



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES
COM CANDIDÍASE VAGINAL RECORRENTE**

LUCAS PEDREIRA DE CARVALHO

**Salvador - Bahia - Brasil
2002**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

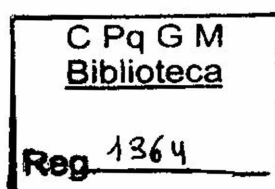
**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM
CANDIDÍASE VAGINAL RECORRENTE**

LUCAS PEDREIRA DE CARVALHO

Orientadora: Dra. AMÉLIA RIBEIRO DE JESUS

Dissertação apresentada ao curso
de pós-graduação em Patologia
como pré-requisito para obtenção
do título de Mestre em Patologia
Experimental

Salvador - Bahia
2002



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Carvalho, Lucas Pedreira de
C331a Avaliação da resposta imune em pacientes com candidíase vaginal recorrente
/ Lucas Pedreira de Carvalho. - Salvador: Faculdade de Medicina da
Universidade Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ,
2002.
7=f. : il. tab.

Dissertação (Mestrado em Patologia)- Universidade Federal da Bahia, 2003.

1. Candidíase vaginal. 2. Imunidade. I. Título.

CDU 616.934:577.27

616.934:577.27
C 331a

100
100
100

LUCAS PEDREIRA DE CARVALHO

FOLHA DE APROVAÇÃO

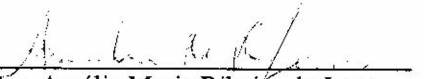
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Lain P. de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos
Pesquisadora Titular
CPqGM - FIOCRUZ



Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus
Médica e Pesquisadora
Serv. de Imunologia do HUPES/UFBA

LISTA DE ABREVIATURAS

α IL-4	Anticorpo monoclonal anti-IL-4
α IL-10	Anticorpo monoclonal anti-IL-10
CD	Cluster of differentiation (marcador de membrana celular)
Células NK	Natural Killer
Células Th1	Células T helper (Auxiliadora) tipo 1
Células Th2	Células T helper (Auxiliadora) tipo 2
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (ensaio imuno-enzimático)
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
mAb	Anticorpo monoclonal

PCR	Polimerase chain reaction (reação de polimerase em cadeia)
PGE2	Prostaglandina E2
PHA	Fitohemaglutinina
PPD	Derivado Protéico purificado do <i>M. tuberculosis</i>
PWM	Pokeweed
RAPD	DNA polimórfico amplificado randomicamente
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TT	Toxoíde Tetânico

