune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* in susceptible and resistant mice is influenced by antigen-presenting cells. **Cell Immunol.** **190**: 68-76, 1998.
- ANDRADE, J.A.F.; ANDRADE, T.M.; LACAZ, C.S.; RODRIGUES, M.C.; PREUSS, M.; LOURENÇO, R.; BADARÓ, R. – Inquérito com paracoccidioidina em uma população da Bahia (Brasil). **Rev . Inst. Med. Trop. São Paulo.** **26**: 1-6, 1984.
- BALCEWICZ-SABLINSKA, MK; KEANE, J; KORFELD, H; REMOLD, HG. - *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . **J. Immunol.** **161**: 2636-2641, 1998.
- BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; SANTOS, S.B.; BADARÓ, F.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; FALCOFF, E.; FALCOFF, R. – Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** **163**: 853-857, 1991.
- BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.W.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. – Transforming growth factor - β in leishmania infection: a parasite escape mechanism. **Science** **257**: 545-548, 1992.

- BENARD, G.; HONG, M.A.; DEL-NELGRO, G.M.B.; BATISTA, L.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; DUARTE, A.J.S. – Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **54**: 7-12, 1996.
- BENARD, G.; ROMANO, C.C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S. - Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine** **13** (4): 248-252, 2001.
- BOCCA, A.L.; HAYASHI, E.E.; PINHEIRO, A.G.; FURLANETTO, A.B.; CAMPANELLI, A.P.; CUNHA, F.Q.; FIGUEIREDO, F. – Treatment of *Paracoccidioides brasiliensis* – infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.** **161**:3056-3063, 1998.
- BOCCA, A.L.; SILVA, M.F.; SILVA, C.L.; CUNHA, F.Q.; FIGUEIREDO, F. – Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **61**: 280-287, 1999.
- BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. – The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.** **10**: 80-87, 2002, Revisão.
- BLACKWELL, J.M.; TOOLE, S.; KING, M.; DAWDA, P.; ROACH, T.L.; COOPER, A. - Analysis of Lsh gene expression in congenic B10.L.Lsh^f mice. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **137**: 301, 1988.

- BLOTTA, M.H.S.L.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUÉR, S.A.; PAPAORDANOU, P.M.O.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. – Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiological study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 1999.
- de BRITO, T. & FRANCO, M.F. - Granulomatous inflammation. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 36: 185-192, 1994. Revisão.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E. & RESTREPO, A. - Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.** 6: 89-117, 1993.
- BRUMMER, E.; HANSON, L.H. & STEVENS, D.A. – Gamma-interferon activation of macrophages for killing of *Paracoccidioides brasiliensis* and evidence for nonoxidative mechanisms. **Int. J. Immunopharmacol.** 10(8): 945-52, 1988.
- BURGER, E.; MIYAJI, M.; SANO, A.; CALICH, V.L.G.; NISHIMURA, K.; LENZI, H.L. – Histopathology of paracoccidioidomycotic infection in athymic and euthymic mice: a sequential study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 55: 235-242, 1996.
- CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGER, E. – Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.** 66: 585-594, 1985.
- CALICH, V.L.G. & KASHINO, S.S. – Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31: 615-623, 1998.

- CAMPOS, C.M. & FAVA-NETO, C. – Reações intradérmicas de paracoccidioidina e de histoplasmina em habitantes urbanos de Bragança Paulista, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 20:** 289-292, 1978.
- CANO, L.E.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.C.; RUSSO, M.; CALICH, V.L. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun. 63:** 1777-1783, 1995.
- CANO, L.E.; ARANGO, R.; SALAZAR, M.E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. – Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by pulmonary macrophages and the effect of cytokines. **J. Med. Vet. Mycol. 30:** 161-168, 1992.
- CANO, L.E.; CASINO, S.S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C.F.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; CALICH, V.L. – Protective role of γ interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun. 66:** 800-806, 1998.
- CERWENKA, A. & SWAIN, S.L. – TGF- β 1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. **Microb. Infect. 1:** 1291-1296, 1999.
- CLARK, D.A. & COKER, R. – Transforming growth factor-beta (TGF- β). **Int. J. Bioch. Cell. Biol. 30:** 293-298, 1998.

- CORRADIN, S.B.; BUCHMULLER-ROUILLER, Y.; SMITH, J.; SUARDET, L.; MAUEL, J. – Transforming growth factor- β 1 regulation of macrofage activation depends on the triggering stimulus. **J. Leukoc. Biol.** **54**: 423-429, 1993.
- DEEPE, G.S.Jr.; ROMANI, L.; CALICH, V.L.; HUFFNAGLE, G.; ARRUDA, C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.; PERFECT, J.R. – Knockout mice as experimental models of virulence. **Med. Mycol.** **38**: 87-98, 2000.
- DEFAVERI, J.; FECCHIO, D.; SANO, A.; ITO, E.; KURITA, N.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. -Cytokines, B and T CD4/CD8 lymphocytes in the lung of murine pulmonary paracoccidioidomycosis. *In*: Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose VII. Campos do Jordão. São Paulo, Brasil. 1999. **Anais.** P-144. E-08.
- DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; ZAMITH, V.A.; SIQUEIRA, A.M. - General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. *In*: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G (eds) **Paracoccidioidomycosis**, CRC Press, Boca Raton, pp 225-232, 1994.
- DENIS, M.; FORGET, A.; PELLETIER, M; SKAMENE, E. – Pleiotropic effects of Bcg gene. III. Respiratory burst in Bcg-congenic macrophages. **Clin. Exp. Immunol.** **73**: 370, 1988.
- DINARELLO, C.A. – Proinflammatory cytokines. *Chest* 118 (2): 503-508, 2000.

- DLUGOVITZKY, D.; BAY, M.L.; RATENI, L.; URIZAR, L.; RONDELLI, C.F.M.; LARGACHA, C.; FARRONI, M.A.; MOLTENI, O.; BOTTASSO, O.A. – *In vitro* synthesis of interferon- γ , interleukin-4, transforming growth factor- β and interleukin-1 β by peripheral blood mononuclear cells from tuberculosis patients: relationship with the severity of pulmonary involvement. **Scand. J. Immunol.** **49**: 210-217, 1999.
- FAVA-NETTO, C. – Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (Blastomicose sul-americana). **Rev. Inst. Adolfo Lutz** **21**: 99-194, 1961.
- FIGUEIREDO, F.; ALVES, L.M.C. & SILVA, C.L. – Tumor necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the wall fractions thereof. **Clin. Exp. Immunol.** **93**: 189-194, 1993.
- FLYNN, J.L. & CHAN, J. – Immunology of tuberculosis. **Ann. Rev. Immunol.** **19**: 93-129, 2001.
- FORNARI, M.C.; BAVA, A.J.; GUEREÑO, M.T.; BERARDI, V.E.; SILAF, M.R.; NEGRONI, R.; DIEZ, R.A. - High serum interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha levels in chronic paracoccidioidomycosis. **Clin Diag Lab Immunol** **8**:1036-1038, 2001.
- FRANCO, M.-Host parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** **25**: 5-18, 1986.

- FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.; MONTENEGRO, M.R. -Paracoccidioidomycosis. **Bailliere's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. 4**:185-220, 1989.
- FRANCO, M.F.; MONTENEGRO, M.R.G.; MENDES, R.P.; MARCOS, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. -Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med Trop. 20**: 129-132, 1987.
- FRANCO, L.; NAJVAR, L.; GOMEZ, B.L.; RESTREPO, S.; GRAYBILL, J.R.; RESTREPO, A. - Experimental pulmonary fibrosis induced by *Paracoccidioides brasiliensis* conidia: measurement of local host responses. **Am. J. Trop. Med. Hyg. 58**: 424-430, 1998.
- GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. – The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin 10 and transforming growth factor- β . **Eur. J. Immunol. 22(10)**: 2501-6, 1992.
- GAZZINELLI, R.T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E.Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. - Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol. 153**: 2533-2543, 1994.

- GOLDMAN, D.; CHO, Y.; ZHAO, M.; CASADEVALL, A.; LEE, S.C. – Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary *Cryptococcus neoformans* granulomas. **Am. J. Pathol.** **148**: 1275-1282, 1996.
- GONZALEZ, A.; de GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L.E. – Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. **Infec. Immun.** **68**: 2546-2552, 2000.
- GOULARD IM; FIGUEIREDO F; COIMBRA T; FOSS NT. - Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **Am. J. Pathol.****148(3)**: 911-917, 1996
- GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. – *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanisms in IFN-stimulated macrophages by induction of TNF. **J. Immunol.** **145**: 4290, 1990.
- GREEN, S.J. & NACY, C.A. – Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** **6**: 384, 1993.
- GREEN, S.J.; SCHELLER, L.F.; MARLETTA, M.A.; SEGUIN, M.C.; KLOTS, F.W.; SLAYTER, M.; NELSON, B.J.; NACY, C.A. - Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunol Letters** **43**:87-94, 1994.

- HARRISON, D.G. – Endothelial function and oxidant stress. **Clin. Cardiol.** **20**: 11-7, 1997. Revisão.
- HEINZEL, F.P.; SCHOENHAUT, D.S.; RERKO, R.M.; ROSSER, L.E.; GATELY, M.K. - Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.** **177**: 1505-1509, 1993.
- HERNANDEZ-PANDO, R.; SCHON, T.; OROZCO, E.H.; SERAFIN, J.; ESTRADA-GARCIA, I. – Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. **Exp. Toxicol. Pathol.** **53**: 257-265, 2001.
- IMHOF, B.A. & DUNON, D. - Leukocyte migration and adhesion. **Adv Immunol** **58**:345-416, 1993.
- KANOLKAR-YOUNG S, SNOWDON D & LOCKWOOD, DN. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. **Clin. Exp. Immunol.** **113(3)**:438-42., 1998.
- KARHAWI, A.S.; COLOMBO, A.L. & SALOMAO, R. – Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.** **38** (3): 225-9, 2000.

- KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L.H.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. – Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. **J. Interferon Cytokine Res.** **20**: 89-97, 2000.
- KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, M.; QIFENG, X.; SAITO, A. – Interleukin-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Exp. Immunol.** **104**: 208-214, 1996.
- KINDLER, V.; SAPPINO, A.P.; GRAU, G.E.; PIGUET, P.F.; VASSALI, P. - The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell** **56**: 731-740, 1989.
- LACAZ, C.S. - South american blastomycosis. **An. Fac. Med. S. Paulo** **29**: 7-120, 1956.
- LAKE, F.R.; NOBLE, P.W.; HENSON, P.M.; RICHES, D.W.H. – Functional switching of macrophage responses to tumor necrosis factor- α (TNF- α) by interferons: implications for the pleiotropic activities of TNF- α **J. Clin. Invest.** **83**: 1661-1669, 1994.
- LANE, T.E.; OTERO, G.C.; WU-HSIEH, B.; HOWARD, D.H. – Expression of inducible nitric oxide synthase by activated macrophages correlates with their antihistoplasma activity. **Infect. Immun.** **62**: 1940-1945, 1994.

- LETTERIO, J.J. & ROBERTS, A.B. – Regulation of immune responses by TGF- β .
Annu. Rev. Immunol. 16: 137-161, 1998. (Revisão).
- LIEW, F.Y. – Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. **Immunol. Letters. 43:** 95-98, 1994.
- LIEW, F.Y. – The role of nitric oxide in parasitic diseases. **Ann. Trop. Med. Parasitol. 87:** 637, 1993
- MACCARTNEY-FRANCIS, N.L. & WAHL, S.M. – Transforming growth factor β : a matter of life and death. **J. Leukoc. Biol. 55:** 401-409, 1994. Revisão.
- MACMICKING, J.; XIE, Q. & NATHAN, C. – Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol. 15:** 323-350, 1997.
- MAMONI, R.L.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Am. J. Med. Hyg. 65:** 237-241, 2001.
- MAMONI, R.L.; NOUÉR, S.A.; OLIVEIRA, S.J.; MUSATTI, C.C.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. Enhanced Production of Specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in Sera from Patients with the Juvenile Form of Paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol. 40:** 1-7, 2002.

- MARQUES, S.A.; FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; SILVA, N.C.; BACCILI, C.;
CURCELLI, E.D.; FERACIN, A.C.; OLIVEIRA, C.S.; TAGLIARINI, J.V.;
DILLON, N.L.-Aspectos epidemiológicos da paracoccidiodomicose na área
endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). **Rev. Inst. Med. Trop. São
Paulo** **25**: 87-92, 1983.
- MARTIN-OROZCO, N.; ISIBASI, A. & ORTIZ-NAVARRETE, V. - Macrophages
present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex
molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon- γ
activation. **Immunology** **103**: 41-48, 2001.
- MOK, W.Y. & FAVA-NETO, C. – Paracoccidiodin and histoplasmin sensitivity in
Coari (state of Amazonas), Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **27**: 808-814,
1978.
- MONCADA, S. & HIGGS, A. – The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J.*
Med. 329: 2002-2012, 1993. Revisão.
- MONTENEGRO, M.R.G. - Formas clínicas da paracoccidiodomicose. **Rev. Inst.**
Med. Trop. São Paulo **28**: 203-204, 1986.
- MOORE, K.W.; de WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. –
Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.** **19**: 683-
765, 2001. Revisão.

- MOSCARDI-BACCHI, M.; SOARES, A.; MENDES, R.; MARQUES, S.; FRANCO, M. – *In situ* localization of T lymphocyte subsets in human paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.** **27**: 149-158, 1989.
- MOSCARDI-BACCHI, M.; BRUMMER, E. & STEVENS, D.A. – Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **J. Med. Microbiol.** **40**: 159-164, 1994.
- MOTA, N.G.; REZKALLAH-IWASSO, M.T.; PERAÇOLI, M.T.S.; AUDI, R.C.; MENDES, R.P.; MARCONDES, J.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; FRANCO, M.F. - Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** **79**: 765-772, 1985.
- MUSATTI, C.C.; REZKALLAH, M.T.; MENDES, E.; MENDES, N.F. - *In vivo* and *in vitro* evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. **Cell Immunol.** **24**: 365-378, 1976.
- NAGELKERKEN, L.; GOLLOB, K.J.; TIELEMANS, M.; COFFMAN, R.L. – Role of transforming growth factor- β in the preferential induction of T helper cells of type 1 by staphylococcal enterotoxin B. **Eur. J. Immunol.** **23**: 2306, 1993.

