

CLAUDIA TRES CORVINO

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SÉRICOS NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA**

CAMPINAS

2006

CLAUDIA TRES CORVINO

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SÉRICOS NA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para Obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em
Ciências Biomédicas.*

ORIENTADOR: MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA

CAMPINAS

2006

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

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

C819m Corvino, Claudia Tres
Mediadores inflamatórios séricos na paracoccidiodomicose humana / Claudia Tres Corvino. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

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

1. Paracoccidoides brasiliensis. 2. Citocinas. 3. Inflamação.
4. ELISA. I. Blotta, Maria Heloisa Souza Lima. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em ingles : Serum levels of inflammatory mediators in human paracoccidiodomycosis

Keywords: • Paracoccidiodomycosis
• Cytokines
• Inflammation
• Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima
Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares
Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

Data da defesa: 17-08-2006

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Banca examinadora da dissertação de mestrado

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Membros:

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

2. Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

3. Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

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

Data: 17/08/2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Salvador e Eliana, minhas irmãs Carolina e Roberta e ao Miguel por toda a ajuda, incentivo, paciência e principalmente pelo apoio.

Obrigada por tudo! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e saúde;

Agradeço à Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta pela oportunidade em poder desenvolver este trabalho e principalmente pela orientação;

Agradeço aos meus pais Eliana e Salvador, minhas irmãs Carolina e Roberta pela paciência, incentivo e apoio;

Agradeço ao meu namorado Miguel pelo carinho e apoio;

Agradeço à toda a minha família pelo carinho, apoio e incentivo.

Agradeço a todos os meus amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular por toda a ajuda, em especial ao Ronei Luciano Mamoni, Rômulo Tadeu Dias de Oliveira e à Priscila Bianchi Juliano.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>x</i>
INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	19
ARTIGO	21
Decision Letter	23
Summary	27
Introduction	28
Results	32
Discussion	41
References	44
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	70



RESUMO

A interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória com importante participação tanto na resposta inata como adquirida. Concentrações elevadas de IL-18 são encontradas em várias doenças inflamatórias e infecciosas. A expressão aumentada de IL-18 pode contribuir para a resolução de processos infecciosos, mas também pode promover uma resposta inflamatória exagerada, prejudicial ao hospedeiro. O objetivo deste estudo foi determinar as concentrações séricas de IL-18 e outros mediadores inflamatórios (IL-12, sICAM-1, sTNFR1, sTNFR2, CXCL9, CXCL10), antes e após tratamento antifúngico, em pacientes com a forma juvenil (FJ) e adulta (FA) da paracoccidiodomicose (PCM), assim como em indivíduos normais saudáveis e relacionar com a atividade e gravidade da doença. Também foram avaliadas as concentrações de IgG total, subclasses de IgG e IgE anti-gp43 de *P. brasiliensis*. Todas as dosagens foram realizadas por método imunoenzimático (ELISA). Os níveis séricos basais de IL-18, IL-12, sICAM-1, sTNFR1, sTNFR2, CXCL9, CXCL10 estavam mais elevados em pacientes com PCM em relação ao grupo controle. Pacientes com a FJ apresentaram concentrações mais elevadas de IL-18 e sTNFR2 em relação aqueles com a FA da PCM, enquanto estes mostraram maiores concentrações de sTNFR1 em relação aos pacientes com a FJ. Houve correlação positiva entre as concentrações de IL-18 e sICAM-1 ($r=0.62$, $p<0.0001$), sTNFR1 ($r=0.61$, $p<0.0001$), sTNFR2 ($r=0.64$, $p=0.002$) e também em relação a gravidade da doença nos pacientes com a FJ. A terapia anti-fúngica resultou em significativa diminuição das concentrações séricas de todos os mediadores inflamatórios analisados que, de maneira geral, atingiram os valores encontrados no grupo controle ao final de 2 anos de tratamento. A pesquisa de anticorpos mostrou níveis basais maiores de IgG4 e IgE nos pacientes com a FJ, enquanto que a IgG1 estava mais elevada naqueles com a FA. Em conjunto os resultados mostraram que uma forte resposta inflamatória marca a fase inicial da PCM humana e que mediadores como a IL-18 e o sTNFR2 parecem contribuir em particular para uma forma mais grave da doença.



ABSTRACT

IL-18 is a pro-inflammatory cytokine of the IL-1 superfamily that exhibits broad functional effects in innate and acquired immune responses and which has been found in high levels in several chronic inflammatory and autoimmune diseases. Over-expression of IL-18 may promote early resolution of infection or could induce a detrimental exaggerated immune response. The aim of this study was to determine serum levels of IL-18 and other inflammatory mediators (IL-12, sICAM-1, sTNFRI, sTNFRII, CXCL9, CXCL10) at baseline and after antifungal therapy in serum from patients with juvenile (JF) and adult form (AF) of paracoccidioidomycosis (PCM) as well as in healthy controls (C), and to assess their possible relationships to the severity of disease. IL-18 and sTNFRII levels in patients with the JF of PCM were significantly higher than in the AF and controls. In relation to sICAM-1, no difference was observed between JF and AF but both presented higher levels than controls. sTNFRI levels were higher in patients with PCM than in controls, and significant higher concentrations were detected in AF patients as compared to JF ones. Moreover IL-12 and chemokines CXCL9 and CXCL10 were also higher in patients than in controls. In JF patients IL-18 levels significantly correlated with sICAM-1 ($r=0.62$, $p<0.0001$), sTNFRI ($r=0.61$, $p<0.0001$), sTNFRII ($r=0.64$, $p=0.002$), as well as with clinical severity. The results suggest the value of serum IL-18 and sTNFRs levels as a parameter of PCM severity and may support a possible role for them in the pathogenesis of the disease.



INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica em diferentes regiões do Brasil. É causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* e acomete principalmente indivíduos adultos do sexo masculino, que trabalham na zona rural (BRUMMER et al, 1993).

Grande parte dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue conter a infecção e não desenvolver a doença. Esse fato é evidenciado pela alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (HTT) positivo para antígenos do fungo, mas não apresentam qualquer sintoma da doença (Bethlem et al., 1999; Wanke e Londero, 1994). Essa condição, denominada PCM-infecção, é muito mais comum do que a PCM-doença.

Quando a doença se estabelece, é caracterizada por um largo espectro de manifestações clínicas, agrupada em 2 formas principais: a forma adulta ou crônica (FA), geralmente mais localizada e menos agressiva, e a forma juvenil (FJ) ou aguda, mais grave. Em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de terapia específica leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças (Benard et al., 1996; Lacaz et al., 2002).

A forma juvenil ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos, representando menos de 10% da casuística geral da doença. A avaliação clínica desses pacientes evidencia a presença de adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea, simulando patologias linfoproliferativas. Nestes casos a evolução da doença é rápida, com febre, emagrecimento e comprometimento do sistema fagocítico-mononuclear (fígado, baço, linfonodos e medula óssea). Os pacientes apresentam a resposta imunológica humoral preservada, com aumento da produção de anticorpos específicos do tipo IgG4, IgE e IgA (Benard et al., 2001, Mamoni et al., 2002, Mamoni et al., 2001), enquanto a resposta imunológica celular a antígenos do fungo está severamente deprimida (Benard et al., 1996, Mota et al., 1985). A análise histopatológica das lesões mostra reação inflamatória não específica com formação de granulomas frouxos, observando-se multiplicação ativa do fungo dentro das células fagocitárias (Franco et al., 1996).

A forma adulta ocorre em aproximadamente 90% 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 forma crônica pode ser leve, moderada ou grave, com lesões que variam desde uma ulceração oral isolada até o envolvimento pulmonar difuso. Pode apresentar-se de forma localizada (unifocal), sendo o pulmão o órgão mais atingido, mostrando múltiplas lesões em todo o trato respiratório e manifestações clínicas como tosse, expectoração e dispnéia a esforços (Benard et al., 2001). A forma crônica multifocal atinge mais de um órgão ou sistema, apresentando sintomas variados com lesões na mucosa oral, nasal, pele, linfonodos, e em menor escala nas glândulas adrenais, intestinos e sistema nervoso central (Brummer et al., 1993, Franco, 1987, Franco et al., 1997). A resposta imunológica humoral caracteriza-se pela produção de níveis elevados de anticorpos do tipo IgG1 na forma crônica unifocal, e de IgG4 e IgE na forma multifocal (Mamoni et al., 2001; Mamoni et al., 2002). Pacientes com a FA geralmente apresentam teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio positivo e achados histopatológicos mostrando granulomas epitelióides típicos, que circundam as lesões e dificultam a multiplicação do fungo (Montenegro, 1986).

Em trabalho anterior verificamos que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a forma juvenil da PCM proliferam pouco e produzem preferencialmente citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-5) em resposta à estimulação com antígeno de *P. brasiliensis*. Em contraposição indivíduos com PCM-infecção produzem IFN- γ , TNF- α e baixos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, caracterizando uma resposta predominantemente Th1. Pacientes com a forma adulta constituem um grupo intermediário, no qual um perfil heterogêneo de resposta imunológica pode ser observado (Oliveira et al., 2002).

O principal indutor da produção de IFN- γ e indiretamente de TNF- α é a IL-12, produzida principalmente por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos (Gately et al., 1998). Em estudo anterior verificamos a presença de concentrações mais elevadas de IL-12 no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com forma adulta da PCM, seguido do grupo PCM-infecção (Oliveira et al., 2002), em relação aos pacientes com a forma juvenil. Esses dados estão de acordo com observações

de que a produção de IL-12, assim como o IFN- γ são indicadores de uma resposta protetora, tendo em vista o fato dos pacientes com a forma adulta mostrarem um controle mais eficiente da doença (lesões mais localizadas), em relação a forma mais grave e disseminada (forma juvenil). Romano et al., 2002 demonstraram que a adição de IL-12 em culturas de células mononucleares de pacientes com PCM aumentava a produção de IFN- γ e, quando adicionadas em culturas junto com anti-IL-10, aumentava também a resposta linfoproliferativa frente a antígenos do fungo.

Dentre as múltiplas atividades da IL-12, está a de induzir a expressão de perforinas e serina esterase e a produção de IFN- γ em células NK e linfócitos T. Estas são condições críticas para o desenvolvimento da resposta Th1, que leva à ativação de macrófagos e a produção de anticorpos que fixam complemento (Peraçoli et al., 1991; Peraçoli et al., 1995; Cesano et al., 1993). O eixo formado entre IL-12 e IFN- γ é essencial para o desenvolvimento do granuloma e a imunidade protetora contra vários microorganismos intracelulares no homem e em camundongos (Gately et al., 1998, Romani et al., 1997; Parise-Fortes et al., 2000; Souto et al., 2000). Animais deficientes em IL-12 são extremamente suscetíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* e apresentam elevada taxa de mortalidade (Livonesi, 2001). Em concordância verificou-se que esta citocina teve um efeito protetor na infecção experimental sistêmica por *P. brasiliensis*, associado à diminuição dos níveis de IL-4 e IL-10, citocinas do tipo Th2 (Arruda et al., 2002).

A interleucina 18 (IL-18) originalmente chamada de Fator Indutor de IFN- γ , é uma citocina pleiotrópica secretada por macrófagos ativados, linfócitos T e B, e células dendríticas (Okamura et al., 1995; Okamura et al., 1998). Sua principal função é induzir a proliferação de células Th1 e a síntese de IFN- γ , potencializada pela ação da IL-12 (Robinson et al., 1997, Yoshimoto et al., 1998). Como o IFN- γ estimula macrófagos e células B a produzir radicais de oxigênio e imunoglobulinas, respectivamente, a IL-18 tem importante papel na resposta de defesa a vários microrganismos intracelulares. Além disso a IL-18 ativa células TCD8+ (Kohyama et al., 1998, Okamoto et al., 1999) cuja participação na resposta de defesa ao *P. brasiliensis* tem sido aventada (Cano et al., 2000, Fornazim et al., 2003).

A IL-18 também exibe uma série de efeitos pro-inflamatórios independentes de IFN- γ e induz a produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-8, provavelmente por meio da ativação do NF- κ B (fator de transcrição nuclear Kappa B).

Vários trabalhos mostraram concentrações séricas elevadas de IL-18 em doenças inflamatórias como artrite reumatóide (Gracie et al., 1999), cirrose biliar primária (Yamano et al., 2000), Doença de Crohn (Monteleone et al., 1999) e associação com a atividade da doença em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (Park et al., 2004), psoríase (Arican et al., 2005) e doença de Behcet (Oztas et al., 2005).