RESUMO

AValiação DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM CANDIDÍASE VAGINAL RECORRENTE. LUCAS PEDREIRA DE CARVALHO. A candidíase vaginal recorrente é uma doença de distribuição mundial causada pelo fungo do gênero *Candida*. Caracterizada pela ocorrência de pelo menos 4 episódios de candidíase no período de 1 ano, esta doença atinge cerca de 5% das mulheres sadias no mundo. O mecanismo pelo qual ocorre a transformação da *Candida* da sua forma não patogênica para a forma patogênica não é esclarecido. Trabalhos contraditórios tem sido publicado a respeito da imunopatogênese da candidíase vaginal recorrente. Enquanto alguns estudos mostram diminuição da resposta linfoproliferativa e do teste intradérmico de hipersensibilidade tardia para o antígeno de *Candida* nestas pacientes, outros não encontram diferença entre os níveis de citocinas de pacientes com candidíase vaginal recorrente e mulheres sadias. Resposta alérgica (hipersensibilidade tipo I) com altos níveis de IgE e presença de eosinófilos também tem sido reportadas em pacientes com candidíase vaginal recorrente. O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar a resposta imune em pacientes com candidíase vaginal recorrente e avaliar o papel de citocinas e antagonistas de citocinas na modulação da resposta imune nestas pacientes. Participaram deste estudo 20 pacientes com diagnóstico de candidíase vaginal recorrente e 7 mulheres com candidíase vaginal esporádica como controle. Para a análise da resposta linfoproliferativa e para a dosagem de citocinas, CMSP foram lavadas e incubadas em presença de antígeno de *C. albicans*, PPD, TT ou PHA por 72 horas para a dosagem de citocinas ou 5 dias para o ensaio de transformação blástica. Em algumas culturas foram adicionadas anticorpos monoclonais anti-IL4, anti-IL10 ou IL-12 humana recombinante. A resposta linfoproliferativa foi realizada através da incorporação de 3H Timidina e a dosagem de IFN- γ , IL-5 e IL-10 foi realizada pela técnica de ELISA sanduiche. Todas as pacientes com candidíase vaginal recorrente tiveram teste de hipersensibilidade tardia para o antígeno de *C. albicans* negativo. A resposta linfoproliferativa para o antígeno de *C. albicans* foi baixa nas 7 pacientes nas quais foi feita a avaliação (1239 ± 861 cpm). Índices de estimulação mais elevados ($p < 0,05$) foram observados quando PPD (IE=4,5) ou TT (IE=32) foram utilizados como estímulo nas culturas destes, pacientes em comparação com culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* (IE=1,3). A produção de IFN- γ em 19 pacientes variou de 0 a 1132 pg/ml com média e desvio padrão de 144 ± 329 pg/ml. Ausência de produção de IFN- γ foi observada em 8 pacientes, baixa produção foi observada em 9 pacientes e apenas 2 pacientes produziram níveis elevados de IFN- γ . Nos sobrenadantes de culturas de células mononucleares de mulheres com candidíase vaginal esporádica foram encontrados altos níveis de IFN- γ quando estimuladas com antígeno de *C. albicans* (353 ± 248 pg/ml). Baixos níveis de IL-5 e IL-10 foram encontrados nos sobrenadantes de culturas de pacientes com candidíase vaginal recorrente estimuladas com antígeno de *C. albicans* (39 ± 60 pg/ml e 16 ± 32 pg/ml, respectivamente). A adição de anticorpos monoclonais anti-IL-10 às culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* restaurou a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ de 889 ± 339 cpm, para 3421 ± 1908 cpm e de 64 ± 70 pg/ml, para 750 ± 753 pg/ml respectivamente. A adição de anticorpos monoclonais anti-IL-4 não restaurou a resposta linfoproliferativa ou a produção

de IFN- γ . A adição de IL-12 recombinante humana foi capaz de restaurar a produção de IFN- γ de todas as pacientes com candidiase vaginal recorrente ($p = 0,0004$). Pacientes com candidiase vaginal recorrente apresentaram altos níveis de IgE sérica específica para o antígeno de *C. albicans*, embora não tenha havido diferença entre os níveis de IgE sérica antígeno específica quando estes dados foram comparados com os níveis encontrados em controles. Estes resultados indicam que a maioria das pacientes com candidiase vaginal recorrente apresentam uma incapacidade de produzir IFN- γ quando células mononucleares são estimuladas *in vitro* com antígeno de *C. albicans* e que a neutralização de IL-10 ou a adição de IL-12 restaura esta produção. Estes dados contribuem para o entendimento da imunopatogênese desta importante enfermidade e abre perspectivas para a utilização da imunoterapia no tratamento da candidiase vaginal recorrente.