- NAKAMURA, T.; WU-HSIEH, B. & HOWARD, D.H. – Recombinant murine gamma interferon stimulates macrophages of the RAW cell line to inhibit the intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. **Infect. Immun.** **62**: 680-684, 1994.
- NASCIMENTO, F.R.; CALICH, V.L.G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. – Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.** **168**: 4596-4600, 2002.
- NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W.; WIEBE, M.E.; RUBIN, B.Y. – Identification of interferon- γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.** **158**: 670-689, 1983.
- NATHAN, C. – Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J. Clin. Invest.** **100**: 2417-2423, 1997. Revisão.
- O'GARRA, A. – Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. **Chem. Immunol.** **63**: 1-13, 1996.
- OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. – Cytokines profile and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis. **Microb. Infect.** **4(2)**:139-44, 2002.

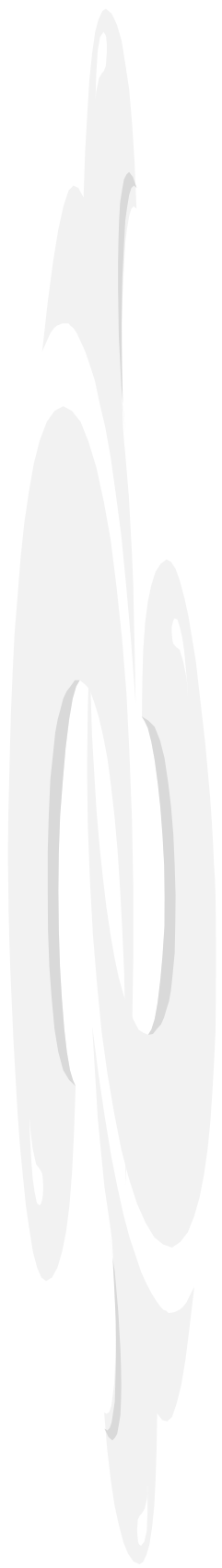
- OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L. & BLOTTA, M.H.S.L. – Resistance in human paracoccidioidomycosis is associated with increased production of IL-2, IFN- γ and TNF- α by peripheral blood mononuclear cells. *In*: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSE, VIII, Pirenópolis / Goiás, 2002. **Annual Review of Biomedical Sciences** P. 105. 03-42.
- OPAL, S.M. & DEPALO, V. – Anti-inflammatory cytokines. **Chest**.**117**:1162-1172, 2000.
- OPAL, S.M.; WHERRY, J.C. & GRINT, P. – Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. **Clin. Infect. Dis.** **27**: 1497-1507, 1998. Revisão.
- OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. – Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a coestimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **89 (18)**: 8676-80, 1992.
- PAWELEE, G.; REHBEIN, A.; SCHLOTZ, E.; FRICCIUS, H.; POHLA, H. – Cytokine modulation of Th1/Th2 phenotype differentiation in directly alloresponsive CD4⁺ human T cells. **Transplantation.** **62**: 1095, 1996.

- POWRIE, F.; CARLINO, J.; LEACH, M.W.; MAUZE, S.; COFFMAN, R.L. – A critical role of transforming growth factor- β but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB (low) CD4⁺ T cells. **J. Exp. Med.** **183**: 2669, 1996.
- RODRIGUES, D.R.; PAGAGLLI, E.; DIAS, L.A.; CALVI, S.A.; PERAÇOLLI, M.T.S.; SOARES, A.M.V.C. – “*In vitro*” fungicidal activity of human monocytes against *Paracoccidioides brasiliensis*: comparison of high and low virulent stains with isolates from armadillos. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSE, VII, Campos do Jordão/Brasil, 1999. **Anais. P.** 152. E-16.
- SALAZAR, M.E. & RESTREPO, A. – Morphogenesis of the mycelium to yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia J. Med. Vet. Mycol.** **22**: 7-11, 1984.
- SAN-BLAS, G. & SAN-BLAS, F. – Molecular aspects of dimorphism. **CRC Crit. Rev. Microbiol.** **11**: 101-127, 1982.
- SAN-BLAS, G.; SAN-BLAS, F.; RODRIGUEZ, L.E.; CASTRO, C.J. – A model of dimorphism in pathogenic fungi: *Paracoccidioides brasiliensis*. **Acta Cient. Venez.** **38**: 202-211, 1987.
- SAN-BLAS, G. - Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.** **31**: 99-113, 1993.

- SANTAMBROGIO, L.; HOCHWALD, G.M.; SAXENA, B.; LEU, C.H.; MARTZ, J.E.;
CARLINO, J.A.; RUDDLE, N.H.; PALLADINO, M.A.; GOLD, L.I.;
THORBECKE, G.J. – Studies on the mechanisms by which transforming
growth factor- β protects against allergic encephalomyelitis: antagonism
between TGF- β and tumor necrosis factor. **J. Immunol.** **151**: 1116, 1993.
- SCHOEDON, G.; TROPPEMAIR, J.; FONTANA, A.; HUBER, C.; CURTIS, H.C.;
NIEDERWIESER, A. - Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral
blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse. **Eur. J.**
Biochem. **166**: 303-310, 1987.
- SHEFFLER, L.A.; WINK, D.A.; MELILLO, G.; COX, G.W. - Exogenous nitric oxide
regulates IFN-gamma plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase
expression in mouse macrophages. **J. Immunol.** **15**: 886-894, 1995.
- SILVA, C.L. & FIGUEIREDO, F. – Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis
patients. **J. Infec. Dis.** **164**: 1033-1034, 1991.
- SILVA, C.L.; SILVA, M.F.; FACCIOLI, L.H.; PIETRO, R.C.L.; CORTEZ, S.A.E.;
FOSS, N.T. – Differential correlation between interleukin patterns in
disseminated and chronic human paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp.**
Immunol. **101**: 314-320, 1995.

- STENGER, S.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. – Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.** **180**: 783-793, 1994.
- SOUTO, J.T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. - Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.** **156(5)**: 1811-20, 2000.
- TAKEUCHI, M.; ALARD, P.& STREILEIN, J.W. – TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. **J. Immunol.** **160(4)**: 1589-97, 1998.
- TOOSI, Z.; GOGATE, P.; SHIRATSUCHI, H.; YOUNG, T.; ELLNER, J.J. – Enhanced production of TGF- β by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF- β in tuberculous granulomatous lung lesions. **J. Immunol.** **154**: 465-473, 1995.
- TRAVASSOS, L.R.R.G. – Imunologia: *In*: Uma vitória contra os fungos. **Rev. FAPESP** **50**: 22-24, 2000.
- VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q. & SILVA, J.S. – Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.** **62**: 5177, 1994.

- VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. – Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β . **J. Exp. Med.** **178**: 605, 1993.
- VODOVOTZ, Y. – Control of nitric oxide production by transforming growth factor- β 1: mechanistic insights and potencial relevance to human disease. *Nitric Oxide* 1: 3-17, 1997. Revisão.
- WAGNER, J.M.; FRANCO, M.; KEPHART, G.M.; GLEICH, G.J. – Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. **Am. J. trop. Med. Hyg.** **59**: 66-72, 1998.
- WERNER, B.A.; WERNER, F.G.; FUCHS, D.; HAUSEN, A.; REIBNEGGER, G.; WACHTER, H. – Parallel induction of tetrahydrobiopterin biosynthesis and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells and cell lines by interferon-gamma. **Biochem. J.** **262**: 861-866, 1989.
- WU-HSIEH, B.A.; CHEN, W. & LEE, H-J. – Nitric oxide synthase expression in macrophages of *Histoplasma capsulatum*-infected mice is associated with splenocyte apoptosis and unresponsiveness. **Infect. Immun.** **66**: 5520-5526, 1998.
- ZEMBRZUSKI, M.M.; BASSANESI, M.C.; WAGNER, L.C.; SEVERO, L.C. – Inquérito intradérmico com histoplasmina e paracoccidioidina em duas regiões do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **28**: 1-3, 1996.



8. APÊNDICE

Tabela I: Pacientes com FA e FJ da PCM

Paciente	Sexo (1)	Idade (anos)	Cor (2)	Tecido	Forma Clínica
AMC	M	67	B	Mucosa Oral	Adulta
CG	M	44	B	Mucosa Oral	Adulta
ECB	F	43	B	Mucosa Oral	Adulta
GR	F	50	B	Mucosa Oral	Adulta
JFG	M	57	B	Mucosa Oral	Adulta
JRR	M	47	B	Mucosa Oral	Adulta
PCN	M	41	B	Mucosa Oral	Adulta
TRG	F	47	B	Mucosa Oral	Adulta
CCB	F	15	B	Linfonodo	Juvenil
FJB	M	15	B	Linfonodo	Juvenil
GR	M	17	N	Linfonodo	Juvenil
LRT	F	17	B	Linfonodo	Juvenil
RAS	M	19	B	Linfonodo	Juvenil
SRF	F	19	B	Linfonodo	Juvenil
TCSR	F	06	B	Linfonodo	Juvenil
WG	M	21	N	Linfonodo	Juvenil

(1) sexo: F (feminino) M (masculino)

(2) cor: B (branca) N (negro) P (parda)

Tabela II: Número de granulomas e abscessos em biópsias de pacientes com a FA e FJ da PCM

	Linfonodo		Mucosa Oral	
	Granuloma	Abcesso	Granuloma	Abcesso
1+		1 (10%)	3 (37,5%)	2 (25%)
2+	3 (30%)	1 (10%)	1 (12,5%)	1 (12,5%)
3+	7 (70%)	5 (50%)	4 (50%)	2 (25%)

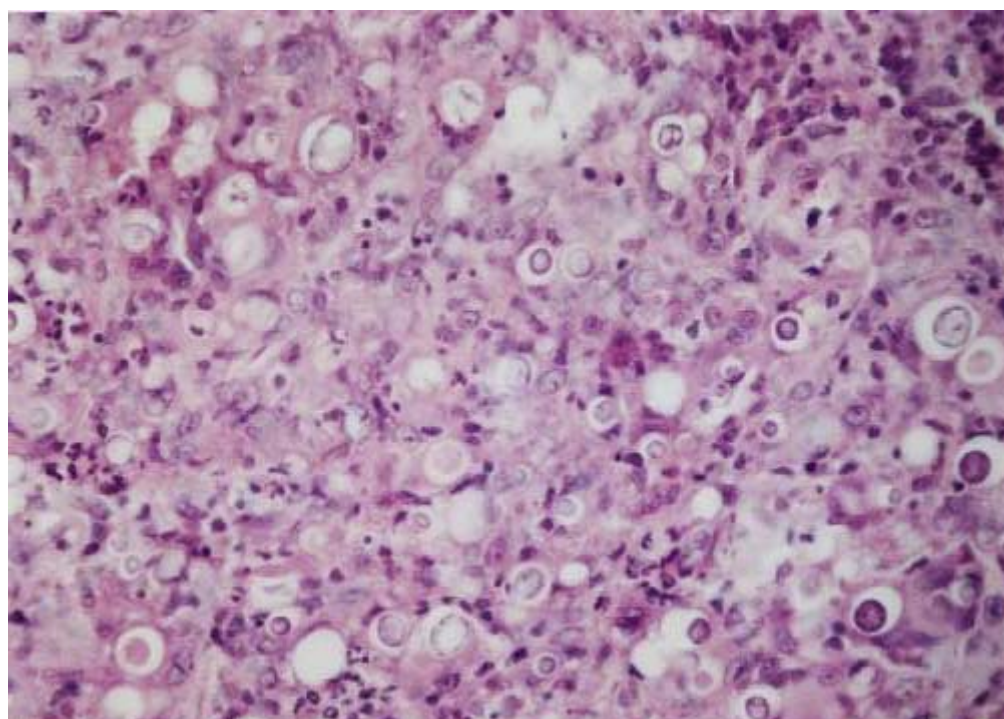


Figura 1: Células leveduriformes de *P. brasiliensis* em biópsia de linfonodo. (400X).

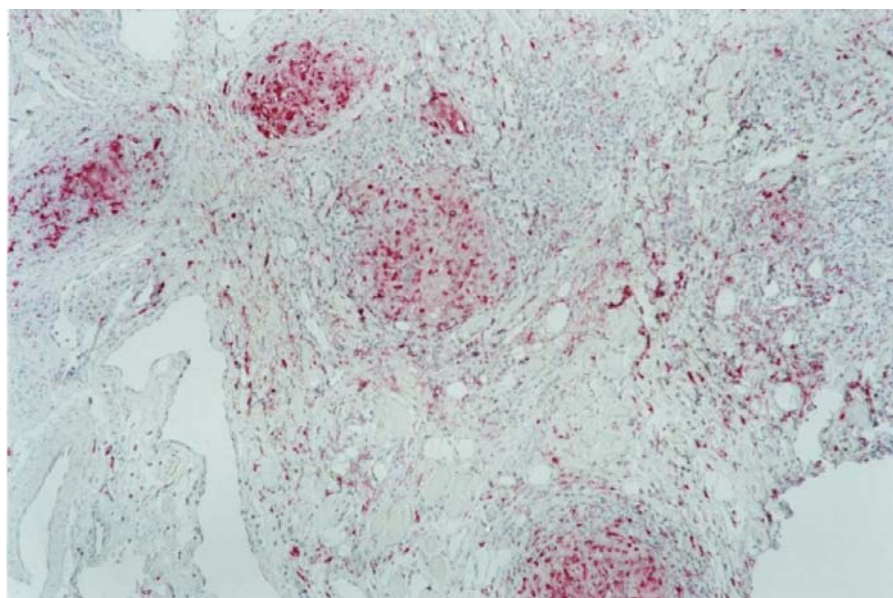


Figura 2: Células CD68+ em biópsia de mucosa oral de pacientes com a forma adulta da paracoccidioidomicose. Observe intensa marcação nos granulomas. (100X).