A IL-18 pode também atuar sobre linfócitos T e células NK de forma independente da IL-12, dando origem a respostas do tipo Th2 (Hoshino et al., 1999, Yoshimoto et al., 2000). Embora IL-18 e IL-12 em conjunto suprimam a síntese de IgG em camundongos infectados por helmintos, a injeção de apenas IL-18 aumenta os níveis de IgE e a produção de IL-4 e IL-13 por basófilos, mastócitos e células TCD4+. Estes resultados sugerem que a IL-18 pode induzir células TCD4+ produtoras de IL-4 ou condicionar células a produzir IL-4 em resposta a estimulação antigênica. Além disso a IL-18 aumenta o recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas (Kumano et al., 1999) e em combinação com a IL-2 aumenta a secreção de IL-13 por células T e NK (Hoshino et al., 1999). Por outro lado, células Th1 de memória estimuladas por IL-18 na presença do antígeno são capazes de produzir IFN- γ , IL-9, IL-13, GM-CSF, TNF- α , RANTES e MIP-1 α e de induzir inflamação e hiperreatividade das vias aéreas (SUGIMOTO et al. 2006). Desta forma, considerando os efeitos pleiotrópicos da IL-18, é provável que esta citocina ative moléculas sinalizadoras distintas em diferentes populações celulares dependendo do contexto de sua estimulação

A expressão de moléculas de adesão constitui um importante passo na indução da inflamação. Em resposta à estimulação por microrganismos, as células do hospedeiro liberam citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , que levam a um aumento na expressão de várias moléculas de adesão em monócitos e células endoteliais (Carlos e Harlan, 1994). A molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1/CD54) é uma proteína transmembrana e membro da superfamília das imunoglobulinas, que é constitutivamente expressa em várias

células (Dustin et al., 1986). A ICAM-1 está envolvida na interação célula-célula e no extravasamento de leucócitos para os locais de inflamação por meio da ligação a duas integrinas CD11a/CD18 (LFA-1) e CD11b/CD18 (Mac-1), ambas da família de integrinas $\beta 2$ (Diamond et al., 1990, Marlin e Springer, 1987). Stuyt et al., 2003 demonstraram que a IL-18 induz ICAM-1 seletivamente, enquanto a expressão de outras moléculas de adesão não é afetada. Além disso verificaram que a IL-12 tem um efeito aditivo sobre a indução de ICAM-1 pela IL-18 dependente, em parte, da produção endógena de TNF- α .

Existem vários mecanismos endógenos para limitar a atividade sistêmica dos mediadores inflamatórios. O TNF por exemplo pode ser ligado por receptores solúveis (sTNFR), domínios extracelulares dos TNFRs tipo I e tipo II (van der Poll e Lowry, 1995). Os sTNFRs retêm a sua afinidade pelo TNF e servem como inibidores da sua atividade, quando presentes em concentrações elevadas em relação à citocina. Os receptores de TNF podem ser dois tipos denominados TNFRI, com peso molecular de 55kD e TNFRII com 75kD, ambos presentes em diferentes células. A interação do TNF com o TNFRI leva ao recrutamento de uma proteína adaptadora que ativa caspases resultando na indução da apoptose. Por outro lado, a interação com TNFRII leva ao recrutamento de proteínas denominadas fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs) que ativam fatores de transcrição nucleares como o NF κ B e ativam proteínas como AP-1, levando a ativação celular (Aldriss e Naismith, 2000). Foi proposto que as concentrações séricas dos receptores endógenos de citocinas possam indiretamente refletir atividade das citocinas pro-inflamatórias. Em infecções crônicas, em particular, a determinação dos níveis séricos de sTNFR pode ser útil para o monitoramento do tratamento (Girardin et al., 1992, Godfried et al., 1993, Juffermans et al., 1998, Zijlstra et al., 1995).

Níveis séricos de sTNFR estão elevados em uma série de doenças inflamatórias e infecciosas, geralmente associada à atividade e gravidade do quadro. (Van Zee et al., 1992; Girardin et al., 1992, Godfried et al., 1993, Zijlstra et al., 1995). Na hepatite B e C o aumento da concentração de receptores de TNF é considerado como marcador de atividade da doença (Tai et al., 2001). Itoh et al. (1999) verificaram que ocorre um aumento da expressão de TNF-RII em pacientes com hepatite C e propuseram que o sistema TNF- α -TNF-Rs, principalmente o TNF-RII, está envolvido diretamente no

processo inflamatório crônico da doença. Recentemente Huang et al (2000) verificaram existir uma correlação positiva entre a concentração de sTNFRII e o número de monócitos no sangue periférico.

O valor potencial da concentração de sTNFRs como marcadores de atividade de doença ainda não foi investigado na PCM.

Ao lado das moléculas de adesão e das citocinas inflamatórias, as quimiocinas desempenham papel fundamental no desenvolvimento de uma resposta imunológica efetiva. Quimiocinas são citocinas cuja principal função é o recrutamento e ativação de leucócitos durante o processo inflamatório, podendo modular a ativação de linfócitos T (Charo e Ransohoff, 2006). Estudos experimentais em camundongos infectados por *P. brasiliensis* mostraram uma elevação nas concentrações de RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IP-10/CXCL10 e Mig/CXCL9 associada a infiltração de células mononucleares nos pulmões, enquanto que em animais deficientes em IFN- γ , a produção de KC e MIP-1 α foi relacionada a neutrofilia, ausência de granulomas e baixa atividade fungicida, resultando em disseminação do fungo e menor resistência à infecção (Souto et al., 2003).

Como já salientado anteriormente, as formas mais graves da PCM (FJ e FA disseminada) foram associadas a uma típica resposta Th2, caracterizada pela produção de altos níveis de anticorpos das classes IgG4, IgE e IgA, da citocina TGF- β e de eosinofilia periférica (Mamoni et al., 2001, Mamoni et al., 2002). Em resposta a estimulação com antígeno de *P. brasiliensis* células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a FJ produzem níveis mais elevados de IL-4 e IL-5, mas níveis diminuídos de IL-12 (RNAm e proteína), quando comparados a pacientes com a FA (Oliveira et al., 2002, Mamoni et al., 2005, Mamoni et al., 2006). O resultado desta polarização seria o desenvolvimento de uma resposta imunológica celular deficitária, levando a desativação de macrófagos, principal mecanismo de defesa contra o fungo. Entretanto, o desenvolvimento de doença ativa e disseminada também aciona potentes mecanismos inflamatórios com repercussão sistêmica e efeitos modulatórios sobre a resposta de defesa do hospedeiro. Neste trabalho foi nosso objetivo quantificar os níveis séricos de vários mediadores inflamatórios em pacientes com a forma juvenil e adulta da PCM, relacioná-los à atividade e gravidade da doença, assim como verificar o seu comportamento frente à terapia antifúngica.



OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a concentração sérica de mediadores inflamatórios e anticorpos anti-*P. brasiliensis* em pacientes com PCM antes e após tratamento antifúngico e correlacionar com a atividade e gravidade da doença.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a concentração sérica de IL-18, sICAM-1, IL-12, sTNFRI, sTNFRII, CXCL9 e CXCL10 antes e após tratamento antifúngico em pacientes com a forma juvenil e adulta da PCM e em indivíduos normais saudáveis.
- Determinar a concentração sérica de IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgE anti-*P. brasiliensis* antes e após tratamento antifúngico em pacientes com a forma juvenil e adulta da PCM e em indivíduos normais saudáveis.
- Correlacionar os achados com os parâmetros de atividade e gravidade da doença.



ARTIGO

Serum IL-18 and sTNFRII are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis, aceito provisoriamente para publicação no periódico:
Clinical and Experimental Immunology

Decision letter

From: s.tobin@immunology.org

To: heblotta@fcm.unicamp.br

Cc:

Subject: CEI-2006-0276.R1

Body:

Dear Dr. Maria Heloisa Blotta

RE: SERUM IL-18 and sTNFRII ARE ASSOCIATED WITH DISEASE SEVERITY IN PATIENTS WITH PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

Authors: Corvino, Claudia; Mamoni, Ronei; Fagundes, Gabriel; Blotta, Maria Heloisa

Manuscript ID: CEI-2006-0276.R1

Thank you for submitting the above manuscript to 'Clinical and Experimental Immunology'. I am pleased to inform you that it has been **provisionally accepted** for publication. There are a few administrative matters that require attention, however, before full acceptance.

Firstly, the following forms must be completed and returned to the editorial office:

Copyright form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CEI_CAF.pdf

Author's declaration: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/CEI_Au.pdf

Publication charge notice:

http://www.blackwellpublishing.com/static/cei_pubcharge.asp

Please note that it is best to copy and paste the above links into your web browser because long URLs do not always transfer well between e-mail systems.

The publishers require the original, completed version of the copyright form — faxed versions are NOT acceptable — so please ensure that you post the completed, signed copyright form to the editorial office. A faxed version of the author's declaration is acceptable, however, and there is no need to send in original signatures for this. Please do NOT send actual payment of the publication charge at this stage.

Secondly, we require separate text and figure files for production purposes. The text file should be a single file that contains: the text of the manuscript; the references; tables; and figure legends. It should not contain any highlighting or underling. It should be in a word-processed, not PDF, format because PDF files cannot be used for production. The figures should NOT be included in this file as this can lead to errors during production.

It is best if you can supply figures in TIFF format. It is also possible to use Illustrator or Photoshop software saved in the format ".eps" or ".tiff". Figures prepared in slide presentation software, such as Powerpoint, can create problems during production and you should avoid this format if at all possible. If you are unable to provide the specified formats, please save the figures in as many different file formats as possible.

The figure resolution/specification for various types of original figures, at their final size, should be as follows:

Line art - Minimum 600 dpi resolution

Halftone (i.e. both B/W and Colour photographs) - Minimum 300 dpi resolution

Line and tone (line art and halftone combined) - Minimum 600 dpi resolution

As a guide, if the electronic files are viewed at 400% on the computer screen and they look pixellated in any way then they will NOT be of sufficient quality for printing.

For further information on file formats, please see the instructions on our website at site www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp

Once you have all the necessary files ready, log on to Manuscript Central <http://mc.manuscriptcentral.com/cei> , and enter the Author Centre where you will find your manuscript (CEI-2006-0276.R1.R1/R2 etc) listed in the section "Revised Manuscripts". Click on the title of the manuscript being revised. This action will take you into the Draft Centre, where you should upload ALL the files for production.

Please ensure that you also send HIGH-QUALITY PRINTED VERSIONS of the figures to the editorial office at the same time as uploading your files. If these are already on their way, please can you let the editorial office know. If a figure is an actual photograph, then it should be provided as a sharp image on photographic paper. For line figures, however, paper printouts are acceptable provided that the quality is good: the lines should be solid, the text in a standard font and not blurred, and the overall image should be sharp and clear. This will ensure that the production process will be as efficient as possible.

I look forward to receiving all the requested items as your manuscript cannot be accepted until these matters have been addressed. If you require any further information please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely

Sharon Tobin

Sharon Tobin

Editorial Assistant,

Immunology & Clinical and Experimental Immunology

Tel: +44 (0)870 833 2408, Fax: +44 (0)870 833 2422

s.tobin@immunology.org

British Society for Immunology

Triangle House, Broomhill Road, London, SW18 4HX, UK

Registered charity 1043255 and registered in England and Wales as company
3005933

www.immunology.org/cei

www.immunology.org/imm

Date Sent: 08-Aug-2006

**SERUM IL-18 and sTNFRII ARE ASSOCIATED WITH DISEASE
SEVERITY IN PATIENTS WITH PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS**

Short title: IL-18 and sTNFRII levels in paracoccidioidomycosis

Corvino CL, Mamoni RL, Fagundes GZZ, Blotta, MHSL*

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

*Correspondence to Maria Heloisa S. L. Blotta, Department of Clinical
Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (UNICAMP), PO
Box 6111, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

Tel: +55 19 37889453, Fax: +55 19 3788 9434

e-mail: heblotta@fcm.unicamp.br

Keywords: Paracoccidioidomycosis, IL-18, sTNFRII, sICAM-1, chemokines.

Summary

IL-18 is a pro-inflammatory cytokine of the IL-1 superfamily that exhibits broad functional effects in innate and acquired immune responses and which has been found in high levels in several chronic inflammatory and autoimmune diseases. Over-expression of IL-18 may promote early resolution of infection or could promote a detrimental exaggerated immune response. The aim of this study was to determine serum levels of IL-18 and other inflammatory mediators (IL-12, sICAM-1, sTNFRI, sTNFRII, CXCL9, CXCL10) at baseline and after antifungal therapy in serum from patients with juvenil (JF) and adult form (AF) of paracoccidioidomycosis (PCM), as well as in healthy controls (C), and to assess their possible relationships to the severity of disease. IL-18 and sTNFRII levels in patients with the JF of PCM were significantly higher than those in the AF and controls. In relation to sICAM-1, no difference was observed between JF and AF patients but both presented higher levels than controls. sTNFRI levels were higher in patients with PCM than in controls, and significant higher concentrations were detected in AF patients as compared to JF ones. Moreover IL-12 and chemokines CXCL9 and CXCL10 were also higher in patients than in controls. In JF patients IL-18 levels significantly correlated with sICAM-1 ($r=0.62$, $p<0.0001$), sTNFRI ($r=0.63$, $p<0.0001$), sTNFRII ($r=0.51$, $p=0.02$), as well as with clinical severity. The results suggest the value of serum IL-18 and sTNFRs levels as a parameter of PCM severity and may support a possible role for them in the pathogenesis of the disease.

Introduction

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

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

New insights concerning the important role of innate immune response in govern protection or immunopathology and the quality of adaptive immune response in fungal infections, support the idea that the magnitude of the initial inflammatory response may influence the disease outcome.