ABSTRACT

Recurrent vaginal candidiasis is defined by the occurrence of at least four episodes of vulvovaginal candidiasis in one year, affecting up to 5% of women in reproductivity age. Although several species of candida can cause disease in humans, recurrent vaginal candidiasis is predominantly associated with *C. albicans*. *Candida* can be isolated from the vagina in 25% of healthy women without symptoms. The pathogenesis of recurrent vaginal candidiasis is not well established. While absent or low lymphoproliferative responses to *C. albicans* antigen have been noted in a previous reports, similar levels of IL-2 and IFN- γ have been detected in women with recurrent vaginal candidiasis when compared with controls with isolated candidiasis. Additionally, expression of Th1 cytokines have been documented in cells recovered from vaginal fluid in recurrent vaginal candidiasis patients. In this study, the cell-mediated immune response of twenty women with recurrent vaginal candidiasis and seven women with sporadic candidiasis were evaluated. All patients had a negative delayed type hypersensitivity to *C. albicans* antigen. Different of cultures stimulated with PPD or TT (IE=4,5; IE=32, respectively), low lymphoproliferative response was found in cultures of recurrent vaginal candidiasis patients stimulated with *C. albicans* antigen (IE=1,3) The levels of IFN- γ in supernatants of peripheral blood mononuclear cells stimulated with *Candida albicans* antigen, PPD and tetanus toxoid were 198 ± 389 pg/ml; 739 ± 774 pg/ml and 1085 ± 546 pg/ml, respectively. High levels of IFN- γ were detected on cells supernatants of women with sporadic candidiasis (353 ± 248 pg/ml). Low levels of both IL-5 and IL-10 were detected in cells supernatants from patients (39 ± 60 pg/ml e 16 ± 32 pg/ml, respectively). To evaluate the possible role of IL-4 and IL-10 modulating the lymphoproliferative response and IFN- γ production, monoclonal antibodies against these cytokines were added to *C. albicans*-stimulated cultures . While neutralization of IL-4 did not restore lymphocyte proliferation or IFN- γ production, neutralization of IL-10 enhanced lymphoproliferative response by 3,8 fold and IFN- γ production from 64 ± 70 pg/ml to 750 ± 753 pg/ml. The addition of recombinant IL-12 restored IFN- γ production ($p = 0,0004$). Although high levels of *Candida*-specific IgE were detected on serum of patients with recurrent vaginal sera, there was no difference between the two groups studied with regards to IgE levels. This study shows that patients with recurrent vaginal candidiasis have an impairment of cell mediated immune response specific to *C. albicans* antigen, and that IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines of this disease. This data not only contribute to the understanding of pathogenesis of this disease but also open opportunity to the use of immunotherapy in the treatment of patients with recurrent vaginal candidiasis.

Agradecimentos

A Dra. Amélia Ribeiro de Jesus pela disponibilidade, paciência e competência com a qual vem me orientando, peças essenciais para uma boa formação.

Ao Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, meu pai e ídolo, a quem devo grande parte de meu aprendizado científico adquiridos até então, pelos dias e noites de dedicação, questionamentos e ensinamentos.

A Dra. Iracema Pedreira de Carvalho, minha mãe e amiga, pelo seu incentivo e sua credibilidade, arsenais os quais enriquecem ainda mais qualquer vitória e potencializam a retomada após a derrota.

A Dra. Maria Olívia Amado Bacellar, colaboradora direta deste trabalho, pelo seu companheirismo e seus ensinamentos constantes, os quais usufruo desde os primórdios da minha formação.

A Dra. Nílma Antas Neves, colaboradora de fundamental importância para este estudo, sem sua participação não seria possível a realização deste.

Ao Dr. Manoel Barral-Netto e Dra. Aldina Barral pelos seus ensinamentos durante o período de iniciação científica.

A Sara Timóteo Passos por seu incentivo, correções e por seus momentos de lucidez nos meus de aflição.

Ao Dr. Albert Schriefer, amigo que vem contribuindo com a minha formação científica na área de Biologia Molecular.

Ao Dr. Sérgio Arruda, amigo, por seus ensinamentos durante a iniciação científica.

A Gloria Órge, pela contribuição com sua experiência na padronização das sorologias.

Aos colegas de pós-graduação: Almério, Cristian, Daniela, Elves, Isadora, Maonel, Rabelo, Rejane.

A Dilma Simplício, pela sua disponibilidade e pelo seu apoio técnico na coleta de material.

A Elbe Mirtes, a qual vem contribuindo com correções e preparação final dos manuscritos.

A Jackson Lemos, Lúcia Reis, Orlando e Clenildo os quais vem contribuindo com suporte técnico- administrativo nas diversas atividades dos Serviço de Imunologia.

