

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UERJ
CENTRO BIOMÉDICO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

Danuza de Almeida Esquenazi



**MECANISMOS DE REVERSÃO DE
HIPORRESPONSIVIDADE IMUNOLÓGICA
EM DOENÇAS INFECCIOSAS CRÔNICAS**

**Rio de Janeiro
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Danuza de Almeida Esquenazi

**MECANISMOS DE REVERSÃO DE HIPORRESPONSIVIDADE
IMUNOLÓGICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS CRÔNICAS**

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Médicas
da Universidade do Estado do Rio de
Janeiro como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Ciências Médicas.**

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira

**Rio de Janeiro
2007**

**CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA**

Esquenazi, Danuza de Almeida

Título/Danuza de Almeida Esquenazi – 2007
122 f.

Orientador: Geraldo Moura Batista Pereira
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas.
Bibliografia: f. 87-110.

1. Imunologia – Teses 2. Ciências Médicas
I. Pereira, Geraldo Moura Batista II. Universidade do Estado do
Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas III. Título

Esses trabalhos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ e no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Ciências Médicas, UERJ

Danuza de Almeida Esquenazi

**MECANISMOS DE REVERSÃO DE HIPORRESPONSIVIDADE IMUNOLÓGICA
EM DOENÇAS INFECCIOSAS CRÔNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Euzenir Nunes Sarno
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. George Alexandre dos Reis
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Antônio Carlos Francesconi do Valle
Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas – IPEC - FIOCRUZ

Prof^ª. Dr^ª. Alda Maria da Cruz
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Prof^ª. Dr^ª. Marilza Ribeiro Carvalho (Revisora)
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira (Orientador)

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2007

AGRADECIMENTOS

Para não incorrer em injustiças ou nos lapsos próprios à memória, agradeço de todo o coração a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a realização das pesquisas e elaboração dessa tese, bem como a todos os que me encorajaram e, em alguma medida, me ajudaram e estimularam a prosseguir nesse árduo caminho.

Muito obrigada!

*Em memória do meu pai, amigo e incentivador
maior, que infelizmente não está mais aqui
para compartilhar esse importante
momento de minha vida.*

*Joseph Esquenazi
(1930 – 2006)*

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

Sir Karl Popper

RESUMO

Falhas na efetuação de resposta imune celular são fatores determinantes na patogênese e evolução de algumas doenças infecciosas crônicas. A presente tese aborda, em duas partes, situações relacionadas à hiporresponsividade imunológica em pacientes com hanseníase e paracoccidiodomicose (PCM), bem como à reversão dessa condição, associada a alterações no status clínico desses indivíduos, ativação de linfócitos T e produção de citocinas inflamatórias. Na primeira parte, foi observada emergência de resposta antígeno-específica em pacientes lepromatosos, que apresentavam uma forma incomum de reação tipo II ou ENL na hanseníase. Os sinais e sintomas dessa reação foram caracterizados por surto inflamatório sistêmico, febre alta, edema de membros superiores e inferiores, linfadenopatia regional e lesões cutâneas formadas por placas superficiais, bolhas e úlceras. A imunohistologia das lesões mostrou bacilos dentro do endotélio vascular, infiltrado inflamatório composto por leucócitos com positividade para HLA-DR e TNF- α , assim como frequência elevada de linfócitos T $\gamma\delta$ +. Contrariamente ao observado nas lesões, análise por citometria de fluxo revelou redução significativa na frequência das subpopulações $\gamma\delta$ +, CD8+ e CD14+ no sangue dos pacientes no início do episódio reacional. No mesmo período, IL-6 e TNF- α se encontravam elevados, como determinado por ELISA, e análise das lesões por imunofluorescência foi negativa para imunocomplexos. Talidomida, ou sua associação com glicocorticóide, levou ao desaparecimento dos sintomas e das lesões, bem como à normalização das frequências de células mononucleares sanguíneas (CMS) e dos níveis das citocinas. Os resultados acima mostram reativação imunoinflamatória com quebra de hiporresponsividade específica para o *M. leprae* e participação de TNF- α e linfócitos T $\gamma\delta$ + na patogênese dessa rara reação de hanseníase. Na segunda parte, foram realizados estudos *in vitro* com CMS de pacientes com a forma crônica da PCM antes e após o tratamento com itraconazol. Elevada frequência de tabagismo e alcoolismo foi observada no grupo de pacientes, bem como desnutrição em cerca de 60% deles. Análise fenotípica das CMS por citometria de fluxo (CF) não mostrou diferenças significativas em pacientes antes e depois do tratamento. Foram observadas reduções significativas da atividade biológica de IL-2 e da proliferação celular sob estímulo de Con-A, mas não de PMA+ION antes do tratamento. A determinação das frequências de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-4 por CF mostrou aumento na proporção relativa de células CD3/IFN- γ + em relação às IL4+ pós-tratamento. Nessa fase, também foram recuperadas tanto as respostas proliferativas, quanto a produção de IL-2 sob estímulo de Con-A. Finalmente, em quatro pacientes, foi feita análise simultânea para seis citocinas por CBA, em sobrenadantes de culturas estimuladas com Con-A, PMA+ION, SEB, PPD e com a gp43 de *P. brasiliensis*. Em pacientes não-tratados houve redução nos níveis de citocinas por células estimuladas com gp43 e Con-A. Os resultados mostram que a hiporresponsividade dos linfócitos T de pacientes com PCM é reversível pós-tratamento. Um possível mecanismo para a evolução da infecção latente pelo *P. brasiliensis* para doença ativa é uma imunodeficiência secundária aos efeitos combinados de tabagismo, alcoolismo e desnutrição na imunidade celular do paciente com a forma crônica da PCM. Tomados em conjunto, os resultados obtidos nas duas partes que compõem essa tese, sugerem que nessas duas doenças infecciosas crônicas, alterações funcionais de células apresentadoras de antígeno por moléculas dos patógenos podem ser um elemento comum e indutor de falha em ativação de linfócitos T.

ABSTRACT

Cellular immunity defects are relevant factors in the pathogenesis and evolution of some chronic infectious diseases. The present work, composed by two parts, focuses situations relating to the immunological hyporesponsiveness in patients with leprosy and paracoccidioidomycosis (PCM), as well as to the reversion of this condition, associated to changes in the clinical status of these individuals, activation of T lymphocytes and production of inflammatory cytokines. In the first part, emergence of *M.leprae*-specific response was observed in lepromatous patients presenting an unusual form of type II leprotic reaction or ENL. The signs and symptoms of this reaction were characterized by inflammatory systemic outbreak, high fever, edema at the superior and inferior limbs, regional lymphadenopathy and skin lesions formed by superficial plaques, blisters and ulcers. Immunohistology of these lesions showed bacilli within the capillary endothelium, inflammatory infiltrate composed by leucocytes positive for HLA-DR and TNF- α , as well as an increased frequency of T $\gamma\delta$ + lymphocytes. On the contrary, flow cytometric analysis of the patients' blood at the beginning of the reactional period disclosed a significant reduction in the frequencies of the $\gamma\delta$ +, CD8+ and CD14+ subsets. In the same period, IL-6 and TNF- α were increased, as determined by ELISA, and analysis of the lesions by immunofluorescence was negative for immune complexes. As a result of the treatment with thalidomide, or with thalidomide plus glucocorticoides, the lesions and symptoms disappeared, and the frequencies of mononuclear blood cells (MBC) returned into normal, as well as the cytokine levels. The above results show immunoinflammatory reactivation with break of specific hyporesponsiveness for *M. leprae*, as well as the participation of TNF- α and T $\gamma\delta$ + lymphocytes in the pathogenesis of this unusual leprotic reaction. At the second part, *in vitro* studies with MBC of patients with the chronic form of PCM were performed before and after treatment with itraconazole. High frequencies of smoking habit and alcoholism were observed in this group of patients, and also malnutrition in about 60% of them. Flow cytometric (FC) phenotypical analysis of MBC showed no significant differences in patients before and after the treatment. It was observed that the levels of the biological activity of IL-2 were significantly reduced, as well as those of cellular proliferation in response to Con-A, but not of PMA+ION before the treatment. Evaluation by FC of the frequencies of TCD3+ lymphocytes producing IFN- γ and IL-4 showed increase of the relative proportion of CD3+/IFN- γ + over CD3+/IL-4+ cells after treatment. In this step, the proliferative responses as well the production of IL-2 in response to Con-A were recovered. Finally, in four patients, a simultaneous analysis for six cytokines by CBA was performed, namely in supernatants of cultures stimulated with Con-A, PMA+ION, SEB, PPD and with gp43 of *P.brasiliensis*. In untreated patients, there was reduction in the cytokine levels of gp43- and Con-A-stimulated cultures. The results show that the T lymphocyte hyporesponsiveness of PCM is reversible post treatment. A possible mechanism for the evolution of *P.brasiliensis* latent infection to active disease is an immunodeficiency, secondary to the combined effects of smoking habits, alcoholism and malnutrition in the cellular immunity of the patient with the chronic form of PCM. Taken together, the results obtained from the two parts of this work suggest that, in these two chronic infectious diseases, functional changes of antigen presenting cells by molecules of pathogens can be a common element, which may induce defective T lymphocyte activation.

SUMÁRIO

	<i>Pág.</i>
INTRODUÇÃO.	
PARTE I	
Considerações Iniciais.....	2
Mecanismos gerais da imunidade inata e adquirida contra a infecção. Ênfase nas micobactérias e fungos patogênicos.....	2
Mecanismos de susceptibilidade e resistência às doenças infecciosas. Imunogenética da hanseníase e da paracoccidiodomicose.....	7
PARTE II	
Aspectos clínicos, epidemiológicos e imunológicos da hanseníase e da paracoccidiodomicose.	
Hanseníase.....	10
Paracoccidiodomicose.....	18
OBJETIVOS.	
Objetivos específicos.....	28
RESULTADOS.	
ESTUDO 1.	
Clinical, immunological and histological aspects of an uncommon type II reaction in patients with lepromatous leprosy.....	30
<i>Anexo 1</i>	35
ESTUDO 2.	
Immune hyporesponsiveness in the chronic form of paracoccidiodomycosis and its reversal following treatment.....	36
DICUSSÃO.	
Doenças infecciosas crônicas com diferentes padrões de resposta imune associados a variações nas formas de apresentação clínica.....	64
A patogênese de uma rara manifestação reacional da hanseníase em pacientes lepromatosos polares está associada com resposta <i>M. leprae</i> -específica.....	64

	<i>Pág.</i>
A resposta transitória ao <i>M. leprae</i> em pacientes reacionais: considerações sobre células e mecanismos associados.....	75
Conclusão.....	77
Imunodeficiência adquirida e anergia reversível pós-tratamento na forma crônica do adulto da paracoccidiodomicose.....	78
Modelo para evolução da infecção pelo <i>P. brasiliensis</i> para a forma crônica do adulto da paracoccidiodomicose.....	83
Conclusão.....	85
CONCLUSÕES FINAIS.	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	87

INTRODUÇÃO

PARTE I

Considerações iniciais.

A regulação de resposta imune a estímulo persistente, bem como mecanismos e mediadores envolvidos na indução de estados de hiporresponsividade, anergia ou tolerância imunológica, são aspectos de extrema relevância em doenças infecciosas crônicas.

A presente tese aborda, em dois estudos, situações relacionadas à falha na efetuação de resposta imune celular em pacientes com hanseníase e paracoccidioidomicose, bem como a reversão dessa condição, decorrente de alterações no status clínico desses indivíduos, com ativação de linfócitos T e produção de citocinas inflamatórias.

A dificuldade no diagnóstico precoce devida à diversidade na apresentação clínica das lesões, as complicações inflamatórias agudas durante a evolução crônica, e as precárias condições sócio-econômicas dos pacientes são fatores que contribuem para aumentar e agravar as seqüelas freqüentemente irreversíveis e as incapacidades comuns às duas doenças. O aprofundamento no estudo da imunoregulação da hanseníase e da paracoccidioidomicose pode auxiliar no desenvolvimento de métodos mais eficientes para prevenção e tratamento dessas doenças.

Mecanismos gerais da imunidade inata e adquirida contra a infecção.

Ênfase nas micobactérias e nos fungos patogênicos.

Os patógenos invadem o organismo por diferentes vias, e podem produzir doenças infecciosas por diversos mecanismos. O contato inicial de um indivíduo com um agente infeccioso geralmente ocorre por meio dos epitélios, sendo uma das vias mais comuns de entrada a mucosa do trato respiratório, especialmente a do nariz, uma das maiores fontes de estimulação natural do sistema imunológico.

A fase inicial de uma resposta imune inata contra infecção decorre das interações entre as moléculas desses patógenos e receptores de células do hospedeiro. Os mecanismos iniciais de proteção não são antígeno-específicos; porém, de acordo

com a natureza do patógeno e com os genes expressos nas células que reconhecem e apresentam antígenos, forma-se um padrão funcional específico.

Dentre as células apresentadoras de antígenos (APC), destacam-se, por sua eficiência, as células dendríticas (DC), únicas capazes de ativar linfócitos T virgens (Janeway e Medzhitov, 2002). Receptores do tipo toll (TLR) expressos nessas células estabelecem a ponte entre a imunidade inata e a adquirida. Essa família de receptores é capaz de reconhecer estruturas altamente conservadas presentes nos patógenos (PAMPs) e outros sinais de *stress*. Em células infectadas por micobactérias, já foi demonstrado que TLR2 e TLR4 possuem a habilidade de inserir-se nos fagossomos, induzindo moléculas com atividade antimicrobiana, como espécies reativas do oxigênio e de nitrogênio (Bhatt e Salgame, 2007).

Vários componentes de fungos patogênicos foram identificados como PAMPs, e são reconhecidos por TLR2 expresso em macrófagos e DCs. Em surtos de candidíase disseminada, foi observada alta expressão de TLR2 e 4 com indução das citocinas inflamatórias interleucina-1 β (IL-1 β) e o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α ; Romani, 2004). Uma vez ativados, TLR induzem a maturação das DCs e influenciam diretamente na qualidade das respostas adaptativas (Steinman e Banchereau, 2007).

De acordo com o estímulo recebido, as DCs maduras passam a expressar fortemente produtos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e outras moléculas co-estimuladoras, além de secretar mediadores determinantes do perfil de diferenciação da resposta imune. As moléculas co-estimuladoras B7.1 e B7.2 são componentes homodiméricos da família das imunoglobulinas, encontradas nas APCs ativadoras de linfócitos T (de Jong et al., 2005). A função mais importante do sinal co-estimulador é promover a síntese de IL-2. Para que ocorra a ativação completa da célula são necessários outros estímulos, dentre os quais, o mais bem caracterizado é a ligação entre CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2) presente na APC e CD28 no linfócito T. A participação das APCs profissionais (DCs, macrófagos e linfócitos B) é importante também para a diferenciação da resposta imunológica desenvolvida posteriormente. Em geral, são as APCs que irão influenciar a diferenciação dos linfócitos por meio da

produção de citocinas como a IL-12, IL-4, e também pela expressão das moléculas co-estimuladoras (Janeway e Bottomly, 1994).

Caso um linfócito T seja ativado somente pela via do seu receptor de antígeno, mas em ausência do sinal co-estimulador proporcionado pela ligação B7-CD28, ocorrerá falha na ativação do mesmo. Desta forma, a célula é direcionada a um estado de anergia pelo bloqueio na transcrição do gene de IL-2 e conseqüente inibição de resposta antígeno-específica. Esse fato também ocorre quando linfócitos T maduros reconhecem antígenos próprios e são inativados na periferia. A dupla sinalização para ativar um linfócito T é fundamental para a tolerância e prevenção das doenças auto-imunes (Schwartz, 2003).

Após a infecção por patógenos intracelulares, DCs e macrófagos ativados produzem IL-12 e IL-23 e expressam níveis elevados da molécula CD40. Em conseqüência, ocorre a diferenciação de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), com produção preferencial de IL-2 e Interferon-gama (IFN- γ), indispensáveis à formação do granuloma e eliminação dos microorganismos em questão. Como ocorre com os linfócitos T CD4+, as células CD8+ também produtoras de IFN- γ migram para a periferia da lesão granulomatosa e participam na contenção do processo infeccioso (Saunders e Cooper, 2000; Berberich et al., 2003). Enquanto os linfócitos T CD4+ reconhecem antígenos oriundos dos vacúolos das APCs, como por exemplo, peptídeos apresentados por moléculas de classe II do MHC, linfócitos T CD8+ reconhecem antígenos citosólicos associados à classe I, atuando como células citotóxicas. Antígenos de micobactérias e fungos podem ser apresentados das duas formas citadas (Kaufmann, 1999; Romani, 2004).

Sob certas condições, os linfócitos T CD8+ podem gerar duas populações com diferentes padrões de produção de mediadores. Isto ocorre de forma análoga, porém não idêntica à diferenciação Th1/Th2, onde mediadores produzidos pelos linfócitos Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) têm função anti-inflamatória, sendo capazes de inibir funcionalmente macrófagos e estimular a produção de anticorpos por linfócitos B, em respostas protetoras contra alérgenos e parasitas. Dentre as citocinas produzidas por

células Th2, a IL-10 desempenha um importante papel modulador das respostas Th1, inibindo a expressão de B7, de moléculas de classe II do MHC, a produção de TNF- α por macrófagos e a síntese do RNA mensageiro (mRNA) de IL-12 (O'Garra, 1998).

Outra propriedade da IL-10 é tornar DCs tolerogênicas, induzindo a geração de linfócitos T anérgicos pela expressão da molécula inibidora de segundo sinal CTLA-4, e não de CD28. Além dos linfócitos Th2, outras células também produzem IL-10, como linfócitos B, macrófagos, DCs e células T reguladoras (Treg). Contrariamente às suas funções supressoras predominantes, a IL-10 também pode ter um efeito positivo sobre algumas respostas imunes, que incluem o aumento direto da produção de IL-10 por células Treg, a estimulação de mastócitos, e a promoção de diferenciação e migração do linfócito T CD8+ com perfil citotóxico (Schwartz, 2003; O'Garra e Vieira, 2007).

Como outros patógenos, as micobactérias liberam antígenos lipídicos, que se associam a moléculas da família CD1 expressas constitutivamente em DCs e células de Langerhans da epiderme, e cuja via de apresentação independe do MHC. Linfócitos T CD8+ reconhecem esses antígenos associados a CD1b, assim como os linfócitos T gama-delta+ ($\gamma\delta$), que povoam principalmente as mucosas (Ulrichs e Porcelli, 2000).

Além de reconhecerem antígenos associados tanto a moléculas de classe I quanto de classe II, os linfócitos T $\gamma\delta$ + reconhecem, ainda, PAMPs e proteínas de choque térmico (Hsp) produzidas por células em situações de *stress* e inflamação. Trabalhos *in vitro* mostraram que clones $\gamma\delta$ + produzem TNF- α e IFN- γ , e são, normalmente, relacionados como fortes sentinelas na vigilância contra a invasão das mucosas (Hayday, 2000; Hedges et al., 2005; Komori et al., 2006). Esta afirmação pode ser reforçada pela demonstração do aumento significativo da proporção dessas células em sangue periférico e em granuloma tuberculóide recém-formado por infecção micobacteriana.

De forma similar, foi observado rápido acúmulo de linfócitos T $\gamma\delta$ + após infecção intratraqueal com o fungo *Cryptococcus neoformans*, seguido de regulação das respostas Th1 e proteção do hospedeiro murino (Modlin et al., 1989; Uezu et al., 2004). Atribui-se ainda grande importância à participação de células $\gamma\delta$ + produtoras de

IFN- γ na prevenção do avanço da colonização da mucosa por *C. albicans* e evolução para infecção sintomática em indivíduos imunocompetentes (Netea et al., 2002).

Embora o IFN- γ seja considerado uma molécula efetora com papel fundamental na resposta contra patógenos intracelulares, outros mediadores produzidos por linfócitos T também desempenham funções relevantes em tais respostas. Dois bons exemplos são o TNF- α e o ligante da molécula Fas (FasL). O TNF- α atua em sinergia com o IFN- γ na indução da formação e maturação do granuloma em micobacterioses. O achado de que pneumonia por *Aspergillus fumigatus* pode ocorrer após a terapia de ablação de TNF assinala o papel primordial dessa citocina no controle da infecção fúngica (Saunders e Cooper, 2000; Warris et al., 2001). A ativação de moléculas pró-apoptóticas como, por exemplo, o Fas induz a ligação Fas-FasL e a apoptose de macrófagos cronicamente infectados, que perdem a habilidade de matar os patógenos ingeridos. Pela via de Fas-FasL também é desencadeada a apoptose de linfócitos fortemente ativados por moléculas próprias do hospedeiro, constituindo um mecanismo adicional de prevenção de doenças auto-imunes (Van Parijs e Abbas, 1998).

Os linfócitos T produzem ainda uma gama de quimiocinas e sinais co-estimuladores capazes não só de estimular a produção de novos macrófagos na medula óssea, induzindo sua migração para os sítios de infecção, como também de controlar a expansão clonal. Esses fatores são determinantes tanto para o equilíbrio das respostas aos microorganismos, quanto para a homeostasia do hospedeiro (O'Garra e Arai, 2000).

Mecanismos de susceptibilidade e resistência às doenças infecciosas.

Imunogenética da hanseníase e da paracoccidiodomicose.

Ainda que, para algumas doenças infecciosas, um gene principal de susceptibilidade tenha sido proposto, a patogênese de uma doença geralmente se deve a características multifatoriais. Diversos genes e regiões do genoma humano atuantes na imunidade inata têm sido relacionados com a susceptibilidade às doenças *per se* ou a uma de suas formas clínicas.

Na hanseníase, o HLA parece estar mais relacionado à modulação da forma clínica da doença do que à susceptibilidade para a infecção propriamente dita. Desde o final da década de 80, diversos autores sugeriam que a doença sofria influência dos alelos e haplótipos do HLA, embora nem todos fossem reprodutíveis em diferentes populações, o que não é surpreendente. Em revisão sobre o tema, Moraes e colaboradores destacam como mais consistentes a frequência aumentada de HLA-DQw1 com o desenvolvimento das formas lepromatosas, e de HLA-DRB1*15 e DRB1*16 com as formas tuberculóides de hanseníase (Moraes et al., 2006). Recentemente, análise de grupos provenientes das populações brasileira e vietnamita demonstrou associação entre HLA-DRB1*04 e resistência e, ainda, entre HLA-DRB1*10 e susceptibilidade à doença, independentemente da forma clínica (Vanderborgh et al., 2007).

No tocante aos genes não relacionados com HLA, foi observado que variantes na região promotora compartilhada pelos genes da parquina (PARK2 e PARCR), presentes no cromossomo 6, atuam como fatores de risco para a doença. Em outro estudo, foi identificado na região 6q25-6q26 um alelo do gene da linfotoxina-alfa (LT- α) que se correlaciona com susceptibilidade à doença em indivíduos jovens. Polimorfismos em outros genes, como TLR2, TNF- α , IL-10 e dos receptores de vitamina D e da IL-12 (IL-12R), podem contribuir para a determinação da forma clínica e da susceptibilidade e/ou resistência à hanseníase (Mira, 2006).

Os mecanismos relacionados à resistência ou susceptibilidade do homem à paracoccidiodomicose não estão totalmente esclarecidos; porém, uma predisposição genética individual pode exercer influência desde a infecção pelo *P. brasiliensis* até a

manifestação da doença propriamente dita (Borges-Walmsley et al., 2002). Em região hiper-endêmica na Colômbia, HLA-A9 e HLA-B13 foram significativamente mais expressos em pacientes do que em indivíduos saudáveis, indicando correlação entre esses antígenos e a susceptibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis* (Calich et al., 1994).

A associação de certos antígenos de histocompatibilidade com susceptibilidade à doença já foi relatada também em nosso país. Na região sudeste foi observada forte associação entre HLA-B40 e HLA-CW1 com pacientes em tratamento (Goldani et al., 1991). Algumas diferenças com relação às apresentações clínicas da doença foram descritas mais recentemente. Almeida e colaboradores associaram o fenótipo HLA-Bw6 com a ocorrência de casos graves de neuroparacoccidioidomicose em agricultores de origem caucasiana, residentes no Paraná, estado com alta prevalência da doença (Almeida et al., 2005). Trabalho realizado no Amazonas associou HLA-DRB1*11 com um número expressivo de pacientes que apresentavam poucas e localizadas lesões (Sadahiro et al., 2007).

Ao contrário da hanseníase, são poucos os relatos de modificações em genes não relacionados com HLA em pacientes com paracoccidioidomicose. Entretanto, trabalhando com um grupo de 60 pacientes de área com alta endemicidade do sudeste brasileiro, Bozzi e colaboradores apontaram uma forte associação entre a presença de polimorfismos de nucleotídeos isolados (SNP) em determinadas regiões dos genes do TNF- α (posição -1082G/A) e da IL-10 (-308G/A) com a forma crônica da doença, em comparação com grupo de indivíduos saudáveis da mesma área (Bozzi et al., 2006).

Em modelo murino de infecção nasal por *P. brasiliensis*, a presença de um gene autossômico dominante análogo a *Nramp1* foi observada por Forbes e colaboradores, que o associaram ao controle de resistência inata em macrófagos de camundongos. Porém, em seres humanos, esse dado não foi observado (revisto por Borges-Walmsley et al., 2002).

As bases biológicas da defesa contra as infecções apontam na direção de deficiências primárias do hospedeiro juntamente com o grau de infectividade e patogenicidade de um microorganismo, para a ocorrência de algumas doenças infecciosas. Um novo modelo para as imunodeficiências primárias (PID) ampliou a

importância das PID nas infecções crônicas. Apesar de se manifestarem como quadros de infecção recorrente ou superinfecção em crianças, as PIDs são mutações que afetam um ou mais genes relacionados às imunidades inata e adquirida, e têm sido associadas com susceptibilidade à infecção por patógenos intracelulares, como as micobactérias e as salmonelas (Casanova e Abel, 2007).

No caso específico das micobacterioses, Jouanguy e colaboradores descreveram um quadro letal de infecção disseminada em uma criança após vacinação pelo BCG. O irmão, que não havia sido vacinado, desenvolveu tuberculose pulmonar severa. Ambos apresentavam deficiência completa no receptor 1 do IFN- γ (IFNR1; Jouanguy et al., 1997). Outros trabalhos associaram deficiência parcial no IFNR1 ao desenvolvimento de infecções por micobactérias ambientais, geralmente não patogênicas, como *M. chelonae*, *M. avium* e *M. smegmatis*, em um grupo de indivíduos com parentesco próximo (Ottenhoff et al., 1998).