IL-18 is a pleiotropic cytokine secreted by activated macrophages, T and B lymphocytes and dendritic cells [4, 5]. IL-18 main function is to induce the proliferation of Th1 cells and IFN- γ production potencialized by IL-12 [6, 7]. As IFN- γ stimulates macrophages and B cells to produce oxygen free radicals and immunoglobulins, respectively, it plays an important role against many intracellular microorganisms. Moreover, elevated expression of IL-18 were associated with inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis [8], primary biliar cirrhoses [9]) and Crohn Disease [10], as well as with disease activity in LES patients [11]. Recently it was shown that IL-18 is also able to stimulate NK and T cells independently of IL-12, giving rise to Th2 responses [12, 13]. Although IL-18 and IL-12 together inhibit IgG synthesis in mice infected by helminthes,

the injection of IL-18 alone increases IgE levels and IL-4 and IL-13 production by basophils, mast cells and CD4⁺ T cells. These results suggest that IL-18 is able to induce IL-4 producing CD4⁺ T cells or to conditioner cells to produce IL-4 in response to antigens. Besides, IL-18 increases eosinophil recruitment to airways [14] and in combination with IL-2 increases IL-13 secretion by T and NK cells [12]. In previous papers we were able to show that JF patients develop an immune response against the fungus characterized by the production of high titers of anti-*P. brasiliensis* IgG4, IgE and IgA [15, 16] and a predominance of immunosuppressive cytokines such as IL-4, IL-5 and TGF- β [17, 18]. These data, associated with eosinophilia, is strong evidence of a Th2 type of response in the JF of PCM.

Adhesion molecules expression is an important step in inflammation induction. In response to microorganisms host cells release cytokines as IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , which cause an up regulation of adhesion molecules in monocytes and endothelial cells [19]. Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) is a transmembrane protein member of the superfamily of the immunoglobulins, constitutively expressed in the membrane of various cell types [20]. ICAM-1 is involved in cell to cell interaction and in the extravasation of leukocytes to the inflammation sites through the ligation to β 2-integrins CD11a/CD18 (LFA-1) and CD11b/CD18 (Mac-1) [21, 22]. Stuyt et al. (2003) demonstrated that IL-18 is able to selectively induce ICAM-1 while no others adhesion molecules are affected. In addition they showed that IL-12 has an additive effect over ICAM-1 induction by IL-18, partly dependent of endogenous production of TNF- α [23]. In addition, IL-18 is able to stimulate CD8⁺ T cells which have a key role in the immune response against virus [24, 25].

In patients with PCM and mice infected with *P. brasiliensis* an overexpression of TNF- α levels was associated with disease activity [26-28]. TNF- α is a key cytokine involved in granuloma formation in PCM [27]. Cell surface TNFRs shed into the serum component may act as soluble TNF-binding proteins to modulate TNF biological activity [29] and soluble TNFR levels have been found to correlate with many inflammatory conditions and are thought to act as a marker of disease activity [30-32].

In the present study we sought to determine serum concentrations of IL-18, IL-12, sICAM-1, sTNFRs, chemokines CXCL9 and CXCL10, as well as anti-*P. brasiliensis* antibodies in patients with JF and AF of PCM, before and after antifungal therapy.

Patients and methods

Sera: Patients with PCM cared for at the University Clinical Hospital of UNICAMP, Campinas – SP, Brazil, were grouped according to the clinical form in juvenil (JF) and adult form (AF). The diagnosis of PCM was confirmed by the histopathological exams of biopsies or the finding of the fungus in scrapings of skin lesions, in material obtained from lymph nodes or in the sputum (direct examination). Serum samples were obtained at baseline (T0) and after antifungal therapy for 1 (T1) and 2 (T2) years. We analyzed 23 sera from patients with the JF (14 males and 9 females, age: 6-41 years) and 18 sera from patients with AF (15 males and 3 females, age: 33-69 years) of PCM. We also analyzed 21 healthy controls (C, 16 males and 5 females, age: 21-62). The study protocol was approved by the Ethics Committee of State University of Campinas Medical School (SP, Brazil).

Measurement of IL-18, IL-12p40p70, sICAM-1, sTNFRI, sTNFRII, CXCL9 and CXCL10: Serum levels of sICAM-1, sTNFRI and sTNFRII, CXCL9 and CXCL10 were assessed by commercially available sandwich enzyme immunoassay according to manufacturer instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Detection limit for sICAM-1, sTNFRI, sTNFRII, CXCL9 and CXCL10 are 15.6 pg/mL, 12.5 pg/mL, 7.8 pg/mL, 62,5 pg/mL, and 31,2 pg/mL, respectively. IL-18 (MBL – Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan) and IL-12 p40/70 (Amersham Biosciences), were also detected by ELISA and the detection limits of the assays are 12,5 pg/mL and 5 pg/mL, respectively.

Determination of IgG subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 anti- *P. brasiliensis* gp43 were detected by ELISA as previously described [15]. Results were expressed as the absorbance index (AI), a numeric value calculated by dividing the net absorbance of each test serum by the net absorbance of a positive reference serum pool on each plate, multiplied by 100. The AI is an arbitrary value that is linearly related to the antibody concentration and allows the comparison of sera tested on different plates and in different experiments.

Determination of IgE anti-*P.brasiliensis* gp43: IgE anti-*P. brasiliensis* gp43 were detected by a capture ELISA as previously described [16]. The results were expressed as absorbance index as for subclasses.

Statistical analysis: Values are presented as medians (range). Comparisons among groups were made using Kruskal-Wallis non parametric test. The comparison between parameters before and after treatment were made by Wilcoxon rank-sum test for matched samples and the correlation analysis, using the nonparametric Spearman test. A p value <0.05 was considered.

Results

Patients with JF and AF of PCM were included in this study. We analyzed clinical and laboratory findings of the patients retrospectively. Lung and mucosal involvement were more frequent among AF patients while superficial lymphadenomegaly, splenomegaly, hepatomegaly, abdominal masses and eosinophilia characterized JF patients.

Table I – Clinical manifestations of PCM patients at baseline

Clinical manifestations	JF– n (%)	AF – n (%)
Superficial lymphadenomegaly	18 (81.8)	4 (22.2)
Splenomegaly	13 (59.1)	0 (0.0)
Hepatomegaly	12 (54.5)	0 (0.0)
Abdominal mass	7 (31.8)	0 (0.0)
Bone lesions	2 (9.1)	0 (0.0)
Lung lesions	2 (9.1)	16 (88.9)
Mucosal lesions	2 (9.1)	10 (55.6)
Cutaneous lesions	4 (18.2)	2 (11.1)
Eosinophilia	22 (100.0)	11 (61.1)
Abdominal pain	6 (27.3)	0 (0.0)
Fever	10 (45.5)	3 (16.7)
Moderate and severe malnutrition	7 (31.8)	6 (33.3)
Diarrhea with/without abdominal pain	1 (4.6)	0 (0.0)
Ascites	1 (4.6)	0 (0.0)

Baseline IL-18 levels were significantly higher in patients with the JF of PCM as compared with AF and C (Fig. 1A). In relation to sICAM-1 the patients (JF and AF) presented higher concentrations in comparison with C individuals (Fig. 1B). It has to be pointed out 6 patients in the JF group, whose IL-18 (>1250 pg/mL) and sICAM-1 (>600 ng/mL) levels were a lot more elevated than in most of the other components of the group. Even considering that JF patients generally present a more severe form of the disease as compared to AF, this special group of 6 patients showed poor prognostic clinical factors at diagnosis with an extensive organ commitment characterized by mesenteric polyadenopathy, hepatosplenomegaly and osteoarticular involvement. Moreover two patients died after episodes of recurrence of the disease. A significant correlation was found between IL-18 and sICAM-1 levels in JF group ($r=0.61$, $P=0.002$), but not in AF group (Fig. 1C).

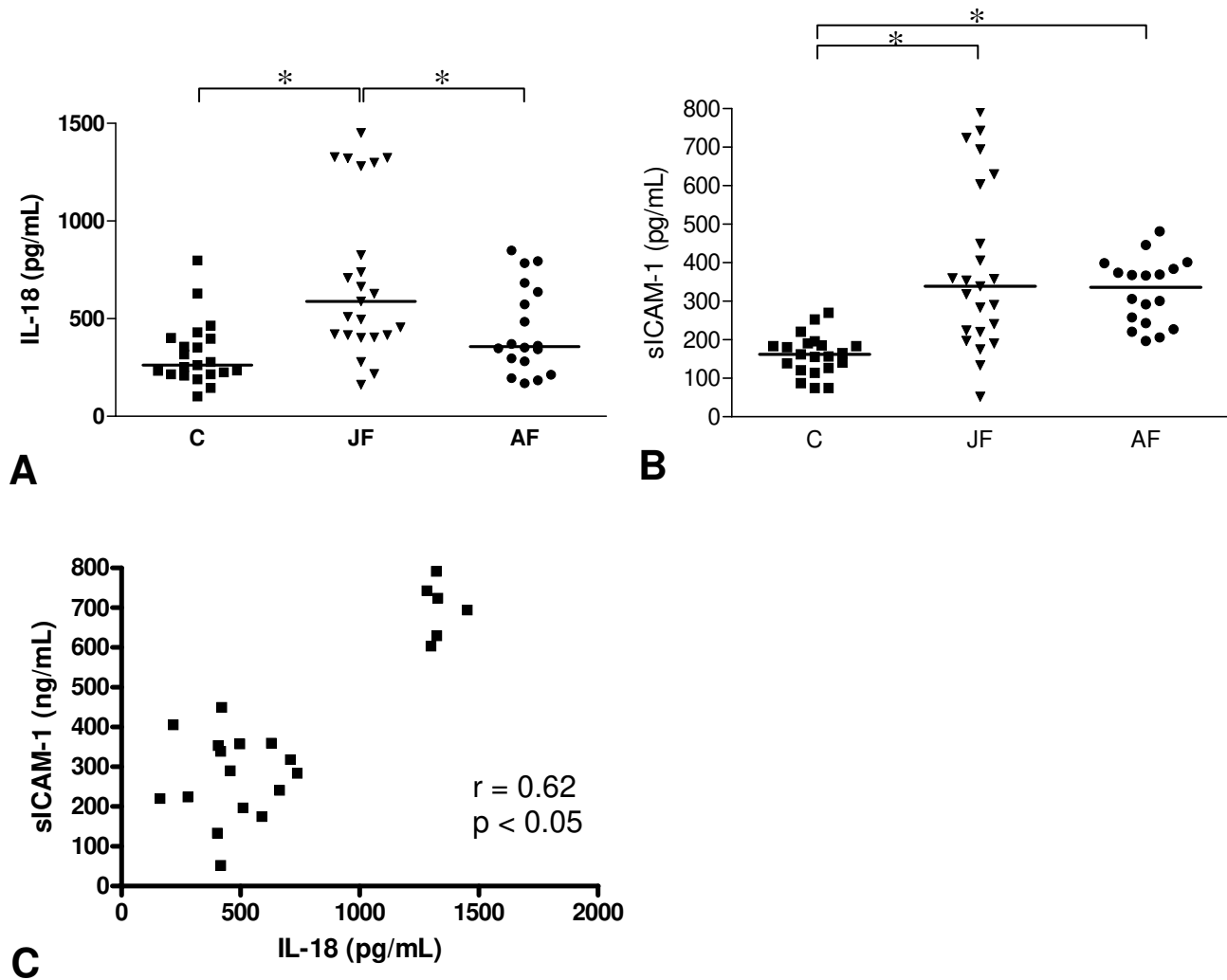


Figure 1- IL-18 (**A**) and sICAM-1 (**B**) levels at baseline in the serum of JF and AF patients as well as in normal controls – C. Horizontal lines represent the median. Statistics: Kruskal-Wallis, * $p < 0.05$. Correlation between IL-18 and sICAM-1 (**C**). The values of r and p are represented in the figure. Statistics: Spearman's rank correlation coefficients.

Patients with PCM presented higher levels of IL-12 as compared with C individuals, although no differences were observed between JF and AF groups (Fig. 2).

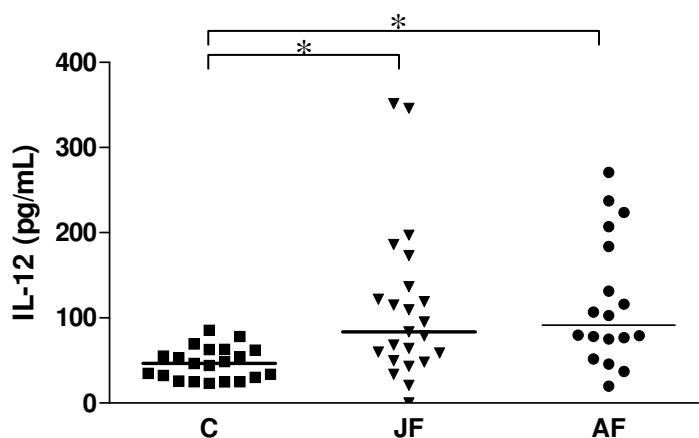


Figure 2- IL-12p40p70 levels at baseline in serum from patients with the JF and AF of PCM as well as normal controls - C. Horizontal lines represent median. Statistics: Kruskal-Wallis, * $p < 0.05$.