Aos demais amigos do Serviço de Imunologia e a aqueles que de certa forma contribuíram para a realização deste estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	02
1.1	Aspectos gerais e epidemiológicos.....	02
1.2	Diagnóstico e tratamento da candidíase vaginal.....	03
1.3	Resposta imune na candidíase vaginal.....	05
1.4	Modelos experimentais de candidíase vaginal.....	06
1.5	Imunologia da candidíase vaginal humana.....	09
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	HIPÓTESE.....	15
4	OBJETIVOS.....	15
4.1	Objetivo geral.....	15
4.2	Objetivos específicos.....	15
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
5.1	Pacientes e controles.....	16
5.2	Antígeno.....	17
5.3	Teste cutâneo de hipersensibilidade tardia.....	17
5.4	Teste de transformação blástica.....	18
5.5	Determinação de citocinas.....	18
5.6	Dosagem de IgE.....	19
5.7	Análise estatística.....	20
5.8	Considerações éticas.....	20
6	RESULTADOS.....	21
7	DISCUSSÃO.....	41
8	SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	50
9	CONCLUSÕES.....	51
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
11	CONSENTIMENTO INFORMADO.....	69
12	ANEXOS.....	66
12.1	Artigo científico.....	73

I INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

As leveduras do gênero *Candida*, estão amplamente distribuídas na natureza, podendo algumas espécies viver em vida saprofítica ou parasitária em tecidos humanos e outros animais. Inicialmente identificadas por Berkhout em 1923, hoje já são descritas mais de 180 espécies de *Candida*, contudo a *Candida albicans* é a principal espécie responsável por infecções no homem, seguida da *Candida parapsilopsis* e a *Candida tropicalis* (Fleury 1981). Os indivíduos infectados pela *C. albicans* podem ser completamente assintomáticos, apresentar manifestações clínicas variadas ou infecções repetidas. A candidíase bucal e a candidíase vaginal são as formas mais frequentes da infecção causada por fungos do gênero *Candida* (Epstein 1984). A candidíase oral é um achado comum em recém nascidos e em indivíduos com prótese dentária, tendo repercussão clínica limitada (Dorey 1985). A candidíase oral grave, principalmente com extensão para esôfago produzindo esofagite, sugere um estado de imunodeficiência (Challacombe 1994). Em crianças, uma forma grave de candidíase é a candidíase mucocutânea. A candidíase mucocutânea é caracterizada pela ocorrência de lesões tegumentares, principalmente na pele, unhas e mucosas, persistentes e recidivantes onde a falha terapêutica é observada (Kirkpatrick 1989). Nestes pacientes existe uma deficiência imunológica, e, embora as lesões cutâneas e mucosas sejam graves, o comprometimento profundo visceral não é um quadro frequente (Kirkpatrick 1989). Em adultos, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Carpenter 1989) e o uso de drogas imunossupressoras são as principais causas dos quadros de candidíase grave (Klein 1984, Macher 1988). Nestes casos pode haver infecção de todo o trato digestivo e também invasão sistêmica deste patógeno (Klein 1984). Os fungos do gênero *Candida* são considerados agentes oportunistas, devido à alta prevalência da candidíase em indivíduos tratados com drogas imunossupressoras, como os transplantados ou em portadores de doenças associadas

com imunossupressão como pacientes com diabetes mellitus e com AIDS (Dahl 1997, Klein 1984, Macher 1988).

A candidíase vaginal é freqüente em mulheres durante a vida reprodutiva. Embora não seja classicamente considerada uma doença sexualmente transmissível, cerca de 3 em cada 4 mulheres irão experimentar pelo menos um episódio de candidíase vaginal durante sua vida sexual ativa (Sobel 1988). A candidíase vaginal recorrente é caracterizada pela ocorrência de no mínimo quatro episódios de candidíase vaginal no período de um ano. A *Candida albicans* é responsável por 85 a 90% das infecções em mulheres com candidíase vaginal recorrente (Fleury 1981, Hurley 1977, Morton 1977, Odds 1988). Estima-se que a candidíase vaginal recorrente acometa cerca de 5% das mulheres sadias na idade reprodutiva (Hurley 1977, Hurley 1979, Hurley 1981), constituindo-se não só em um grande problema médico, mas também social, desde que afeta de modo importante as relações entre os casais.