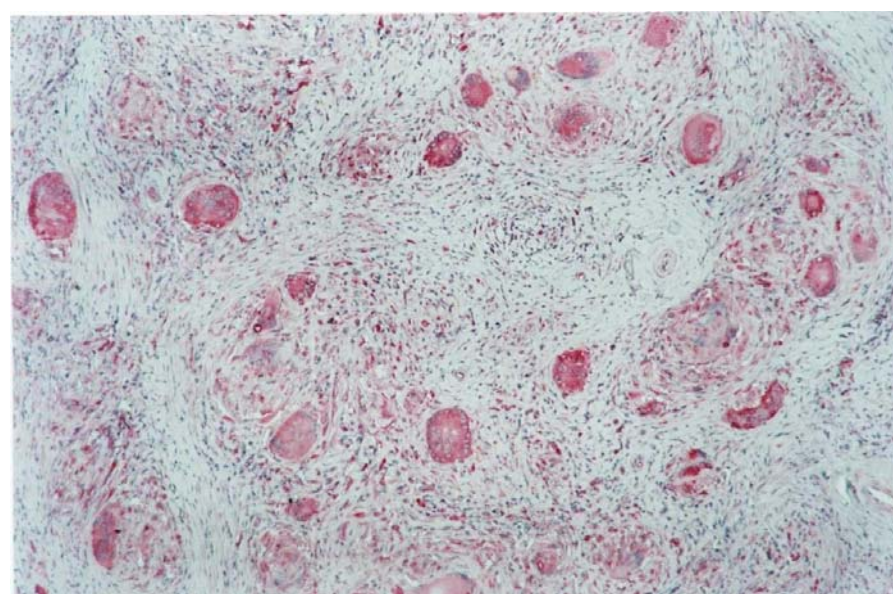


Figura 3: Células CD68+ em biópsia de linfonodo de pacientes com a forma juvenil da paracoccidioidomicose. Observe intensa marcação nas células gigantes e macrófagos. (100X).

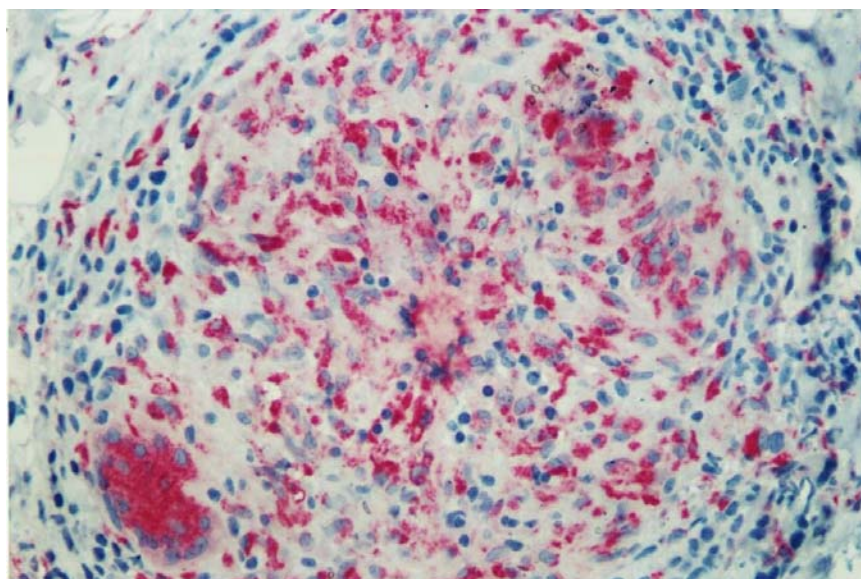


Figura 4: Células CD68+ em biópsia de mucosa oral de pacientes com a forma adulta da paracoccidioidomicose. Observe intensa marcação nas células epitelióides e células gigantes no interior do granuloma. (400X).

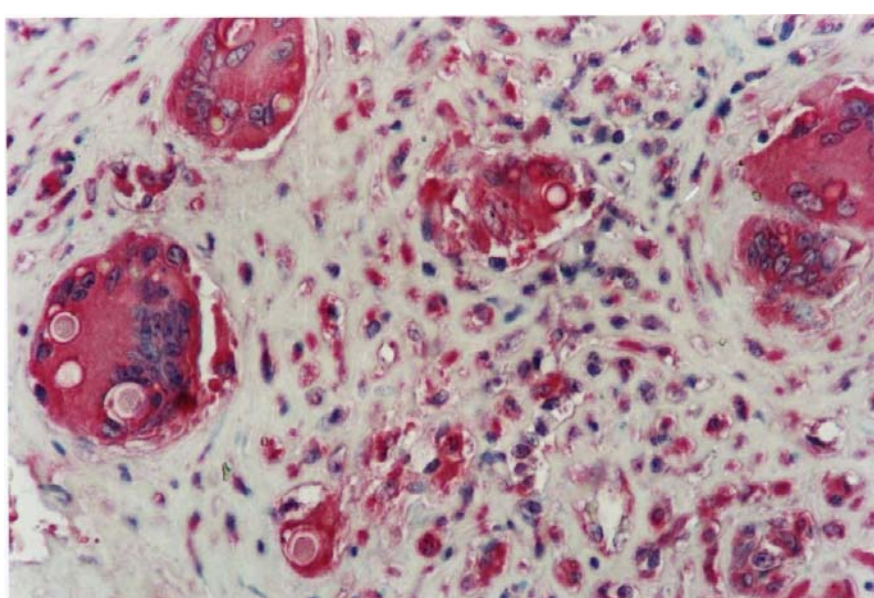


Figura 5: Células CD68+ em biópsia de linfonodo de pacientes com a forma juvenil da paracoccidioidomicose. Observe intensa marcação das células gigantes e macrófagos. (400X).

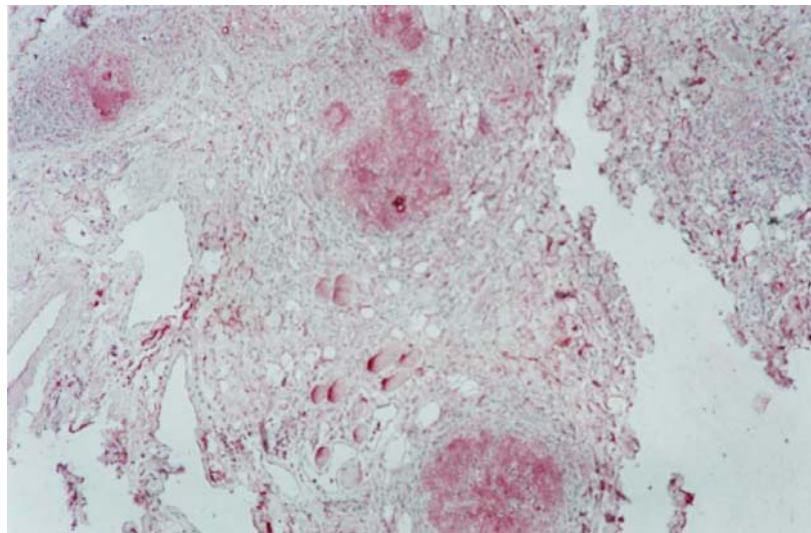


Figura 6: Expressão de TGF- β em biópsia de mucosa oral de paciente com a forma adulta da paracoccidioidomicose. Observe intensa marcação nos granulomas. (100X).