Patients with PCM also exhibit elevated levels of sTNFRs in relation to controls. However, an interesting difference was observed between AF and JF patients, with the former showing substantially higher levels of sTNFR I (Fig. 3A) and the latter presenting more TNFR II (Fig. 3B). A significant correlation was found between IL-18 and sTNFR I ($r=0.63$, $p<0.0001$), as well as IL-18 and sTNFR II ($r=0.51$, $p=0.02$) levels in JF group, but not in AF group (Fig. 3 C and D, respectively).

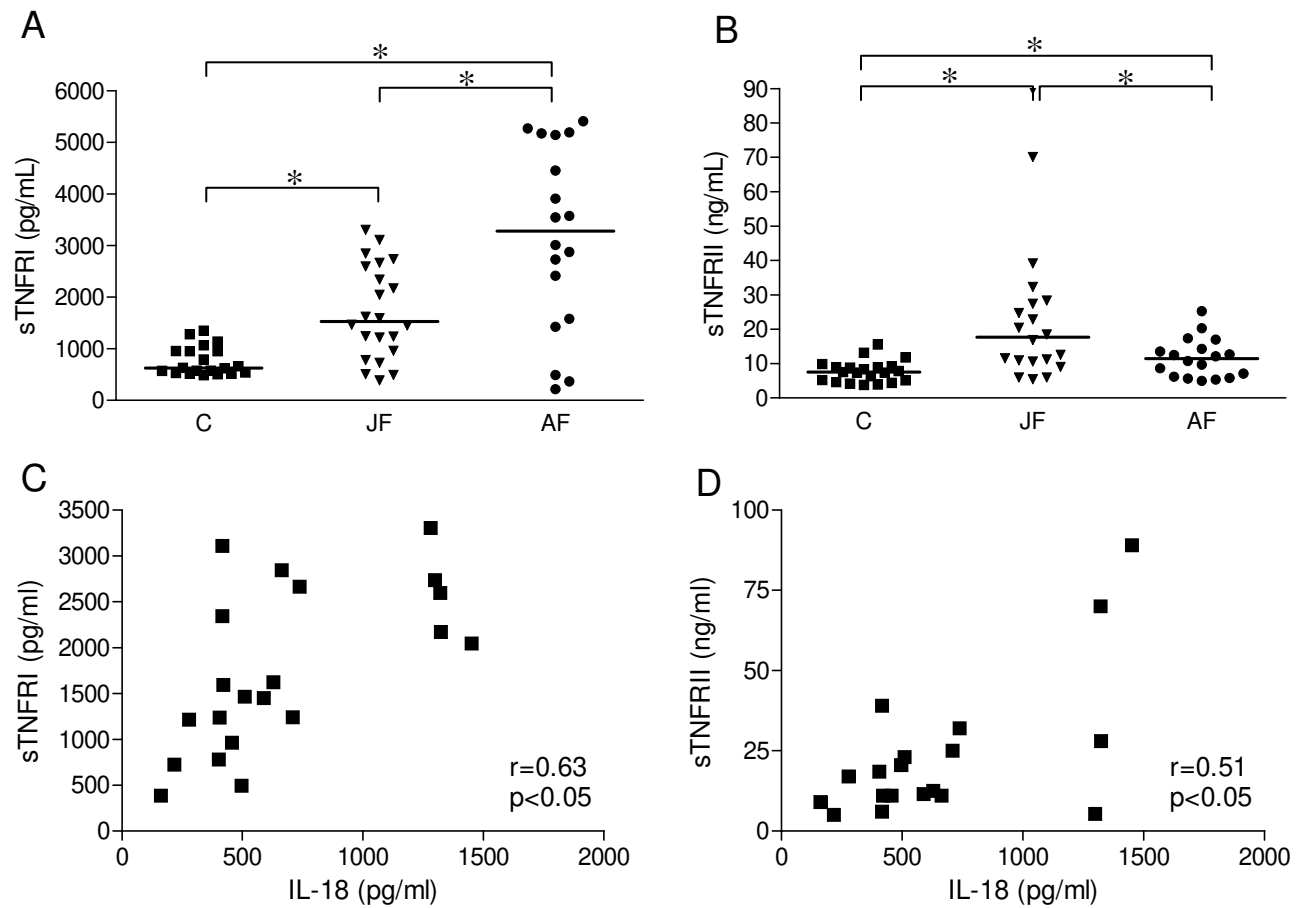


Figure 3- sTNFRI (A) and sTNFRII (B) levels at baseline in serum from patients with the JF and AF of PCM as well as normal controls - C. Horizontal lines represent median. Statistics: Kruskal-Wallis, * p<0.05. Correlation between IL-18 and sTNFRI (C) and TNFRII (D). The values of r and p are represented in the figure. Statistics: Spearman's rank correlation coefficients.

Another important component of the inflammatory reaction are the chemokines that direct the movement of circulating leukocytes to sites of inflammation. No differences were detected among the groups in relation to CCL2 (MCP-1) concentration in sera (data not shown). However the levels of the IFN- γ -induced chemokines CXCL9 and CXCL10 were more elevated in PCM patients, regardless the clinical form, as compared to controls (Fig. 4A and B).

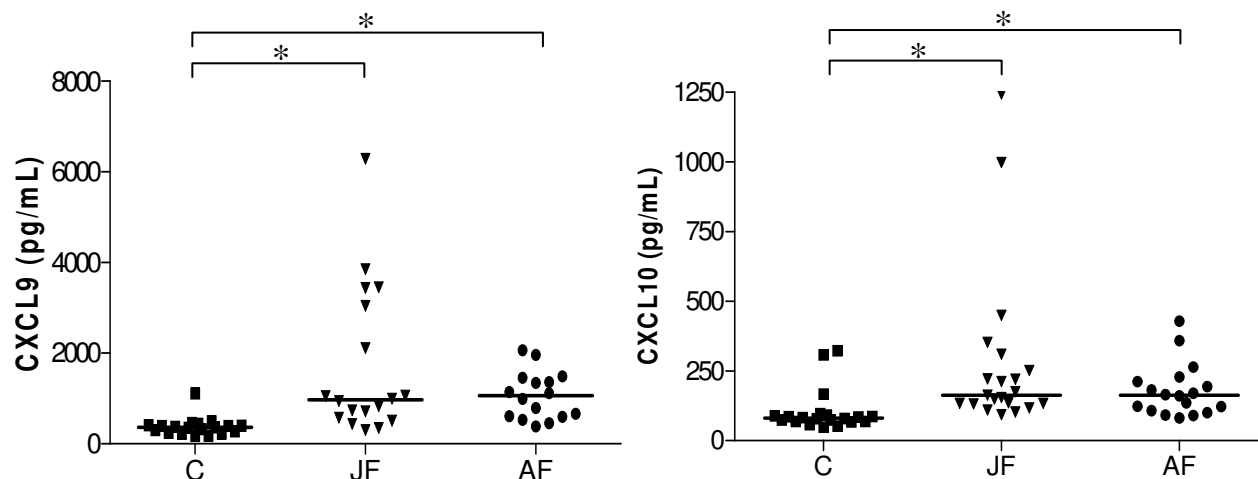


Figure 4- CXCL9 (A) and CXCL10 (B) levels at baseline in serum from patients with the JF and AF of PCM as well as normal controls - C. Horizontal lines represent median. Statistics: Kruskal-Wallis, * $p < 0.05$.

IL-18 and sICAM-1 serum levels decreased significantly during the first year of antifungal treatment in JF patients as compared to AF ones for whom a less pronounced effect was observed. On the other hand, JF patients presented constant levels of IL-12 during the first twelve months of treatment and then showed a strongly decrease until the end of the period, while IL-12 levels markedly dropped in sera from AF patients during treatment (Table II).

Although initial concentration of sTNFRI was more elevated in AF than in JF, the levels almost overlap after 2 years of treatment. sTNF-RII levels was initially more elevated in JF as compared to AF patients and declined substantially after treatment. On the other hand in AF patients the concentration of sTNF-RII remained constant during the analyzed period (Table II).

Table II – Levels of mediators in serum at baseline (T0) and after 1 (T1) and 2 years (T2) of antifungal therapy in patients with juvenile and adult form of paracoccidioidomycosis.

Juvenile Form (JF)			
Mediator	T0	T1	T2
IL-18 (pg/mL)	588.0 (162.2-1450.0)*#	257.9 (103.3-613.3)	250.7 (97.1-364.9)
sICAM-1 (ng/mL)	338.9 (52.6-791.7)*#	173.1 (34.9-396.0)	135.3 (58.6-374.6)
IL-12 (pg/mL)	83.5 (20.9-351.4)	85.8 (9.9-278.5)#	38.8 (5.9-155.1)
sTNFRI (pg/mL)	1530.0 (385.4-3307.0)	2060.0 (430.8-12651.0)	2362.0 (522.6-3366.0)
STNFR II (ng/mL)	17.7 (5.4-89.8)*#	9.3 (3.8-96.0)#	5.8 (4.1-18.7)
CXCL9 (pg/mL)	971.9 (301.7-6285.0)*#	479.5 (272.3-7047.0)	352.6 (273.6-1857.0)
CXCL10 (pg/mL)	163.0 (93.7-1243.0)*#	116.9 (66.7-382.5)	123.8 (53.8-628.1)
Adult Form (AF)			
Parameter	T0	T1	T2
IL-18 (pg/mL)	356.4 (168.9-849.3)*#	277.1 (66.1-664.9)	260.1 (151.3-663.7)
sICAM-1 (ng/mL)	336.6 (196.9-481.4)#	283.9 (54.5-451.6)	236.6 (135.5-402.8)
IL-12 (pg/mL)	91.7 (19.7-270.8)*#	48.2 (8.1-327.4)	61.1 (0.0-131.0)
sTNFRI (pg/mL)	3282.0 (216.0-5415.0)#	2755.0 (862.0-5473.0)	2495.0 (257.0-6287.0)
STNFR II (ng/mL)	11.4 (5.0-25.3)	9.1 (3.7-20.0)	8.6 (4.4-19.2)
CXCL9 (pg/mL)	1054.0 (380.9-2062.0)*	639.4 (369.1-1404.0)	789.9 (241.0-4418.0)
CXCL10 (pg/mL)	162.6 (81.4-428.8)*#	100.8 (68.5-183.0)	107.3 (66.2-193.5)

Results expressed as median (range). Statistics: Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks: (*) Statistical significance ($p < 0.05$) in relation to T1; (#) statistical significance ($p < 0.05$) in relation to T2.

Elevated levels of anti-*P.brasiliensis* IgG, IgE and IgG4 characterized JF of PCM as compared to AF (fig. 5). On the other hand, AF patients presented higher levels of IgG1 as previously described.

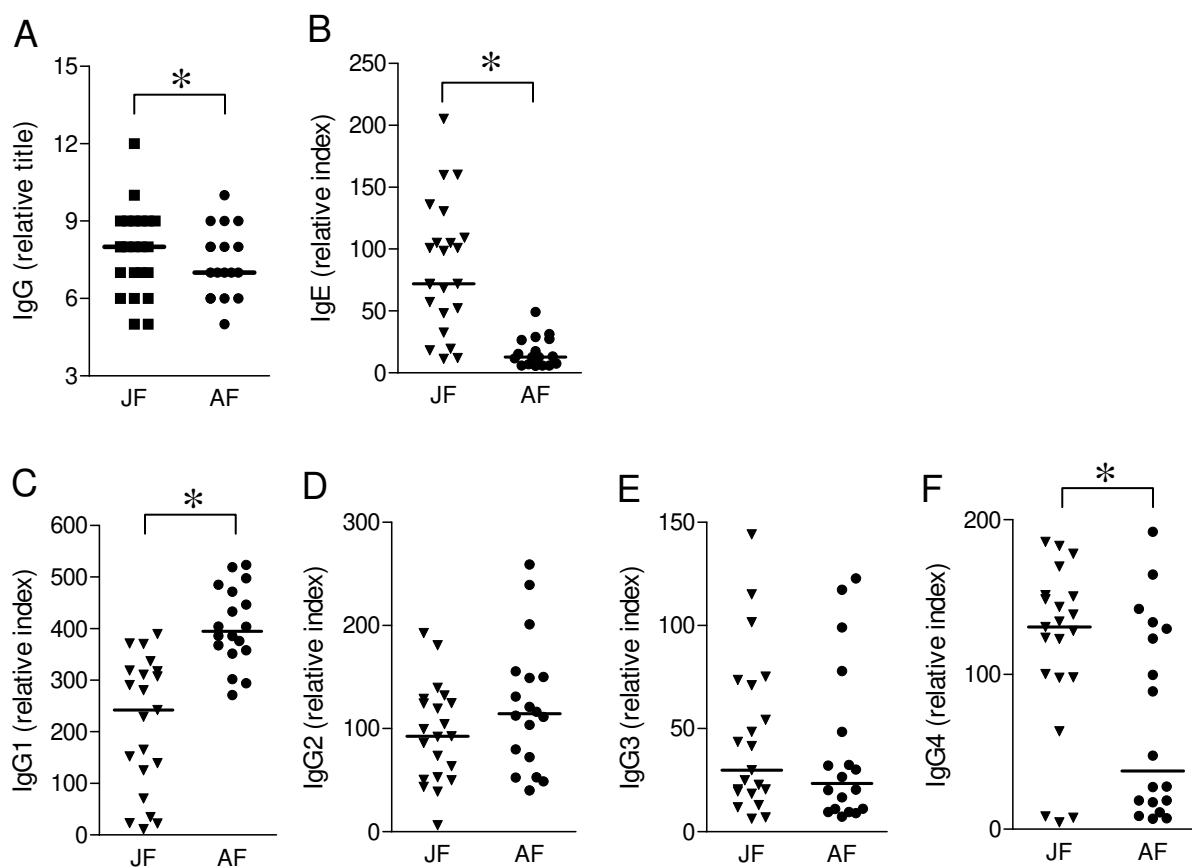


Figure 5- Anti-*P. brasiliensis* IgG (A), IgE (B), IgG1 (C), IgG2 (D), IgG3 (E) and IgG4 (F) at baseline in the serum of JF and AF patients. Horizontal lines represent the median. Statistics: Mann-Whitney, * p<0.05.