Uma deficiência parcial tênue em genes associados à imunidade pode não acarretar doenças graves na infância, mas pode relacionar-se com o aparecimento de infecções crônicas na idade adulta. Mutações no IL-12R inativa o eixo IL-12-IL-23-IFN- γ , fundamental ao desenvolvimento das respostas Th1. Já foram demonstradas mutações no gene que codifica a IL-12 em pacientes com hanseníase (Ottenhoff et al., 1998; Doffinger et al., 2006).

As PIDs também estão associadas às infecções fúngicas. Pacientes com doença granulomatosa crônica hereditária ligada ao cromossomo X, são comumente afetados por infecções respiratórias causadas por fungos. Esses pacientes apresentam mutações em genes que codificam as sub-unidades da enzima nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADPH) que afeta a produção de metabólitos intermediários reativos do oxigênio (ROI) em fagócitos (Heyworth et al., 2003). Deficiências em TLR2 e 4 já foram identificadas em pacientes com diversas infecções fúngicas (Hohl et al., 2006).

PARTE II

Aspectos clínicos, epidemiológicos e imunológicos da hanseníase e da paracoccidioidomicose.

Hanseníase.

A hanseníase é uma doença infecciosa sistêmica, de curso crônico, sem predileção por sexo e raça, que afeta principalmente os nervos periféricos, a pele e a mucosa das vias aéreas superiores. Seu agente etiológico, o *Mycobacterium leprae*, infecta macrófagos, células de Schwann, e o endotélio vascular. A via de entrada do *M. leprae* é o nariz, por onde atinge a mucosa do trato respiratório e dissemina-se pelo organismo. Grandes quantidades de bacilos íntegros são isolados de secreções nasais dos pacientes. É uma doença incapacitante pelo dano neural provocado pela invasão do *M. leprae* (Gallo et al., 2005).

O diagnóstico da hanseníase é feito pelo exame clínico, acompanhado de exame baciloscópico em esfregaços de linfa e de exame histopatológico. Os sinais e sintomas clínicos da doença são variados e podem contribuir para o retardamento do diagnóstico e início do tratamento. As lesões apresentam-se desde uma única mancha hipocrômica até inúmeras pápulo-eritematosas disseminadas pelo corpo. Apesar da falta de sensibilidade ser característica predominante das lesões de hanseníase, cerca de 30% das lesões não são anestésicas, o que pode dificultar ainda mais o diagnóstico da doença (Walker e Lockwood, 2006).

As características clínicas da hanseníase refletem a patologia da doença, variando conforme o equilíbrio entre a multiplicação bacilar e o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro. O grau de disseminação da infecção e o número de lesões cutâneas variam ao longo de um espectro de formas clínicas, uma característica marcante da doença. Baseados nessa diversidade, Ridley e Jopling propuseram uma classificação para a hanseníase, que consiste em duas formas polares, tuberculóide (TT) e lepromatosa (LL), e três formas intermediárias denominadas “borderlines”, a saber: BT, BB e BL, como mostrado na figura 1 (Ridley e Jopling, 1966).

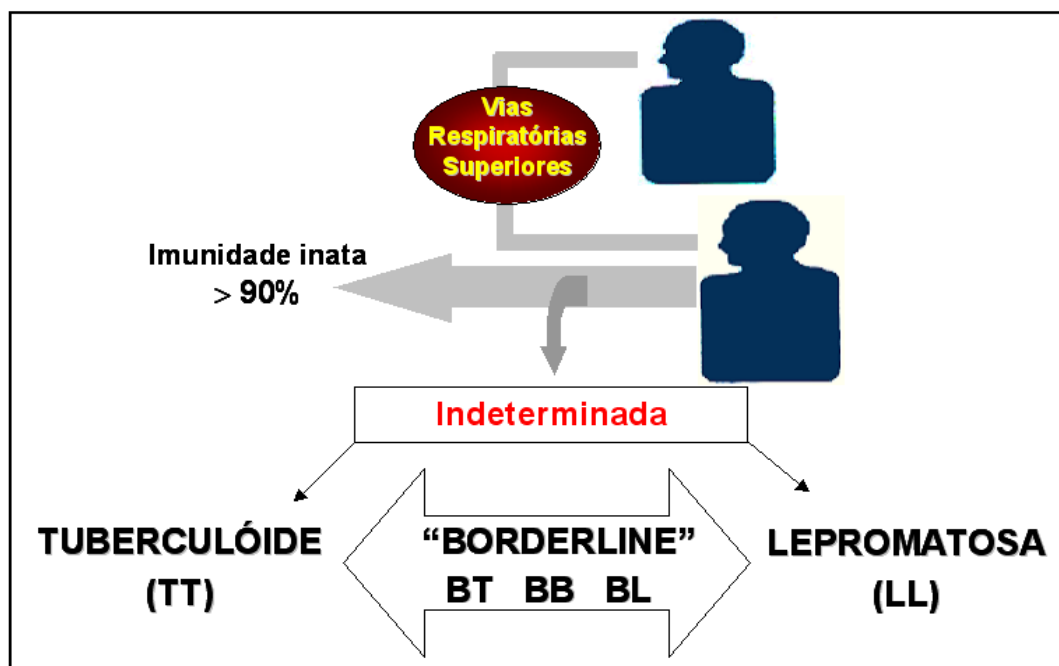


Figura 1. Ciclo provável de transmissão do *M. leprae* e espectro de formas clínicas da hanseníase com base na classificação de Ridley e Jopling.

Devido a dificuldades na realização de exames histopatológicos e visando a descentralização do acompanhamento médico dos pacientes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu aos países endêmicos que adotassem uma simplificação do critério diagnóstico de acordo com o índice baciloscópico (IB) feito a partir de esfregaços de linfa. De um modo geral, pacientes tuberculóides (BT e TT) são paucibacilares, com IB=0 e pacientes lepromatosos são multibacilares, com IB>0 (Gallo et al., 2005).

Existem evidências de que a proteção contra a infecção pelo *M. leprae* pode ser induzida em indivíduos vacinados com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). Entretanto, os resultados obtidos são controversos, variando de 20 a 90% a eficácia da vacinação com o BCG nas diferentes áreas endêmicas testadas. Essa variação pode ser atribuída a reações cruzadas com micobactérias do meio ambiente. No Brasil, o BCG confere cerca de 70% de proteção contra a forma multibacilar da doença na vacinação neonatal. Em contatos de pacientes com hanseníase, a vacinação neonatal confere 50% de proteção, porém, na revacinação, essa taxa aumenta para 75% (Cunha et al., 2004; Setia et al., 2006).

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, que apresenta baixa atividade catabólica e não produz endo ou exotoxinas. Apesar de causar doença apenas em seres humanos, o bacilo pode se replicar em coxim plantar de camundongos e produzir infecção disseminada no tatu de nove bandas (*Dasyopus novemcinctus*, Linn.). O fígado de um tatu infectado concentra cerca de 10^9 bacilos/grama de tecido, o que disponibiliza uma quantidade considerável de *M. leprae* para ensaios laboratoriais, pois até hoje não foi possível cultivá-lo *in vitro* (Scollard et al., 2006).

O tempo de geração do bacilo varia entre 11 a 14 dias; é Gram positivo e, por ter parede celular rica em lipídeos, tem a propriedade de ser álcool-ácido resistente, ou seja, cora-se pela fucsina e não se decora pelos ácidos e álcoois quando corado pelo método de Ziehl-Neelsen. Os principais componentes do *M. leprae* são oriundos da parede celular, onde se destaca o glicolípido fenólico-I (PGL-I), majoritário e exclusivo do bacilo, indutor da produção de níveis elevados de anticorpos em parte dos indivíduos infectados (Hunter e Brennan, 1981; Scollard et al., 2006).

Em 2001 foi seqüenciado o genoma do *M. leprae* e, a partir de então, vários aspectos do patógeno foram esclarecidos. O organismo parece ter sofrido uma extensa evolução redutiva, com considerável diminuição de seu genoma, se comparado ao *M. tuberculosis*. Quase a metade do genoma é ocupada por pseudogenes, além de diversas regiões de quadros abertos de leitura que não estão presentes no *M. tuberculosis*. O grande número de genes inativados pode ser relacionado com a incapacidade do bacilo de se multiplicar em meios de cultura, e ainda, com a sua condição de patógeno intracelular obrigatório (Cole et al., 2001). O *M. leprae* é um microorganismo com alta infectividade e baixa patogenicidade. Embora tenha a capacidade de infectar um grande número de indivíduos, os dados relacionados com a susceptibilidade à infecção situam em 10% ou menos a proporção de pessoas expostas que passam a apresentar sinais e sintomas da hanseníase (Lockwood e Suneetha, 2005).

Baseados em estudos de tipagem molecular do *M. leprae*, em dados arqueológicos e antropológicos, Monot e colaboradores propuseram recentemente que as origens da hanseníase remontam ao leste da África Oriental, aproximadamente em

600 a.C., de onde se estendeu para a Europa, Ásia e América. No Brasil, a doença chegou pelo tráfico de escravos por volta de 1690 (Monot et al., 2005).

O número de casos de hanseníase vem caindo desde a implantação da poliquimioterapia¹ na década de 80, quando a doença ainda era endêmica em 122 países com aproximadamente 14 milhões de casos diagnosticados. Segundo a OMS, em 2006, o número de casos registrados foi de 259.017 indivíduos, em particular nos seguintes países: Angola, Brasil, República Africana Central, República Democrática do Congo, Índia, Madagascar, Moçambique, Nepal e Unidade Republicana da Tanzânia. Em conjunto, esses países respondem por 84% da prevalência mundial. Na figura 2 é mostrada a taxa de prevalência nos países endêmicos (WHO, 2007).

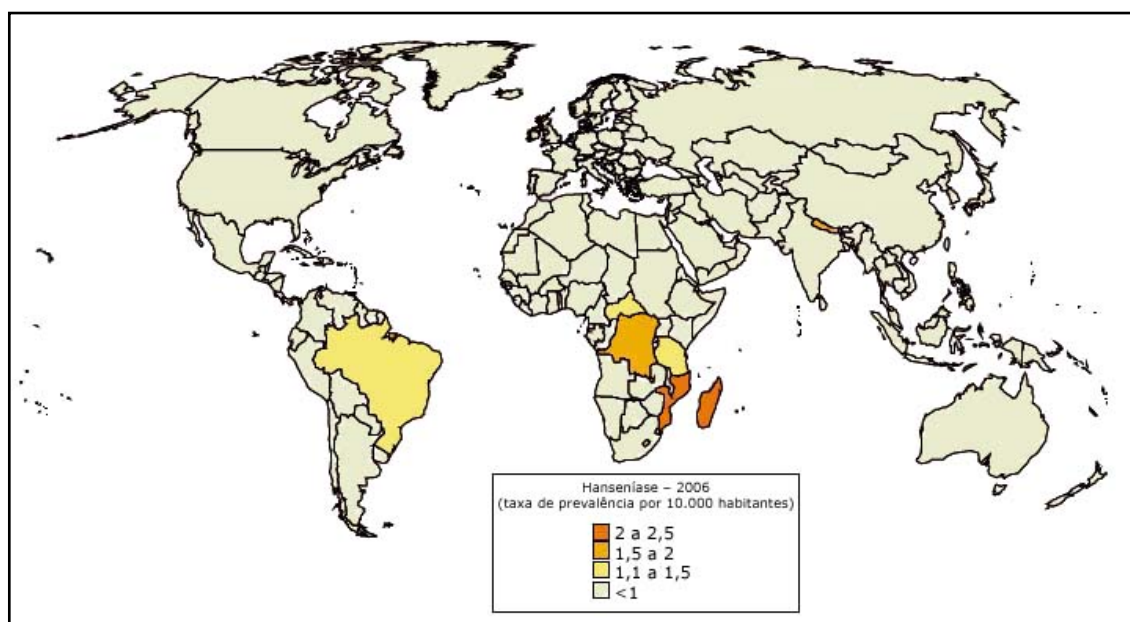


Figura 2. Taxa de prevalência da hanseníase até o final de 2006 segundo a OMS (adaptado de <http://www.who.int/wer>, acessado em 13/11/2007).

Apesar da grande queda na prevalência dos casos de hanseníase no mundo observada nas duas últimas décadas, no Brasil a doença ainda constitui um problema de saúde pública, atingindo proporções endêmicas, com taxa de prevalência de 1,6

¹ Esquema terapêutico combinando Diamino-Difenil-Sulfona, Rifampicina e Clofazimina, em doses supervisionadas e auto-administradas.

indivíduos para cada 10.000 habitantes e cerca de 65.000 casos registrados em 2006. Dentre os novos casos diagnosticados no país, mais da metade manifesta uma das formas multibacilares da doença, uma taxa de 8% é de crianças menores de 14 anos e um número significativo de casos com algum grau de incapacidade física, é observado no momento do diagnóstico (WHO, 2007).

As principais hipóteses para a susceptibilidade imunológica à hanseníase incluem: a) um defeito básico, de origem genética, na função efetora durante a fase inata da defesa contra a infecção; b) diferenciação da resposta imune celular para um padrão funcional ineficaz para a destruição do patógeno e/ou c) associação com dano tecidual por vezes incapacitante. Pacientes lepromatosos apresentam um defeito funcional nos linfócitos T, não respondendo ou sendo hiporresponsivos ao *M. leprae*.

Em um micro-ambiente com função efetora inadequada, o patógeno cresce em elevadas concentrações. Uma lesão de pele de paciente lepromatoso concentra aproximadamente 10^{10} bacilos/grama de tecido. Além disso, pacientes multibacilares podem eliminar grande número de *M. leprae* pelas vias aéreas superiores, em média 10^7 bacilos viáveis por dia. Os componentes do *M. leprae*, por serem antigênicos e desempenharem outras atividades biológicas inibidoras de resposta inflamatória e imune, acentuam ainda mais o defeito funcional observado nesses pacientes. Apesar dos pacientes lepromatosos possuírem elevados níveis de anticorpos anti-*M. leprae*, a resposta humoral não confere proteção por tratar-se de um patógeno intracelular (Scollard et al., 2006).

Os pacientes tuberculóides possuem resposta imune celular efetiva na destruição do bacilo e o padrão de resposta se expressa pelo perfil de citocinas produzidas e formação de granulomas epitelióides. A maioria dos linfócitos T presentes na lesão granulomatosa é CD4+, com razão entre CD4+/CD8+ em torno de 2:1. Essas células expressam receptores de alta afinidade para IL-2 e formam um anel em volta de macrófagos e células epitelióides. A reação de Mitsuda² é positiva, assim como os testes *in vitro* de resposta antígeno-específica (Modlin e Rea, 1994).

² Teste cutâneo com suspensão de *M. leprae* morto pelo calor (lepromina), utilizado para avaliação prognóstica de pacientes e contatos de pacientes com hanseníase. Uma reação positiva caracteriza-se por uma pápula eritemato-edematosa no sítio da injeção intradérmica e a leitura é realizada após 28 dias do inóculo.

Nos pacientes multibacilares, a negatividade da reação cutânea à lepromina, a ausência de formação de granulomas típicos e a presença de altos níveis séricos de anticorpos específicos para componentes da parede micobacteriana, se associam à baixa resistência à infecção pelo *M. leprae*. Nas lesões de pele são encontrados poucos linfócitos T nos infiltrados, e predominam os de fenótipo CD8, com razão CD4/CD8 de 0,5:1. Imunohistoquímica das lesões mostra ainda, diminuição na expressão de antígenos de ativação, como CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) e HLA-DR (Modlin e Rea, 1994).

Ainda na década de 1970 foi demonstrado que leucócitos de sangue periférico de pacientes lepromatosos não proliferam em cultura frente ao *M. leprae*, e foi sugerido que a resposta celular deficiente era decorrente da deleção de clones de linfócitos T antígeno-específicos (Godal et al., 1972).

Outros trabalhos indicaram um defeito na produção de IL-2 nesses pacientes, impossibilitando a proliferação e expansão clonal dos linfócitos T. Foi demonstrado ainda que, adicionando-se IL-2 exógena à cultura, linfócitos T sanguíneos de pacientes lepromatosos passam a responder ao *M. leprae*. Posteriormente, foi demonstrado que células mononucleares de sangue periférico de pacientes lepromatosos não produzem IFN- γ após estímulo com *M. leprae*. Nas mesmas condições, produção normal dessa citocina é observada em células de pacientes tuberculóides (Nogueira et al., 1983; Kaplan e Cohn, 1986).

A partir da observação de que o *M. leprae* não apresenta variações morfológicas e funcionais em cepas isoladas de pacientes com as diferentes formas clínicas da doença, várias teorias surgiram na tentativa de explicar a ausência de resposta imune celular em pacientes lepromatosos. A presença de linfócitos T CD8⁺ em maior quantidade nas lesões desses pacientes poderia estar suprimindo uma resposta eficiente na contenção ao bacilo. Porém, os resultados das experiências realizadas por diferentes grupos não foram suficientes para a caracterização de um linfócito T supressor na hanseníase (Kaplan, 1988; Bloom et al., 1992).

Como células de pacientes com a forma lepromatosa são incapazes de proliferar e produzir citocinas moduladoras da imunidade frente ao *M. leprae*, foi também

sugerido que haveria um estado de anergia clonal nesses indivíduos. Assim, linfócitos T CD4+ de pacientes multibacilares seriam inativados funcionalmente, acarretando forte resposta humoral. De fato, já foi demonstrado que pacientes lepromatosos apresentam diminuição na sinalização dependente de B7.1 e CD28, tanto em sangue, quanto em lesão cutânea (Schlienger et al., 1998; Agrewala et al., 1998).

Embora o estado de não-resposta ou de hiporesponsividade específica ao *M. leprae* seja um achado constante na forma lepromatosa, a recuperação da resposta antígeno-específica já foi relatada em algumas situações, como por exemplo, após longo período de tratamento e cura clínica (Esquenazi et al., 1990). Em culturas de leucócitos sanguíneos de pacientes lepromatosos, a adição de IL-2 também implicou na reversão da anergia, assim como sua associação com IL-12, que restaurou a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ a níveis observados somente em pacientes tuberculóides (De Jong, 1997).

A possibilidade de reversão da resposta antígeno-específica em pacientes lepromatosos, seja pelo tratamento, seja por imunomodulação, demonstrou que as formas multibacilares da hanseníase não são estáticas. As formas “borderlines” do espectro são reconhecidamente mais dinâmicas do ponto de vista imunológico, e a alternância entre elas pode ocorrer no curso da doença, sendo frequentemente associadas às reações.

A demonstração da diferenciação de linfócitos T auxiliares contribuiu para o desenvolvimento de teorias acerca dos padrões de resposta imune na hanseníase. Foram realizados inúmeros experimentos com leucócitos sanguíneos e com lesão de pele de pacientes portadores das formas polares da doença e alguns resultados confirmaram, de certa forma, a dicotomia Th1 x Th2. Em geral, pacientes tuberculóides apresentam resposta imune celular efetiva na destruição do bacilo com produção local de citocinas predominantemente do tipo 1, incluindo IFN- γ , IL-2 e IL-12. Por outro lado, em pacientes lepromatosos observa-se uma diferenciação da para um perfil associado à produção preferencial de citocinas do tipo 2, especialmente IL-4 e IL-10 (Yamamura et al., 1991; Salgame et al., 1991). Mais recentemente, análise direta da expressão de 12.000 genes, dentre os quais os de citocinas em lesões cutâneas

de pacientes com as diferentes formas clínicas da hanseníase, confirmou o padrão previamente estabelecido (Bleharski et al., 2003).

Durante o curso da doença, cerca de 50% dos pacientes apresentam episódios reacionais devidos à reativação da resposta imune celular ligada à produção de mediadores inflamatórios e associada ao dano tecidual. As reações podem ocorrer a qualquer momento durante a evolução crônica da doença, sobretudo após o início do tratamento específico, que leva à morte bacilar e liberação maciça de antígenos micobacterianos. O aparecimento de novas lesões cutâneas e/ou a reinfilhação de lesões pré-existentes são as principais características clínicas das reações, freqüentemente acompanhadas de sintomas sistêmicos como febre, mal estar, dor articular e neurítica (Britton e Lockwood, 2004).

A reação do tipo I ou reação reversa (RR) é a que mais afeta pacientes de formas clínicas “borderlines” (BT, BB, BL), sendo caracterizada pelo aparecimento de lesões eritematosas na pele e pela emergência de imunidade celular aos antígenos do *M. leprae*, com produção de mediadores pró-inflamatórios e presença de linfócitos T $\gamma\delta+$ nas lesões granulomatosas (Little et al., 2001; Uyemura et al., 1991). Tem sido observada elevação na expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- γ , IL-2 e IL-12 em lesão cutânea e sangue durante a RR (Moraes et al., 1999). Aumento nos níveis de IL-1 β e TNF- α em células sanguíneas também já foi observado (Sarno et al., 1991; Manandhar et al., 2002). Os episódios de RR estão associados a neurites severas, com lesão progressiva de nervos periféricos, e, para o tratamento específico dos episódios reacionais são utilizados principalmente glicocorticóides (Manandhar et al., 2002).

Em pacientes multibacilares polares ou subpolares (BL, LL) acometidos da reação tipo II ou eritema nodoso leproso (ENL), surgem lesões cutâneas nodulares, eritematosas e dolorosas, que podem ulcerar, quase sempre associadas à febre, perda de peso e mal estar geral. Histologicamente observa-se alterações vasculares da derme profunda com infiltrado inflamatório difuso de células mononucleares, e intenso infiltrado neutrofilico. A resposta inflamatória observada no desencadeamento do ENL é complexa, e o aumento considerável dos níveis séricos de TNF- α e IL-1 está

associado com a imunopatologia da reação e suas complicações sistêmicas (Sarno et al., 1991; Sampaio et al., 1998). A produção de IL-6, uma citocina envolvida em reações de fase aguda, também foi observada em níveis acima dos normais no ENL (Moreira et al., 1993).

Processos de reativação de resposta imuno-inflamatória são relacionados com o ENL. Esses processos, associados inicialmente à produção de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, levam à exacerbação do quadro inflamatório, com aumento da secreção de IFN- γ , TNF- α e IL-1. Nesse contexto, a presença de IL-6 pode acelerar a evolução das respostas e contribuir para a severidade das lesões teciduais (Morales et al., 1999; Britton e Lockwood, 2004). Além disso, a presença do gene *foxp3* em biopsias cutâneas de pacientes com ENL apontam para uma atividade reguladora de linfócitos T CD4/CD25+ nas lesões reacionais (Haslett et al., 2005). O tratamento do ENL é feito com talidomida, de forma supervisionada e, se necessário, glicocorticóides são associados (Sampaio et al., 2002).

As manifestações reacionais incomuns que investigamos em pacientes lepromatosos polares estavam associadas a emergência de resposta *in vitro* ao *M. leprae*, bem como a elevados níveis séricos de citocinas inflamatórias nesses pacientes. Diferentemente de outras observações em pacientes com ENL, a resposta *in vitro* não era acompanhada de presença de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas estimuladas com *M. leprae*. Inicialmente linfócitos T $\gamma\delta$ +, CD8+ e monócitos estavam ausentes ou com frequência reduzida no sangue dos pacientes e presentes nas lesões de pele. Porém, o tratamento com talidomida ou talidomida associado à prednisona foi seguido de reaparecimento dos linfócitos T $\gamma\delta$ + e das outras subpopulações leucocitárias no sangue, bem como da emergência de resposta proliferativa transitória ao *M. leprae*. A presença inicial de níveis séricos elevados de TNF- α no grupo de pacientes e a resposta terapêutica à talidomida, uma droga inibidora da produção de TNF- α , apontaram também para um papel central dessa citocina na patologia desta forma reacional.

Paracoccidioidomicose.

A paracoccidioidomicose é uma doença autóctone da América Latina, sendo a micose sistêmica mais frequente dessa região. Seu agente etiológico, o *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico, que vive saprofiticamente na natureza, de habitat natural ainda desconhecido e com crescimento lento. Nos tecidos do hospedeiro cresce de 7 a 14 dias, formando colônias leveduriformes contendo propágulos infectantes chamados conídios. O diagnóstico da doença baseia-se nos aspectos clínicos e radiológicos. A confirmação é dada pela identificação do patógeno em exame direto ou cultura de amostra de material biológico de pacientes, onde são observados elementos característicos da morfologia dos fungos. Porém, apenas as imagens de “brotamento em roda-de-leme” são patognomônicas do *P. brasiliensis* (San Blas, 1993; Silva-Vergara et al., 1998).

A infecção é adquirida pela inalação de conídios, ocorrendo, geralmente, nas duas primeiras décadas de vida. A maioria dos indivíduos infectados é resistente, permanecendo assintomáticos, e apresentando um foco primário quiescente no parênquima pulmonar. Em indivíduos susceptíveis, a infecção pode causar doença aguda ou evoluir para doença crônica a partir da terceira década de vida, sendo causa importante de mortalidade e morbidade, com complicações graves e seqüelas raramente reversíveis (Cadavid e Restrepo, 1993; Wanke e Londero, 1998).

Uma vez estabelecida, a doença é caracterizada por um largo espectro de manifestações clínicas, agrupadas em duas formas principais e polares: a forma aguda ou juvenil, caracterizada pela progressão da infecção primária para doença disseminada e severa, e a forma crônica do adulto, caracterizada pela duração prolongada com alteração progressiva do estado geral, que afeta primordialmente os pulmões. Enquanto a forma aguda juvenil ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos, com evolução rápida, representando menos de 10% da casuística, a forma crônica do adulto ocorre em aproximadamente 86% dos pacientes, com progressão lenta e insidiosa, podendo levar meses ou anos para se estabelecer, como resultado da reativação de um foco latente da infecção fúngica. A figura 3 mostra a

patogênese da paracoccidioidomicose, as possibilidades da evolução da doença e suas diferentes formas clínicas (Wanke e Londero, 1994).