A *Candida* pode ser encontrada sob a forma de blastóporo, geralmente não patogênica na vagina, em aproximadamente 25% de mulheres sadias sem história de episódios de candidíase vaginal, diferindo das pacientes com candidíase vaginal recorrente, onde a maior percentagem de *Candida* é em forma de hifa (Sobel 1988). No grupo de mulheres que nunca desenvolveram episódios de candidíase, a quantidade de *Candida* detectável na flora vaginal é baixa (Sobel 1988), demonstrando o perfeito equilíbrio entre o fungo, a flora bacteriana vaginal normal e o sistema imune. Os fatores que levam a transformação da *Candida* da sua forma saprofítica para a forma de hifa parasitária ainda não são bem esclarecidos.

A candidíase vaginal esporádica caracteriza-se por um ou raros episódios de infecção vaginal por *Candida* e pode ser classificada em primária ou secundária (Sobel 1996). A candidíase vaginal é considerada primária quando não são encontrados fatores que predisõem ao aparecimento da infecção. A candidíase vaginal esporádica de ordem secundária tem como fatores predisponentes o hábito de roupas apertadas, antibioticoterapia,

utilização de anticoncepcionais orais e condições como gravidez (Fidel 1996). A candidíase vaginal secundária é também observada, geralmente, após terapia imunossupressora ou em indivíduos com doenças associadas a imunodepressão como AIDS ou diabetes mellitus (Macher 1988). Cerca de 5% das mulheres com candidíase vaginal esporádica irão evoluir para a candidíase vaginal recorrente (Fidel 1996). Os fatores envolvidos no aparecimento da candidíase vaginal recorrente ainda não são determinados. Apesar de não se tratar de uma doença letal, a morbidade faz da candidíase vaginal recorrente uma doença de grande importância clínica. Corrimento vaginal, dispareunia, hiperemia e edema são as principais manifestações clínicas, tornando esta doença um grande problema conjugal (Sobel 1990). Pode haver comprometimento tanto da região do epitélio vaginal quanto da região cervical (Giger 1995).

1.2 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA CANDIDÍASE VAGINAL

O diagnóstico da candidíase vaginal é realizado através dos achados clínicos e confirmado após o isolamento e crescimento do fungo em meio de cultura ou através da identificação direta da *Candida* pela microscopia óptica. Classicamente, o meio de cultura utilizado para o crescimento de *Candida* é o meio de Sabourad's, e a identificação das espécies pode ser feita através de métodos morfológicos (API 20C) ou de técnicas de biologia molecular como PCR e RAPD (Wissenbacher 2000, Cresti 1999). A cura da candidíase cutânea ou mucosa pode ser obtida com medicação de uso local. A maioria das pacientes infectadas por *Candida* sp. que fazem episódios de candidíase vaginal esporádica curam-se espontaneamente ou após terapia anti-fúngica local com clotrimazol vaginal ou uso oral de cetoconazol, fluconazol ou itraconazol, isoladamente ou em combinação com tratamento local (Fleury 1981, Sobel 1988). Por outro lado, existe uma pequena percentagem de mulheres que,

por motivo desconhecido, são refratárias ao tratamento com cetoconazol, fluconazol ou itraconazol. Outros casos apresentam uma involução da sintomatologia durante o tratamento, mas dias ou semanas após o encerramento deste, apresentam recorrência dos sintomas. Embora os antifúngicos sejam extremamente eficazes no tratamento dos episódios esporádicos de candidíase vaginal, cerca de 50% das mulheres com candidíase vaginal apresentam um novo episódio em um período de 3 meses após a remissão da doença (Sobel 1988, Fleury 1981). A ausência de resposta ao tratamento convencional é um acontecimento emergente nas mulheres com candidíase vaginal recorrente, embora os testes microbiológicos *in vitro* de resistência à drogas não demonstrem resistência da *Candida* aos derivados de azoles (Fong 1993, Lynch 1996). Desta forma, é possível que a falta de resposta terapêutica ou freqüente recorrência da candidíase esteja relacionada com o hospedeiro. Mais recentemente, a utilização de antifúngicos por períodos maiores do que seis meses, o uso profilático destas drogas previamente ao período menstrual (Perry 1995) e a utilização de antifúngicos associados a anti-inflamatórios não hormonais ou anti-alérgicos têm sido preconizados (Moraes 2000, Ringdahl 2000), mas a capacidade destas formas de tratamento em curar a candidíase vaginal recorrente ainda precisa ser melhor estabelecida.