JF patients presented constant elevated levels of anti-*P. brasiliensis* antibodies during the whole period, except for IgE, which dropped significantly, and total IgG. On the other hand, all classes of antibodies presented a marked decrease in AF patients (Table III).

Table III- Levels of anti-*P. brasiliensis* total IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 and IgE in serum at baseline (T0) and after 1 (T1) and 2 years (T2) of antifungal therapy in patients with juvenile and adult form of paracoccidioidomycosis.

Juvenile Form			
	T0	T1	T2
Total IgG^a	8 (5-12)#	8 (3-11)#	5 (2-8)
IgG1^b	242.2 (11.2-389.7)	253.6 (15.6-527.5)	68.4 (15.3-393.9)
IgG2^b	92.7 (6.4-192.5)	93.4 (30.8-152.9)	90.1 (28.7-142)
IgG3^b	29.8 (6.3-144.2)	23.7 (7-120.4)	13.2 (8.7-65.6)
IgG4^b	130.7 (4.34-185.7)	131.3 (16.8-188.6)	122.5 (23.2-185.7)
IgE^b	71.9 (11.4-205.3)*#	43.4 (9.8-153.6)	27.4 (6.4-84.7)
Adult Form			
	T0	T1	T2
Total IgG^a	7 (5-10)*#	5 (2-8)	4(2-8)
IgG1^b	394.8 (271.2-523.6)*#	333.9 (107-493.3)	243.7 (29.6-398.0)
IgG2^b	114.4 (40-259.2)*#	93.5 (32.8-214.7)#	71.4 (19.5-172.5)
IgG3^b	23.5 (7.3-122.8)#	18.9 (7.3-87.5)#	14.8 (5.5-44.0)
IgG4^b	37.5 (6.7-192.2)*#	17.5 (5.6-188.7)	14.5 (5.3-145.7)
IgE^b	13.0 (5.8-49.2)*#	7.4 (5.9-33.8)	7.1 (5.5-21.9)

Results expressed as median (range) of Relative Title (a) or relative index (b). Relative title: 1=No reactive; 2=1:800; 3=1:1600; 4=1:3200; 5=1:6400; 6=1:12800; 7=1:25600; 8=1:51200; 9=1:102400; 10=1:204800; 11=1:405600; 12=1:811200. Statistics: Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks - (*) Statistical significance ($p < 0.05$) in relation to T1; (#) statistical significance ($p < 0.05$) in relation to T2.

Discussion

It has been suggested that the complex network of various cytokines play important role in the pathogenesis of PCM [33]. This study showed that IL-18 and sTNFRII levels were elevated in serum of patients with the JF of PCM and associated with disease severity.

IL-18 is important for a pathogen-specific Th1 response and initiation of host defenses against fungal infection [34]. However in mice it was shown that IL-18 is neither required for protection against systemic *P. brasiliensis* infection nor for FasL induction [35]. In the absence of other inflammatory signals or in a situation where the cells are already compromised with a Th2 response IL-18 is able to stimulate IL-4 producing T CD4⁺ cells and in addition, to activate and attract eosinophils to respiratory airways [14]. Patients with PCM, mainly with the JF of the disease, show a predisposition to produce Th2 cytokines (mRNA and protein) in response to specific and nonspecific stimulation [17, 18, 19]. Furthermore eosinophilia is a hallmark for JF PCM, particularly in children [36]. In this context the production of elevated levels of IL-18 in the beginning of *P. brasiliensis* infection may promote the Th2 polarization and consequent exacerbation of the disease in JF patients.

A relationship was observed between IL-18 and sICAM-1 levels in JF patients. IL-18 enhances ICAM-1 expression and might play a potential role in immunoregulation by mediating immune cell infiltration into the tissues. The association of these two mediators and disease severity was very evident for 6 patients of the JF group with markedly high levels of IL-18 (>1250 pg/mL) and sICAM-1 (> 600 ng/mL) and poor prognosis.

In the present study we demonstrated that serum levels of IL-12 were also elevated in patients with PCM, but no differences were observed in relation to the clinical form of the disease. Previous studies of our group showed higher IL-12 production by peripheral blood mononuclear cells stimulated with *P. brasiliensis* antigen [17] as well as higher numbers of IL-12⁺ monocytes [19] in AF than in JF patients. Moreover alveolar macrophages from patients with AF of PCM and pulmonary involvement express high levels of adhesion and co-stimulatory molecules and produce large amounts of IL-12, in

addition to IL-6, TNF- α and MIP-1 α [31]. In this study we measured cytokine levels in serum, which may reflect the actual status of the cytokine network *in vivo* and detected elevated IL-12 levels also in JF patients. Recent findings demonstrated that susceptible mice respond to the *P. brasiliensis* infection with an initial exacerbated innate inflammatory response in the lungs, producing high amounts of pro-inflammatory cytokines as IL-12 and high NO expression, whereas resistant mice present a more controlled response, with mild production of IL-10 and TGF- β 1, and low levels of pro-inflammatory cytokines [37, 38]. In addition to a protective role in infection, data from the experimental model of PCM showed that treatment with rIL-12 diminished *P. brasiliensis* dissemination, although an extensive inflammation is detected in the lungs of infected mice [39].

In this paper we demonstrated that serum levels of sTNFR I and sTNFR II are significantly higher in PCM patients with active disease in comparison to controls. The underlying causative mechanism that explains the elevated levels of sTNF receptors in the serum of granulomatous disease is still unclear. One possible explanation is a compensatory mechanism to down-regulate bioactivity of TNF- α . This hypothesis is supported by the fact that TNF- release by cultured PBMC of PCM patients is significantly higher in patients with active disease [23, 25]. Furthermore, serum levels of sTNFR II were significantly higher in JF patients as compared with AF patients and markedly decreased after treatment. Concentrations of sTNFR II in serum correlates significantly and positively with activity and/or severity of various infectious and inflammatory diseases [10, 11, 40, 41]. In contrast, baseline levels of sTNFR I was higher in AF as compared to JF of PCM suggesting that sTNFR I/II may be differently modulated, contributing to different outcomes of the disease. Moreover, antifungal treatment does not significantly affect sTNFR I levels in both JF and AF patients, showing no relationship to the clinical course of the PCM. These results indicate that sTNFR II, but not sTNFR I levels are closely related to the clinical course and may be used as a severity marker in PCM, although IL-18 levels correlated positively with both in JF patients.

The higher expression of chemokines CXCL10 and CXCL9 in serum of PCM patients may also reflect the IFN- γ -mediated inflammatory response. CXCL10 and CXCL9 are IFN- γ inducible and very effectively attract activated T lymphocytes [42-44]. Both chemokines signal through a common receptor, CXCR3, expressed by memory (CD45RO⁺) T cells, preferentially of the Th1 subset, and by natural killer cells, but not by monocytes or neutrophils [43]. In experimental PCM high levels of CCL5, CCL2, CXCL10 and CXCL9, in addition to a mononuclear cell infiltration were detected in the lungs of mice infected with *P. brasiliensis* [32]. IFN- γ modulates the expression of chemokine and chemokine receptors and determines the cells that infiltrate the lungs of *P. brasiliensis*-infected mice [45]. Moreover, chemokine and chemokine receptors play an important role in granulomatous inflammatory reactions [42] .

In previous papers we [17, 18, 19, 24] and others [37, 46] demonstrated a misbalance between Th1 and Th2 cytokines in PCM, with Th2 cytokines associated to a more severe form of the disease. Here we showed that elevated levels of inflammatory mediators detected at the beginning of the infection are also related to disease activity and severity and may be important to modulate the host adaptive response.

Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] Franco M, Peracoli MT, Soares A et al. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993; 5: 115-49.
- [2] Franco M, Montenegro MR, Mendes RP et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; 20: 129-32.
- [3] Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1987; 25: 5-18.
- [4] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88-91.
- [5] Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S et al. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 1998; 70: 281-312.
- [6] Robinson D, Shibuya K, Mui A et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 1997; 7: 571-81.
- [7] Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 1998; 161: 3400-7.
- [8] Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999; 104: 1393-401.
- [9] Yamano T, Higashi T, Nouse K et al. Serum interferon-gamma-inducing factor/IL-18 levels in primary biliary cirrhosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 227-31.
- [10] Monteleone G, Trapasso F, Parrello T et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163: 143-7.
- [11] Park MC, Park YB, Lee SK. Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 225-9.

- [12] Hoshino T, Wiltout RH, Young HA. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol* 1999; 162: 5070-7.
- [13] Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol* 2000; 1: 132-7.
- [14] Kumano K, Nakao A, Nakajima H et al. Interleukin-18 enhances antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 873-8.
- [15] Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2002; 40: 153-9.
- [16] Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP et al. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 237-41.
- [17] Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect* 2002; 4: 139-44.
- [18] Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine* 2005; 32: 20-9.
- [19] Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* (in press).
- [20] Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-101.
- [21] Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK et al. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986; 137: 245-54.

- [22] Stuyt RJ, Netea MG, Geijtenbeek TB et al. Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunology* 2003; 110: 329-34.
- [23] Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol* 1993; 93: 189-94.
- [24] Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL et al. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2003; 21: 234-41.
- [25] Silva CL, Figueiredo F. Tumor necrosis factor in paracoccidioidomycosis patients. *J Infect Dis* 1991; 164: 1033-4.
- [26] Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 231-40.
- [27] Tai DI, Tsai SL, Chen TC et al. Modulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in chronic hepatitis B and C: the differences and implications in pathogenesis. *J Biomed Sci* 2001; 8: 321-7.
- [28] Itoh Y, Okanoue T, Ohnishi N et al. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1332-40.
- [29] Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E et al. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 4845-9.
- [30] Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-21.

- [31] Fornazim MC, Balthazar A, Quagliato R, Jr. et al. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J* 2003; 22: 895-9.
- [32] Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol* 2003; 163: 583-90.
- [33] Calich VLG, Blotta MHSL. Pulmonary Paracoccidioidomycosis In: Fidel PL, Huffnagle GB. *Fungal Immunology: from organ perspective*. New York: Springer, 2005: 201-27.
- [34] Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 11-24.
- [35] Panagio LA. PhD. Thesis. University of Sao Paulo, Brazil, 2006.
- [36] Benard G, Orii NM, Marques HH et al. Severe acute paracoccidioidomycosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 510-5.
- [37] 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: 615-23.
- [38] Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE et al. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1202-13.
- [39] Arruda C, Franco MF, Kashino SS et al. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol* 2002; 103: 185-95.
- [40] Yao HP, Xia DJ, Zhang LH et al. [Serum levels of sFas, sICAM-1, IL-18 in patients with chronic hepatitis C and their clinical significance]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2002; 31: 2-5.

- [41] Huang ZS, Chiang BL, Hsu KL. Serum level of soluble tumor necrosis factor receptor II (sTNF-R75) is apparently an index of overall monocyte-related infectious and inflammatory activity. *Am J Med Sci* 2000; 320: 183-7.
- [42] Liao F, Rabin RL, Yannelli JR et al. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995; 182: 1301-14.
- [43] Loetscher M, Gerber B, Loetscher P et al. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184: 963-9.
- [44] Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1997; 61: 246-57.
- [45] Algood HM, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 3: S189-93.
- [46] Romano CC, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ et al. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. *Cytokine* 2002; 18: 149-57.



DISCUSSÃO

A resposta imunológica à infecção pelo *P. brasiliensis* é marcada por uma forte resposta inflamatória por parte do hospedeiro e diversos estudos têm demonstrado um aumento na síntese de mediadores inflamatórios em pacientes com PCM, em especial TNF- α , IL-6 e IL-8 (Figueiredo et al., 1993, Neworal et al., 2003). Os resultados obtidos nesse estudo indicam que nas formas mais graves da doença ocorre uma resposta inflamatória exacerbada, que longe de ser benéfica, pode contribuir ou mesmo ser responsável por muitos dos efeitos deletérios observados.