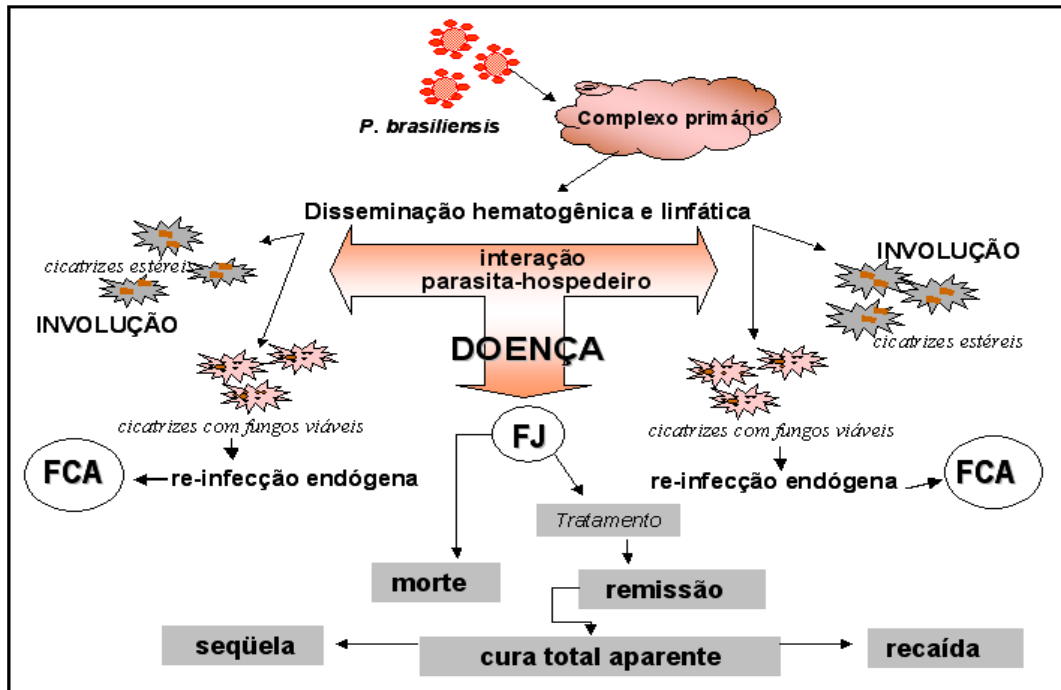


Figura 3. Paracoccidioidomicose: patogênese, evolução e formas clínicas. (adaptação de ilustração gentilmente cedida pela Dra. Regina Lana B. Costa, IPEC - FIOCRUZ).

As manifestações clínicas variam de acordo com a forma da doença. Pacientes com a forma juvenil apresentam adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea, simulando doenças linfoproliferativas, com comprometimento sistêmico agudo, como febre e anorexia. A forma crônica pode ser leve, moderada ou grave, com lesões que variam desde uma ulceração oral isolada até o envolvimento pulmonar difuso. Pode ser unifocal, apresentando múltiplas lesões em todo o trato respiratório e manifestações clínicas correlatas, ou multifocal, atingindo mais de um órgão além dos pulmões, com sintomas variados e lesões na mucosa oral, nasal, pele, linfonodos, e em menor escala nas glândulas adrenais e sistema nervoso central (Franco et al., 1987; Brummer et al., 1993).

A paracoccidioidomicose ocorre com maior frequência no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela. Estima-se que haja 10 milhões de indivíduos infectados pelo *P. brasiliensis* nas áreas endêmicas atualmente. O Brasil conta com aproximadamente

85% dos casos relatados e está situado no centro da área endêmica, onde a doença ocorre com maior frequência nas regiões sudeste, sul e centro-oeste. Por não ser de notificação compulsória, a taxa de prevalência no país é estimada com base em inquéritos epidemiológicos, variando de 1 a 3 casos para cada 100.000 habitantes e incidência média de aproximadamente 140 novos casos por ano. Ultimamente vêm ocorrendo casos da doença de forma mais frequente na Amazônia, principalmente em áreas onde ocorrem modificações sócio-econômicas, desmatamento e substituição das atividades tradicionais por agricultura de larga escala. Na figura 4 é mostrada a distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose, bem como o grau de ocorrência da doença nos países endêmicos (Coimbra et al., 1994; Wanke e Londero, 1998; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

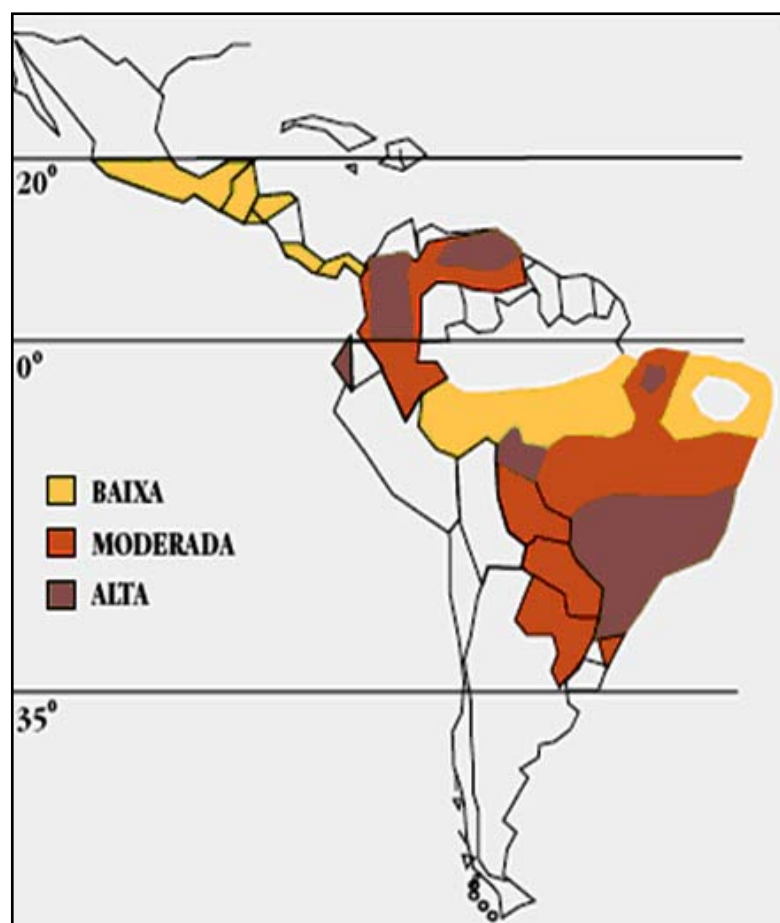


Figura 4. Distribuição da Paracoccidioidomicose e o grau de ocorrência da doença (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Assim como a incidência, a letalidade da paracoccidiodomicose é avaliada com base em análise de casuísticas dos serviços médicos. Os dados variam de 4,8 a 22% e a doença é a oitava causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias, com a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas (Del Negro, 1974; Valle et al., 1988). Mais recentemente, em estudo retrospectivo da mortalidade da doença no Brasil por um período de 16 anos, Coutinho e colaboradores chamaram a atenção para as regiões sul e centro-oeste, por apresentarem o coeficiente mais alto do país, com tendência ao crescimento (Coutinho et al., 2002).

A importância da paracoccidiodomicose em saúde pública deve-se aos custos sociais e econômicos decorrentes não apenas da doença em atividade, que afeta indivíduos em fase produtiva, como também das freqüentes seqüelas secundárias a essa micose, motivo comum de incapacitação para o trabalho. A alta incidência da doença em homens - são afetados 14 indivíduos adultos do sexo masculino para cada um do sexo feminino se deve ao fato de que o estrogênio inibe a conversão do fungo de micélio para levedura (Restrepo et al., 1984; Benard e Franco, 2005).

O esquema terapêutico básico para a paracoccidiodomicose é feito pela associação de sulfametoxazol e trimetoprim. Entretanto, outras drogas fungicidas³ podem ser utilizadas. Algumas questões tornam a cura da doença ainda difícil, como por exemplo, o início tardio do tratamento devido à dificuldade no diagnóstico, às recaídas freqüentes e à resistência às drogas por cepas do *P. brasiliensis* (Hahn et al., 2003; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Outros fatores contribuem para a morbidade da doença, como o elevado grau de alcoolismo e tabagismo, hábitos freqüentes dos pacientes (Costa, 2000; dos Santos et al., 2003). Quadros de desnutrição também já foram descritos em pacientes com as diferentes formas da doença (Restrepo e Benard, 2004).

A estrutura antigênica do *P. brasiliensis* é complexa, e diferentes componentes exocelulares têm sido isolados. Alguns antígenos são utilizados em testes intradérmicos que têm valor prognóstico, pois refletem o estado imunológico do paciente e a ocorrência de infecção. No entanto, não permitem discriminar a

³ Itraconazol, Cetoconazol, Fluconazol e Anfotericina B.

paracoccidioidomicose, devido à reação cruzada com outras micoses (Del Negro et al., 1991).

A gp43 é uma glicoproteína específica imunodominante de peso molecular 43 kD, que se liga à laminina da matriz extracelular em tecidos infectados. Trata-se do antígeno contra o qual a maior parte dos indivíduos com paracoccidioidomicose apresenta anticorpos específicos (Gesztezi et al., 1996; Taborda et al., 1998; Souza et al., 2000). O papel dessa proteína ainda não está determinado com precisão, mas, aparentemente, apresenta importância nos mecanismos de infecção e adesão às células do hospedeiro. Recentemente a gp43 também foi descrita como um fator envolvido na evasão do fungo à resposta imune, modulando a ativação de macrófagos infectados. A gp43 vem sendo utilizada no diagnóstico sorológico, em testes cutâneos e na avaliação de resposta imune celular da doença humana (Hanna et al., 2000; Flavia-Popi et al., 2002). Em camundongos susceptíveis, testes *in vitro* com 25 peptídeos isolados após mapeamento da gp43, mostraram que um peptídeo denominado P10, elicitou resposta do tipo Th1, protetora contra a infecção fúngica (Taborda et al., 1998).

A paracoccidioidomicose depende da interação entre o fungo e a resposta imune do hospedeiro para evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando uma doença granulomatosa crônica. Nos pacientes, os níveis de anticorpos séricos IgA, IgG e IgE são altos e se correlacionam com a gravidade da doença. Até hoje não foi demonstrado que os anticorpos conferem proteção contra a doença (Biselli, 2001; Mamoni et al., 2002).

As alterações nos parâmetros de imunidade celular que ocorrem nos pacientes com paracoccidioidomicose se correlacionam à heterogeneidade clínica da micose. Nesse contexto, foi observada uma tendência progressiva à piora da resposta imune a partir da forma crônica unifocal até a forma juvenil. Em lesões de pacientes com as formas graves são observados poucos e mal formados granulomas repletos de fungos, enquanto em lesões de pacientes com manifestações menos severas há inúmeros granulomas epitelióides e presença de poucos fungos (Franco et al., 1997).

A comparação entre indivíduos com a infecção subclínica e pacientes com a doença ativa sugere que a presença do fungo no organismo não seja suficiente para

alterar a imunidade protetora, cujo perfil de diferenciação e produção de mediadores é Th1. Oliveira e colaboradores analisaram proliferação celular e produção de citocinas em culturas de células estimuladas com o *P. brasiliensis* em pacientes com paracoccidiodomicose e em indivíduos com a infecção, sem sintomatologia da doença. Foi demonstrado que, além do teste cutâneo positivo, este último grupo apresentava proliferação de linfócitos aumentada em resposta antígeno-específica. Foi também observada produção diminuída de IL-10 e IL-4 e aumentada de IFN- γ , quando comparados a pacientes com a doença ativa (Oliveira et al., 2002).

De uma maneira geral, aspectos da imunidade celular em pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose apontam para uma hiporresponsividade cutânea e queda na relação de linfócitos T CD4/CD8+ nas lesões. Também foi demonstrado que linfócitos T de pacientes produzem níveis baixos de IL-2, IL-12 e IFN- γ , associados com produção aumentada de IL-4 e IL-10 (Benard et al., 2001). Em outro trabalho, a reatividade cutânea foi restaurada na maioria dos pacientes previamente não-respondedores, após o tratamento da doença e a remissão dos sintomas. Nesse mesmo grupo ocorreu produção *in vitro* de IFN- γ em culturas de células de sangue periférico estimuladas com antígenos do *P. brasiliensis* (Karhawi et al., 2000).

A IL-12 produzida no início da infecção desempenha papel fundamental na imunidade à paracoccidiodomicose pela ativação de linfócitos Th1. Romano e colaboradores demonstraram que a adição de IL-12 em culturas de células mononucleares de pacientes aumentava a produção de IFN- γ , e quando adicionadas em culturas junto com anti-IL-10, aumentava também a resposta proliferativa frente a antígenos do fungo (Romano et al., 2002). Em modelo experimental murino de infecção por *P. brasiliensis*, o efeito protetor da IL-12 está associado à diminuição dos níveis de IL-4 e IL-10 (Calich e Kashino, 1998).

Em conjunto com outros resultados, tem sido proposto que nas manifestações agudas e graves da doença, como na forma juvenil, ocorra falha na contenção do fungo ainda no início do processo infeccioso, devido a uma modulação negativa das respostas do tipo Th1, concomitante com produção aumentada de citocinas anti-

inflamatórias. A eosinofilia observada nesses casos é relacionada com alta produção de IL-5 (Oliveira et al., 2002).

Na forma crônica unifocal e menos grave da doença, a infecção inicial parece ser mais controlada como consequência de um equilíbrio na resposta do tipo Th2, com produção diminuída de IL-4. Apoptose de linfócitos T antígeno-específicos demonstrada nessa forma da doença, também pode contribuir para a diminuição da resposta imune (Cacere et al., 2002). Com relação à atividade microbicida de macrófagos humanos infectados *in vitro* com *P. brasiliensis*, foi demonstrada a necessidade de sinergismo entre TNF- α e IFN- γ para que tal evento ocorresse. Porém, a adição de gp43 nas culturas provocou a inibição da produção de TNF- α (Anjos et al., 2002).

Um trabalho recente investigou a expressão de mRNA de citocinas e quimiocinas em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com as diferentes formas clínicas de paracoccidiodomicose. RT-PCR foi realizado com células não estimuladas e estimuladas com fitohemaglutinina (PHA), em diferentes períodos, variando de 3 a 48h de incubação. Indivíduos com infecção sub-clínica sem sintomatologia da doença apresentaram níveis precoces e altos de IFN- γ , TNF- α , e das quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10 quando comparados com pacientes com a forma juvenil. Em comparação aos pacientes com a forma crônica do adulto, indivíduos com infecção sub-clínica apresentaram níveis similares de CXCL-10 e IFN- γ , além de níveis mais elevados de CXCL-9. Citocinas com perfil Th2 estavam mais altas nos dois grupos de pacientes quando comparadas aos indivíduos assintomáticos (Mamoni e Blota, 2005).

A evolução da infecção pelo *P. brasiliensis* para a paracoccidiodomicose, em sua forma crônica do adulto, ocorre apenas em pequena parte dos indivíduos expostos. Em nossa investigação abordamos inicialmente co-morbidades que poderiam estar associadas a defeitos de imunidade celular com potencial para facilitar a ocorrência de paracoccidiodomicose, especialmente por afetar a resposta imune celular. Três dessas condições foram observadas na população de pacientes investigada: tabagismo, alcoolismo e desnutrição protéico-calórica. Como esses fatores comprometem a função

de APCs, investigamos a ativação de linfócitos T por estímulos policlonais e gp43, uma proteína do *P. brasiliensis*. Nossos resultados mostraram um defeito funcional de linfócitos T em resposta a estímulo policlonal (Con-A), que não ocorria em ativação com PMA+ION. Esses dados evidenciam falha não-antígeno-específica, compatível com anergia. Uma segunda avaliação dos níveis de IL-2/TCGF e proliferação em resposta a Con-A pós-tratamento mostrou que o estado anérgico da célula era dependente da presença do patógeno, sendo reversível com tratamento.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar parâmetros relacionados à hiporresponsividade imunológica, bem como a sua reversão, em pacientes com hanseníase e paracoccidiodomicose. Correlacionar a emergência de respostas imuno-inflamatórias *in vivo* e *in vitro* às alterações no status clínico desses indivíduos e a resposta ao tratamento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

ESTUDO 1

1. Investigar a natureza da resposta imune-inflamatória em lesão de pele de pacientes com a forma hiporresponsiva da hanseníase apresentando um raro episódio reacional com severo comprometimento sistêmico.
2. Determinar as alterações nas frequências relativas de subpopulações leucitárias, e citocinas pró-inflamatórias, no momento do diagnóstico e após a regressão dos sinais e sintomas clínicos do quadro reacional.
3. Analisar as alterações nos parâmetros de resposta imune *M. leprae*-específica no sangue desses pacientes antes e após a terapêutica anti-inflamatória com talidomida.

ESTUDO 2

1. Investigar a presença de condições clínicas associadas a defeitos de imunidade celular em pacientes com paracoccidiodomicose.
2. Analisar a presença de alterações em frequências de subpopulações leucocitárias e nas proporções de linfócitos T produtores de IFN- γ e IL-4 antes e após tratamento da doença.
3. Avaliar o perfil de produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em cultura de células mononucleares sanguíneas de pacientes antes e após o tratamento estimuladas com gp43 e mitógenos.
4. Investigar a presença de alterações funcionais não-patógeno-específicas de linfócitos T e sua reversibilidade após terapêutica específica em pacientes com paracoccidiodomicose.

RESULTADOS

ESTUDO 1.

**Clinical, immunological and histological aspects of an uncommon type II
reaction in patients with lepromatous leprosy.**

Clinical and Experimental Dermatology, 2007

doi: 10.1111/j.1365-2230.2007.02654.x

Clinical, immunological and histological aspects of an uncommon type II reaction in patients with lepromatous leprosy

D. Esquenazi,*† A. L. Moreira,‡ A. Miranda,*† J. A. C. Nery,* F. F. Alvarenga,† E. N. Sarno* and G. M. B. Pereira*†

*Department of Mycobacterioses, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil; †Department of Pathology and Laboratories, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; and ‡Department of Pathology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

Summary

This study reports three cases of an unusual leprotic reaction characterized by superficial bullous ulcerative cutaneous lesions associated with high fever, malaise and oedema in patients with leprosy. Two patients responded to thalidomide treatment, with regression of the symptoms and skin ulcers. The third patient responded to thalidomide plus prednisone. Analysis of the ulcerated skin lesions showed dermal oedema with mononuclear cell infiltrate enriched for $\gamma\delta$ -positive T lymphocytes and an increased number of *Mycobacterium leprae* bacilli within capillary endothelium. In contrast, $\gamma\delta$ + cells were decreased in or absent from the blood. Tumour necrosis factor- α and interleukin-6 were raised in the serum of the patients at the onset of the reaction. After the episode, cytokine levels and the percentage of $\gamma\delta$ + cells in the blood returned to normal. These cases characterize an uncommon leprotic reaction with clinical similarities to type II reaction and may indicate a significant role for $\gamma\delta$ + T cells in its pathogenesis.

In our study population, about 40% of leprosy patients develop acute reactions that are reactivations of the cellular immune response linked to the production of several inflammatory cytokines. Such events are associated with tissue and nerve damage and are responsible for deformities caused by the disease, adding to the stigma associated with it.^{1,2} The classic type II reaction, erythema nodosum leprosum (ENL), verified in approximately 55% of these patients, occurs in patients with multibacillary disease and is characterized by the appearance of new erythematous nodules, often associated with fever, malaise and neuritis. In severe type II reactions, lesional polymorphism is verified by nodules,

bullae and/or pustules that can ulcerate (necrotizing ENL).³

Report

We report three cases of lepromatous leprosy with an unusual leprotic reaction that shares some characteristics with type II reaction. All patients had systemic symptoms, such as high fever, oedema of the limbs and face, regional lymphadenopathy, and erythematous skin lesions that, in contrast to classic or necrotizing ENL, formed superficial plaques, bullae and ulcers. The lesions had well-defined raised borders; some were dry and others had serous secretion. Most of the lesions were new, not involving a previous leprosy lesion, and were present on both the lower and upper limbs. One of our patients also had an ulcerated plaque in the nose. The lesions were of variable size, the largest measuring 50 mm. No typical ENL or necrotizing ENL lesions were present in any of the patients. The lesions regressed in a few days after treatment with thalidomide or thalidomide plus prednisone (Table 1).

Correspondence: Dr Danuza Esquenazi, Department of Mycobacterioses (IOC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Avenue Brazil, 4365 Manguinhos, CEP 21045-900 Rio de Janeiro, Brazil.
E-mail: danuza@ioc.fiocruz.br

Conflict of interest: none declared.

The first two authors contributed equally to this work.

Accepted for publication 17 July 2007

Table 1 Clinical findings of patients with reaction

Patient	Age (years)/gender	Probable onset of disease	BI*	Duration of MDT until reaction	Day 0		Day 7		Treatment of reaction
					Axillary temp (°C)	Clinical signs and symptoms	Axillary temp (°C)	Clinical signs and symptoms	
1	73/M	6 months	2.5	8 days	40	Ulcerated skin lesions, oedema, malaise, anorexia	36.5	Regression of lesions, no oedema	Dipirone, thalidomide (300 mg/day)
2	61/M	6 years	2.6	13 months	39	Ulcerated skin lesions, oedema, malaise, anorexia	36.4	Partial regression of lesions, no oedema	Paracetamol, prednisone (50 mg/day), thalidomide (300 mg/day)
3	67/M	1 year	2.0	Not treated	38.7	Violaceous and ulcerated skin lesions, oedema, malaise	36.5	Regression of lesions, no oedema	Paracetamol, thalidomide (300 mg/day)

*Bacteriological Index; multidrug therapy.

Skin biopsies taken at the time of diagnosis showed intense and diffuse superficial dermal oedema, passive congestion of blood vessels with focal haemorrhage, and sparse inflammatory infiltration of mononuclear and polymorphonuclear cells. In contrast to ENL, there was no panniculitis of the subcutaneous tissue. There was a high load of *Mycobacterium leprae* bacilli in the capillary endothelium of the skin.

Immunohistological studies of the skin biopsies showed an inflammatory infiltrate composed predominantly of CD4+ T cells within the dermis and expression of human leucocyte antigen DR by overlying keratinocytes. In addition, the inflammatory infiltrate was strongly positive for tumour necrosis factor (TNF)- α . Incubation of sera with antihuman immunoglobulins and anticomplement fractions showed no immune complex deposition. Similar findings have been seen with ENL lesions.^{4,5} However, in contrast to classic ENL, there was an increased number of $\gamma\delta$ + T cells in the dermis of these patients (Fig. 1).

Levels of TNF- α and interleukin-6, associated with acute-phase reaction and tissue damage, were found in sera collected 0–7 days after the diagnosis of the reaction, a routine test for all patients undergoing leprotic reaction in our institution. Similar to ENL, the levels of these cytokines were higher in patients after the onset of the reaction than in nonreactive leprosy patients. A marked reduction in levels of both cytokines was observed after the first day of treatment. The levels continued to fall over the following week (Fig. 2).

Flow-cytometry analysis of peripheral blood leucocytes in all three patients at day 0 of the reactional episode showed the expected frequency of CD4+ T

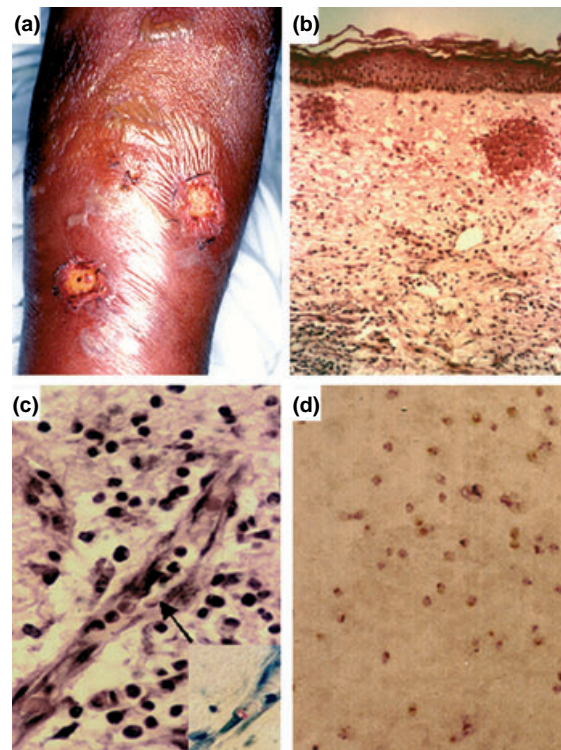


Figure 1 Clinical and microscopic features of cutaneous lesions at the onset of reactional episode. (a) Macroscopic aspect of the skin in upper arm showing oedema and ulcerated necrotic lesions. (b) Histopathological examination of the border of a necrotic area disclosed an intense and diffuse oedema of the superficial dermis, and destruction of small blood vessels with punctual haemorrhages (haematoxylin and eosin; original magnification $\times 40$). (c) Dermal blood vessel with acid-fast bacilli (inset) grouped within the wall (haematoxylin and eosin and Wade; original magnification $\times 1000$). (d) Several $\gamma\delta$ + T cells can be seen in the dermis (immunoperoxidase staining $\times 10$).

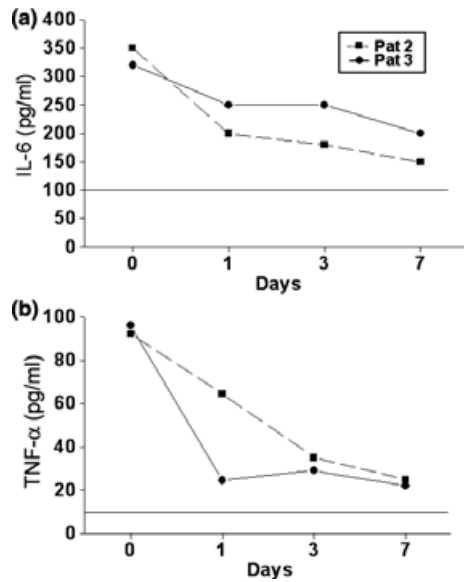


Figure 2 Patients with reactional leprosy have raised tumour necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6 serum levels. (a) IL-6 and (b) TNF- α levels were measured in sera obtained from venous blood collected from two patients (patients 2 and 3; no data were obtained for patient 1) at 0, 1, 3 and 7 days after diagnosis of the reaction. The cytokine levels were determined by ELISA and the horizontal lines show the cut-off of each cytokine, determined by mean values in five healthy individuals. Both cytokines have been previously shown to be raised in the serum of patients with reactional leprosy.

lymphocytes and a relative reduction for CD8+ T cells and CD14+ monocytes, as seen in other inflammatory processes. Interestingly, there were no $\gamma\delta$ + T cells detectable in the blood of the patients at day 0, but levels had returned to normal by day 7 of treatment (Fig. 3). We did not find this fluctuation of $\gamma\delta$ + T cells in the peripheral blood in other patients presenting classic type II reaction (data not shown).

Follow-up information was available for one patient, who continued his treatment in the Leprosy Outpatient Unit, at the Oswaldo Cruz Foundation. During the course of his therapy, this patient experienced episodes of classic ENL during the 21st and 24th months of the specific multidrug leprosy therapy, which were controlled with thalidomide. The patient was followed up for 6 years, and has had no other complication.