1.3 RESPOSTA IMUNE NA CANDIDÍASE VAGINAL

Os mecanismos de defesa contra *Candida* sp. incluem elementos da imunidade inata e adaptativa. Polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, e macrófagos são as principais células da imunidade inata envolvidas na destruição da *Candida* sp. (Fidel 1996). A *Candida* sp. é fagocitada e destruída por estas células (Fidel 1996). Pacientes neutropênicos ou com deficiência funcional de neutrófilos apresentam frequentemente infecções por esse fungo (Odds 1988). As células NK, através da produção de citocinas ativadoras de neutrófilos, macrófagos ou pela citotoxicidade, podem participar na defesa contra este fungo (Fulurija

1996). Todavia, em modelos experimentais de candidíase, embora aumento da atividade de células NK seja documentado durante a infecção por *Candida*, o bloqueio da atividade destas células não exacerba a doença (Greenfield 1993). Na resposta imune adaptativa contra patógenos, tanto a imunidade humoral quanto a celular podem ser importantes. Uma das principais evidências do papel da imunidade mediada por células contra a infecção por *Candida* é a documentação de que indivíduos com imunodeficiência celular, a exemplo da AIDS, ou pacientes em uso de drogas imunossupressoras são mais susceptíveis à este fungo (Dahl 1997, Clift 1984, Klein 1984, Macher 1988). O IFN- γ produzido por células NK, CD4+ e CD8+ é a principal citocina ativadora de macrófagos, fazendo com que haja aumento da atividade microbicida destas células (Murray 1983). Apesar da presença de anticorpos contra antígenos de *Candida*, existem dúvidas a respeito da importância da resposta imune humoral na infecção causada por *C. albicans*. A participação das imunoglobulinas da classe IgA na neutralização do fungo, e de IgG e do complemento na opsonização e consequente fagocitose foi demonstrada *in vitro* (Rogers 1980, Ferrante 1979, Kagaya 1981, Yamamura 1977). Apesar de ocorrer síntese de anticorpos *in vivo* contra antígenos de *Candida* em pacientes com candidíase, a não existência de um aumento da susceptibilidade para aquisição de *Candida* em indivíduos com anormalidades congênitas ou adquiridas de linfócitos B, indica que anticorpos não se constituem mecanismos importantes de defesa contra este fungo (Hobbs 1977, Rogers 1980).

1.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CANDIDÍASE VAGINAL

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para o estudo da candidíase vaginal. Em alguns destes modelos a doença está associada a alterações da resposta imune, entretanto em outros a participação de estrógenos na patogênese da doença tem sido documentada. Dentre os modelos experimentais utilizados para o estudo da candidíase vaginal, ênfase tem