Nossos resultados demonstraram produção sérica elevada de IL-18 em pacientes com PCM, principalmente naqueles com a FJ da doença. Pacientes com a FJ geralmente desenvolvem uma doença de curso mais longo, com recidivas freqüentes e alta letalidade associada a casos com envolvimento abdominal, acompanhado de icterícia e ascite (Benard et al., 1995, Benard et al., 1994, Castro e Del Negro, 1976, Castro e Szynekier, 1981, Goncalves et al., 1998, Londero e Melo, 1983, Nogueira et al., 2006, Nogueira et al., 2001, Ramos et al., 1981, Severo et al., 1996, Simon et al., 2005, Tresoldi et al., 2005). Dentro do grupo estudado alguns pacientes (n=6) se destacaram por apresentar concentrações muito aumentadas de IL-18 (> 1250 pg/mL) e sICAM-1 (> 500 ng/mL). A análise dos prontuários médicos mostrou que se tratavam de casos especialmente graves, com comprometimento visceral e ósseo, resposta mais lenta ao tratamento constatada pelo elevado tempo de internação e óbito decorrente de complicações. A presença de altas concentrações de IL-18 no microambiente dominado por citocinas Th2 poderia ter colaborado para a polarização da resposta resultando na desativação de macrófagos e facilitação do crescimento fúngico.

Em sua tese de doutorado Panagio (2006) verificou que camundongos deficientes (KO) em IL-18 infectados por *P. brasiliensis* apresentavam uma menor carga fúngica e menor taxa de mortalidade, comparado aos animais selvagens. Neste modelo ficou claro que a IL-18 é dispensável na proteção contra o *P. brasiliensis* e que a sua presença pode contribuir para o pior desempenho dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente à infecção e, portanto ser associada à suscetibilidade.

A IL-18 foi inicialmente descrita como uma citocina capaz de, em colaboração com a IL-12, estimular a produção IFN- γ por células Th1, importante na defesa contra microrganismos intracelulares (Micallef et al., 1996). Por outro lado, na ausência de outros sinais inflamatórios ou em um ambiente onde as células já se encontram comprometidas com a resposta Th2, a IL-18 tem a capacidade de estimular células TCD4+ produtoras de IL-4 ou condicionar células a produzir IL-4 em resposta a estimulação antigênica, além de participar da atração de eosinófilos para as vias respiratórias (Kumano et al., 1999; Hoshino et al., 1999). Pacientes com PCM, principalmente aqueles com as formas mais graves e disseminadas da doença demonstram uma predisposição à produção de citocinas Th2, fato evidenciado pela expressão aumentada do RNAm para IL-4, IL-5 e IL-10 após estímulo (Mamoni e Blotta, 2005, Oliveira et al., 2002) ou pela produção *in vitro* destas citocinas (Oliveira et al., 2002, Mamoni e Blotta, 2006).

Os efeitos inflamatórios da IL-18 são relacionados à estimulação da produção de outras citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8 e a expressão de moléculas de adesão (Reddy, 2004). Monócitos humanos estimulados *in vitro* com IL-18 expressam grande quantidade de ICAM-1, enquanto que a expressão de outras moléculas de adesão como CD14, LFA-1, Mac-1, VLA-4 e VLA-5 não é afetada (Stuyt et al., 2003).

Em nosso trabalho encontramos maiores concentrações de sICAM-1 no soro de pacientes com PCM em relação ao grupo controle, sem diferença entre as duas formas clínicas da doença. Entretanto, quando analisamos os pacientes com a FJ da PCM observamos existir uma correlação positiva entre os níveis de IL-18 e sICAM-1, sugerindo haver uma dependência entre estes dois parâmetros. Os níveis de IL-18 e sICAM-1 diminuíram após o tratamento de forma bastante similar, com queda mais acentuada nos pacientes com a FJ da doença, indicando haver uma ligação entre a eficiência clínica do tratamento e a modulação das moléculas envolvidas na resposta imunológica. A relação da IL-18 e do sICAM-1 com a atividade da doença ficou clara, uma vez que houve uma diminuição significativa dos níveis séricos após o tratamento nos pacientes com as duas formas clínicas da doença. De fato, no final do período analisado (2 anos) as concentrações de IL-18 e sICAM-1 decresceram a níveis comparáveis aos observados no grupo controle.

Pacientes com PCM apresentaram concentrações séricas mais elevadas de IL-12, sem diferença entre as formas clínicas. A IL-12 é produzida principalmente por macrófagos ativados e tem como principal função a indução da produção de IFN- γ (Gately et al., 1998; Fieschi e Casanova, 2003). Nos vários trabalhos em que analisamos a produção de IL-12 (Oliveira et al., 2002, Mamoni e Blotta, 2005, Mamoni e Blotta, 2006) observamos concentrações mais elevadas em pacientes com a FA em relação a FJ. Com base nestes dados poderíamos supor que a IL-18, frente a baixa produção de IL-12, contribuiria para a polarização Th2, que caracteriza a resposta imunológica dos pacientes com a FJ da doença.

Os dados referentes ao papel da IL-12 na infecção experimental pelo *P. brasiliensis* são conflitantes. Maior produção de IL-12 foi encontrada em camundongos resistentes à infecção, evidenciando o seu papel na diferenciação da resposta protetora Th1 (Calich e Kashino, 1998; Arruda et al., 2002). O tratamento com IL-12 recombinante diminui a disseminação do fungo para os órgãos, embora ocorra um marcante aumento da inflamação pulmonar (Arruda et al., 2002). Além disso, foi demonstrado que macrófagos de animais suscetíveis estimulados por IFN- γ são capazes de produzir níveis elevados de IL-12 e NO e de controlar a multiplicação do fungo, embora apresentem teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio negativo. Já macrófagos de animais A/J (resistentes) produzem TGF- β , pouco NO, baixa atividade fungicida, porém paulatinamente desenvolvem a imunidade celular (Calich e Blotta, 2005). Outra evidência que associa a gravidade da doença e a elevação da IL-12 foi descrita por Pina et al. (2006), que mostrou que a depleção de polimorfonucleares induz doença mais disseminada e letal em camundongos B10.A, associada com a presença de níveis elevados de IL-12 e IFN- γ .

Embora não tivesse sido possível avaliar os níveis séricos de IFN- γ mesmo utilizando testes de alta sensibilidade, a dosagem de CXCL9 e CXCL10, quimiocinas induzidas por IFN- γ , mostrou concentrações maiores em pacientes com PCM. Tanto a CXCL10, como a CXCL9 são potencialmente quimiotáticas para linfócitos T ativados e sinalizam por meio de um receptor comum, o CXCR3, expresso por células T de memória (CD45RO+), preferencialmente do tipo Th1 e por células NK, mas não por monócitos ou neutrófilos (Romagnani et al., 2001, Sallusto, 1999, Sallusto et al., 1998). Na PCM

experimental altos níveis de CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1), CXCL10 e CXCL9 em associação com infiltrado mononuclear foram detectados nos pulmões de camundongos infectados com *P. brasiliensis* (Souto et al., 2000). Dessa forma, os achados sorológicos do presente trabalho podem significar que a presença das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 no soro dos pacientes seja um reflexo do processo inflamatório ativo mediado por IFN- γ . Entretanto, a intensa resposta inflamatória observada principalmente nos pacientes com a FJ pode inibir a resposta Th1 protetora, tornando-a insuficiente para contrabalançar a alta produção de citocinas Th2.

O TNF- α tem importante função na resposta inflamatória e atua juntamente com IFN- γ na ativação da resposta imune celular, principalmente no que diz respeito a ativação de macrófagos (Xing et al., 2000). Alguns estudos têm demonstrado a participação do TNF- α na resposta ao *P. brasiliensis* (Figueiredo et al., 1993, Neworal et al., 2003, Silva e Figueiredo, 1991), associando-o à resistência à infecção. Macrófagos de camundongos suscetíveis estimulados com antígenos de *P. brasiliensis* produzem somente pequenas quantidades de TNF- α enquanto que as células de camundongos resistentes produzem grandes quantidades dessa citocina (Calich e Kashino, 1998). Outra evidência da importância dessa citocina na PCM é o fato de camundongos deficientes para o receptor do TNF- α serem mais suscetíveis à infecção, quando comparados aos camundongos selvagens (Souto et al., 2000). Além disso, o TNF- α parece ser indispensável para a formação de granulomas, estruturas formadas por reação inflamatória tipicamente Th1, que representam uma tentativa do sistema imunológico em conter a infecção, impedindo a sua disseminação.

Receptores solúveis do TNF podem ser detectados na circulação em processos inflamatórios e infecciosos. Nossos resultados demonstraram concentrações séricas mais elevadas de TNFRI e II em pacientes com PCM, em relação aos indivíduos controles. Os mecanismos envolvidos na elevação destes mediadores no soro de pacientes com doenças granulomatosas ainda não estão claros. Uma explicação possível seria um mecanismo compensatório para contrabalançar a alta taxa de produção de TNF- α na PCM, conforme descrito anteriormente (Silva e Figueiredo, 1991; Figueiredo et al., 1993). Além disso, nos pacientes com a FA foram observadas maiores concentrações de sTNFRI, enquanto que nos pacientes com a FJ prevaleceram os receptores do tipo II. Estes resultados sugerem que os

dois tipos de receptores devem ser modulados de maneira distinta, levando a diferentes formas da doença. Por outro lado, o fato do tratamento antifúngico não afetar significativamente os níveis de sTNFRI indica que este marcador não tem relação com o curso clínico da doença.

Os receptores solúveis do TNF- α além serem importantes marcadores da resposta inflamatória, aparentemente desempenham um papel no controle da resposta imunológica, atuando como supressores dos efeitos mediados pelo TNF- α . Essa modulação fica evidente durante a gestação, quando se observa um aumento na concentração plasmática dos sTNFRs, notadamente o sTNFRI, após o terceiro mês de gestação (Doria et al., 2004).

De maneira geral o tratamento antifúngico resultou em diminuição da concentração dos mediadores inflamatórios, sugerindo que refletem a atividade da doença. No caso da IL-18 e sTNFRII podemos considerar que são marcadores de gravidade, visto que são encontrados em níveis mais elevados nos pacientes com a FJ.

Além destes mediadores, a pesquisa de anticorpos específicos confirmou achados anteriores que mostraram diferenças marcantes quanto aos níveis de IgE e a IgG4 anti-*P. brasiliensis* em pacientes com a FJ e a FA da PCM (Mamoni et al., 2002, Mamoni et al., 2001). Concentrações elevadas de IgE e IgG4, acompanhadas de baixos níveis de IgG1 caracterizam a FJ da PCM, enquanto que o oposto ocorre para os pacientes com a FA da doença. Esses marcadores foram então propostos como indicadores de atividade e gravidade de doença, visto que foram observados em maiores concentrações em pacientes com comprometimento de vários órgãos, nos quais o tratamento demandou maior tempo e utilização de diferentes drogas. A resposta de produção de anticorpos ao tratamento antifúngico revelou que a IgE apresenta queda significativa já no primeiro ano e pode ser associada a melhora clínica do hospedeiro. Por outro lado, a IgG4 mantém-se elevada e constante mesmo na vigência do tratamento, por períodos maiores que 2 anos. Estes resultados refletem a participação de citocinas Th2 na resposta imune na forma juvenil, visto que a IL-4 e a IL-5 atuam como indutores do switch para IgE e IgG4, isotipos predominantes nesta forma clínica da doença. A IL-5 também pode ser relacionada a eosinofilia periférica característica de crianças com PCM. Neste contexto podemos aventar

a possibilidade da participação da IL-18 na polarização Th2 nas formas mais graves da PCM, tendo em vista os elevados níveis séricos e o seu papel na diferenciação de células Th2, na produção de anticorpos da classe IgE (Yoshimoto et al., 2000) e na atração/ativação de eosinófilos (Kumano et al., 1999).

Vários estudos mostraram que a resposta inflamatória pode ter um efeito deletério na PCM. Soares et al. (2001) verificaram que a inibição da produção de prostaglandinas pelo tratamento com indometacina estimula a atividade fungicida de macrófagos, anteriormente incapazes de lisar cepas virulentas de *P. brasiliensis*. Em outros modelos de infecção por microrganismos intracelulares a alta produção de PGE2 por macrófagos foi associada à imunossupressão (Edwards et al., 1986). Antígenos com a capacidade de induzir a liberação de prostaglandinas de macrófagos podem influenciar uma resposta Th1 ou Th2, mostrando que um processo inflamatório que leva a um aumento local de PGE2 pode controlar uma resposta em direção a produção de citocinas Th2 (Betz e Fox, 1991).

Na mesma linha, Ribeiro (2005) em sua tese de mestrado estudou o papel dos leucotrienos na determinação da gravidade da doença em camundongos infectados com o *P. brasiliensis* pela via intratraqueal e constatou que estes mediadores inibem a atividade fungicida de macrófagos facilitando o estabelecimento da infecção.

Desta forma podemos inferir que a interação inicial entre patógeno e hospedeiro que desencadeia uma forte resposta inflamatória não leva necessariamente a uma resposta protetora, mas parece ativar mecanismos regulatórios que suprimem a imunidade celular necessária para o controle da doença, conforme aventado para na PCM experimental (Calich e Blotta, 2005).

Em conclusão os resultados obtidos no presente estudo indicam que a elevação dos níveis séricos de alguns dos marcadores inflamatórios em pacientes com PCM reflete a atividade da doença e que em especial a IL-18 e os receptores solúveis de TNF- α se relacionam à gravidade do quadro clínico. Além disso, podemos pressupor que estes mediadores da resposta inata podem ter um papel importante na fisiopatologia da PCM humana, determinando a qualidade da resposta imunológica adaptativa, conforme sugerido no esquema abaixo (figura 1).