We treat approximately 700 leprosy patients/year, with 150 newly diagnosed cases/year, and during >15 years of follow-up, only the 3 patients described here have presented this unusual reaction. Our data indicate a rare and unusual leprotic reaction that shares many characteristics with type II reaction, but in contrast to classic or necrotizing ENL, these patients

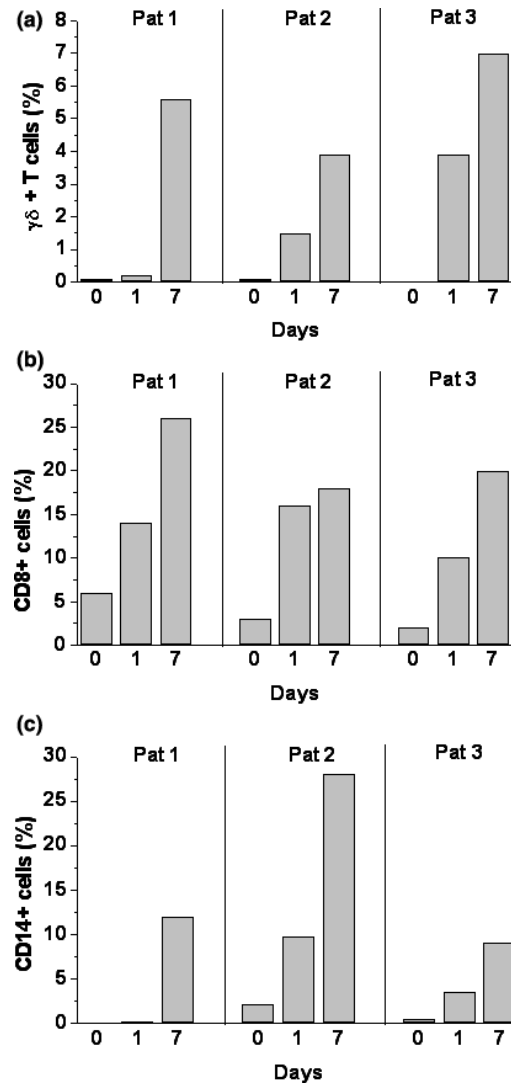


Figure 3 Selective reduction in the frequencies of blood leucocytes subsets of reactional patients. Peripheral blood leucocytes collected at days 0, 1 and 7 after diagnosis of reaction were stained with monoclonal antibody specific for (a) $\gamma\delta$ +, (b) CD8+ and (c) CD14+ cells, and analysed by flow cytometry. The relative frequencies of positive cells of each subset of all patients are shown.

presented superficial ulceration with characteristic histopathological and immunological features.

The presentation of superficial necrotizing lesions in leprosy brings Lucio's phenomenon (LP) into the differential diagnosis. LP appears to be restricted to patients with diffuse non-nodular leprosy, a type of leprosy seen predominantly in Mexico. Care should be taken to differentiate between these two entities, as LP lacks many of the clinical and histopathological characteristics described in our patients.^{6,7} The skin lesions

in our patients are superficial ulcerating lesions, with a high load of bacilli within capillaries and superficial congestion of blood vessels, similar to LP; however, in LP, the ulceration is infarct-like, possibly due to vasculitis.⁷ In addition, patients with LP have no systemic symptoms, unless there is a superimposed bacterial skin infection. Our cases differ from LP in the clinical presentation (fever, malaise and oedema), which are similar to type II reactions. The fact that our patients responded to thalidomide with or without prednisone with improvement of clinical symptoms and healing of the lesions without antibiotic administration leads us to conclude that no secondary infection was responsible for these symptoms. In addition, the response to thalidomide supports a type II-like reaction, as the drug is not effective in LP.

In spite of the small number of cases studied, our patients shared the same immunological profile; all of them had increased numbers of $\gamma\delta+$ T cells in the skin lesions. These cells were not present in the peripheral blood at the onset of the reaction. $\gamma\delta+$ T cells have been showed to be specifically responsive to mycobacterial antigens and large numbers of these cells migrate to the site of lepromin injection in patients with tuberculoid leprosy.⁸ TNF- α appears to be the main mediator of $\gamma\delta+$ cells and is also responsible for the downregulation of the inflammatory process.^{9,10}

In conclusion, the experimental and histological findings seem to suggest that $\gamma\delta+$ T lymphocytes and TNF- α play important roles in the immunopathology of these rare type II reactions.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Sérgio L. G. Antunes for critical reading of the text and for the final edition of the

photographs, and to Ms. Katia B. Magalhães for the English revision of the manuscript.

References

- 1 Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 2004; **363**: 1209–19.
- 2 Sampaio EP, Moraes MO, Pessolani MCV, Sarno EN. Role of TH1 cytokines in host defenses against *M. leprae*. In: *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook* (Kotb M, Calandra T, eds). Totowa (NJ): Humana Press, 2003: pp. 163–86.
- 3 Lockwood DN. The management of erythema nodosum leprosum: current and future options. *Lepr Rev* 1996; **67**: 253–9.
- 4 Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Bra J Med Biol Res* 1998; **31**: 69–76.
- 5 Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A *et al*. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* 1993; **168**: 408–14.
- 6 Rea TH, Ridley DS. Lucio's phenomenon: a comparative histological study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1979; **47**: 161–6.
- 7 Rea TH, Jerskey RS. Clinical and histologic variations among thirty patients with Lucio's phenomenon and pure and primitive diffuse lepromatosis (Latapi's lepromatosis). *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2005; **73**: 169–88.
- 8 Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM *et al*. Lymphocytes bearing antigen-specific $\gamma\delta+$ T cell receptors accumulated in human infections disease lesions. *Nature* 1989; **339**: 544–8.
- 9 Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA. $\gamma\delta$ T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J Immunol* 2005; **174**: 6045–53.
- 10 Lang F, Peyrat MA, Constant P *et al*. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol* 1995; **154**: 5986–94.

ANEXO I

Por tratar-se de um “Concise Report” limitado a apenas três figuras, os resultados abaixo não foram mostrados no Estudo 1, porém, devido à sua relevância, decidimos incluí-los nessa tese.

Emergência de resposta antígeno-específica não associada à produção de IFN- γ *in vitro*.

Ao analisarmos as células mononucleares de sangue periférico (CMS) de dois pacientes com uma forma incomum de ENL frente ao *M. leprae* ou a PHA, observamos que houve mudança no padrão de resposta antígeno-específica de não respondedor para respondedor no decorrer do processo reacional. Porém, em nenhum momento foi detectada produção de IFN- γ quando as CMS desses indivíduos foram estimuladas em cultura com o *M. leprae*, ao contrário do que ocorreu quando o estímulo foi PPD.

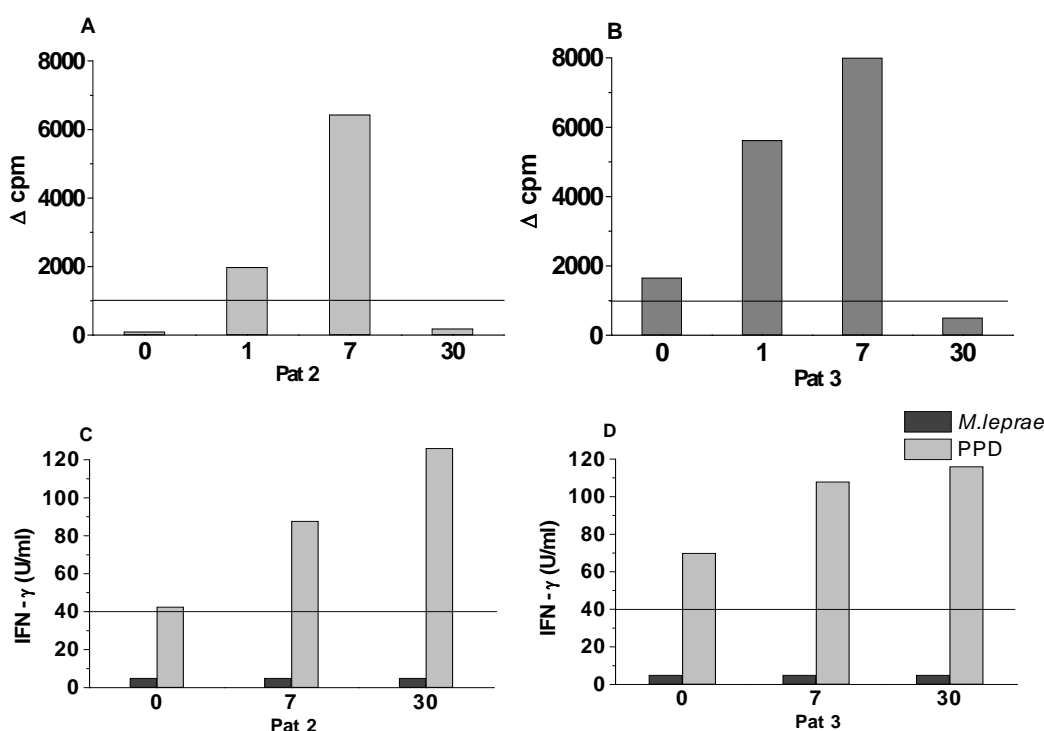


Figura. Resposta proliferativa ao *M. leprae* em dois pacientes com ENL incomum não foi acompanhada de produção de IFN- γ . Nos gráficos estão expressos em Δ com os resultados obtidos através de ensaio de incorporação de ^3H TdR nas culturas de CMS cultivadas por 5 dias em presença de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *M. leprae* nos diferentes dias em que o sangue periférico dos pacientes foi coletado e os experimentos realizados (A e B). Valores ≥ 1000 Δ com foram considerados positivos. Os erros-padrão omitidos foram sempre menores que 20%. Todas as culturas estimuladas com PHA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 72 horas foram positivas (dados não mostrados). O sobrenadante de cultura de CMS estimuladas com 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de *M. leprae* ou PPD por 5 dias foi analisado por rádio-imuno ensaio (RIA). Os resultados obtidos estão expressos em U/ml e valores acima de 40 U/ml são considerados positivos (C e D).

ESTUDO 2.

**Immune hyporesponsiveness in the chronic form of
paracoccidioidomycosis and its reversal following treatment.**

Scandinavian Journal of Immunology

SJI-07-310 (submetido a publicação)



**IMMUNE HYPORESPONSIVENESS IN THE CHRONIC FORM OF
PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS AND ITS REVERSAL FOLLOWING
TREATMENT**

Journal:	<i>Scandinavian Journal of Immunology</i>
Manuscript ID:	SJI-07-310
mstype:	Regular Manuscript
Date Submitted by the Author:	20-Nov-2007
Complete List of Authors:	Esquenazi, Danuza; Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, Cellular Microbiology Lab, Oswaldo Cruz Institute; State University of Rio de Janeiro-UERJ, Lab of Immunopathology, School of Medical Sciences Costa, Regina; Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, Evandro Chagas Research Institute do Valle, Antonio Carlos; Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, Evandro Chagas Research Institute Alvim, Iris; State University of Rio de Janeiro-UERJ, Lab of Immunopathology, School of Medical Sciences; Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, Cellular Microbiology lab, Oswaldo Cruz Institute Bóia, Márcio; Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, Parasitic Diseases Lab, Oswaldo Cruz Institute; State University of Rio de Janeiro, Infectious and Parasitic Diseases Discipline, School of Medical Sciences Pereira, Geraldo; Oswaldo Cruz Foundation-FIOCRUZ, Cellular Microbiology Lab, Oswaldo Cruz Institute; State University of Rio de Janeiro-UERJ, Lab of Immunopathology, School of Medical Sciences
Keywords:	Fungal < Infections, T Cells < Cells, Tolerance/Suppression/Anergy < Processes, Cytokines < Molecules, Human < Subject



IMMUNE HYPORESPONSIVENESS IN THE CHRONIC FORM OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS AND ITS REVERSAL FOLLOWING TREATMENT

Short title: PCM treatment and immune hyporesponsiveness

Danuza de Almeida Esquenazi^{1,2*}, Regina Lana Braga Costa^{3*}, Antonio Carlos Francesconi do Valle³, Iris Maria Peixoto Alvim^{1,2}, Márcio Neves Bóia⁴ and Geraldo Moura Batista Pereira^{1,2}

¹Laboratory of Immunopathology, School of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro - UERJ; ²Laboratory of Cellular Microbiology, and ⁴Parasitic Diseases Laboratory, Oswaldo Cruz Institute and ³Evandro Chagas Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to:

Geraldo M. B. Pereira, Lab of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation - FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil. Phone and Fax: 55 (21) 2270-9997. E-mail: geraldo@fiocruz.br

Word counts: abstract 248

article text 3093

CLINICAL IMMUNOLOGY

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis prevalent in the areas of Latin America where *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) is present. Only a small proportion of the individuals exposed to Pb develop disease. Functional impairment of T cells has the potential to increase susceptibility to this mycosis, but can also represent adaptative and reversible change in the course of the disease. In order to address this problem, we performed an evaluation of the *in vitro* response to polyclonal and antigenic stimuli in patients with the adult chronic form of paracoccidioidomycosis (PCM-A; n=20, male, 35-57 years old) before and after treatment with itraconazole. All the patients were smokers. Protein-energy malnutrition (60%), strongyloidiasis (50%) and moderate to heavy use of alcohol (90%) were also observed in the PCM-A patients. Low to absent IL-2 bioactivity was observed prior to treatment, in response to Concanavalin-A (Con-A) but not to PMA+Ionomycin. Following treatment there was reversal of the unresponsiveness to Con-A, and data suggestive of increase in the IFN- γ /IL-4 producing T cell ratio in blood leukocytes. Pb-specific IFN- γ levels were seen only in treated patients. Smoking, alcoholism and malnutrition are frequently observed in PCM-A patients. These conditions may have contributed to the impairment of T cell function detected before treatment, and perhaps to the evolution of the infection to active disease. Taken together our observations suggest that at least some aspects of the T cell hyporesponsiveness seen in PCM are secondary to the disease onset, non-antigen-specific and reversible by treatment of this chronic mycosis.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis, endemic in Latin America, caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). The infection occurs by the inhalation of Pb spores, usually during the first two decades of life. Positive skin tests in response to a Pb antigenic preparation (PbAg) were initially observed in PCM patients and asymptomatic individuals from Colombia [1]. Brazil accounts for 80% of the cases reported worldwide [2, 3]. It is estimated that throughout the endemic region as many as ten million individuals could be infected by Pb, but only 2% of them will develop the disseminated forms of the disease [4, 5]. This low frequency of clinical disease following infection is also observed with other mycoses [6].

The majority of patients with adult chronic form of paracoccidioidomycosis (PCM-A) are male, 30 to 50 years old, active or retired farm workers [3]. The spectrum of PCM clinical forms also includes the subacute or juvenile form (PCM-J).

The clinical manifestations vary from oligosymptomatic to severe and disseminated disease. Patients with the PCM-A present mainly mucosal and lung involvement, while PCM-J patients develop a severe disseminated disease, with diffuse lymph node enlargement and hepatosplenomegaly. Treatment of PCM includes long courses of itraconazole or sulfamethoxazole/trimetoprim for outpatients, while amphotericin B is used for severe cases under inpatient care [7].

Musatti and cols. evaluated cellular immunity parameters in Brazilian PCM patients. The skin tests (PbAg, 2,4-dinitrochlorobenzene; DNCB) detected impaired responses to the stimuli in almost half of the PCM patients (n=19). The *in vitro* responses (PbAg, phytohemagglutinin, and *Candida albicans*) were comparable. Relative frequencies of T cells were reduced in the patients [8]. In a group of Colombian PCM patients, defective skin test responses to DNCB and *Candida albicans* were observed. The

presence of Pb-specific antibodies was associated to *in vitro* unresponsiveness to PbAg in a T cell proliferation assay, and absence of Pb-specific antibodies to good proliferation in response to PbAg. A progressive impairment of the cellular immunity parameters was observed during the evolution of the disease. The skin test and *in vitro* responses to PbAg and PPD in clinically cured patients suggested that reduced responsiveness to PbAg and other antigens in PCM patients was reversible with treatment. A preliminary longitudinal investigation with 6 PCM patients supported this conclusion [9]. The negative DNCB skin tests suggest a defective priming of T cells in the group of patients [10]. The reduced responses to PHA, PPD and *Candida albicans* indicate that the changes in immunity seen in PCM may affect the immune response to other antigens and pathogens.

The pathogenesis of fungal diseases is usually connected to therapeutic immunosuppression, innate or acquired immunodeficiencies such as AIDS [6]. However, other conditions associated to defective cellular immunity or deviation of immune response to a T helper type 2 (Th2) pattern could compromise the T helper type 1 (Th1) pattern of response linked to protection, and also trigger the onset of clinical manifestations of PCM [11]. Alcoholism and malnutrition are commonly observed in PCM patients [12]. These health problems can affect antigen-presenting cells and priming of T cells [13, 14]. And alcoholism increases the probability of strongyloidiasis detection, adding one more condition that can be related to the changes in cellular immune response seen in PCM [15-17].

Substantial levels of IFN- γ , interleukin (IL)-2 and low levels of IL-10 were observed in asymptomatic, infected individuals, reflecting an effective immune response against Pb [18]. By contrast, low levels of IL-2 and IFN- γ and substantial amounts of IL-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , and transforming growth factor (TGF- β) were described in PCM-A patients [19-21]. An increase in IFN- γ levels in response to PHA and

Pb antigens was observed in paracoccidioidomycosis patients following clinical remission [22]. A pathogen-specific Th1 immunosuppression was also proposed as a defect present in PCM, possibly by inhibition of the IL-12 pathway. This defect was partially reversed in treated individuals, or, *in vitro*, by adding a neutralizing anti-IL-10 monoclonal antibody to the cultures of PBL (peripheral blood leukocytes) from PCM patients [23].

In order to evaluate possible changes in T-lymphocyte responsiveness present in PCM-A and their reversibility after treatment, we have done a prospective investigation in PCM-A patients. The group of patients was submitted to evaluation of T-lymphocyte *in vitro* response to polyclonal stimuli and antigens at the onset of treatment and after its completion. The relative frequencies of PBL subsets and the ratios of IFN- γ /IL4-producing T cells were also analyzed at the same time points.

In this work we have found a defective *in vitro* activation of T lymphocytes in PCM-A patients and the reversal of this defective activation after itraconazole treatment. Reduced IL-2/TCGF levels and proliferation were seen in response to Con-A, but not to PMA+ION. This observation suggests that the defects in T cell function seen in PCM-A are not pathogen-specific and may be related to T-cell tolerance or anergy, requiring the presence of Pb in the organism.

MATERIALS AND METHODS

Study population. Twenty male patients, 35-57 years old, with the adult chronic form of PCM (PCM-A) were evaluated. Diagnosis was made by the detection of *Pb* in direct examination and/or culture of clinical specimen [7]. All patients were submitted to treatment (200 mg/ day, Itraconazole, Jansen Pharm., NY, USA) at the Evandro Chagas Research Institute of the Oswaldo Cruz Foundation, State of Rio de Janeiro, Brazil. Strongyloidiasis was investigated by using the Baermann-Moraes method as previously described [17]. Smoking habit was defined as moderate or heavy. The categories for alcohol intake were: light, for weekly, and moderate for daily ingestion of low alcohol concentration beverages; heavy, daily made use of distilled beverages. Moderate smokers used less, and heavy smokers more than 20 cigarette packages/year. Protein-energy malnutrition was defined as loss of more than 10 % of habitual weight and body mass index lower than 20 Kg/m². Ten healthy volunteers (male, 35-41 years old) were included as endemic area healthy controls for PCM, and their cellular immunity parameters were evaluated in parallel with the PCM-A patients.

Antigens and mitogens. *P brasiliensis*-derived glycoprotein gp43 (kindly provided by Dr. Luíz R. Travassos, São Paulo Medicine School, UNIFESP, SP, Brazil) and Purified Protein Derivative (PPD; Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) were used at 20µg/ml. Staphylococcal Enterotoxin B (SEB; Sigma Chemical Co., MO, USA) was used at 1µg/ml. Concanavalin-A (Con-A; Sigma) was used at 10µg/ml. Phorbol Myristate Acetate (PMA; Sigma) plus Ionomycin (ION; Sigma) were used at 10ng/ml and 1µg/ml respectively.

Lymphocyte proliferation assay. Peripheral blood leukocytes (PBLs) were isolated from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque density gradient (Amersham

Biosciences, Uppsala, Sweden). PBLs were incubated in RPMI 1640 (GIBCO Laboratories, NY, USA) supplemented with 10% pooled AB normal human serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine and 5×10^{-5} M 2-Mercaptoetanol (all from GIBCO), named complete medium. Results were expressed as mean counts per minute obtained from stimulated and unstimulated cells.

Quantification of cytokine levels. PBLs were incubated at 37°C in complete medium (0.2 ml/well, 10^6 cells/ml, 96-well microplates; Corning, USA). The cells were stimulated with mitogens (3 days) and antigens (5 days) cultures, and the supernatants were harvested and stored at – 70°C for the determination of the levels of cytokines.

CBA cytokine assay. In order to quantify the levels of Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α) and Th2-cytokines (IL-4, IL-5, IL-10), PBL supernatants of polyclonally (Con-A, SEB and PMA+ION) and antigen-stimulated (gp43 and PPD) cultures were analyzed by flow cytometry, with the Cytometric Bead Array Kit and the BD CBA Analysis software (Becton Dickinson, CA, USA).

IL-2/TCGF bioassay. IL-2/TCGF bioactivity was evaluated by culturing CTLL-2 cells (5×10^3 /well; ATCC, MD, USA) in the presence of the 18-hour supernatants of Con-A- or PMA+Ion-stimulated PBLs, and detecting the IL-2 bioactivity by quantification of CTLL-2 proliferation, as previously described [24].

Flow cytometry. For phenotypic characterization freshly obtained PBLs were resuspended in cytometry buffer and directly labeled with monoclonal antibodies (anti-CD3 FITC, anti-CD4 Cy, anti-CD8 Cy, anti-CD14 PE, anti-CD16 FITC, anti-CD19 PE; BD-Biosciences, San Jose, CA, USA). After fixation the cells were analyzed in a 4-color flow cytometer

FACSCalibur (BD-Biosciences). The assessment of the frequencies of IL-4- and IFN- γ -producing T cells was done in 6-hour cultures stimulated with Con-A or PMA+ION. Intracellular detection of the cytokines was performed as previously described [25], and the cells were analyzed in a FACSCalibur cytometer, using the CellQuest Pro v4.0.2 software (BD-Biosciences).

Statistical analysis. Significance of the difference between values was evaluated by the ANOVA and Student's *t*-test. Results were considered significant when $p \leq 0.05$.

Ethics. This study was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation. The patients and controls were included in the study only after their informed consent. The Brazilian and institutional guidelines for experiments involving human subjects were followed.

RESULTS

Clinical profile of the studied patients

All the patients were diagnosed with PCM-A, by using standard clinical, radiological and laboratorial parameters [7]. At the moment of the diagnosis of PCM-A, and before treatment, 50% of patients presented intestinal strongyloidiasis, all the patients were chronic smokers, 90% were moderate to heavy consumers of alcohol and 60% presented some degree of protein-energy malnutrition (Table 1). When patients positive and negative for strongyloidiasis were compared, no differences were observed in cytokine levels, relative frequencies of PBL subsets or the other functional parameters investigated in this work (Data not shown).

Relative frequencies of T-lymphocytes and other leukocyte subsets in PCM patients and healthy volunteers were comparable

Reduced relative frequencies of T-lymphocytes were observed in previous works on PCM [8, 9]. In order to evaluate if changes in the frequencies of T-lymphocytes or other leukocytes could be a cause for functional changes in the PCM patients, the phenotypic analysis of peripheral blood leukocytes (PBLs) was performed before and after the treatment. No differences were observed in the leukocyte subsets when the frequencies of PBLs expressing CD3, CD4, CD8, CD14, CD16 and CD19 were analyzed in patients before and after the treatment, or when the patients were compared to healthy volunteers (Figure 1).

The relative proportion of IFN- γ over IL-4-producing T-lymphocytes increases after PCM-A treatment

The assessment of the frequencies of IFN- γ - or IL-4-producing T lymphocytes was done in PBLs of 17 patients, after short-term stimulation with PMA+ION. The results have shown an increase in the relative proportion of T lymphocytes which produce IFN- γ , in comparison with those producing IL-4, when values before and after the treatment were compared. The IFN- γ /IL-4 ratio was $6.4 \pm 4.8\%$ for untreated patients, and $17.1 \pm 12\%$ in treated patients (Figure 2). The IFN- γ /IL-4 ratio for the healthy controls (n=10) was $15.2 \pm 3.2\%$ (data not shown).

IL-2/TCGF bioactivity and proliferative response increase in Con-A stimulated PBLs of PCM-A patients and reaches levels comparable to the healthy control group

The PBLs of the patients and healthy controls were stimulated *in vitro* with Con-A and PMA+ION for evaluation of the functional activation of T cells. The IL-2/TCGF bioactivity was markedly reduced in the Con-A-activated cells of untreated patients (UN). However, the response to PMA+ION was not affected in the same patients. The proliferative responses of the PBLs presented the same functional pattern, low or even absent in response to Con-A, but in parallel with IL-2 bioactivity, proliferation following PMA+ION was preserved. After treatment the T cell defective responsiveness was reversed, in terms of proliferation and IL-2/TCGF bioactivity in response to Con-A (Figure 3).

Reduced Th-1 and Th-2 cytokine levels were seen in PCM-A in response to Con-A and PB antigen, but not to PMA+ION

Four patients (two untreated, UN; and two post-treatment, TR) were submitted to simultaneous analysis for Th1- and Th2-cytokines, for determination of the cytokine levels in culture supernatants. Reduced levels of cytokines were seen in the cultures of the untreated patients, for gp43 and Con-A. The results show an inhibition of the production of Th1- (IL-2, IFN- γ) and Th2-cytokines (IL-4, IL-5; Table 2). IL-10 levels were similar in untreated and post-treatment patients.

DISCUSSION

The infection by *P. brasiliensis* (*Pb*) and the evolution of this infection to the chronic form of PCM are limited by several preconditions. The infectious agent, and as a consequence the disease, are present only in Latin America. There is no evidence of person to person transmission, but only infection as a consequence of exposition to environmental *Pb*. The differentiation of *Pb* to its infectious form does not occur in the presence of female hormones, almost limiting PCM-A to male individuals [12]. The vast majority of the exposed individuals do not evolve to clinical disease.

There are aspects linked to the pathogen and to the host which can affect the evolution of *Pb* infection to disease. Three different phylogenetic species of *Pb* presenting differences in virulence and expression of antigenic proteins have been characterized and two of them can be distinguished by microsatellite analysis. [26]. Very frequently patients presenting PCM are heavy smokers, alcoholic and undernourished (Table 1). These three conditions precede clinical disease, and are associated to systemic as well as localized defects of immune function [15, 27-30].