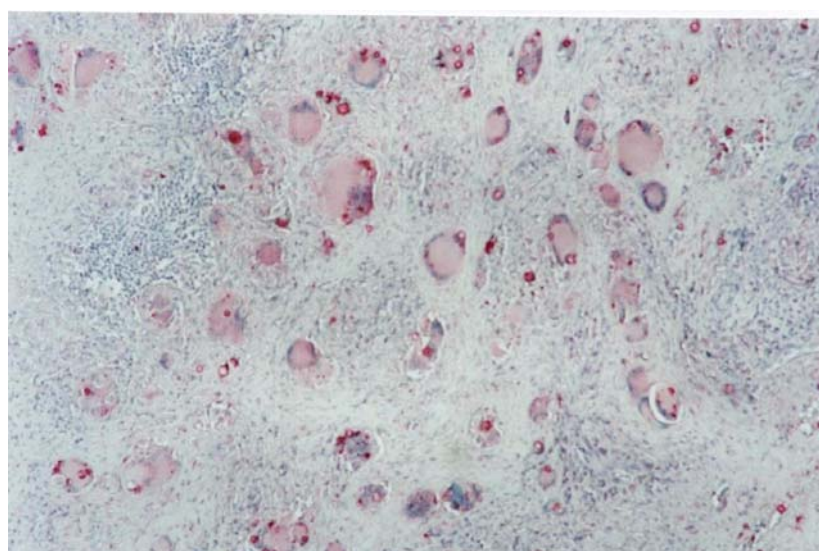


Figura 7: Expressão de TGF- β em biópsia de linfonodo de paciente com a forma juvenil da paracoccidioidomicose. Observe marcação em células gigantes. Leveduras do fungo apresentam-se coradas intensamente. (100X).

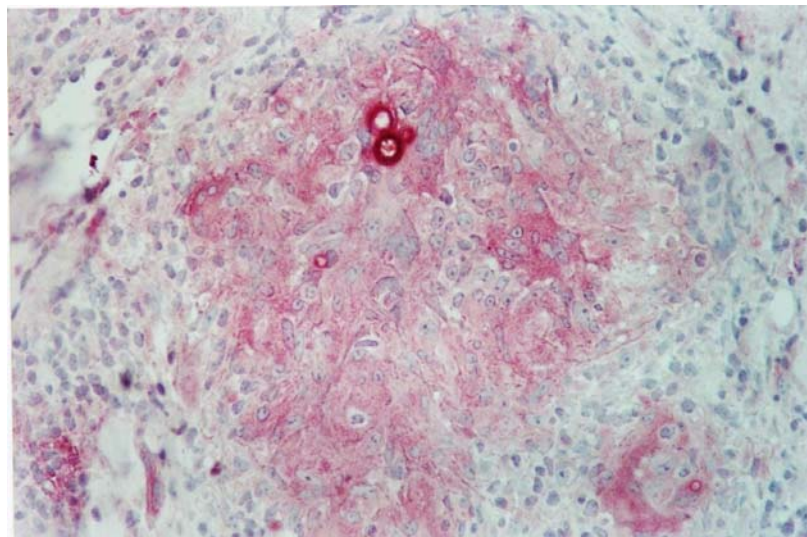


Figura 8: Expressão de TGF- β em biópsia de mucosa oral de paciente com a forma adulta da paracoccidioidomicose. Observe marcação no granuloma. Leveduras do fungo apresentam-se coradas intensamente. (400X).

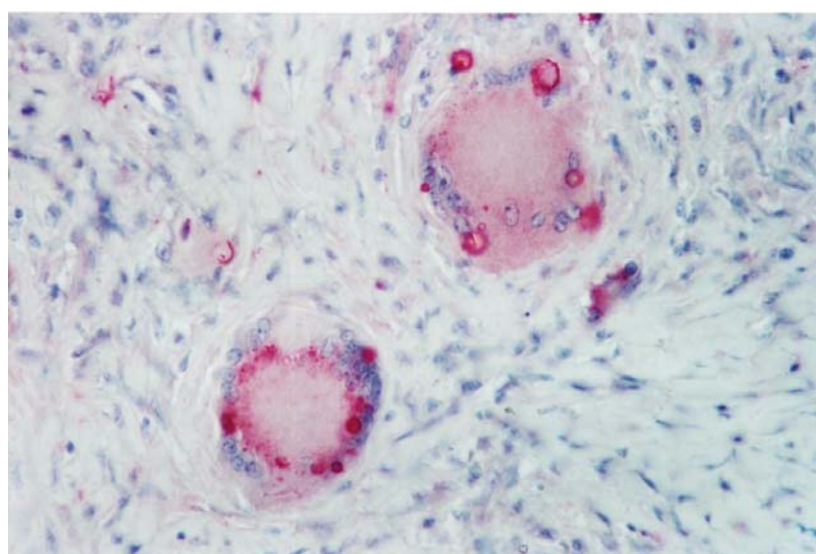


Figura 9: Expressão de TGF- β em biópsia de linfonodo de paciente com a forma juvenil da paracoccidioidomicose. Observe marcação em células gigantes. Leveduras do fungo apresentam-se coradas intensamente. (400X).

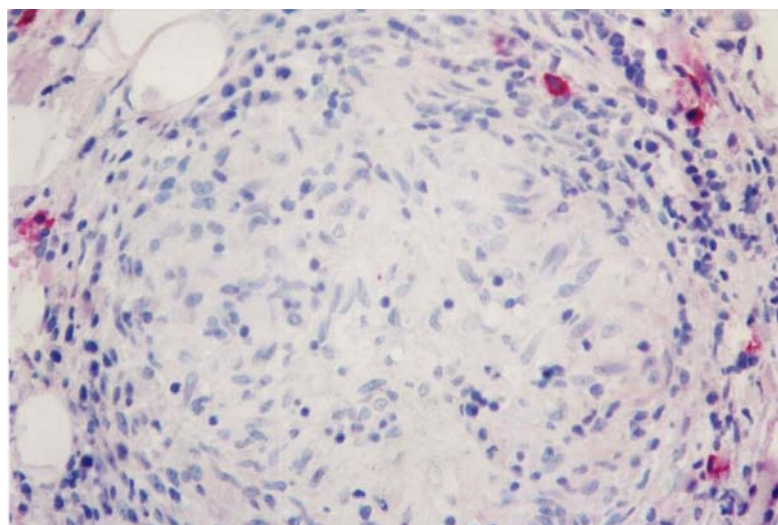


Figura 10: Expressão de iNOS em biópsia de mucosa oral de paciente com a forma adulta da paracoccidioidomicose. Observe marcação em macrófagos situados na periferia do granuloma (400X).