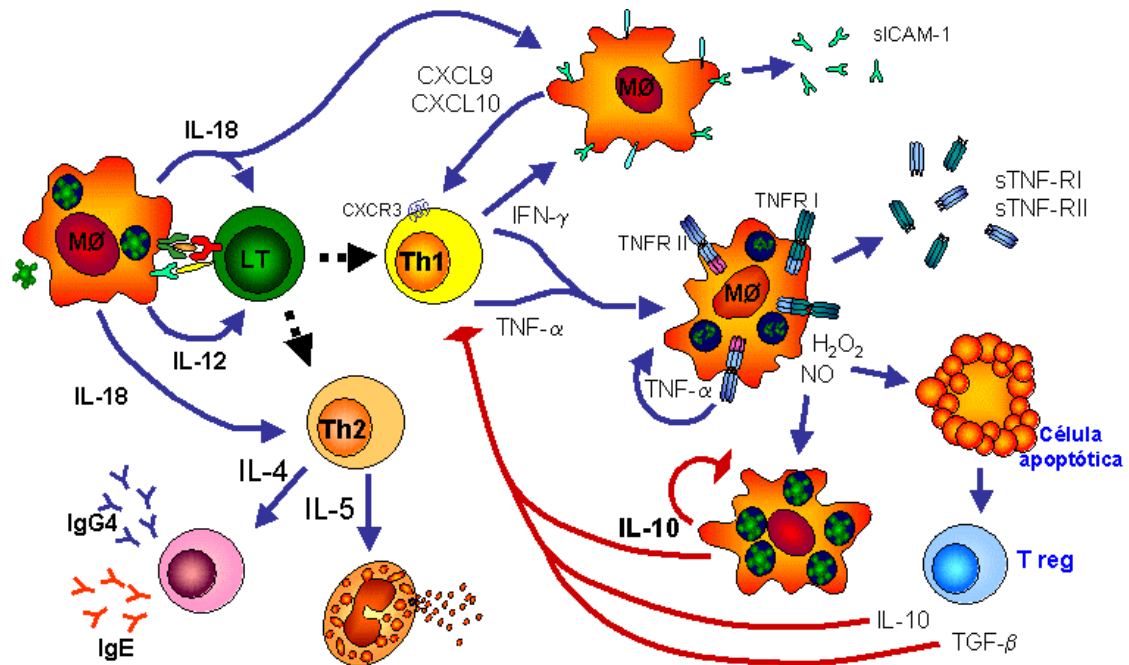


Figura 1- Papel dos mediadores inflamatórios no desenvolvimento da paracoccidioidomicose. Na fase inicial da resposta à infecção pelo *P. brasiliensis* macrófagos (Mφ) ativados produziram citocinas como IL-12 e IL-18 que atuaram sobre células T (LT), estimulando a diferenciação destas em células T helper 1 (Th1). Estas células produziram IFN-γ, que, em conjunto com a IL-18, estimularia a expressão de moléculas de adesão como a ICAM-1 e a produção de quimiocinas como CXCL9 e CXCL10 que iriam atrair e estimular as células Th1 produtoras de TNF-α e IFN-γ. Estas citocinas, por sua vez, atuaram sobre macrófagos estimulando a produção de TNF-α e reativos intermediários de oxigênio (ROI), como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO), importantes na destruição do fungo. Entretanto, em uma resposta exacerbada, concentrações muito elevadas de NO poderiam estimular a produção de IL-10, suprimindo a ativação dos macrófagos, permitindo o crescimento fúngico. Os ROIs também agiriam no tecido levando as células à necrose e apoptose. As células apoptóticas estimulariam células T regulatórias (Treg) a produzirem citocinas supressoras como IL-10 e TGF-β que atuaram no bloqueio da resposta inflamatória e no bloqueio da diferenciação de células Th1, estimulando a diferenciação de células Th2. As células Th2, por sua vez produziram IL-4, estimulando linfócitos B a produzirem anticorpos como IgG4 e IgE, e IL-5 que estimularia a produção e a ativação de eosinófilos. Além disso, a alta produção de IL-18 por macrófagos ativados também polariza a resposta para Th2, levando a disseminação do fungo e aumentando a gravidade da doença.



CONCLUSÕES

Pacientes com paracoccidioidomicose apresentam concentrações séricas basais mais elevadas de IL-18, sICAM-1, IL-12, sTNFR1, sTNFR2, CXCL9 e CXCL10 do que controles normais.

Houve correlação positiva entre as concentrações de IL-18 e sICAM-1 ($r=0.62$, $p<0.0001$), sTNFR1 ($r=0.61$, $p<0.0001$), sTNFR2 ($r=0.64$, $p=0.002$) e também em relação a gravidade da doença nos pacientes com a FJ, indicando haver uma dependência entre estes parâmetros.

A terapia anti-fúngica resultou em significativa diminuição das concentrações séricas de todos os mediadores inflamatórios analisados que, de maneira geral, atingiram os valores encontrados no grupo controle ao final de 2 anos de tratamento.

A pesquisa de anticorpos mostrou níveis basais maiores de IgG4 e IgE nos pacientes com a FJ, enquanto que a IgG1 estava mais elevada naqueles com a FA.

Em conjunto os resultados mostraram que uma forte resposta inflamatória marca a fase inicial da PCM humana e que mediadores como a IL-18 e o TNFR2 parecem contribuir em particular para uma forma mais grave da doença.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arıcan O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm* 2005; 2005:273-9.

Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FR, Fazioli Rdos A, Vaz CA, et al. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol* 2002; 103:185-95.

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

Benard G, Neves CP, Gryschek RC, Duarte AJ. Severe juvenile type paracoccidioidomycosis in an adult. *J Med Vet Mycol* 1995; 33:67-71.

Benard G, Orii NM, Marques HH, Mendonca M, Aquino MZ, Campeas AE, et al. Severe acute paracoccidioidomycosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13:510-5.

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; 13:248-52.

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

Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 1991; 146:108-13.

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

Calich VLG, Blotta MHSL. Pulmonary paracoccidioidomycosis. In: Fidel Jr PL, Huffnagle GB, editors. New York: Springer; 2005. p.201-27.

Calich VL, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31:615-23.

Cano LE, Singer-Vermes LM, Costa TA, Mengel JO, Xidieh CF, Arruda C, et al. Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun* 2000; 68:352-9.

Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84:2068-101.

Castro RM, Del Negro G. Clinical characteristics of paracoccidioidomycosis in children. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1976; 31:194-8.

Castro RM, Szynkier VP. Paracoccidioidomycosis in children. Report on 2 patients. *Hautarzt* 1981; 32:420-2.

Cesano A, Visonneau S, Clark SC, Santoli D. Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12. *J Immunol* 1993; 151:2943-57.

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354:610-21.

Diamond MS, Staunton DE, de Fougères AR, Stacker SA, Garcia-Aguilar J, Hibbs ML, et al. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 1990; 111:3129-39.

Doria A, Iaccarino L, Ghirardello A, Briani C, Zampieri S, Tarricone E, et al. Pregnancy in rare autoimmune rheumatic diseases: UCTD, MCTD, myositis, systemic vasculitis and Behçet disease. *Lupus* 2004; 13:690-5.

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986; 137:245-54.

Edwards CK, 3rd, Hedegaard HB, Zlotnik A, Gangadharam PR, Johnston RB, Jr., Pabst MJ. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-gamma. *J Immunol* 1986; 136:1820-7.

Fieschi C, Casanova JL. The role of interleukin-12 in human infectious diseases: only a faint signature. *Eur J Immunol* 2003; 33:1461-4.

Figueiredo F, Alves LM, Silva CL. Tumour necrosis factor production in vivo and in vitro in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. *Clin Exp Immunol* 1993; 93:189-94.

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

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

Franco M, Bagagli E, Cunha M, Chamma LG, Fecchio D. *Paracoccidioides brasiliensis* antigen batches from the same isolate show immunological and biochemical differences. *Mycopathologia* 1996; 135:13-9.

Franco MV, Goes AM, Koury MC. Model of in vitro granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1997; 137:129-36.

Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:495-521.

Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. *Immunology* 1992; 76:20-3.

Godfried MH, van der Poll T, Jansen J, Romijin JA, Schattenkerk JK, Endert E, et al. Soluble receptors for tumour necrosis factor: a putative marker of disease progression in HIV infection. *Aids* 1993; 7:33-6.

Goncalves AJ, Londero AT, Terra GM, Rozenbaum R, Abreu TF, Nogueira SA. Paracoccidioidomycosis in children in the state of Rio de Janeiro (Brazil). Geographic distribution and the study of a "reservarea". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1998; 40:11-3.

Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, et al. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999; 104:1393-401.

Hoshino T, Wilttrout RH, Young HA. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol* 1999; 162:5070-7.

Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000; 50:184-95.

Itoh Y, Okanoue T, Ohnishi N, Sakamoto M, Nishioji K, Nakagawa Y, et al. Serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors and effects of interferon therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1332-40.

Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJ, van Deutekom H, Speelman P, van der Poll T. Tumor necrosis factor and interleukin-1 inhibitors as markers of disease activity of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1328-31.

Kohyama M, Saijyo K, Hayasida M, Yasugi T, Kurimoto M, Ohno T. Direct activation of human CD8+ cytotoxic T lymphocytes by interleukin-18. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89:1041-6.

Kumano K, Nakao A, Nakajima H, Hayashi F, Kurimoto M, Okamura H, et al. Interleukin-18 enhances antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:873-8.

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

Livonesi MC. Papel de IL-12 e IL-4 na modulação da resposta imune induzida por Paracoccidioides brasiliensis [dissertação]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2001.

Londero AT, Melo IS. Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review. Mycopathologia 1983; 82:49-55.

Mamoni RL, Blotta MHSL. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. Cytokine 2006; (in press).

Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes Paracoccidioides brasiliensis infection from disease. Cytokine 2005; 32:20-9.

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

Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg 2001; 65:237-41.

Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). Cell 1987; 51:813-9.

Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, et al. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. Eur J Immunol 1996; 26:1647-51.

Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, et al. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. J Immunol 1999; 163:143-7.

Montenegro MRG. Formas clínicas da paracoccidioidomicose. Rev Inst Med Trop S. Paulo 1986; 28: 203-4.

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

Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. Cytokine 2003; 21:234-41.

Nogueira MG, Andrade GM, Tonelli E. Clinical evolution of paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. Mycopathologia 2006; 161:73-81.

Nogueira SA, Guedes AL, Wanke B, Capella S, Rodrigues K, Abreu TF, et al. Osteomyelitis caused by *Paracoccidioides brasiliensis* in a child from the metropolitan area of Rio de Janeiro. J Trop Pediatr 2001; 47:311-5.

Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, Ikegami H, Kurimoto M. Development of CD8+ effector T cells is differentially regulated by IL-18 and IL-12. J Immunol 1999; 162:3202-11.

Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. Nature 1995; 378:88-91.

Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. Adv Immunol 1998; 70:281-312.

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; 4:139-44.

Oztas MO, Onder M, Gurer MA, Bukan N, Sancak B. Serum interleukin 18 and tumour necrosis factor-alpha levels are increased in Behcet's disease. Clin Exp Dermatol 2005; 30:61-3.

Panágio LA. O papel de IL-18 e de Fas-L no mecanismo de resistência à infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* [Tese – Doutorado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Parise-Fortes MR, da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, Soares AM, et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. Med Mycol 2000; 38:51-60.

Park MC, Park YB, Lee SK. Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 2004; 23:225-9.

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

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

Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. J Leukoc Biol 2006; 79:1202-13.

Ramos CD, Londero AT, Gal MC. Pulmonary paracoccidioidomycosis in a nine year old girl. Mycopathologia 1981; 74:15-8.

Reddy P. Interleukin-18: recent advances. Curr Opin Hematol 2004; 11:405-10.

Ribeiro LRR. Caracterização do papel dos leucotrienos na paracoccidioidomicose (PCM) pulmonar e na atividade fungicida e secretora de macrófagos peritoneais infectados pelo *Paracoccidioides brasiliensis* [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2005.

Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 1997; 7:571-81.

Romagnani P, Annunziato F, Lazzeri E, Cosmi L, Beltrame C, Lasagni L, et al. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCRgammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood* 2001; 97:601-7.

Romani L, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:611-36.

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

Sallusto F. The role of chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Haematologica* 1999; 84 Suppl EHA-4:28-31.

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19:568-74.

Severo LC, Agostini AA, Londero AT. [Bone involvement in chronic disseminated paracoccidioidomycosis. A report on the first cases in Rio Grande do Sul]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29:241-4.

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

Simon CY, Castro CN, Romero GA. Thoracic adenomegaly as the predominant manifestation of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38:448-9.

Soares AM, Calvi SA, Peracoli MT, Fernandez AC, Dias LA, Dos Anjos AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Immunology* 2001; 102:480-5.

Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, Ferreira BR, et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol* 2003; 163:583-90.

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

Stuyt RJ, Netea MG, Geijtenbeek TB, Kullberg BJ, Dinarello CA, van der Meer JW. Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunology* 2003; 110:329-34.

Tai DI, Tsai SL, Chen TC, Lo SK, Chang YH, Liaw YF. Modulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in chronic hepatitis B and C: the differences and implications in pathogenesis. *J Biomed Sci* 2001; 8:321-7.

Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13:151-3.

Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA, Jr., Goeddel DV. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:9292-6.

Tresoldi AT, Pereira RM, Castro LC, Rigatto SZ, Belanger VM. [Hypercalcemia and multiple osteolytic lesions in a child with disseminated paracoccidioidomycosis and pulmonary tuberculosis]. *J Pediatr (Rio J)* 2005; 81:349-52.

van der Poll T, Lowry SF. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? Shock 1995; 3:1-12.

Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89:4845-9.

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

Ware CF, Crowe PD, Vanarsdale TL, Andrews JL, Grayson MH, Jerzy R, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. J Immunol 1991; 147:4229-38.

Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. J Leukoc Biol 2000; 68:897-902.

Yamano T, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Kariyama K, Yumoto E, et al. Serum interferon-gamma-inducing factor/IL-18 levels in primary biliary cirrhosis. Clin Exp Immunol 2000; 122:227-31.

Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben-Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. Nat Immunol 2000; 1:132-7.

Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, et al. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. J Immunol 1998; 161:3400-7.

Zijlstra EE, van der Poll T, Mevissen M. Soluble receptors for tumor necrosis factor as markers of disease activity in visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1995; 171:498-501.



ANEXOS

Pacientes com a Forma Juvenil da PCM

Paciente	Sexo	Idade	Sintomas	Eosinófilos/ VHS	Internação	Ultra-som / RX Cintilo	Sorologia / outros Exames	Tratamento
APRC	F	18	LNmegalia , esplenomegalia, febre, vômito	43% 108mm	20 dias	Raio X: Baço aumentado Tomografia: Hepatoesplenomegalia, LNmegalia	1/16, 1/8 Punção de LN: positivo, Biópsia (medular óssea): positiva	11/03 Bactrim
ACS	M	16	LNMegalia, Hepatoesplenomegalia, emagrecimento, febre	16%	19 dias	Raio X: Fígado e baço aumentados, LNmegalia	1/1024 Biópsia (pele): positiva	05/00-Itraconazol 11/00- Bactrim
ARC	M	19	LNmegalia crônica	10,5%	–	–	NR, Biopsia (LN axilar): positiva	07/03 Bactrim
AAR	F	18	Dor abdominal, emagrecimento, LNmegalia	12%	–	Raio X: Hepatoesplenomegalia, LN retroperitoneal, derrame pleural	1/128, 1/64, 1/32, 1/4, 1/16, 1/8	10/97 Bactrim 03/98 Itraconazol
CDL	F	14	LNmegalia,	32,7% 83mm	5 dias	Raio X: LN e baço aumentados Raio X (depois de um ano): normal	1/64, 1/256, 1/64, 1/16, 1/8, NR (vários)	Bactrim 2 anos (97-99)
DAPC	M	24	Feridas no rosto e LNmegalia	4% / 87mm recidiva 5,5% / 14mm	8 dias	Raio X: Hepatoesplenomegalia, LNmegalia retroperitoneal	1/64, 1/256, 1/32, 1/16, 1/8 recidiva 1/32	Bactrim (97-00) Recidiva 01- Itraconazol
EAC	F	35	Emagrecimento, LNmegalia cervical e inguinal	8,4% 24mm	–	Raio X e Ultra-sonografia normais	1/32, 1/8, ¼, 1/1, NR	08/02 Bactrim
FYP	M	16	Febre, adenomegalia, hepatoespleno, lesões cutâneas	43% 84mm depois diminuiu	3 dias	Raio X: LNmegalia intraperitoneal, hepatomegalia, microabcessos baço	1/16, 1/4, NR Biópsia (pele): positiva FALC 3150U/L	04/03 Itraconazol
GPS	F	9	Lesão no tronco; LNmegalia; Febre, eosinofilia	36,8% 103mm	1 semana	Raio X: Derrame pleural, hepatoesplenomegalia, LNs peritoneais	1/32, 1/16, 1/8, 1/8 Exame direto: positivo	11/03 Bactrim
JAR	M	17	LNmegalia	8% 116mm	1 mês (pneumonia bacteriana)	Raio X e Ultra-sonografia: LNmegalia, hepatoesplenomegalia, Cintilografia: positiva	1/64, ¼, NR, NR Punção LN: positiva	07/01 – Bactrim
JOMS	M	27	Febre, LNmegalia	14,1% 64mm	–	Raio X: LNmegalia, hepatomegalia Citilografia: normal	1/16 demais NR Biópsia (ext): positiva	(01-03) Bactrim
KA	M	6	LNmegalia, emagrecimento, febre	15-32% Recidiva 46% 119mm	1° - 24 dias 2° - 23 dias	Raio X: Hepatoesplenomegalia, ascite, LN retroperitoneal	1/512, 1/64, 1/32, 1/16, 1/8 Recidiva 1/32	07/02- Bactrim, Itraconazol

LSC	M	14	Dor abdominal, vômito, diarreia, febre, LNmegalia	14,6%	5 dias (ext) 31 dias	Raio X: LNmegalia (98 e 99)	1/512, 1/64, 1/64, 1/32, 1/16, 1/8, 1/8, NR Exame Direto (LN): positivo	98- Bactrim 03/99 – Itraconazol
LRT	F	17	Dor na garganta, LNmegalia	8,4%	–	Raio X: normal	1/8, 1/16	02/03- Bactrim
MSCPR	F	20	Dor de garganta, LNmegalia cervical, disfagia, fraqueza	7,24%	1° - 14 dias 2° - 36 dias 3° - 11 dias	Cintilografia: positiva	1/32, 1/512, 1/512, 1/256, 1/64, 1/32, 1/16, 1/8, 1/8, ½ Biópsia (LN): positiva	00 – Bactrim + Itraconazol
MMFB	M	27	comprometimento do estado geral, emagrecimento, LNmegalia generalizada, múltiplas lesões de pele, lesões de orofaringe, duodenite fúngica, hepatoesplenomegalia,	20-24% 134-1100 mm	1° - 18 dias 2° - 13 dias		1/4, 1/8	
NMJ	M	9	Febre, emagrecimento, dor abdominal	12% 113mm	1° - 16 dias 2° - 4 dias	Ultra-sonografia.: Hepatopatologia crônica, esplenomegalia e múltiplas LNmegalias	1/16 Biópsia (Fígado): positiva	05/03 - Bactrim
RAS	M	26	Hepatite C, abscesso lombar, PCM disseminada	25%	14 dias Óbito	Ultra-sonografia: Hepatoesplenomegalia	1/32, 1/16, 1/2, NR	08/ 99 - Bactrim
RAL	M	30	Dor abdominal, LNmegalia generalizada	20% 65mm	–	–	1/64, outros NR Pesquisa de fungo (LN) positiva	08/01 – Bactrim
SRF	F	18	Emagrecimento, vômito, Lnmegalia cervical	16,2%	7 dias	Raio X: Hepatoesplenomegalia, LNmegalia retroperitoneal Ultra-sonografia: Hepatomegalia discreta, LNmegalia perihepatica	1/512, 1/16, 1/8, 1/32, 1/256, 1/128, 1/8 ...	08/98- Bactrim 1 mês – Itraconazol 06/02 – Bactrim
SS	M	16	Hepatoespleno, febre, lesões cutâneas	4%	6 dias Óbito	Raio X: Hepatite crônica granulomatosa, colestase intrahep.	1/128 Pesquisa de Fungo: positiva para: Líquido Pleural, Raspado de Pele e Aspirado de LN	06/03 – Itraconazol
SSP	F	21	Dor abdominal, LNmegalia	7%	2° - 14 dias	Cintilografia: positiva	1/4, 1/2, 1/1, 1/4, 1/4 Pesquisa de fungo (punção LN): positiva	10/00 – Anfotericina B
SE	M	41	Dor abdominal, Lnmegalia	12,3% 87mm	–	–	1/512, 1/64, 1/16, 1/8	11/03 - Bactrim

Pacientes com a Forma Adulta da PCM

Paciente	Sexo	Idade	Sintomas	Eosinófilos/ VHS	Internação	Ultra-som / RX Cintilo	Sorologias / outros Exames	Tratamento
AVS	M	45	Tosse, dispnéia	26,9% 19mm	–	Cintilografia: Opacidade retículo-nodular em campos pulmonares Raio X: LNmegalia, opacidade bilateral	1/16, 1/8, 1/8, 1/8, 1/2, 1/4, ...	04/01- Bactrim
AFMS	F	34	Lesão granulomatosa, emagrecimento, tosse	12,5% 9mm	–	–	1/8 Pesquisa de Fungo: (escarro): positiva para leveduras e filamentos	05/02 - Bactrim
AAF	M	45	TB pulmonar tratada Febre e sudorese noturna, dispnéia, tosse produtiva, lesões na língua	1,5%	7 dias	Raio X – Opacidade heterogênea, hiperinsuflação pulmonar	1/16, 1/8, 1/16, 1/16, 1/8, 1/2, 1/2, NR, 1/1, 1/1 Pesquisa de Fungo (escarro): positiva	09/97 - Bactrim
FC	M	68	Tosse, febre, emagrecimento	2,6%	–	Raio X: opacidade intersticial de padrões reticulares	1/16, 1/32, 1/16, 1/4, 1/4, 1/4, ... ,	08/96 - Bactrim
JAPB	M	42	Recidiva: ferida na boca	4,7% 7,3%	–	Raio X – Hiperinsuflação pulmonar Recidiva: Cintilografia: processo infeccioso/inflamatório em atividade	1/8, 1/8, 1/2, 1/1, 1/1, NR, 1/1 recidiva: 1/8 até 1/1	11/87 – Bactrim
JAO	M	33	Garganta seca com tosse, nódulos nas axilas	24,2% 10,9mm		Raio X normal	1/32, 1 /4, 1/128, 1/16, 1/16, 1/ 4, ..., Biópsia (gânglio): positiva	03/95-Bactrim, 02/00- Itraconazol, 09/00- Cetoconazol
JCS	M	64	Tosse produtiva, emagrecimento, dispnéia	5,66%	–	Raio X – Opacidade retículo-nodular	1/32, 1/64, 1/16, 1/4, 1/2, 1/1, 1/1, NR	09/99- Bactrim
JT	M	60	Lesão de lábio, emagrecimento e rouquidão	13,4%	14 dias	Raio X – Opacidade heterogênea, hiperinsuflação pulmonar	1/8, 1/4, 1/1, NR, NR Biópsia (lesão lábio inf.): positiva	06/99 – Cetoconazol
JLG	M	40	Tumorações cervicais, emagrecimento	9,74%	–	Raio X – Opacidade heterogênea reticular Cintilografia: processo infeccioso/inflamatório em atividade	1/16, 1/8, 1/4, 1/4, 1/1, 1/2, 1/1, 1/1, NR Biópsia (amídala): positiva	02/99- Bactrim
JMTF	M	57	Emagrecimento, dispnéia	2,7%	–	Raio X: Opacidade heterogênea difusa bilateral, opacidade retículo-nodular	1/16, 1/8, 1/8, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, ... Pesquisa de Fungo (escarro): positiva	93 por 3 meses, Recidiva 97/98 Recidiva 2001

LAL	M	42	Emagrecimento, tosse, dispnéia	6,03%	5 dias	Raio X – Opacidade intersticial	1/8, 1/8, 1/1, 1/1, NR ...NR Pesquisa de Fungo (lesões orais): positiva	99 suspenso 01/00 - Bactrim
MJNFS	F	40	Biópsia brônquica com uso de bactrim	1,8%	9 dias	Cintilografia: processo infeccioso/inflamatório em atividade	1/4, 1/2, 1/1, 1/2, 1/2, NR Pesquisa de Fungo (escarro): positiva	99- Bactrim
MAT	M	69	Edema no lábio, lesões mucosa oral, dor de garganta, emagrecimento	12%	–	Raio X – Opacidade reticular, hiperinsuflação pulmonar	1/8, 1/8, 1/4, 1/1, 1/1, 1/2, 1/1, 1/1, NR Biópsia (mucosa oral): positiva	(00-02) - Bactrim
NCM	M	50	Lesão no assoalho da boca, aparecimento de nódulos submandibulares	3% 14mm	–	Cintilografia: processo infeccioso/inflamatório em atividade Raio X: normal	1/2, 1/1, NR... Biópsia (mucosa gengival): positiva	09/01 - Bactrim
OB	M	47	Odinofagia resistente, dor de garganta, tosse, lesão palato	2,22%	–	–	1/16, 1/4, 1/2, 1/4, 1/2, 1/8 Biópsia (epiglote e lesão Prega vocal): positivas	02/99 – Bactrim
OD	M	62	Lesão, rouquidão e dispnéia	6,7%	–	Raio X: discreto infiltrado intersticial	1/2, ... 1/1, NR Biópsia (prega vocal): positiva	03/97 - Bactrim
SMS	M	53	Tosse seca, dispnéia, febre vespertina	0,93%	–	–	1/32, 1/16, NR, NR	06/98-Bactrim
TRG	F	46	Lesão mucosa labial	5,5%	–	Raio X – Opacidade linear na periferia campo médio à esquerda	1/32, 1/4, 1/4, 1/4, 1/2, 1/2 Pesquisa de Fungo (mucosa jugal): positiva Biópsia (mucosa oral): positiva	02/01- Bactrim