Interestingly enough, smoking and alcohol consumption compromise functions of the alveolar macrophages and dendritic cells, affecting the level of expression of toll-like receptors (TLR) molecules and their function. The effect is selective for some TLR (TLR-2, TLR-4). In consequence, the expression of the genes and release of inflammatory cytokines is reduced (IL-6, IL-12, TNF- α), but the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1 receptor antagonist are not affected. The functional changes induced by smoking were restricted to the respiratory system. The simultaneous evaluation of alveolar macrophages and blood monocytes did not detect differences between smokers and non-smokers in the blood [31]. The targeting of the respiratory system by smoking and alcoholism may be an

important element in the pathogenesis of PCM. The relatively frequent association of pulmonary tuberculosis and PCM-A may be a consequence of these immunocompromising conditions [32].

Dendritic cells (DC) are a fundamental link between innate and acquired immunity. Different TLR are triggered according to the nature of the pathogen interacting with a DC, and, as consequence, different groups of genes are expressed in the DC, leading to a pathogen-specific DC functional profile [33]. DCs are initially immature cells negative or with reduced expression of MHC and costimulatory molecules. The contact of immature DCs with pathogens induces maturation of these cells, a necessary step for surface expression of the molecules required for antigen presentation and production of cytokines such as IL-6, IL-12, IL-1 β [34]. Antigen presentation by immature DCs fails to deliver strong activation signals, or the cytokines required for T cell differentiation, and induces tolerance or anergy instead of immunity. In the course of some systemic mycoses, molecules derived from the pathogen can regulate the host response, inhibiting IL-12 production by dendritic cells, an important requirement for the induction of the Th-1 pattern of differentiation for T cells [6], and control of the fungal infection.

The maturation of murine bone marrow-derived CD_s induced by LPS is inhibited by Pb or gp43, a Pb protein present in large amounts during PCM. This inhibition affects MHC and B7 expression [35]. If it happens *in vivo*, during human infections, priming of T cells and their programming for differentiation can be compromised. It is conceivable that the resulting T cell anergy or tolerance will be more pronounced as the fungal load and time of exposure of the immune system to the fungus increase. And the removal of Pb by treatment would be expected to reverse the T cell hyporesponsiveness observed in the untreated individuals. Anergy or tolerance can provide the functional profile observed in our untreated patients, with unresponsiveness to antigen and ConA, but proliferative

response and IL2/TCGF production in cultures stimulated with PMA+ION [36]. The effects of *Pb* and gp43 on T cell stimulation by DCs could be initially restricted to the response to *Pb*, but DCs with immature phenotype would also tolerize T cells specific for other antigens.

These defects of immune response defects may affect effector function and facilitate the evolution of latent infections to disease. The very low incidence of PCM suggests that besides smoking, malnutrition, alcoholism and some genetic profiles could be associated to the pathogenesis of PCM-A.

A murine experimental model for PCM reproduces several basic aspects of the human disease. There are susceptible and resistant mouse strains, supporting the hypothesis of a genetic component in the pathogenesis of the disease [37]. The disease can be induced by intratracheal inoculation, reproducing basic aspects of the human disease such as Th1 pattern of response and low antibody levels in resistant mice, and the opposite situation in the susceptible mice [38]. The cutaneous anergy seen in the human disease can also be observed in the murine model for paracoccidiodomycosis. Interestingly enough, a previous subcutaneous infection with *Pb* protects the susceptible B10.A mouse strain, and reverses the cutaneous anergy. The protected mouse is able to mount an immune response against *Pb* that includes production of IFN- γ and IL-12 [39].

A recent review of the concept of primary immunodeficiency suggests that genotypes causing immunodeficiency are more common in humans than previously assumed [40].

Taken together these observations allow the following model for the pathogenesis of PCM: the combination of genetic background, alcoholism, smoking and malnutrition induces an immune deficiency, more pronounced in the respiratory system because of the

targeting of this area in smokers. Genetic variations of the pathogen are also an element to be taken into consideration [26].

The reversal of the T cell functional impairment seen with treatment suggests, as previously pointed, that the T cell function impairment observed in our patients is at least partially secondary to the disease onset, and may represent an adaptation of the host to the persistent inflammatory stimulation by this infectious agent, and/or the inhibitory effects of components of the pathogen in immune/inflammatory response [6].

Previous observations linked the hyporesponsiveness of T cells in PCM-A to the action of IL-10 [20]. The number of individuals tested for IL-10 in this investigation was small, but PBLs of PCM patients evaluated for IL-10 levels in cultures stimulated with a *Pb* antigen or mitogens did not show reduction in IL-10 levels in association to the post-treatment reversal of T cell hyporesponsiveness.

The reversal of the T lymphocyte functional impairment after the treatment suggests as a possible explanation for this T cell hyporesponsiveness, the action of a *Pb*-derived signal/molecule inducing a reversible inhibition of T cell responsiveness to antigen or co-stimulation-dependent mitogen (Con-A). The reversal of cutaneous anergy and susceptibility to *Pb* in the murine model raises the possibility of modification of the susceptible status in the human infection, by vaccination. Further investigation on the roles of smoking, alcoholism and malnutrition in the pathogenesis of PCM-A may provide more tools for controlling this severe and frequently lethal disease.

Acknowledgments: This work was supported by the Oswaldo Cruz Foundation - PAPES grant 250.250.331 and the Brazilian Council for Scientific Development - CNPq grant 469502/00-2.

REFERENCES

- 1 Restrepo A, Robledo MV, Ospino SC, Restrepo MI, Correa AL. *Distribution of Paracoccidioidin Sensitivity in Colombia*. Am J Trop Med Hyg. 1968 January;17:25-37.
- 2 Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ *et al*. *Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region*. Am J Trop Med Hyg. 1999 Sep;61:390-4.
- 3 Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Ratón: CRC Press 1994:109-20.
- 4 Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. *The habitat of Paracoccidioides brasiliensis: how far from solving the riddle?* Med Mycol. 2001 Jun;39:233-41.
- 5 McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A. *In search of the natural habitat of Paracoccidioides brasiliensis*. Arch Med Res. 1995;26:305-6.
- 6 Romani L. *Immunity to fungal infections*. Nat Rev Immunol. 2004 Jan;4:1-23.
- 7 Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. *[Guidelines in paracoccidioidomycosis]*. Rev Soc Bras Med Trop. 2006 May-Jun;39:297-310.
- 8 Musatti C, Rezkallah MT, Mendes E, Mendes NF. *In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis*. Cellular Immunology. 1976;24:365-78.
- 9 Mok PW, Greer DL. *Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis*. Clin Exp Immunol. 1977 Apr;28:89-98.
- 10 Pickard C, Smith AM, Cooper H *et al*. *Investigation of Mechanisms Underlying the T-Cell Response to the Hapten 2,4-Dinitrochlorobenzene*. J Invest Dermatol. 2006;127:630-7.
- 11 Rocken M, Urban J, Shevach EM. *Antigen-specific activation, tolerization, and reactivation of the interleukin 4 pathway in vivo*. J Exp Med. 1994 Jun 1;179:1885-93.
- 12 Benard G, Franco M. Paracoccidioidomycosis. In: William G, Roderick J, eds. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Medical Mycology* 10 ed. London: Hodder Arnold 2005:541-59.
- 13 Conzen SD, Janeway CA. *Defective antigen presentation in chronically protein-deprived mice*. Immunology. 1988 Apr;63:683-9.
- 14 Niiya T, Akbar SM, Yoshida O *et al*. *Impaired dendritic cell function resulting from chronic undernutrition disrupts the antigen-specific immune response in mice*. J Nutr. 2007 Mar;137:671-5.

- 15 Waltenbaugh C, Vasquez K, Peterson JD. *Alcohol consumption alters antigen-specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair*. Alcohol Clin Exp Res. 1998 Aug;22:220S-3S.
- 16 Neva FA, Filho JO, Gam AA *et al*. *Interferon-gamma and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human T lymphotropic virus type I and Strongyloides stercoralis*. J Infect Dis. 1998 Dec;178:1856-9.
- 17 de Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes Dde M, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. *Frequency of Strongyloides stercoralis infection in alcoholics*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002 Jan;97:119-21.
- 18 Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF *et al*. *Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients*. Microbiol Immunol. 1991;35:167-74.
- 19 Tapia FJ, Goihman-Yahr M, Caceres-Dittmar G *et al*. *Leukocyte immunophenotypes in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis*. Histol Histopathol. 1991;6:395-402.
- 20 Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. *Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis*. Cytokine. 2001 Feb 21;13:248-52.
- 21 Peracoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA *et al*. *Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis*. Microbes Infect. 2003 Apr;5:413-8.
- 22 Karhawi AS, Colombo AL, Salomao R. *Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission*. Med Mycol. 2000 Jun;38:225-9.
- 23 Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. *The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects*. Clin Immunol. 2005 Jan;114:86-94.
- 24 Pereira GM, Miller JF, Shevach EM. *Mechanism of action of cyclosporine A in vivo. II. T cell priming in vivo to alloantigen can be mediated by an IL-2-independent cyclosporine A-resistant pathway*. J Immunol. 1990 Mar 15;144:2109-16.
- 25 Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ *et al*. *Identification of specific proteins and peptides in mycobacterium leprae suitable for the selective diagnosis of leprosy*. J Immunol. 2005 Dec 15;175:7930-8.
- 26 Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM *et al*. *Microsatellite analysis of three phylogenetic species of Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 2006 Jun;44:2153-7.

- 27 McCue JM, Link KL, Eaton SS, Freed BM. *Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation*. J Immunol. 2000 Dec 15;165:6771-5.
- 28 Schaible UE, Kaufmann SH. *Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts*. PLoS Med. 2007 May;4:e115.
- 29 Aloman C, Gehring S, Wintermeyer P, Kuzushita N, Wands JR. *Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction*. Gastroenterology. 2007 Feb;132:698-708.
- 30 Joshi PC, Applewhite L, Ritzenthaler JD *et al*. *Chronic ethanol ingestion in rats decreases granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression and downstream signaling in the alveolar macrophage*. J Immunol. 2005 Nov 15;175:6837-45.
- 31 Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE. *Tobacco Smoking Inhibits Expression of Proinflammatory Cytokines and Activation of IL-1R-Associated Kinase, p38, and NF- κ B in Alveolar Macrophages Stimulated with TLR2 and TLR4 Agonists*. J Immunol. 2007 Nov 1;179:6097-106.
- 32 Quagliato Júnior R, Grangeia TdAG, Massucio RAdC, De Capitani EM, Rezende SdM, Balthazar AB. *Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: reality and misdiagnosis*. J Bras Pneumol 2007;33:295-300.
- 33 Huang Q, Liu D, Majewski P *et al*. *The Plasticity of Dendritic Cell Responses to Pathogens and Their Components*. Science. 2001 October 26, 2001;294:870-5.
- 34 Lutz MB, Schuler G. *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol. 2002 Sep;23:445-9.
- 35 Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. *Down-regulation of dendritic cell activation induced by Paracoccidioides brasiliensis*. Immunol Lett. 2004 Jun 15;94:107-14.
- 36 Schwartz RH. *T cell anergy*. Annu Rev Immunol. 2003;21:305-34.
- 37 Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. *Susceptibility and resistance of inbred mice to Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol. 1985 Oct;66:585-94.
- 38 Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. *Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns*. Infect Immun. 1995 May;63:1777-83.
- 39 Arruda C, Vaz CA, Calich VL. *Aseptic cure of pulmonary paracoccidioidomycosis can be achieved after a previous subcutaneous immunization of susceptible but not resistant mice*. Microbes Infect. 2007 May;9:704-13.

40 Casanova JL, Abel L. *Primary immunodeficiencies: a field in its infancy*. Science. 2007 Aug 3;317:617-9.

For Peer Review

Table 1 Presence of conditions frequently observed in PCM patients and potentially related to impairment of the immune response

Patient s	Strongyloidiasis	Smoking habit	Alcohol intake	<i>Protein- energy Malnutrition</i>
Pat 1	No	Heavy	Heavy	No
Pat 2	No	Heavy	Moderate	Yes
Pat 3	No	Heavy	Heavy	Yes
Pat 4	Yes	Heavy	Moderate	No
Pat 5	No	Heavy	Heavy	No
Pat 6	No	Heavy	Heavy	Yes
Pat 7	Yes	Heavy	Heavy	No
Pat 8	Yes	Heavy	Moderate	No
Pat 9	Yes	Heavy	Moderate	Yes
Pat 10	Yes	Heavy	Moderate	No
Pat 11	Yes	Heavy	Heavy	Yes
Pat 12	Yes	Heavy	Light	Yes
Pat 13	Yes	Heavy	Heavy	Yes
Pat 14	No	Heavy	Moderate	No
Pat 15	No	Heavy	Light	Yes
Pat 16	Yes	Heavy	Moderate	Yes
Pat 17	Yes	Moderate	Moderate	Yes
Pat 18	No	Heavy	Heavy	No
Pat 19	No	Heavy	Heavy	Yes
Pat 20	No	Heavy	Heavy	Yes

Table 2 Cytokine levels in response to antigen-specific and polyclonal stimuli, before and after treatment for PCM

IFN- γ							
Individuals	UNS	CON-A	PMA+ION	SEB	UNS	GP43	PPD
P11 (UN)	0	ND	>2500	1570	34	0	900
P3 (UN)	0	71	>2500	189	0	0	45
P9 (TR)	28	253	>2500	ND	33	85	379
P8 (TR)	29	>2500	>2500	>2500	83	1483	1866

TNF- α							
Individuals	UNS	CON-A	PMA+ION	SEB	UNS	GP43	PPD
P11 (UN)	ND	ND	1187	>2500	171	313	686
P3 (UN)	1200	1968	764	1137	114	260	275
P9 (TR)	>2500	>2500	>2500	ND	571	640	772
P8 (TR)	1639	1905	>2500	>2500	93	396	201

IL-2							
Individuals	UNS	CON-A	PMA+ION	SEB	UNS	GP43	PPD
P11 (UN)	0	ND	1961	412	0	0	0
P3 (UN)	0	0	1853	65	0	0	0
P9 (TR)	0	24	1853	ND	0	0	0
P8 (TR)	0	710	>2500	944	0	0	0

IL-4							
Individuals	UNS	CON-A	PMA+ION	SEB	UNS	GP43	PPD
P11 (UN)	0	ND	0	0	0	0	0
P3 (UN)	0	0	35	0	0	0	0
P9 (TR)	0	0	77	ND	0	0	0
P8 (TR)	0	29	20	24	0	0	0

IL-5							
Individuals	UNS	CON-A	PMA+ION	SEB	UNS	GP43	PPD
P11 (UN)	0	ND	104	0	0	0	0
P3 (UN)	0	0	152	0	0	0	0
P9 (TR)	0	0	129	ND	0	0	0
P8 (TR)	0	49	50	23	0	0	0

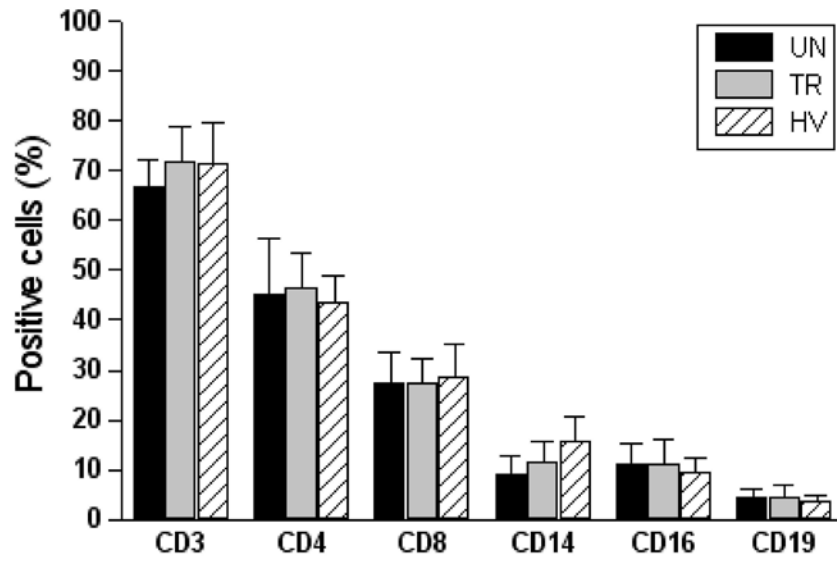
IL-10							
Individuals	UNS	CON-A	PMA+ION	SEB	UNS	GP43	PPD
P11 (UN)	32	ND	0	28	0	0	0
P3 (UN)	37	49	0	55	0	0	0
P9 (TR)	0	0	0	ND	0	0	0
P8 (TR)	0	39	0	49	0	0	0

Supernatants of PBL cultures from 4 patients (2 UN, untreated and 2 TR, post-treatment) were stimulated for 3 days with Con-A (1 μ g/ml), SEB (1 μ g/ml), PMA+ION (10ng/ml and 1 μ g/ml respectively) and 5 days with gp43 (10 μ g/ml) or PPD (20 μ g/ml). The assessment of the cytokine levels in the supernatants was done by flow cytometry, using the Cytometric Bead Array (CBA) kit. The BD CBA analysis software was used for quantification of cytokines. The cytokine levels are expressed in pg/mL (UNS=unstimulated; ND=not done).

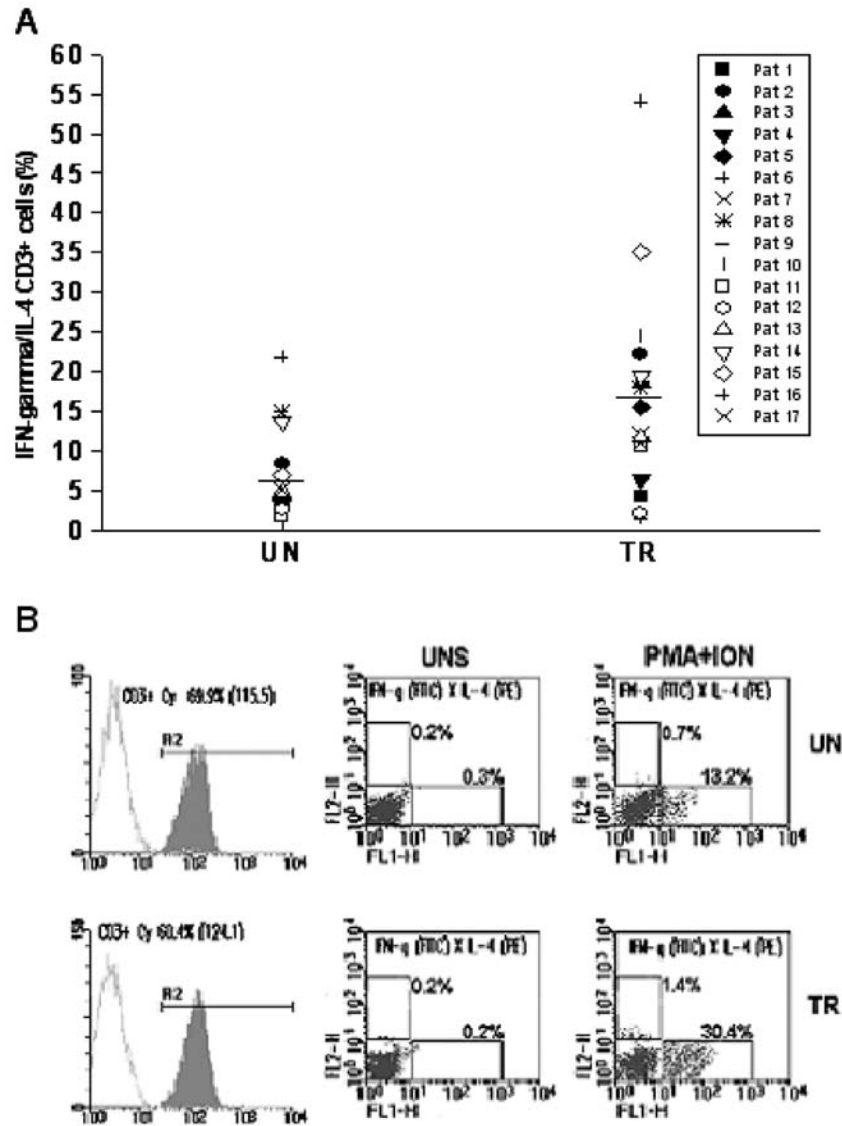
Figure 1 Evaluation of blood leukocyte subsets in PCM patients and healthy volunteers. PBL from untreated (UN) and post-treatment (TR) patients (n=18), as well as from healthy volunteers (HV, n=10) were stained with monoclonal antibodies specific for the different PBL subsets and analyzed by flow cytometry. Each bar represents the mean value for the frequency of cells in a given leukocyte subset and the standard error is drawn for each mean shown.

Figure 2 IFN- γ /IL-4 producing T cells ratio increased following treatment for PCM. (A) The IFN- γ /IL-4 producing T cells ratio is shown for 17 untreated (UN) and post-treated (TR) patients. Value for each patient is represented by a different numbers (Pat1, Pat2, ...). The horizontal thick lines correspond to the mean values for the two groups (p=0.07; ANOVA). (B) The experiment shown is representative of the PBLs from one patient before (*top*, UN) and after treatment (*bottom*, TR).

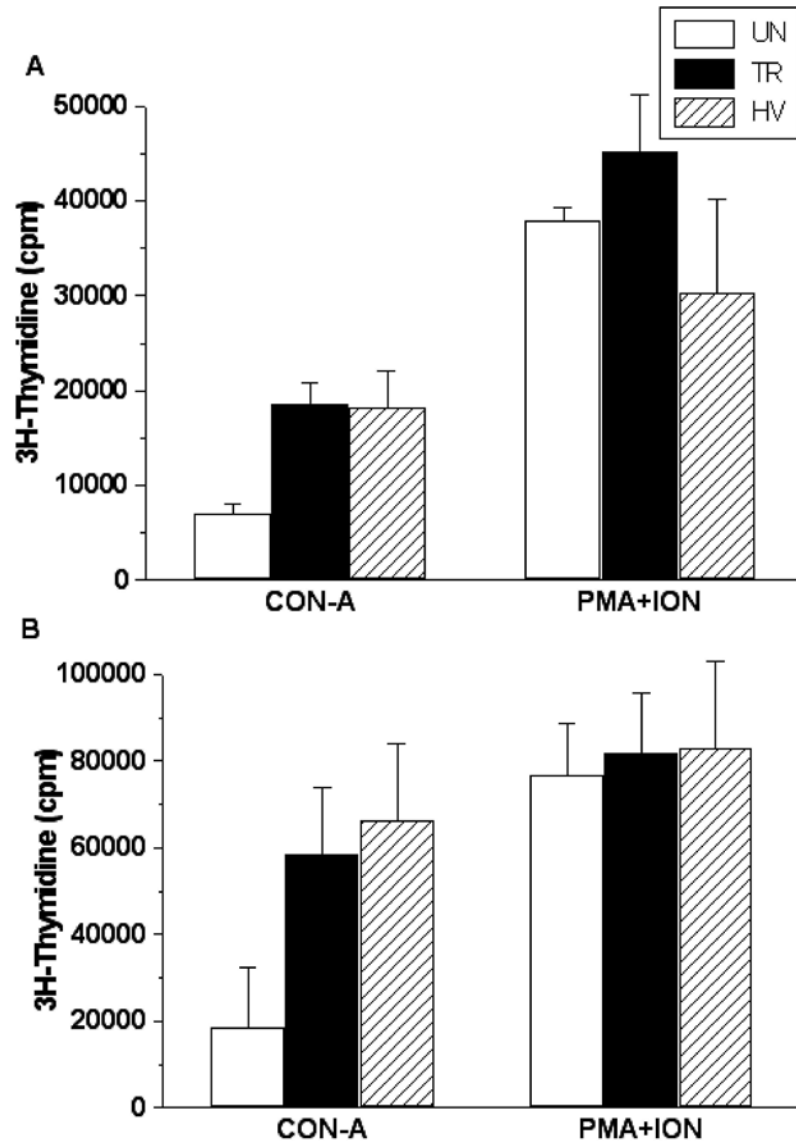
Figure 3 IL-2/TCGF bioactivity and proliferation in response to stimulation by Con-A is impaired in untreated patients. (A) For the IL-2/TCGF evaluation PBL were stimulated with Con-A and PMA+ION. The IL-2 bioactivity in the supernatants was assessed in the CTLL-2 bioassay and was expressed as cpm. (B) For the proliferative assay PBL were stimulated as previously described and the proliferative response was expressed as cpm. In both figures, the bars correspond to the mean values for the groups of untreated (UN), post-treated (TR) patients (n=18), and healthy volunteers (HV; n=10). The standard errors bars are shown for each group (p<0.05).



170x131mm (600 x 600 DPI)



167x212mm (600 x 600 DPI)



171x251mm (600 x 600 DPI)

DISCUSSÃO

Doenças infecciosas crônicas com diferentes padrões de resposta imune associados a variações nas formas de apresentação clínica.

O entendimento sobre a participação dos mecanismos determinantes de alterações funcionais no padrão de resposta imune celular cresceu significativamente nas últimas três décadas, particularmente com: i) a descoberta de diversas citocinas, ii) a caracterização de diferentes subpopulações de linfócitos T de memória, iniciando-se pelos linfócitos Th1 e Th2 e, mais recentemente, iii) o grande avanço no conhecimento da biologia das células dendríticas (DCs). Esses achados estimulam ainda mais os estudos sobre a fisiopatologia dos processos infecciosos, principalmente de doenças como a hanseníase e a paracoccidiodomicose, nas quais diferentes padrões de resposta imune estão associados a variações nas formas de apresentação clínica.

A patogênese de uma rara manifestação reacional da hanseníase em pacientes lepromatosos polares está associada com resposta *M. leprae*-específica.

No primeiro estudo, descrevemos a ocorrência de um raro episódio reacional clinicamente similar à reação tipo II, observado em três pacientes lepromatosos polares. Ao contrário do ENL clássico, os pacientes apresentavam lesões cutâneas superficiais, bolhosas e ulcerativas, acompanhadas de severas manifestações sistêmicas de resposta inflamatória aguda, como febre e edema. Além disso, a elevada carga de *M. leprae* no endotélio capilar da pele e a marcada congestão dos vasos sanguíneos superficiais são estranhas ao ENL e também não correspondem à descrição de ENL necrótico (Ramesh et al., 1992; Lockwood, 1996). A apresentação das lesões, assim como a presença de bacilos na parede de vasos, sugere que esses microorganismos participem na ativação leucocitária intravascular observada nesses pacientes.

Esses dados se assemelham a observações anteriores de outra forma reacional rara de hanseníase, o Fenômeno de Lúcio. Contudo, em pacientes com essa forma reacional, as lesões são violáceas e com aspecto isquêmico, possivelmente devido à vasculite. Além disso, em pacientes com essa reação, o

tratamento somente é eficaz pelo uso de corticosteróides, como afirmado por vários autores (Rea e Ridley, 1979; Souza et al., 2000; Rea e Jerskey, 2005; Sehgal, 2005).