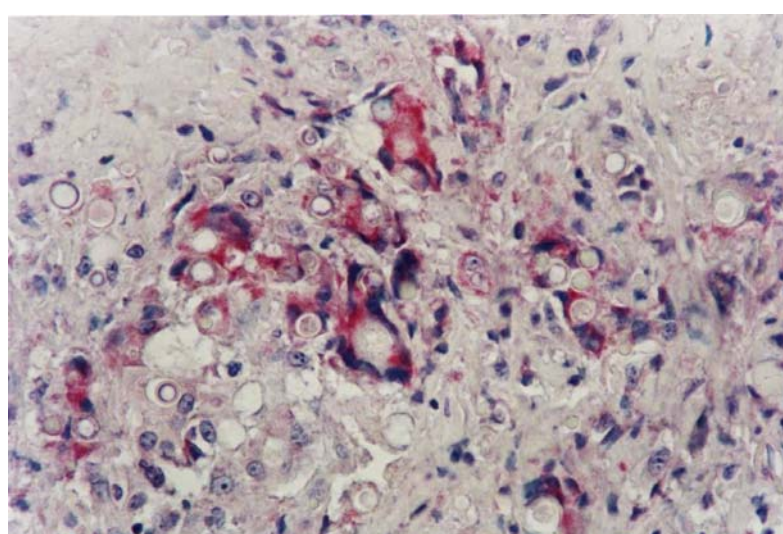


Figura 11: Expressão de iNOS em biópsia de mucosa oral de paciente com a forma juvenil da paracoccidioidomicose. Observe marcação em células gigantes multinucleadas, as quais também contém fungos no seu citoplasma. (400X).

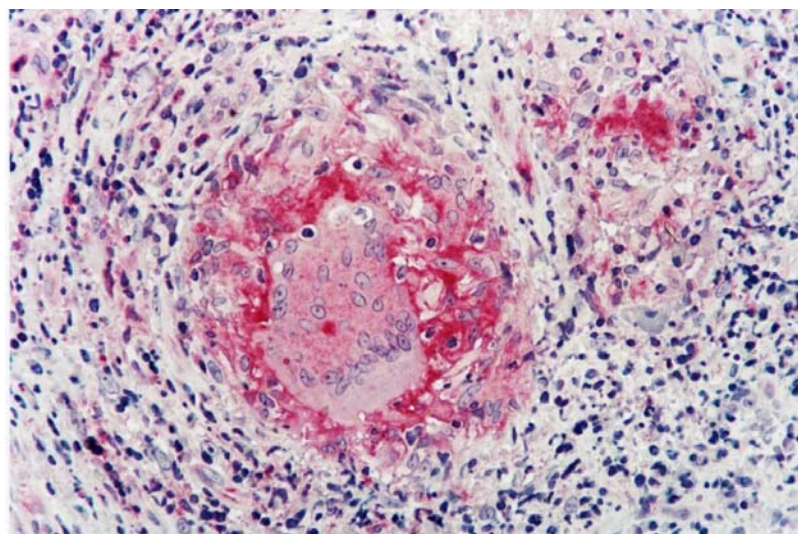


Figura 12: Expressão de IL-10 em biópsia de mucosa oral de paciente com a forma adulta da paracoccidioidomicose. Observe marcação nas células epitelióides que compõem o granuloma. (400X).

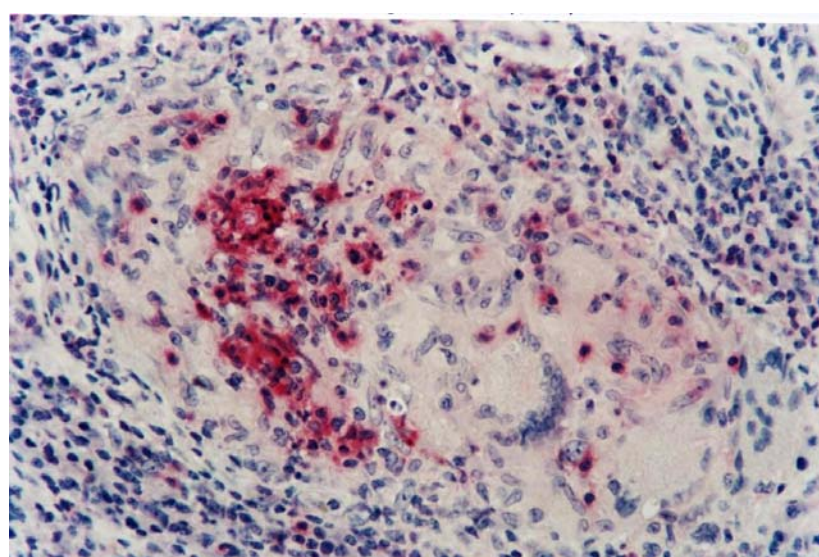


Figura 13: Expressão de IL-10 em biópsia de mucosa oral de paciente com a forma adulta da paracoccidioidomicose. Observe marcação em macrófagos e neutrófilos. (100X).

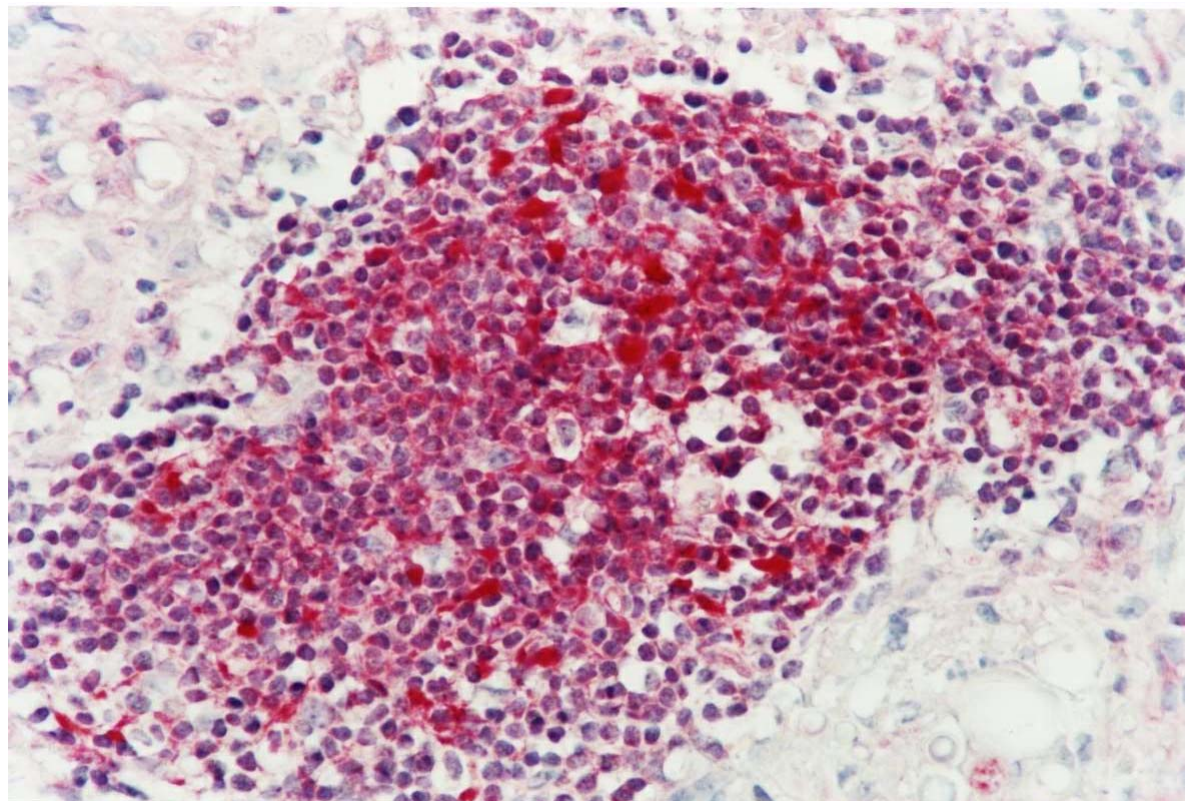


Figura 14: Expressão de IL-10 em biópsia de linfonodo de paciente com a forma juvenil da paracoccidioidomicose. Observe intensa marcação no tecido linfóide residual. (400X).