Análise imunohistoquímica das lesões mostrou predominância de linfócitos T CD4+ e de células HLA-DR+ nos infiltrados da derme, observação comparável à exacerbação de resposta imune em estados reacionais como anteriormente observada na RR e no ENL clássico (Verhagen et al., 1997; Mahaisavariya et al., 1999). Já foi proposto que deposição tecidual de imunocomplexos seja o elemento desencadeador das lesões inflamatórias nos estados reacionais (Piepkorn et al., 1983; Ramanathan et al., 1991; Sehgal, 2005). Porém, como não observamos depósitos de imunoglobulinas ou fatores de complemento por imunofluorescência, essa hipótese não foi corroborada.

Em nosso estudo, foi digna de nota a frequência aumentada de linfócitos T $\gamma\delta$ + nas lesões, concomitantemente ao seu desaparecimento do sangue periférico. As células $\gamma\delta$ + só foram detectadas no sangue após o início do tratamento específico da reação. Uma possibilidade é que essas células tenham migrado para as lesões cutâneas.

O processo de *homing* de linfócitos $\gamma\delta$ + para a pele é bastante seletivo e regulado, em parte, pela interação de receptores específicos expressos na membrana dos linfócitos, com moléculas de adesão expressas em células endoteliais dos vasos sanguíneos (Sullivan et al., 1991). Modlin e colaboradores observaram que os linfócitos T $\gamma\delta$ + migram em grande número para a epiderme de pacientes com a forma tuberculóide da hanseníase no sítio da injeção da lepromina, e estão presentes na fase inicial de lesões inflamatórias induzidas pelo *M. leprae* (Modlin et al., 1989). Nossa observação acerca da elevação na frequência dessas células nas lesões agudas sugere um aspecto semelhante também quanto à cronologia da lesão.

O número reduzido de linfócitos T CD8+ e monócitos observado no sangue no início da reação elevou-se progressivamente com o tratamento anti-inflamatório. A redução da frequência de subpopulações leucocitárias detectada por citofluorimetria de fluxo (CD8+, CD14+ e linfócitos T $\gamma\delta$ +) pode ser

explicada pela adesão dessas células ao endotélio vascular, como anteriormente descrito (Sullivan et al., 1991; Beekhuizen e van Furth, 1993; Battistini et al., 2003). Porém, não é possível excluir formalmente uma modulação negativa das moléculas expressas nas membranas celulares, que deveriam ser reconhecidas pelos anticorpos monoclonais específicos; ou ainda, modificações conformacionais nos antígenos de membrana, seguindo-se à ativação das células em questão. Qualquer dessas hipóteses tornaria os receptores inacessíveis aos anticorpos monoclonais utilizados para a identificação das células.

No tocante ao tratamento, dois dos pacientes responderam satisfatoriamente à talidomida, com total regressão dos sintomas e lesões cutâneas. Entretanto, foi necessário acrescentar prednisona a um dos pacientes¹ no segundo dia após o início da terapêutica com talidomida. Um dado curioso foi a verificação nesse paciente, em particular, dos níveis séricos mais elevados de IL-6 no momento do diagnóstico da reação. Também chamou a atenção o fato de que os níveis de TNF- α só diminuíram expressivamente no terceiro dia da terapêutica anti-inflamatória. Acrescente-se a isso a observação de que, nesse indivíduo, as lesões cicatrizaram mais tardiamente, apesar do desaparecimento da febre e do edema nos membros inferiores alguns dias após o início do tratamento. Essas observações sugerem que a associação da talidomida com a prednisona foi necessária para inibir o processo inflamatório, que nesse paciente poderia ser mais intenso ou envolver mecanismos resistentes à ação da talidomida. A resposta de nossos pacientes à terapia com talidomida com ou sem prednisona, com melhoria clínica e cura das lesões sem a administração de antibióticos, leva à conclusão de que nenhuma infecção secundária foi responsável pelos sintomas acima mencionados.

Nossas observações foram compatíveis com um quadro de ativação leucocitária intravascular, com produção de IL-6 e TNF- α , associado à emergência de resposta imune celular *in vitro* ao *M. leprae*. Curiosamente, não detectamos produção de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura frente ao *M. leprae*

¹ Paciente identificado como Pat. 2 tanto no manuscrito aceito para publicação, quanto nos resultados suplementares ao manuscrito.

antes, durante e após o tratamento do episódio reacional nos pacientes estudados. Nas mesmas condições, sob estímulo de PPD, a produção de IFN- γ foi verificada em todos os pacientes.

Com relação à IL-6, citocina produzida por fagócitos mononucleares ativadas, já foi mostrado que tem importante papel co-estimulador, induzindo a síntese de outras proteínas de fase aguda em hepatócitos e estimulando a ativação e proliferação de queratinócitos (Hirano e Kishimoto, 1992; Hurst et al., 2001). Em pacientes com a forma clássica do ENL foram observados níveis séricos aumentados de IL-6 (Moreira et al., 1993). Em dois de nossos pacientes, essas taxas foram ainda mais elevadas. Torna-se assim possível que a produção *in vivo* de IL-6 tenha contribuído para a maior expressão das moléculas do MHC e para a resposta antígeno-específica observada nos pacientes estudados. A diminuição dos níveis séricos dessa citocina após tratamento anti-inflamatório e regressão das lesões inflamatórias indica que ela tenha participado no desencadear do processo reacional. Porém, sua atividade anti-inflamatória não pode ser descartada (Scheller e Rose-John, 2006).

Os resultados sugerem ainda que o TNF- α desempenhou papel fundamental na gênese dessas lesões. A redução progressiva dessa citocina pelo tratamento com talidomida e conseqüente melhora das lesões corrobora essa hipótese. Sarno e colaboradores foram os primeiros a associar a elevação de concentrações séricas de TNF- α com as reações, especialmente nos casos de ENL. Estudos posteriores demonstraram que a talidomida inibe seletivamente a produção de TNF- α pela redução da meia-vida de seu mRNA (Sarno et al., 1991; Sampaio et al., 1991; 1993; Moreira et al., 1993).

O TNF- α é um mediador chave com efeitos tóxicos bastante conhecidos. Anticorpos anti-TNF- α levam à redução da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas em modelo experimental de choque séptico (Beutler, 1999). Ainda em modelo murino, choque séptico induzido com injeções de LPS foi bloqueado pelo uso de droga análoga à talidomida (Moreira et al., 1997). Em patologias como malária cerebral, esclerose múltipla e doença de Crohn, entre outras, a

terapêutica anti-inflamatória induz a redução dos níveis de TNF- α e suprime os efeitos clínicos dessa citocina (van Hensbroek et al., 1996; Lin et al., 2007).

Curiosamente, a detecção da resposta *in vitro* ao *M. leprae* ocorreu somente após o início do tratamento específico, quando os linfócitos T $\gamma\delta^+$ passaram a ser detectados no sangue. Considerando que a resposta a PHA foi observada durante todo o tratamento para a reação, pode-se concluir que a inibição da ativação do linfócito T não é consequência do uso de drogas anti-inflamatórias. Conforme esperado, a resposta ao PPD foi verificada durante todo o período reacional, vez que a falta de imunidade em pacientes LL é patógeno-específica.

De acordo com esses resultados, podemos sugerir que as células que proliferaram frente ao *M. leprae* eram preferencialmente $\gamma\delta^+$, possivelmente ativadas por componentes micobacterianos. Já foi demonstrado que sinalização por meio de moléculas co-estimuladoras em culturas de pacientes com a forma tuberculóide de hanseníase e contatos sadios positivos ao teste da lepromina, estimula a proliferação de células $\gamma\delta^+$ na presença da glicoproteína de 30Kd de *M. tuberculosis* (Gonzalez-Amaro et al., 2000). Relatos sobre infecção de fagócitos mononucleares por *M. tuberculosis* e por BCG vivo atestaram a participação de linfócitos T $\gamma\delta^+$ nas áreas necróticas da linfadenite tuberculóide. TNF- α , mas não IFN- γ , figura como o principal mediador dessas células, assim como na regulação negativa do processo inflamatório (Lang et al., 1995; Hedges et al., 2005).

É possível que esses três pacientes apresentassem alguma alteração genética ligada à patogênese de uma forma reacional tão rara. Uma imunodeficiência associada a infecções respiratórias bacterianas crônicas e ulceração da pele com necrose e vasculite foi observada em um pequeno número de pacientes. Esses indivíduos apresentavam ausência quase completa de moléculas de superfície do MHC I, apesar da demonstração de níveis normais do mRNA de MHC I. Além disso, eles apresentavam mutações nos genes *TAP1* ou *TAP2*, que codificam as duas sub unidades do transportador de peptídeos, e não tinham linfócitos T CD8 $^+$ circulantes. Contudo, foi verificado um

enriquecimento na subpopulação de células $\gamma\delta^+$ e, de forma surpreendente, a imunidade a infecções virais estava preservada (Gadola et al., 2000; Crespi et al., 2003).

Além de possíveis mecanismos genéticos, uma modulação funcional característica, desencadeada principalmente pelos componentes do *M. leprae* poderia determinar o tipo e a intensidade da reação. Essa modulação pode ser consequência da ativação de apoptose e/ou da anergia. Apesar de tratar-se de um fenômeno raramente observado, Moraes e colaboradores descreveram a presença de RR e ENL em um mesmo paciente. Os autores encontraram granuloma epitelióide enriquecido de linfócitos T $\gamma\delta^+$ na lesão de RR. Por meio de RT-PCR, os autores mostraram mRNAs de IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12, independentemente do tipo da lesão biopsiada (Moraes et al., 2001). Os pacientes por nós estudados não apresentavam granulomas, apesar do grande número de células CD4⁺ e $\gamma\delta^+$ nas lesões. Apesar da elevação sistêmica de TNF- α , a ausência de IFN- γ pode explicar esse fato, pois as duas citocinas atuam em sinergia na indução e maturação de granulomas (Saunders e Cooper, 2000).

Os mecanismos imunopatológicos envolvidos nos episódios reacionais da hanseníase continuam pouco conhecidos. A forma rara detectada nos pacientes incluídos nesse estudo torna a investigação ainda mais difícil, principalmente nos aspectos que exigiriam análise em grupos maiores de pacientes. Entretanto, assim como nas outras reações, a ativação de subpopulações específicas no microambiente cutâneo e os níveis de citocinas pró-inflamatórias observados nesses pacientes são consistentes com o quadro sistêmico e com as numerosas e graves lesões inflamatórias apresentadas. A exacerbação do quadro inflamatório com aumento da secreção de TNF- α , IL-1 e IL-6 contribuem para a severidade das lesões teciduais.

Outras células também podem ser associadas ao desencadeamento e ao agravamento do episódio reacional. A presença do gene *foxp3* e de células CD4/CD25⁺ em biopsias cutâneas de pacientes com ENL aponta para uma atividade reguladora de linfócitos Treg nas lesões (Haslett et al, 2005). Não se pode excluir a participação da subpopulação de células Th17 nesses episódios. A

indução da diferenciação de Th17 ocorre pela via IL-12/IL-23 em macrófagos e DCs ativadas. A gênese de processos inflamatórios previamente atribuída aos linfócitos Th1 pode ser originada por linfócitos Th17, como já demonstrado em diferentes condições patológicas. IL-17 foi detectada em pacientes com artrite reumatóide, esclerose múltipla e na agudização de doença inflamatória intestinal, incluindo colite ulcerativa e Doença de Crohn. Neste último caso, o aumento de níveis séricos de IL-17 estava relacionado com o grau de atividade da doença (Fugino et al, 2003). Recente trabalho demonstrou a presença de Th17 em lesões de pele com psoríase e correlacionou a ativação dessas células com exacerbação da resposta imune de mucosa pela modulação negativa de mecanismos inatos em células epiteliais (Wilson et al., 2007).

Ainda dentro do contexto da interação entre células e citocinas reguladoras, um estudo recente mostrou que o TGF- β , em ausência de IL-6, desempenha papel fundamental na indução da diferenciação de células Treg (Veldhoen et al, 2006; Betteli et al, 2007). Diferentemente das observações em camundongo, em ser humano os dados mais recentes mostram que IL-23 e IL-1 β são as citocinas que criam o microambiente de diferenciação para Th17 (Wilson et al., 2007). Esses e outros resultados permitem algumas indagações, principalmente no âmbito de doenças inflamatórias crônicas, como a possibilidade de uma atuação simultânea de células Th1, Th17 e Treg. Nos episódios de agudização e/ou reativação da resposta imune celular, como nas reações da hanseníase, essas interações também devem ser consideradas.

Inúmeros trabalhos descrevendo os padrões de resposta imune celular na hanseníase indicam os pacientes lepromatosos como anérgicos, em decorrência da produção de mediadores que modulam negativamente a resposta de linfócitos T *M. leprae*-específicos (Bjune, 1979; Yamamura et al., 1991; Misra et al., 1995). De fato, pacientes lepromatosos não conseguem montar uma resposta imune celular eficiente contra o patógeno. Várias evidências apontam para isso, desde a falha na apresentação de antígenos até a ausência de produção de IL-2 e IFN- γ .

A diminuída expressão de moléculas co-estimuladoras em eventos precoces da sinalização pelas vias de cálcio/calcinerina e proteína quinase C (PKC)/p21ras, é crítica para a transcrição do gene de IL-2. Já foi demonstrado que se tais eventos não ocorrerem, estabelece-se uma situação de anergia (Schwartz, 2003). Alguns trabalhos já identificaram alterações nas vias de sinalização nos linfócitos T de pacientes lepromatosos (Nath et al., 1974; Haregewoin et al., 1983). Sharma e colaboradores mostraram que estímulo de PMA em linfócitos sanguíneos de pacientes lepromatosos não induz aumento de Ca^{++} intracelular, inositol fosfato e PKC, ao contrário do observado em pacientes tuberculóides e indivíduos sadios (Sharma et al., 1999).

Em outro trabalho, foram apontadas modificações que levavam à baixa expressão da cadeia ζ do TCR e do fator de transcrição NF- κ B em linfócitos T de pacientes lepromatosos (Zea et al., 1998). Muito recentemente foi mostrado ainda que, após estímulo do TCR, ocorre uma regulação negativa em outras vias bioquímicas de ativação do linfócito T nessa forma da hanseníase, incluindo as MAPK e NFAT (Chattree et al., 2007). Na grande maioria dos estudos, a anergia em pacientes lepromatosos é tida como resultado dessas alterações, provavelmente a partir de uma inadequada ativação das APCs.

Nesse contexto, deve ser levado em conta que o *M. leprae* não é um forte indutor da maturação de DCs, tornando-as parcialmente ativadas. Experimentos *in vitro* mostraram que somente a adição de grandes quantidades do bacilo em cultura leva as DCs a expressarem os antígenos de ativação CD83 e CD86, além de produzirem IL-10 e TNF- α (Hashimoto et al., 2002). O reconhecimento de antígenos pelos receptores TLR leva a uma ativação mais completa das DCs, que passam a expressar elevado número de moléculas de classe II do MHC e ativar mais fortemente linfócitos Th1. Krutzik e colaboradores encontraram células fortemente positivas para TLR1 e TLR2 em lesões de pele de pacientes tuberculóides. O mesmo não foi observado nas lesões de pacientes lepromatosos. Nesses últimos foi observado um polimorfismo em TLR2, associado à baixa produção de mediadores do tipo Th1 e altos níveis de IL-10 (Krutzik et al., 2003; Kang et al., 2004).

Os componentes lipídicos abundantes nas micobactérias também merecem destaque. Vários relatos indicam que essas moléculas produzem defeitos de ativação em APCs e indução de elevadas taxas de anticorpos associadas à lesão tecidual. É atribuído ao PGL-I forte papel modulador em macrófagos infectados com *M. leprae* pela indução da produção de grandes quantidades de TNF- α (Tomimori-Yamashita et al., 1999; Charlab et al., 2001). Já foi demonstrado também que lipoarabinomanana de *M. bovis* inibe a maturação de DCs pela regulação do receptor DC-SIGN. Esse receptor é envolvido com interiorização de vários patógenos, dentre os quais o *M. leprae*, e é tido como imunomodulador, pois sua interação com antígenos lipídicos induz a secreção de IL-10 e inibe ativação de DCs por LPS (Teunis et al., 2003; Soilleux et al., 2006).

Trabalho de Reed e colaboradores demonstrou que um glicolípídeo de *M. tuberculosis* suprime a ativação de macrófagos infectados e modula negativamente a produção de TNF- α e IFN- γ (Reed et al., 2004). Em conjunto, esses dados definem o papel chave da imunidade inata na ativação de linfócitos T nas micobacterioses, e associam a ela o estado anérgico dessas células. É possível que a ativação parcial das DCs mantenha o estado de tolerância periférica e seja fundamental para a homeostasia, ativando preferencialmente respostas reguladoras.

A resposta antígeno-específica em pacientes lepromatosos foi observada também por Kaplan e colaboradores. Análise *in vitro* de leucócitos sanguíneos desses indivíduos mostrou resposta proliferativa de baixo nível, em comparação com pacientes tuberculóides, e também exibiu alguma produção de IFN- γ em resposta ao *M. leprae*. No entanto, esse mesmo grupo de pacientes apresentava grande aumento em ambas as respostas quando IL-2 exógena era adicionada às culturas. Além disso, a depleção de monócitos também levava a um aumento na proliferação e na produção de IFN- γ em resposta ao *M. leprae*. Ainda nesse trabalho, um segundo grupo de pacientes lepromatosos investigado não respondeu ao antígeno em qualquer das condições mencionadas acima (Kaplan et al., 1985). Em outro trabalho, foram detectados níveis significativos de IL-4 ou

IFN- γ e, em algumas vezes, de ambos, em resposta *in vitro* ao *M. leprae* em pacientes lepromatosos (Misra et al., 1995). Essas observações mostram não só que respostas antígeno-específicas ainda que fracas são observadas em parte dos pacientes lepromatosos, bem como que respostas indetectáveis podem se tornar significativas após adição de IL-2 exógena ou remoção de monócitos.

Experiências posteriores demonstraram que monócitos humanos estimulados com *M. leprae* produzem níveis elevados de IL-10, o que sugere uma forte modulação negativa e anergia induzidas pelo patógeno. De fato, Groux e colaboradores demonstraram que linfócitos T estimulados através do TCR, na presença de IL-10, passam a apresentar um tipo de anergia no qual não proliferam e não produzem diversos mediadores, inclusive IL-2 e IFN- γ (Sieling et al., 1993; Groux et al., 1996).

Em estudo anterior, nosso grupo observou que, embora o padrão de não-resposta ao *M. leprae* tenha se confirmado no grupo de pacientes lepromatosos acompanhados em nosso ambulatório, 32% desses indivíduos apresentaram resposta proliferativa antígeno-específica com produção de IFN- γ *in vitro*, logo após o diagnóstico da hanseníase e, imediatamente antes do início do tratamento poliquimioterápico. Nas mesmas condições de cultura, todos os pacientes avaliados responderam a outros antígenos, como PPD e *C. albicans*, além de estímulo policlonal com Con-A. Foi interessante notar ainda que, ao longo de um ano do acompanhamento ambulatorial, a ocorrência de episódios reacionais foi três vezes maior entre os pacientes previamente respondedores ao *M. leprae*, quando comparados ao grupo não-respondedor. Porém, nem todos os pacientes respondedores ao *M. leprae* apresentaram reação e, ainda, parte dos pacientes que o fizeram levaram mais de seis meses até a abertura do quadro, o que não é usualmente observado (Esquenazi, Nery, Pereira, Sarno; resultados não publicados).

Além de nossos resultados, várias evidências associam a imunidade celular ao *M. leprae* com a patogênese das reações, que acometem metade dos pacientes ao longo do curso da doença (Sampaio et al., 2003; Briton e Lockwood, 2004). As reações fogem aos padrões estáticos propostos

inicialmente, e seu completo entendimento continua sendo um desafio para os imunologistas.

É sabido que situações que interferem diretamente com homeostasia do sistema imune, tais como vacinação, quimioterapia e gravidez, são fatores facilitadores dos episódios reacionais (Bjune, 1983; Meyerson, 1996). Tratamento intralesional com IL-2 e IFN- γ suscitou episódios de ENL em pacientes lepromatosos não respondedores ao *M. leprae*. Em outro estudo realizado no Laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz, Sampaio e colaboradores observaram que teste intradérmico com PPD em pacientes lepromatosos não reacionais foi seguido de ENL em cerca de 20% desses pacientes (Kaplan et al., 1989; Sampaio et al., 1992).

Em nosso estudo, observamos ainda que a detecção de resposta *in vitro* ao *M. leprae* só ocorreu após o início do tratamento específico, e em situações em que os linfócitos T $\gamma\delta+$ passaram a ser detectados no sangue. A presença de altos níveis de resposta a PHA ocorreu independentemente da situação de não-resposta específica. Assim, a ausência de resposta inicial ao *M. leprae* não decorreu de uma inibição na ativação de linfócitos T, como consequência do uso de medicação anti-inflamatória.

Inicialmente, esses resultados permitiriam sugerir que: i) os linfócitos T antígeno-específicos que proliferaram fossem $\gamma\delta+$, ii) a resposta *in vitro* ao *M. leprae* nesses pacientes dependesse basicamente de mediadores produzidos por essas células, iii) ou ainda, que um efeito sinérgico entre linfócitos T $\alpha\beta+$ e $\gamma\delta+$ tivesse ocorrido. Pode ser que as três afirmativas estejam corretas e não se excluam. Porém, o fato de que só após o início do tratamento da reação essa resposta tenha sido detectada, não reforça essas possibilidades.

Uma outra hipótese é a de que a emergência transitória de resposta ao *M. leprae* com produção de citocinas inflamatórias observada nos pacientes pode levar a uma modulação negativa nas lesões. Não sabemos se os pacientes incluídos em nosso trabalho eram anteriormente respondedores ao *M. leprae*. Entretanto, após 30 dias do episódio reacional, a resposta proliferativa ao PPD e

a PHA foi mantida, e o padrão de não-resposta ao *M. leprae* predominante em pacientes lepromatosos polares foi mais uma vez observado.

Já foi demonstrado que linfócitos T $\gamma\delta+$ reconhecem proteínas de choque térmico presentes em micobactérias, dentre as quais a hsp65 encontrada no *M. tuberculosis* e também no *M. leprae* (Rajasekar et al.,1990). Em modelo experimental de infecção por *L. monocytogenes* foi demonstrada a necessidade de sinergia entre linfócitos T $\alpha\beta+$ e $\gamma\delta+$ no processo inflamatório em camundongos *knock-out* (KO) para genes dos dois tipos de receptor de antígeno de linfócito T. Na ausência de uma das duas subpopulações em consequência da modificação gênica, os animais KO não apresentavam a formação de um granuloma típico no sítio da lesão, e ocorria exacerbação das lesões inflamatórias. Os autores sugeriram que os linfócitos T $\gamma\delta+$ exerçam uma função reguladora negativa nesse processo inflamatório (Mombaerts et al., 1993).

O conjunto de eventos imuno-inflamatórios observados nesses pacientes e discutidos em nosso trabalho indica uma resposta transitória ao *M. leprae* durante o episódio reacional com participação de linfócitos T $\gamma\delta+$, e sugere que o TNF- α desempenhe papel central na patogênese dessa rara forma reacional de hanseníase. A divulgação desses dados pode contribuir para o diagnóstico mais preciso e para a escolha do tratamento mais adequado a ser ministrado a pacientes com essa forma incomum de reação.

A resposta transitória ao *M. leprae* em pacientes reacionais: considerações sobre células e mecanismos relacionados.

Pacientes com hanseníase lepromatosa polar, como os que analisamos em nosso grupo com um quadro reacional incomum, não respondem ao *M. leprae*, especialmente se considerarmos a resposta antígeno-específica restrita por moléculas convencionais do MHC. Porém, a mobilização dos linfócitos T $\gamma\delta+$ sanguíneos no início do quadro reacional, e a resposta proliferativa transitória ao *M. leprae* observada quando do reaparecimento dessas células no sangue, sugerem fortemente a hipótese de que os linfócitos $\gamma\delta+$ (V γ 9V δ 2) sejam as células que proliferam em resposta ao *M. leprae*, e que estejam envolvidos na

geração dos altos níveis séricos de citocinas inflamatórias observados em nossos pacientes reacionais. Na figura 5 é proposto um modelo da participação dos linfócitos T $\gamma\delta+$ na imunopatologia da forma incomum de ENL em pacientes lepromatosos.

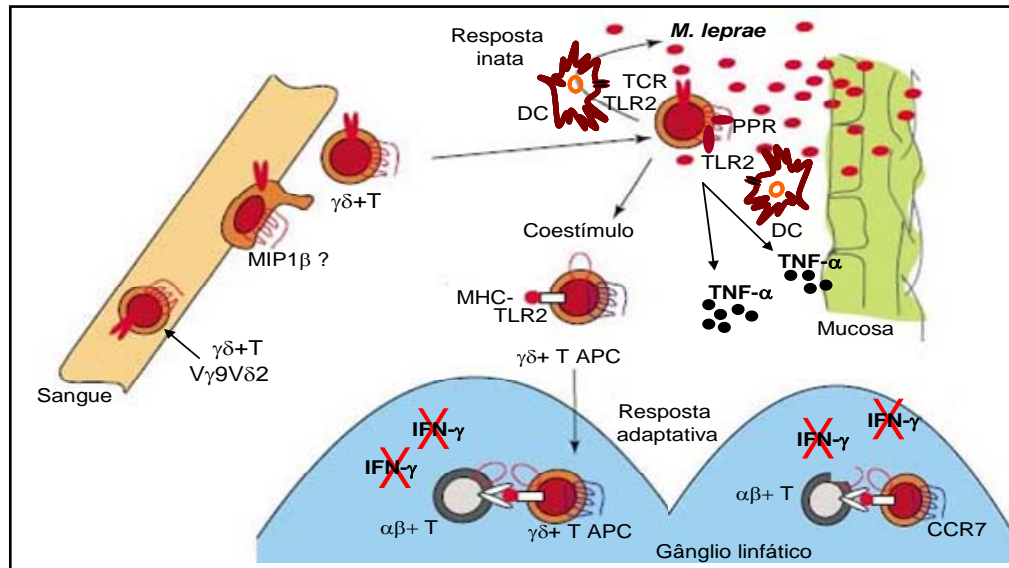


Figura 5. Modelo da participação dos linfócitos T $\gamma\delta+$ na imunopatologia da forma incomum de ENL.

Os linfócitos T $\gamma\delta+$ sanguíneos reconhecem moléculas expressas por células dendríticas e fagócitos mononucleares infectados por micobactérias, tais como *M. bovis*, BCG, *M. tuberculosis* e *M. leprae* (Shrestha et al., 2005; Lockhart et al., 2006; Martino et al., 2007). Tal reconhecimento se dá através do receptor antígeno da célula $\gamma\delta+$, e também de receptores TLR2 (Martino et al., 2007). A sinalização pelo TCR, quando simultânea com TLR2, induz a produção de IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta+$; porém, como a sinalização por TLR2 falha em pacientes lepromatosos, torna-se possível uma resposta ao *M. leprae* com a produção de citocinas inflamatórias, mas sem IFN- γ . Este modelo pode ser testado *in vitro* com células $\gamma\delta+$ e dendríticas de pacientes lepromatosos polares e de indivíduos com sinalização via TLR2 não-comprometida.

Conclusão.

As reações hansênicas merecem especial atenção, pois nelas emerge imunidade celular transitória, potencialmente responsável pelas alterações abruptas nos quadros clínicos dos pacientes. O impacto gerado pelo entendimento dos fenômenos biológicos que ocorrem na gênese desses processos pode ser grande, tanto pelo estabelecimento de marcadores imunológicos preditivos, quanto pelo potencial terapêutico na manipulação dessas respostas.

Imunodeficiência adquirida e anergia reversível pós-tratamento na forma crônica do adulto da paracoccidioidomicose.

Alguns trabalhos publicados desde os anos setenta do século passado sobre imunidade celular em pacientes com paracoccidioidomicose ora se referem à hiporresponsividade patógeno-específica, ora mostram modificações mais gerais de imunidade celular, como anergia cutânea, inclusive com negatividade do teste cutâneo com DNCB (Musatti et al., 1976; Mok e Greer, 1977). Mais recentemente, associação de padrão de resposta Th1 com resistência à doença e Th2 à susceptibilidade também foi proposta. A heterogeneidade de observações pode refletir o espectro da doença, diversidade de grupos de pacientes ou diferenças metodológicas. Para reduzir algumas possibilidades de variação, avaliamos a presença de condições que poderiam contribuir para defeitos de imunidade celular e evolução da infecção para doença. A avaliação dos pacientes antes do tratamento mostrou elevada frequência de condições (tabagismo, alcoolismo, desnutrição protéico-calórica) que, isoladamente, afetam imunidade celular sistemicamente, e combinadas podem induzir um estado de imunodeficiência. A avaliação da ativação funcional de linfócitos de sangue destes pacientes mostrou defeito de resposta a estímulo policlonal dependente de co-estímulo, reversível com tratamento. A reversibilidade da hiporresponsividade inespecífica com o tratamento sugere que um componente do patógeno seja necessário para a manutenção do estado de hiporresponsividade/anergia dos pacientes.

Doenças agudas e crônicas podem resultar de respostas imunológicas distintas. Na paracoccidioidomicose, a forma juvenil supostamente ocorre logo após a exposição ao *P. brasiliensis*, a partir da disseminação fúngica pelo sistema linfático. Já a forma crônica do adulto é considerada uma reativação de um foco latente estabilizado por longos períodos, consequência de uma resposta imune temporária contra o patógeno (Wanke e Londero, 1994). A forma crônica responde por mais de 90% dos casos, e a evolução para ela é limitada a precondições graves. A progressão é lenta e silenciosa, podendo levar anos até que seja diagnosticada. Como principal fator de risco estão as profissões ou

atividades relacionadas ao manejo do solo contaminado pelo fungo. A maioria dos pacientes é de homens em idade produtiva, tornando a doença um problema sócio-econômico.

Os pacientes incluídos em nosso estudo apresentavam a forma multifocal da paracoccidioidomicose, de grau moderado a grave, com cerca de seis meses de evolução. Os órgãos mais acometidos foram os pulmões, a mucosa oral, os gânglios linfáticos da oro-faringe, a laringe e as glândulas supra-renais. Outra característica importante do grupo estudado foi o alto índice de tabagismo e etilismo, associado a casos de desnutrição protéico-calórica que precediam o aparecimento das lesões.

Alguns estudos clínicos apontam o alcoolismo e o tabagismo como fatores de risco para a doença. Del Negro sugeriu que o tabagismo possa influenciar na recidiva de lesões pulmonares em pacientes considerados clinicamente curados (Del Negro, 1985). Quanto ao alcoolismo, estudo caso-controle demonstrou a associação entre o consumo excessivo de álcool, em especial a aguardente de cana, e a forma crônica da doença (Martinez e Moya, 1992). Mais recentemente foi feita a observação da presença constante de desnutrição entre os pacientes, independente da forma da doença (Restrepo e Benard, 2004). Porém, desperta a atenção o fato de que a grande maioria dos estudos acerca da resposta imune na paracoccidioidomicose não menciona essas condições patológicas, e não considera a influência delas sobre os resultados obtidos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o tabagismo é considerado a principal causa de morte evitável no mundo. No Brasil, 32,6% da população adulta fumam, a faixa de 20 a 49 anos de idade concentra a maioria dos fumantes, com predomínio do sexo masculino e o maior consumo está nas camadas sociais com menor poder aquisitivo, proporcionalmente maior entre os moradores da zona rural (MS, 1998). Curiosamente, esse perfil reúne as características típicas dos pacientes com a paracoccidioidomicose. Chaieb e Castellarin relataram maior prevalência de fumantes no grupo de alcoólatras quando comparado ao grupo não-alcoólatra, com tendência de os primeiros começarem a fumar mais cedo, além de o fazerem por mais tempo, consumindo

maior número de cigarros. As evidências sugerem que o alcoolismo atue como um co-fator de risco associado ao tabagismo para o desenvolvimento da doença (Chaieb e Castellarin, 1998).

As alterações funcionais de resposta imune induzidas pelo tabagismo são mais acentuadas, ou em alguns estudos restritas ao sistema respiratório. Já foi mostrado um decréscimo na relação de células CD4+/CD8+ no lavado bronco-alveolar de tabagistas crônicos, além de uma diminuição da proliferação dessas células (Costabel et al., 1986; McCue et al., 2000). O tabagismo compromete principalmente as funções dos macrófagos alveolares e das DCs, cujas alterações levam a um profundo efeito inibidor na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12. A supressão de IL-2 e IFN- γ também já foi mostrada (Ouyang et al., 2000; Hagiwara et al., 2001).

Recentemente, Chen e colaboradores demonstraram que os níveis de expressão de TLR-2 e TLR-4 são afetados pela exposição ao tabaco. Em consequência, a expressão de genes de IL-6, IL-12 e TNF- α é reduzida; porém, a de IL-10 é elevada. A avaliação simultânea de macrófagos alveolares e monócitos sangüíneos detectou diferenças entre fumantes e não-fumantes no pulmão, mas não no sangue. Os autores sugerem que a exposição crônica ao tabaco induz a um estado de hiporresponsividade similar ao modelo experimental de tolerância à endotoxina, manifestada pela inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias induzidas por TLR2/4 e uma fraca ativação de IRAK-1 e NF κ B (Chen et al., 2007). Os efeitos do tabagismo e alcoolismo sobre o sistema respiratório podem exercer uma importante influência na patogênese da doença, já que corresponde à via de entrada do patógeno no organismo e área mais importante de ocorrência das lesões da paracoccidiodomicose.

A desnutrição está associada a uma série de distúrbios sistêmicos primários, dentre os quais as infecções crônicas, associadas às alterações de resposta imune e, dependendo do patógeno, essa relação recíproca leva a um agravamento em diferentes graus. Foi demonstrado ainda que a desnutrição em conjunto com a deficiência de zinco, ativa o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) induzindo aumento nos níveis de cortisol e causando, além de atrofia

tímica, inibição da hematopoiese e modulação de respostas imuno-inflamatórias (Soliman et al., 2000; Fraker e King, 2004; Cunningham-Rundles et al., 2005). Em recente revisão sobre o tema, Schaible e Kaufmann discutem como a combinação entre desnutrição crônica e doenças infecciosas provoca o enfraquecimento generalizado da resposta imune, alterando o perfil das subpopulações leucocitárias e induzindo um aumento generalizado na produção de citocinas inflamatórias (Schaible e Kaufmann, 2007).

A associação relativamente freqüente entre tuberculose pulmonar e a paracoccidiodomicose (Valle et al. 1992; Quagleato Junior et al., 2007) pode ser uma conseqüência dessas condições imunocomprometedoras, especialmente no aparelho respiratório. Em pacientes com a forma crônica da doença, outras infecções são igualmente observadas, dentre elas, a estrogiloidíase e a ancilostomíase/necatoríase (Costa, 2000). Em nosso estudo, a metade dos pacientes apresentava teste parasitológico positivo para a estrogiloidíase no momento do diagnóstico da paracoccidiodomicose. Esse alto índice de associação já foi observado nos pacientes acompanhados no IPEC - FIOCRUZ. Na casuística apresentada por Costa, 46,5% dos pacientes com a forma crônica do adulto apresentavam a helmintíase (Costa, 2000).

Variações no patógeno são importantes para a interação patógeno-hospedeiro e evolução da infecção para doença. A virulência pode variar, dependendo das cepas isoladas do *P. brasiliensis*. Apesar de não ser um patógeno essencialmente intracelular, o fungo já foi observado no citoplasma de células epiteliais *in vivo* e *in vitro*. Experimentos com a linhagem epitelial Vero mostraram que o *P. brasiliensis* induz um rearranjo do citoesqueleto dessas células. A mesma observação foi feita com uma linhagem de pneumócitos (Mendes-Giannini et al., 2000; 2005). Com base nesse conjunto de dados pode-se supor que a participação de células epiteliais na infecção pode ser um ponto importante na transição do fungo do solo para a invasão tecidual do hospedeiro, e assim, influenciar na patogênese da paracoccidiodomicose.

Estudos de biologia molecular indicam a presença de, no mínimo, cinco diferentes grupos de cepas de *P. brasiliensis* que estão presentes em vários países

endêmicos (Niño-Vega et al., 2000). Recentemente, em trabalho realizado na Colômbia, três espécies poligênicas de *P. brasiliensis* apresentando diferentes graus de virulência e expressão de proteínas antigênicas foram caracterizadas, e duas delas distinguidas em análise por microsatélite. Ambas estão associadas com a paracoccidioidomicose-doença em seres humanos e animais, embora uma delas apresente um baixo fator de virulência (Matute et al., 2006).

Com efeito, os diferentes graus de virulência do *P. brasiliensis* podem se traduzir em diferentes formas clínicas da doença. É possível que as cepas menos virulentas estejam associadas com a forma crônica, elicitando uma resposta imune mais insidiosa e mais tolerante à multiplicação do patógeno.

A resposta imune efetiva para o controle da infecção pelo *P. brasiliensis*, assim como de outras infecções fúngicas sistêmicas, é mediada por linfócitos T, com a participação de DCs e macrófagos ativados, como demonstrado anteriormente (Newman, 1999; Ferreira et al., 2004). Na paracoccidioidomicose-infecção é observada produção elevada de IFN- γ e TNF- α , assim como proliferação de linfócitos a antígenos derivados do fungo (Oliveira et al., 2002; Benard et al., 2005).

Estudos prévios mostraram diminuição tanto na produção de IL-2 e expressão de seus receptores, quanto na resposta proliferativa *P. brasiliensis*-específica em pacientes com a paracoccidioidomicose, independente da forma clínica da doença, sendo esse quadro ainda mais reduzido na forma juvenil aguda (Benard et al., 1996). Em outro trabalho, para investigar a produção de subclasses de IgG anti-gp43, foram analisados soros de pacientes com as duas formas da doença por ELISA. Na forma juvenil houve grande predomínio de IgG4 e ausência de IgG2, compatível com um *switch* regulado por linfócitos Th2. No soro de pacientes com a forma crônica houve predomínio de IgA, provavelmente como resultado da estimulação persistente de mucosa pelo *P. brasiliensis* (Baida et al., 1999). Esses dados são similares ao modelo de candidíase experimental, no qual a doença disseminada e fatal foi relacionada a níveis extremamente elevados de IL-4. Injeção intravenosa com anticorpo neutralizante anti-IL-4 resultou na cura dos camundongos (Romani et al., 1992).

Em nosso estudo, não observamos resposta proliferativa nem atividade biológica de IL-2 em leucócitos sanguíneos estimulados com Con-A no grupo de pacientes com essa forma da doença. Como a análise fenotípica das subpopulações leucocitárias não mostrou diminuição nas frequências celulares, e considerando-se ainda que a resposta ao estímulo de PMA+ION estava preservada, nossos resultados apontam para a possibilidade da ausência de sinal co-estimulador. Enquanto o PMA (acetato de forbol-miristila) é um agente indutor da ativação celular com ação direta sobre a PKC, atuando como um potente estímulo para a transcrição gênica, a Con-A ativa as APCs que, por sua vez, induzem proliferação celular e conseqüente produção de citocinas. A utilização do ionóforo de cálcio potencializa a ação do PMA por meio da elevação dos níveis de cálcio intracelular, agindo dessa forma em diversas vias de sinalização.

Modelo para evolução da infecção pelo *P. brasiliensis* para a forma crônica do adulto da paracoccidioidomicose.

Apesar da existência de diferentes cepas de *P. brasiliensis* com variação em virulência, a pequena proporção de indivíduos infectados que evolui para a paracoccidioidomicose sugere fortemente que aspectos relacionados com o hospedeiro são fundamentais para a evolução da infecção para doença.

Em nosso grupo de pacientes, a falha na ativação funcional de linfócitos T por estímulo policlonal, aponta para um defeito de um mecanismo básico na indução de resposta imune celular. Os dados anteriores de resposta cutânea negativa ao DNCB e a outros estímulos são compatíveis com falha funcional em células apresentadoras de antígeno, inclusive as DCs. Observações em modelo experimental murino corroboram a hipótese de defeito em células apresentadoras de antígeno, inclusive DCs na desnutrição protéico-calórica (Conzen e Janeway, 1988; Niiya et al., 2007).

Da mesma forma, existem evidências de que o álcool regula negativamente a expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em macrófagos, além de comprometer a diferenciação e maturação de células dendríticas (Goral e Kovacs,

2005; Lau et al., 2006). Como o tabagismo afeta seletivamente a sinalização via TLR2 e TLR4 em macrófagos pulmonares, a associação de tabagismo às condições já mencionadas aumenta consideravelmente a probabilidade de uma resposta imune efetora eficiente, especialmente no aparelho respiratório, porta de entrada do *P. brasiliensis* e sítio de infecção latente (Chen et al., 2007).

Evidências recentes de que TLR-4 expresso em epitélio de mucosa oral desempenha papel importante em proteção contra micose reforça a probabilidade de que o conjunto de condições mencionadas induza uma falha em imunidade inata e função de DCs e outras células acessórias (Weindl et al., 2007).

O conjunto de alterações em imunidade inata e células apresentadoras de antígeno levaria a uma falha em ativação de linfócitos T virgens e de memória, inicialmente, no aparelho respiratório. Essas condições levariam a uma falha no controle de infecções latentes, como, por exemplo, pelo *P. brasiliensis*. Dados recentes indicando que o *P. brasiliensis* ou a gp 43, uma proteína produzida em grande quantidade pelo fungo, inibe a maturação de células dendríticas, fornece um mecanismo possível para a anergia cutânea e hiporresponsividade *in vitro* de linfócitos T de pacientes com a forma crônica da doença, bem como para a reversibilidade dessas alterações funcionais com o tratamento da micose (Ferreira et al., 2004). O grande número de pacientes com diagnóstico de estrogiloidíase sugere que a função de linfócitos Th2 também possa estar comprometida, tendo em vista o papel deste tipo de linfócito T de memória no controle de parasitoses intestinais.

A exposição ao *P. brasiliensis*, e a associação de alcoolismo, tabagismo e desnutrição ocorrem com uma frequência muito mais alta que os casos de paracoccidiodomicose. Além disso, em diversas doenças infecciosas e nos modelos experimentais murinos, existem genótipos associados à susceptibilidade. Polimorfismos gênicos, como os de genes de citocinas, ou TLRs são exemplos de possíveis fatores de susceptibilidade que podem completar o modelo proposto para esta forma da doença.

Conclusão.

Na paracoccidiodomicose, não se pode deixar de levar em conta a influência de fatores comuns observados na maioria dos pacientes, como o alcoolismo, o tabagismo e a desnutrição sobre os padrões de resposta imune celular ao *P. brasiliensis*. Em conjunto, ou mesmo isoladamente, essas condições patológicas são suficientes para modular a imunidade e favorecer a instalação da doença. Modelo esquemático da patogênese da forma crônica do adulto é proposto na figura 6 abaixo.

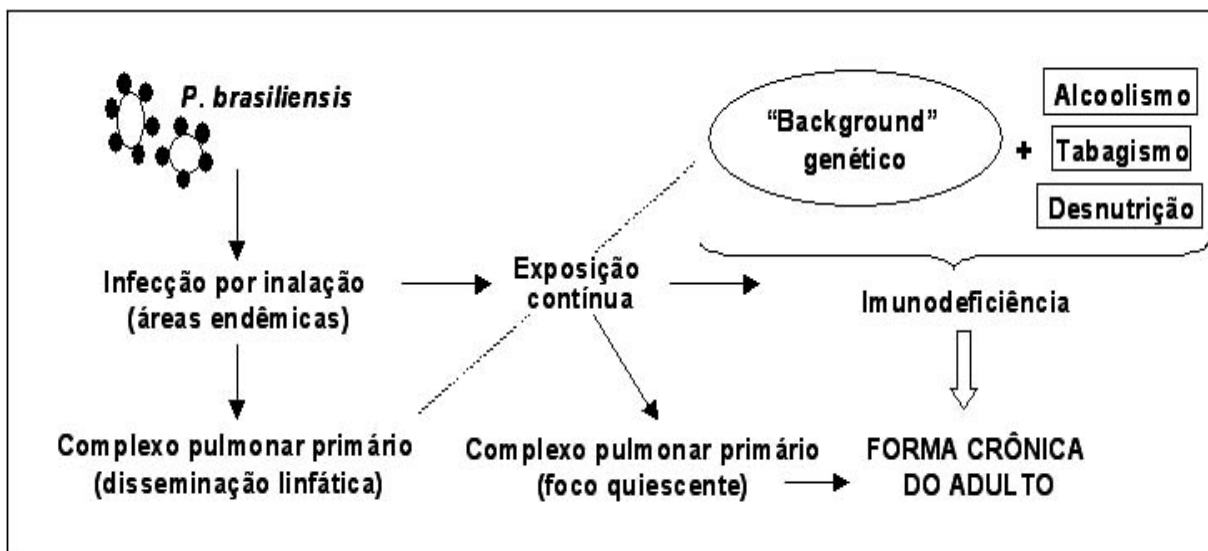


Figura 6. Paracoccidiodomicose: modelo para a patogênese da forma crônica do adulto.

De acordo com nossos resultados, a imunossupressão observada nos indivíduos não tratados não é causada por padrão defeituoso específico ao patógeno. Estímulo antigênico persistente, ausência ou hiporresponsividade imunológica associada a variações nas formas de apresentação clínica e cronicidade das lesões, aumentam a morbidade e a incapacidade física, comprometendo pacientes em uma faixa etária economicamente ativa.

CONCLUSÕES FINAIS

Tomados em conjunto, os resultados obtidos nas duas partes que compõem essa tese, sugerem que tanto na hanseníase quanto na paracoccidioidomicose, alterações funcionais de células apresentadoras de antígeno por moléculas dos patógenos podem ser um elemento comum e indutor de falha na ativação dos linfócitos T.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

1. Agrewala JN, Kumar B, Vohra H. Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. *Clin Exp Immunol*, 1998; 111(1):56-63.
2. Almeida SM, Rebelatto CLK, Queiroz-Telles F, Werneck LC. Major histocompatibility complex and central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. *J Infection*, 2005; 51:140-3.
3. Aloman C, Gehring S, Wintermeyer P, Kuzushita N, Wands JR. Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction. *Gastroenterology*, 2007; 132:698-708.
4. Anjos AR, Calvi SA, Ferracini R, Peraçoli MT, Silva CL, Soares AM. Role of *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall fraction containing beta-glucan in tumor necrosis factor-alpha production by human monocytes: correlation with fungicidal activity. *Med Mycol*, 2002; 40(4):377-82.
5. Aristizabál BH, Clemons, KV, Stevens, DA, Restrepo, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: In vivo inhibition in females. *Infect Immun*, 1998; 66:5587-91.
6. Arruda C, Vaz CA, Calich VL. Aseptic cure of pulmonary paracoccidioidomycosis can be achieved after a previous subcutaneous immunization of susceptible but not resistant mice. *Microbes Infect*, 2007; 9:704-13.
7. Baida H, Biselli PJ, Juvenale M, Del Negro GM, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, 1999; 1(4):273-8.
8. Battistini L, Piccio L, Rossi B, Bach S, Galgani S, Gasperini C et al. CD8+ T cells from patients with acute multiple sclerosis display selective increase of adhesiveness in brain venules: a critical role for P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*, 2003; 101(12):4775-82.
9. Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol Immunol*, 1991; 35:167-74.

10. Beekhuizen H, van Furth R. Monocyte adherence to human vascular endothelium. *J Leukoc Biol*, 1993; 54(4):363-78.
11. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*, 2005; 6:353-60.
12. Benard G, Franco M. Paracoccidoidomycosis. In: Merz WG, Hay RJ (eds). Medical Mycology, Topley's and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*, 10th edition, Hodder Arnold, London, p.541-59, 2005.
13. Benard G, Hong MA, Del Negro GM, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJ. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidoidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*, 1996; 54(1):7-12.
14. Benard G, Kavakama J, Mendes-Giannini MJ, Kono A, Duarte AJ, Shikanai-Yasuda MA. Contribution to the natural history of paracoccidoidomycosis: identification of the primary pulmonary infection in the severe acute form of the disease - a case report. *Clin Infect Dis*, 2005; 40(1): 1-4.
15. Benard G, Mendes-Giannini MJS; Juvenal M; Miranda ET, Duarte AJS. Immunosuppression in Paracoccidoidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Dis*, 1997; 175: 1263-67.
16. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidoidomycosis. *Cytokine*, 2001; 13:248-52.
17. Berberich C, Ramírez-Pineda JR, Hambrecht C, Alber G, Skeiky YA, Moll H. Dendritic cell (DC)-based protection against an intracellular pathogen is dependent upon DC-derived IL-12 and can be induced by molecularly defined antigens. *J Immunol*, 2003; 170(6):3171-9.
18. Betteli E, Oukka M, Kuchroo V. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*, 2007; 8(4):345-50.
19. Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl*, 1999; 57:16-21.
20. Bhatt K, Salgame P. Host Innate Immune Response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol*, 2007; 27(4):347-62.

21. Biselli PJ, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benardi G. IgE antibody response to the main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*, 2001; 39(6):475-8.
22. Bjune G. In vitro lymphocyte stimulation in leprosy; simultaneous stimulation with *Mycobacterium leprae* antigens and phytohaemagglutinin. *Clin Exp Immunol*, 1979; 36:479-87.
23. Bjune G. Reactions in leprosy. *Lepr Rev*, 1983; Spec No:61-7.
24. Bleharski JR, Li H, Meinken C, Graeber TG, Ochoa MT, Yamamura M, Burdick A, Sarno EN et al. Use of genetic profiling in leprosy to discriminate clinical forms of the disease. *Science*, 2003; 301:1527-30.
25. Bloom BR, Modlin RL, Salgame P. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. *Annu Rev Immunol*, 1992; 10:453-88.
26. Blotta MHSL, Mamoni SJ, Oliveira SA, Nouer PMO, Goveia G, Camargo ZP. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in southeast region. *Am J Trop Med Hyg*, 1999; 61:390-394.
27. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol*, 2002; 2:80-7.
28. Bozzi A, Pereira PP, Reis BS, Goulart MI, Pereira MC, Pedrosa EP et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphism frequency in paracoccidioidomycosis. *Hum Immunol*, 2006; 67(11):931-9.
29. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet*, 2004; 363:1209-19.
30. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*, 1993; 6:89-117.
31. Cacere CR, Romano CC, Mendes Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. *Clin Immunol*, 2002; 105(2):215-22.

32. Cadavid D, Restrepo A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. *Epidemiol Infect*, 1993; 111:121-33.
33. Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res*, 1998; 31(5):615-23.
34. Calich VL, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol*, 1985; 66:585-94.
35. Calich VLG, Singer-Vermes, LM, Russo M, Vaz CAC, Burger, E. Immunogenetics in Paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G (eds) *Paracoccidioidomycosis*, Boca Raton, FL: CRC Press, p.151-73; 1994.
36. Cano LE, Singer-Vermes LM, Vaz CA, Russo M, Calich VL. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. *Infect Immun*, 1995; 63:1777-83.
37. Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science*, 2007; 317(5838):617-9.
38. Chaieb JA, Castellarin C. Smoking associated with alcoholism: introduction to the major human dependencies. *Rev. Saúde Pública*, 1998; 3:246-54.
39. Charlab R, Sarno EN, Chatterjee D, Pessolani MC. Effect of unique *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid-I (PGL-I) on tumour necrosis factor production by human mononuclear cells. *Lepr Rev*, 2001; 72(1):63-9.
40. Chattree V, Khanna N, Bisht V, Rao DN. Inhibition of apoptosis, activation of NKT cell and upregulation of CD40 and CD40L mediated by *M. leprae* antigen(s) combined with Murabutide and Trat peptide in leprosy patients. *Mol Cell Biochem*, 2007; doi: 10.1007/s11010007-9646-8.
41. Chattree V, Khannab N, Rao DN. Alterations in T cell signal transduction by *M. leprae* antigens is associated with downregulation of second messengers PKC, calcium, calcineurin, MAPK and various transcription factors in leprosy patients. *Molecular Immunol*, 2007; 44:2066-77.

42. Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE. Tobacco Smoking Inhibits Expression of Proinflammatory Cytokines and Activation of IL-1R-Associated Kinase, p38, and NF- κ B in Alveolar Macrophages Stimulated with TLR2 and TLR4 Agonists. *J Immunol*, 2007; 179:6097-106.
43. Coimbra Jr CEA, Wanke B, Santos RV, Do Valle ACF, Costa RLB, Zancoppe-Oliveira RM. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in Tupi-Monde Amerindian populations from Brazilian Amazonia. *Ann Trop Med Parasitol*, 1994; 88:197-207.
44. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 2001; 409(6823):1007-11.
45. Conzen SD, Janeway CA. Defective antigen presentation in chronically protein-deprived mice. *Immunology*, 1988; 63:683-9.
46. Costa RLB. Paracoccidioidomycose: aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos de 276 pacientes acompanhados no Centro de Pesquisa Hospital Evandro Chagas. *Tese de Mestrado em Medicina Tropical, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2000; 198 p.*
47. Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Ruhle KH, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T cell subsets in cigarette smokers: a phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest*, 1986; 90:39-44.
48. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*, 2002; 18(5):1441-54.
49. Cunha SS, Rodrigues LC, Pedrosa A, Dourado IM, Barreto ML, Pereira SM. Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon. *Leprosy Rev*, 2004; 75: 357-66.
50. Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 2005; 115(6):1119-28.
51. De Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol*, 2005; 26(3):289-307.