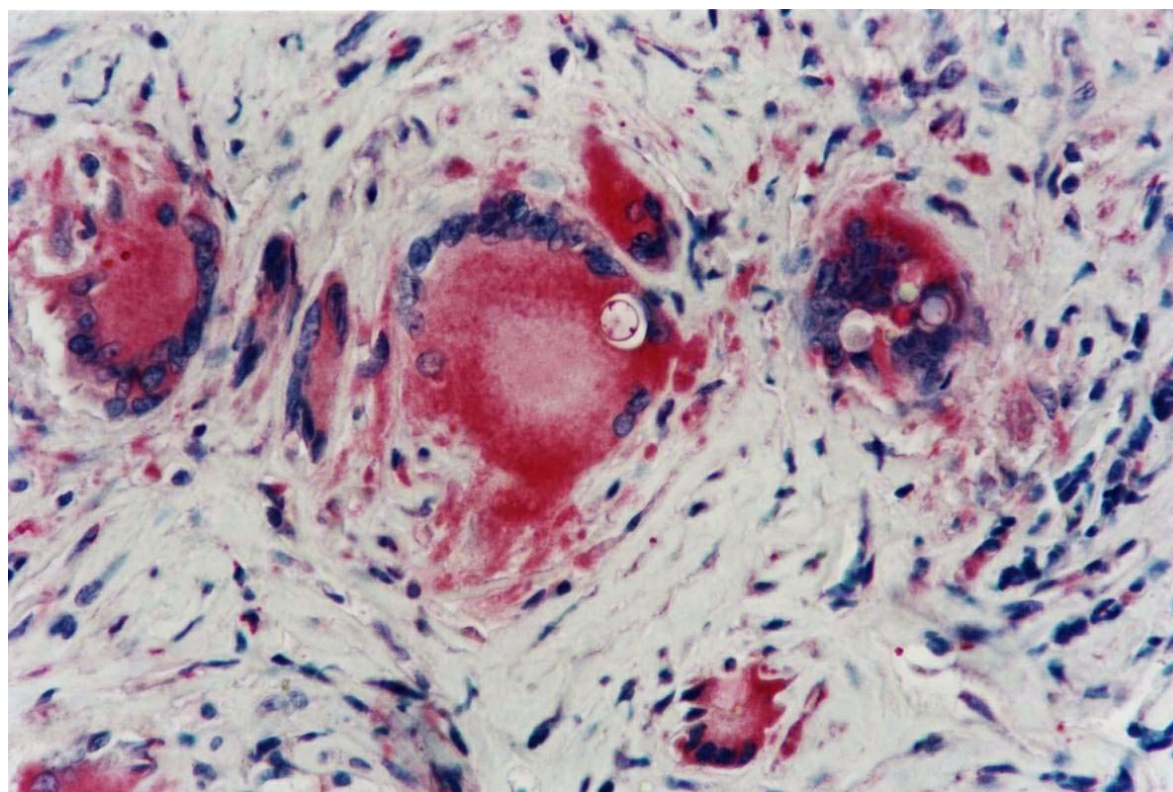


Figura 15: Expressão de TNF- α em biópsia de linfonodo de paciente com a forma juvenil da paracoccidioidomicose. Observe intensa marcação em células gigantes multinucleadas (400X).

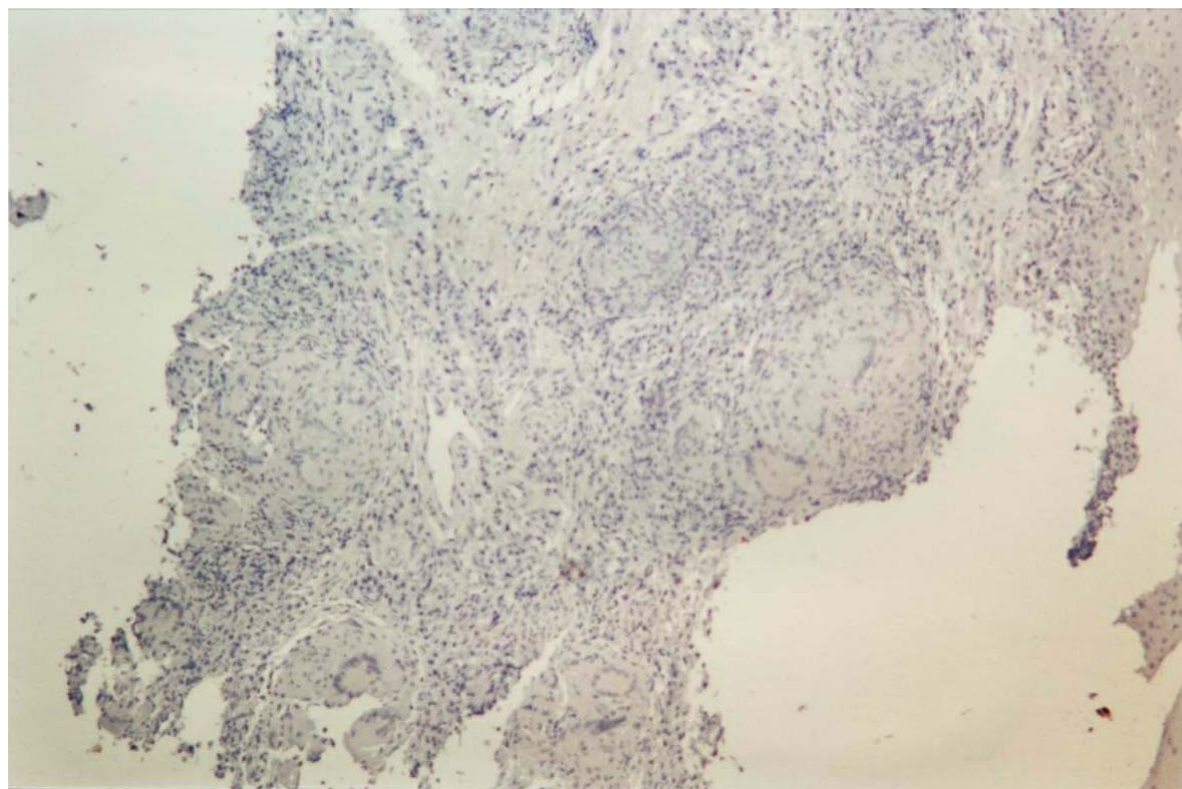


Figura 16: Controle negativo (100X)