52. De Jong R, Janson AA, Faber WR, Naafs B, Ottenhoff TH. IL-2 and IL-12 act in synergy to overcome antigen-specific T cell unresponsiveness in mycobacterial disease. *J. Immunol*, 1997; 159(2):786-93.
53. De Oliveira LC, Ribeiro CT, Mendes De M, Oliveira TC, Costa-Cruz JM. Frequency of Strongyloides stercoralis infection in alcoholics. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002; 97:119-21.
54. Del Negro G. AMB. Treatment of paracoccidioidomycosis. *Rev Assoc Med Bras*, 1974; 20(6):231-4.
55. Del Negro G. Peculiarities in the treatment of systemic mycoses. *AMB Rev. Assoc. Med. Bras*, 1985; (3-4):47-51.
56. Del Negro GM, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MI, de Aguiar MS, Lírio Vde S, Lacaz Cda S. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1991; 33(4):277-80.
57. Do Valle AC, Guimarães RR, Lopes DJ, Capone D. Thoracic radiologic aspects in paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1992; 34(2):107-15.
58. Doffinger R, Patel SY, Kumararatne DS. Host genetic factors and mycobacterial infections: lessons from single gene disorders affecting innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*, 2006; 8:1141-50.
59. Dos Santos WA, Da Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. *Cad Saúde Pública*, 2003; 19(1):245-253.
60. Esquenazi DA, Sampaio EP, Moreira AL, Gallo ME, Almeida SM, Sarno EN. Effect of treatment on immune responsiveness in lepromatous leprosy patients. *Lepr Rer*, 1990; 61(3):251-7.
61. Ferreira KS, Lopes JD, Almeida SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by Paracoccidioides brasiliensis. *Immunol Lett*, 2004; 94:107-14.

62. Flavia Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. *Cell Immunol*, 2002; 218(1-2):87-94.
63. Fraker PJ, King LE. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Ann Rev Nutr*, 2004; 24:277-98.
64. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1987; 20(2):129-32.
65. Franco MV, Goes AM, Koury MC. Model of in vitro granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 1997; 137(3):129-36.
66. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2003; 52:65-70.
67. Gadola SD, Moins-Teisserenc HT, Trowsdale J, Gross ML, Cerundolo V. TAP deficiency syndrome. *Clin Exp Immunol*, 2000; 121:173-8.
68. Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV, Sarno EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. Em: Coura, JR (ed.) *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan, p.1383-94, 2005.
69. Gesztesí JL, Puccia R, Travassos LR. Monoclonal antibodies against glycoprotein gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis* modulates laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma*, 1996; 15: 415-422.
70. Godal T, Myrvang B, Froland SS, Shao J, Melaku G. Evidence that the mechanism of immunological tolerance ("central failure") is operative in the lack of host resistance in lepromatous leprosy. *Scand J Immunol*. 1972; 1(4):311-21.
71. Goldani LZ, Monteiro CM, Donadi EA, Martinez R, Voltarelli JC. HLA antigens in Brazilian patients with paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 1991; 114: 89-91.

72. González-Amaro R, Portales-Pérez DP, Baranda L, Moncada B, Toro C, López-Briones S, Espitia C, Mancilla R. Co-stimulatory signals increase the reactivity of gammadelta T cells towards mycobacterial antigens. *Clin Exp Immunol*, 2000; 120(3):468-75.
73. Goral J, Kovacs EJ. In vivo ethanol exposure down-regulates TLR2-, TLR4-, and TLR9-mediated macrophage inflammatory response by limiting p38 and ERK1/2 activation. *J Immunol*, 2005; 174(1):456-63.
74. Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*, 1996; 184(1):19-29.
75. Hagiwara E, Takahashi KI, Okubo T, Ohno S, Ueda A, Aoki A et al. Cigarette smoking depletes cells spontaneously secreting Th(1) cytokines in the human airway. *Cytokine*, 2001; 14:121-26.
76. Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and *in vitro* resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. *Mycoses*, 2003; 46(8): 342-7.
77. Hanna SA, Monteiro da Silva JL, Giannini MJ. Adherence and intracellular parasitism of *Paracoccidioides brasiliensis* in Vero cells. *Microbes Infect*, 2000; (8):877-84.
78. Haregewoin A, Godal T, Mustafa AS, Belehu A, Yemaneberhan T. T-cell conditioned media reverse T-cell unresponsiveness in lepromatous leprosy. *Nature*, 1983; 303(5915):342-4.
79. Harrington L, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18:1-8.
80. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun*, 2002; 70(9):5167-76.
81. Haslett PAJ, Roche P, Butlin CR, Macdonald M, Shrestha N, Manandhar R et al. Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation. *J Infect Dis*, 2005; 192:2045-53.

82. Hayday AC. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*, 2000; 18:975-1026.
83. Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA. $\gamma\delta$ T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J Immunol*, 2005; 174:6045-53.
84. Heyworth PG, Cross AR, Curnuttan JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol*, 2003; 15:578-84.
85. Hirano T, Kishimoto T. Molecular biology and immunology of interleukin-6. *Res Immunol*, 1992; 143:723-4.
86. Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol*, 2006; 18:465-72.
87. Huang Q, Liu D, Majewski P. The Plasticity of Dendritic Cell Responses to Pathogens and Their Components. *Science*, 2001; 294:870-5.
88. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol*, 1981; 147:728-35.
89. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N et al. Control of leukocyte infiltration during inflammation: IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. *Immunity*, 2001; 14:705-14.
90. Janeway CA, Bottomly K. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*, 1994; 76(2):275-85.
91. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Ann Rev Immunol*, 2002; 20:197-216.
92. Joshi PC, Applewhite L, Ritzenthaler JD. Chronic ethanol ingestion in rats decreases granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor expression and downstream signaling in the alveolar macrophage. *J Immunol*, 2005; 175:6837-45.
93. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi-Cherradi S, Casanova JL. Infections in IFNGR-1-deficient children. *J Interferon Cytok Res*, 1997; 17(10):583-7.

94. Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology*, 2004; 112(4):674-80.
95. Kaplan G, Cohn ZA. The immunobiology of leprosy. *Int Rev Exp Pathol*, 1986; 28:45-78.
96. Kaplan G, Gandhi RR, Weinstein DE, Levis WR, Patarroyo ME, Brennan PJ, Cohn ZA. *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation in vitro. *J Immunol*, 1987; 138(9):3028-34.
97. Kaplan G, Sampaio EP, Walsh GP, Burkhardt RA, Fajardo TT, Guido LS, de Miranda Machado A, Cellona RV, Abalos RM, Sarno EN, et al. Influence of *Mycobacterium leprae* and its soluble products on the cutaneous responsiveness of leprosy patients to antigen and recombinant interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1989; 86(16):6269-76.
98. Kaplan G, Weinstein DE, Steinman RM, Levis WR, Elvers U, Patarroyo ME, Cohn ZA. An analysis of in vitro T cell responsiveness in lepromatous leprosy. *J Exp Med*, 1985; 162(3):917-29.
99. Kaplan G. The efficacy of a cell-mediated reaction in the disposal of *M. leprae* in human skin. *Immunol Lett*, 1988; 19(3):223-7.
100. Karhawi AS, Colombo AL, Salomao R. Production of IFN-gamma is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. *Med Mycol*, 2000; 38:225-9.
101. Karp CL, Auwaerter PG. Coinfection with HIV and tropical infectious diseases. II. Helminthic, fungal, bacterial, and viral pathogens. *Clin Infect Dis*, 2007; 45(9):1214-20.
102. Kaufmann SHE. Immunity to infectious agents. In: Paul W (ed.) *Fundamental Immunology*, 4th ed. New York: Lippincott-Raven, p.1335–71, 1999.
103. Komori HK, Meehan TF, Havran WL. Epithelial and mucosal gamma-delta T cells. *Curr Opin Immunol*, 2006; 18(5):534-8.
104. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*, 2003; 9(5):525-32.

105. Lang F, Peyrat MA, Constant P, Davodeau F, David-Ameline J, Poquet Y et al. Early activation of human V γ 9V δ 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol*, 1995; 154:5986-94.
106. Laso AFJ, Iglesias-Osma C, Ciudad J, Lopez A, Pastor I, Orfao A. Chronic Alcoholism Is Associated With an Imbalanced Production of Th-1/Th-2 Cytokines by Peripheral Blood T Cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 1999; 23(8):1306-11.
107. Lau AH, Abe M, Thomson AW. Ethanol affects the generation, cosignaling molecule expression, and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*, 2006; 79(5):941-53.
108. Lin J, Ziring D, Desai S, Kim S, Wong M, Korin Y et al. TNF-alpha blockade in human diseases: An overview of efficacy and safety. *Clin Immunol*, 2007; doi:10.1016/j.clim.2007.08.012.
109. Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun*, 2001; 69:3413-17.
110. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol*, 2006; 177(7):4662-9.
111. Lockwood DN, Suneetha S. Leprosy: too complex disease for a simple elimination paradigm. *Bull WHO*, 2005; 83:230-5.
112. Lockwood DN. The management of erythema nodosum leprosum: current and future options. *Lepr Rev*, 1996; 67: 253-9.
113. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 2002; 23:445-9.
114. Mahaisavariya P, Kulthanan K, Khemngern S, Pinkaew S. Lesional T-cell subset in leprosy and leprosy reaction. *Int J Dermatol*, 1999; 38(5):345-7.

115. Mamoni RL, Blotta MHSL. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*, 2005; 32:20-9.
116. Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*, 2002; 40(2):153-9.
117. Manandhar R, Shrestha N, Butlin CR, Roche PW. High levels of inflammatory cytokines are associated with poor clinical response to steroid treatment and recurrent episodes of type 1 reactions in leprosy. *Clin Exp Immunol*, 2002; 128:333-38.
118. Martinez R, Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. *Rev. Saúde Pública*, 1992; 26:12-6.
119. Martino A, Casetti R, Sacchi A, Poccia F. Central memory Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes primed and expanded by bacillus Calmette-Guérin-infected dendritic cells kill mycobacterial-infected monocytes. *J Immunol*, 2007; 179(5):3057-64.
120. Matute DR, Sepulveda VE, Quesada LM et al. Microsatellite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*, 2006; 44:2153-7.
121. McCue JM, Link KL, Eaton SS, Freed BM. Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation. *J Immunol*, 2000; 165:6771-5.
122. McEwen JG, Garcia AM, Ortiz BL, Botero S, Restrepo A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res*, 1995; 26:305-6.
123. Mendes-Giannini MJ, Soares CP, da Silva JL, Andreotti PF. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2005; 45(3):383-94.

124. Mendes-Giannini MJ, Taylor ML, Bouchara JB, Burger E, Calich VL, Escalante ED, Hanna SA, Lenzi HL, Machado MP, Miyaji M, Monteiro Da Silva JL, Mota EM, Restrepo A, Restrepo S, Tronchin G, Vincenzi LR, Xidieh CF, Zenteno E. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Med Mycol*, 2000; 38(1):113-23.
125. Meyerson MS. Erythema nodosum leprosum. *Int J Dermatol*, 1996; 35(6):389-92.
126. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes and Infection*, 2006; 8:1124-31.
127. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, Nath I. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett*. 1995; 48(2):123-8.
128. Modlin R, Rea T. Immunopathology of leprosy. In: RC Hastings and DVA Opromolla (eds.) *Leprosy*, New York, NY: Churchill Livingstone, p.225-34, 1994.
129. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, Rea TH, Bloom BR. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1988; 85:1213-7.
130. Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB. Lymphocytes bearing antigen-specific $\gamma\delta$ T cell receptors accumulated in human infectious disease lesions. *Nature*, 1989; 339:544-8.
131. Mok PW, Greer DL. Cell-mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol*, 1977; 28:89-98.
132. Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SH. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature*, 1993; 365:53-6.
133. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C et al. On the origin of leprosy. *Science*, 2005; 308(5724):1040-2.
134. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev*, 2006; 77:189-202.

135. Moraes MO, Sampaio EP, Nery JA, Saraiva BC, Alvarenga FB, Sarno EN. Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. *Br J Dermatol*, 2001; 144(1):175-81.
136. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS. mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*, 1999; 50:541-9.
137. Moreira AL, Corral LG, Ye W, Johnson B, Stirling D, Muller GW, Freedman VH, Kaplan G. Thalidomide and thalidomide analogs reduce HIV type 1 replication in human macrophages in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1997; 13(10):857-64.
138. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Ehlers S, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on TNF- α by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med*, 1993; 177:1675-80.
139. MS (Ministério da Saúde). Falando sobre Tabagismo. (Manual de Orientação - Dia Mundial sem Tabaco, 31 de Maio; distribuição limitada). *Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 1998.*
140. Musatti C, Rezkallah MT, Mendes E, Mendes NF. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cellular Immunol*, 1976; 24:365-78.
141. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: *Paracoccidioidomycosis, Boca Ratón. p.175-184, 1994.*
142. Nath I, Curtis J, Bhutani LK, Talwar GP. Reduction of a subpopulation of T lymphocytes in lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol*, 1974; 18:81-7.
143. Netea MG, Stuyt RJ, Kim SH, Van der Meer JW, Kullberg BJ, Dinarello CA. The role of endogenous interleukin (IL)-18, IL-12, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α in the production of interferon- γ induced by *Candida albicans* in human whole-blood cultures. *J Infect Dis*, 2002; 185:963-70.
144. Neva FA, Filho JO, Gam AA. Interferon-gamma and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human T lymphotropic virus type I and *Strongyloides stercoralis*. *J Infect Dis*, 1998; 178:1856-9.

145. Newman B. Imaging of medical disease of the newborn lung. *Radiol Clin North Am*, 1999; 37(6):1049-65.
146. Niiya T, Akbar SM, Yoshida O. Impaired dendritic cell function resulting from chronic undernutrition disrupts the antigen-specific immune response in mice. *J Nutr*, 2007; 137:671-5.
147. Niño-Vega GA, Calcagno AM, San-Blas G, San-Blas F, Gooday GW, Gow NA. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*, 2000; 38(6):437-41.
148. Nogueira N, Kaplan G, Levy E, Sarno EN, Kushner P, Granelli-Piperno A et al. Defective gamma interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin 2. *J Exp Med*, 1983; 158(6):2165-70.
149. O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol*, 2000; 10:542-9.
150. O'Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 1998; 8:275-83.
151. O'Garra A, Vieira P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*, 2007; 6:425-8.
152. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*, 2002; 4(2):139-44.
153. Ottenhoff THM, Kumararatne D, Casanova, JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today*, 1998; 19(11):491-4.
154. Ouyang Y, Virasch N, Hao P, Aubrey MT, Mukerjee N, Bierer BE, Freed BM. Suppression of human IL-1 β , IL-2, IFN- γ , and TNF- α production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106:280-7.
155. Peracoli MT, Kurokawa CS, Calvi AS. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, 2003; 5:413-8.

156. Pereira GM, Miller JF, Shevach EM. Mechanism of action of cyclosporine A in vivo. II. T cell priming in vivo to alloantigen can be mediated by an IL-2-independent cyclosporine A-resistant pathway. *J Immunol*, 1990; 144:2109-16.
157. Pickard C, Smith AM, Cooper H. Investigation of Mechanisms Underlying the T-Cell Response to the Hapten 2,4-Dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol*, 2006; 127:630-7.
158. Piepkorn M, Brown C, Zone J. Auricular chondritis as a rheumatologic manifestation of Lucio's phenomenon: clinical improvement after plasmapheresis. *Ann Intern Med*, 1983; 98(1):49-51.
159. Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *P.brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with Paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 1610-1615.
160. Quagliato Júnior R, Grangeia TAG, Massucio RAC, De Capitani EM, Rezende SM, Balthazar AB. Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: reality and misdiagnosis. *J Bras Pneumol*, 2007; 33:295-300.
161. Rajasekar R, Sim GK, Augustin A. Self heat shock and gamma delta T-cell reactivity. *Proc Natl Acad Sci*, 1990; 87:1767-71.
162. Ramanathan VD, Tyagi P, Ramanathan U, Katoch K, Sengupta U, Ramu G. Persistent reduced solubilization of immune complexes in lepromatous leprosy patients with reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1991; 59(1):5-11.
163. Ramesh V, Saxena U, Mukherjee A, Misra RS. Multiple ulcers in an elderly man. Necrotizing erythema nodosum leprosum (necrotizing ENL). *Arch Dermatol*. 1992; 128(12):1643-46.
164. Rea TH, Jerskey RS. Clinical and histologic variations among thirty patients with Lucio's phenomenon and pure and primitive diffuse lepromatosis (Latapi's lepromatosis). *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 2005; 73: 169-88.
165. Rea TH, Ridley DS. Lucio's phenomenon: a comparative histological study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1979; 47: 161-6.

166. Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, 2004; 431(7004):84-7.
167. Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*, 2001; 39:233-41.
168. Restrepo A, Robledo MV, Ospino SC, Restrepo MI, Correa AL. Distribution of Paracoccidioidin Sensitivity in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 1968; 25-37.
169. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*, 1984; 46: 346-53.
170. Restrepo AM, Benard G. Paracoccidioidomycosis. In: Feigin, R.D. and Cherry, J.D. (eds). *Textbook of pediatric infectious diseases, 4th edition*. Houston, TX: *Harcourt Health Sciences*, 2004.
171. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int J Lepr*, 1966; 34:255-73.
172. Rocken M, Urban J, Shevach EM. Antigen-specific activation, tolerization, and reactivation of the interleukin 4 pathway in vivo. *J Exp Med*, 1994; 179:1885-93.
173. Romani L, Cenci E, Mencacci A, Spaccapelo R, Grohmann U, Puccetti P, Bistoni F. Gamma interferon modifies CD4⁺ subset expression in murine candidiasis. *Infect Immun*, 1992; 60(11):4950-2.
174. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 2004; 4:1-23.
175. Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine*, 2002; 18(3):149-57.

176. Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ, Benard G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin Immunol*, 2005; 114:86-94.
177. Sadahiro A, Roque AC, Shikanai-Yasuda MA. Generic human leukocyte antigen class II (DRB1 and DQB1) alleles in patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*, 2007; 45(1):35-40.
178. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun*, 1988; 56: 711-13.
179. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*, 1991; 254(5029):279-82.
180. Salgame P, Modlin R, Bloom BR. On the mechanism of human T cell suppression. *Int Immunol*, 1989; 1(2):121-9.
181. Sampaio EP, Hernandez MO, Carvalho DS, Sarno EN. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit *M. leprae*-induced TNFalpha production in vitro. *Biomed Pharmacother*, 2002; 56(1):13-9.
182. Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JA, Sarno EN. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis*, 1993; 168: 408-14.
183. Sampaio EP, Moraes MO, Nery JA, Santos AR, Matos HC, Sarno EN. Pentoxifylline decreases *in vivo* and *in vitro* tumour necrosis factor-alpha production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin Exp Immunol*, 1998; 111:300-8.
184. Sampaio EP, Moraes MO, Pessolani MCV, Sarno EN. Role of cytokines in host defenses against *M. leprae*. In: Kotb M, Calandra T (eds) *Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, p.163-186, 2003.

185. Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J Exp Med*, 1992; 175(6):1729-37.
186. Sampaio EP, Oliveira RB, Warwick-Davies J, Neto RB, Griffin GE, Shattock RJ. T cell-monocyte contact enhances tumor necrosis factor-alpha production in response to *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis*, 2000; 182(5):1463-72.
187. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*, 1991; 173(3):699-704.
188. Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz J Med Biol Res*, 1998; 31:69-76.
189. San Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol*, 1993; 31: 99-113.
190. Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorré K, Van Heuverswyn H. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi (Japanese J Lepr)*, 2001; 70(1):15-24.
191. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol*, 1991; 84(1):103-8.
192. Saunders BM, Cooper AM. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol*, 2000; 78:334-41.
193. Schaible UE, Kaufmann SH. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med*, 2007; 4:115-26.
194. Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol*, 2006; 195(4):173-83.
195. Schlienger K, Uyemura K, Jullien D, Sieling PA, Rea TH, Linsley PS, Modlin RL. B7-1, but not CD28, is crucial for the maintenance of the CD4+ T cell responses in human leprosy. *J Immunol*, 1998; 161(5):2407-13.
196. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*, 2003; 21: 305-34.
197. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Kraenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*, 2006; 19(2):338-81.

198. Sehgal VN. Lucio's Phenomenon/erythema necroticans. *Int J Dermatol*, 2005; 44:602-5.
199. Setia MS, Steinmaus C, Ho CS, Rutherford GW. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2006; 6:162-70.
200. Sharma N, Sharma VK, Gupta A, Kaur I, Ganguly NK. Immunological defect in leprosy patients: altered T-lymphocyte signals. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1999; (4):355-62.
201. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2006; 39:297-310.
202. Shrestha N, Ida JA, Lubinski AS, Pallin M, Kaplan G, Haslett PA. Regulation of acquired immunity by gamma delta T-cell/dendritic-cell interactions. *Ann N Y Acad Sci.*, 2005; 1062:79-94.
203. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, Modlin RL. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol*, 1993; 150(12):5501-10.
204. Sieling PA, Torrelles JB, Stenger S, Chung W, Burdick AE, Rea TH et al. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J Immunol*, 2005; 174:2637-44.
205. Silva-Vergara ML, Martinez R; Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite-Maffei CM. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol*, 1998; 36: 37-42.
206. Soilleux EJ, Sarno EN, Hernandez MO, Moseley E, Horsley J, Lopes UG, Goddard MJ, Vowler SL, Coleman N, Shattock RJ, Sampaio EP. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? *J Pathol*, 2006; 209(2):182-9.

207. Soliman AT, El Zalabany MM, Salama M, Ansari BM. Serum leptin concentrations during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. *Metabolism*, 2000; 49:819-25.
208. Souza AR, Gesztesi JL, del Negro GM, Benard G, Sato J, Santos MV, Abrahão TB, Lopes JD. Anti-idiotypic antibodies in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000; (2):175-81.
209. Souza CS, Roselino AM, Figueiredo F, Foss NT. Lucio's phenomenon: clinical and therapeutic aspects. *Int J Lepr*, 2000; 68(4):417-25.
210. Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MAM, Williams DL; Martins MVBS et al. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. *J Immunol*, 2005; 175:7930-38.
211. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 2007; 449(7161):419-26.
212. Sullivan L, Sano S, Pirmez C, Salgame P, Mueller C, Hofman F et al. Expression of adhesion molecules in leprosy lesions. *Infect Immun*, 1991; 59(11):4154-60.
213. Tabora CP, Juliano MA, Puccia R, Franco M, Travassos LR. Mapping of the T cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. *Infect Immun*, 1998; 66: 786-93.
214. Tapia FJ, Goihman-Yahr M, Caceres-Dittmar G. Leukocyte immunophenotypes in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis. *Histol Histopathol*, 1991; 6:395-402.
215. Teunis B.H. Geijtenbeek, Sandra J. van Vliet, Estella A. Koppel, Marta Sanchez-Hernandez, Christine M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, Ben Appelmelk, and Yvette van Kooyk. Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *J Exp Med*, 2003; 197(1):7-17.

216. Tomimori-Yamashita J, Cruaud P, Rotta O, Lagrange PH. Antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of anti-PGL-I specific circulating immune complex in leprosy patients. *Lepr Rev*, 1999;70(3):261-71.
217. Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo T, Ishikawa H, Saito A. Accumulation of $\gamma\delta$ T Cells in the Lungs and Their Regulatory Roles in Th1 Response and Host Defense against Pulmonary Infection with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, 2004; 172:7629-34.
218. Ulrichs T, Porcelli SA. CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity. *Rev Immunogenet*, 2000; 2(3):416-32.
219. Uyemura K, Band H, Ohmen J, Brenner MB, Rea TH, Modlin RL. Gamma delta T cells in leprosy lesions. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991; 173:203-07.
220. Valle AC, Guimarães RR, Lopes DJ, Capone D. Thoracic radiologic aspects in paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1992; 34(2):107-15.
221. Van Hensbroek MB, Palmer A, Onyiorah E, Schneider G, Jaffar S, Dolan G et al. The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. *J Infect Dis*, 1996; 174(5):1091-7.
222. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*, 1998; 280(5361):243-8.
223. Vanderborght PR, Pacheco AG, Moraes ME, Antoni G, Romero M, Verville A, Thai VH et al. HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immunol*, 2007; 8(4):320-4.
224. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF-beta in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity*, 2006; 24:179-89.
225. Verhagen CE, Wierenga EA, Buffing AA, Chand MA, Faber WR, Das PK. Reversal reaction in borderline leprosy is associated with a polarized shift to type 1-like *Mycobacterium leprae* T cell reactivity in lesional skin: a follow-up study. *J Immunol*, 1997; 159:4474-83.

226. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, De Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun*, 1994; 62: 1465-69.
227. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *British Med Bull*, 2006; 77/78:103–21.
228. Waltenbaugh C, Vasquez K, Peterson JD. Alcohol consumption alters antigen-specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair. *Alcohol Clin Exp Res*, 1998; 22:220-3.
229. Wanke B, Londero AT. 1998. *Paracoccidioides brasiliensis*. In Collier C, Balows A, Sussman M (eds.) *Microbiology and Microbial Infections*, Oxford University Press Inc., New York, p. 395-407, 1998.
230. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: M. Franco, CS Lacaz, A. Restrepo-Moreno, G Del Negro (Eds). *Paracoccidioidomycosis*, CRC Press, Boca Ratón, p. 109-120, 1994.
231. Warris A, Bjorneklett A, Gaustad P. Invasive pulmonary aspergillosis associated with infliximab therapy. *N Engl J Med*, 2001; 344:1099-100.
232. Weindl G, Naglik JR, Kaesler S, Biedermann T, Hube B, Korting HC, Schaller M. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4. *J Clin Invest*, 2007; 117(12):3664-72.
233. WHO. Global leprosy situation. *Weekly epidemiological record*, 2007; 25(82):225-232. Disponível em <http://www.who.int/wer> (acessado em 13/11/2007).
234. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, 2007; 8(9):950-7.
235. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 1991; 254(5029):277-81.
236. Zea AH, Ochoa MT, Ghosh P, Longo DL, Alvord WG, Valderrama L et al. Changes in Expression of Signal Transduction Proteins in T Lymphocytes of Patients with Leprosy. *Infect Immunity*, 1998; 66 (2):499-504.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)