sido dada ao uso de camundongos susceptíveis como o BALB/c e resistentes como o CBA/j. Assim como em outras doenças infecciosas, a dicotomia da resposta imune tipo Th1 e Th2 também exerce um papel importante na suscetibilidade ou resistência à *Candida* sp.. A dicotomia de células CD4 foi inicialmente descrita por Mosmann e Coffman (Mosmann e Coffman 1986), que identificaram clones de células T que secretavam diferentes tipos de citocinas, as quais se relacionam com aspectos diferentes da resposta imune. Enquanto as células Th1 secretam IL-2, IFN- γ e TNF-beta e estão relacionadas com a resposta imune celular, as células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão relacionadas com alguns aspectos da imunidade humoral, como a secreção de IgE e IgG4 (Mosmann 1989). Adicionalmente, foi documentado que essas respostas são antagônicas, no sentido de que uma grande produção de IFN- γ por células Th1 suprime a resposta Th2 e a produção de IL-4 e IL-10 por células Th2 modula negativamente a resposta Th1 (Fiorentino 1991). Mais recentemente, foi documentada a importância da IL-12 na derivação da célula Th0 para Th1 e da IL-4 na derivação da célula Th0 para Th2 (Hsieh 1993, Macatonia 1993, Seder 1993, Chatelain 1992). Enquanto a fonte principal de IL-12 são células dendríticas e macrófagos (Trinchieri 1996), a IL-4 é secretada por mastócitos, eosinófilos, linfócitos B e linfócitos Th2 (Betz 1990, Chatelain 1992). Estudos dos mecanismos de resistência à infecção por fungos demonstraram que, em modelos experimentais de candidíase vaginal recorrente, a resposta imune tipo Th1, com produção de IL-2 e IFN- γ , está associada a resistência à doença (Romani 1992, Puccetti 1994, Romani 1993). Por outro lado, a derivação para a resposta imune tipo Th2, com produção predominante de IL-4, IL-5 e IL-10, está relacionada com suscetibilidade à infecção por *C. albicans* (Romani 1992, Spaccapelo 1995, Romani 1994, Tonnetti 1995). O ambiente de citocinas nos primeiros estágios da infecção por *Candida* pode influenciar na resposta imune de camundongos susceptíveis ou resistentes à infecção. A neutralização de IFN- γ e de IL-12 e a presença de IL-4 levam a uma derivação para a resposta imune tipo Th2

nesses camundongos (Romani 1992, Puceti 1994, Romani 1994). Alternativamente, a utilização de anticorpos monoclonais *in vivo* que neutralizam a IL-4, restaura a resposta imune celular tipo Th1 em camundongos BALB/c e diminui a intensidade da infecção por *Candida* mensurada por unidades formadoras de colônias (Cenci 1997). Embora o paradigma Th1/Th2 seja também evidente em relação à resistência e à susceptibilidade à *Candida*, trabalhos recentes tem mostrado que a IL-4 é necessária para a manutenção de células Th1 protetoras na resposta imune contra a *Candida* sp (Mencacci 1998). Os resultados desse estudo mostram que, embora não haja diferença entre a sobrevivência de camundongos BALB/c e os BALB/c deficientes de IL-4 após um inóculo grande de *Candida* sp, os camundongos deficientes de IL-4 foram mais susceptíveis à doença do que os camundongos normais após um inóculo pequeno de *Candida* (Mencacci 1998).

A influência de hormônios na susceptibilidade para o desenvolvimento da *Candida* sp. vem sendo estudada em modelos experimentais. Apesar da maioria dos estudos apontarem para o fato de que a resistência à *Candida* está relacionada com a resposta imune tipo Th1, este tipo de resposta imune com altos níveis de IL-2 e IFN- γ é observada em camundongos CBA/j (*H-2^k*) que tornaram-se susceptíveis à infecção pela *Candida* após o tratamento com estrógeno, não conseguindo se livrar do fungo (Fidel 1993). O papel dos hormônios na resposta imune têm sido bem estabelecidos, tanto através da documentação de que corticosteróides modulam a resposta inflamatória e a resposta imune, como em doenças auto-imune como no lupus eritematoso sistêmico (Chatham 2001). Como nesse modelo experimental de candidíase vaginal dependente de estrógeno a administração destes hormônios não atenua a resposta Th1 (Fidel 1993), estes dados indicam que, mesmo na presença de uma resposta imune protetora, a candidíase pode se tornar persistente. Desta forma além da resposta imune outros fatores como hormônios esteróides podem contribuir para a persistência da candidíase vaginal.

1.5 IMUNOLOGIA DA CANDIDÍASE VAGINAL HUMANA

A candidíase vaginal recorrente e a candidíase mucocutânea são os principais exemplos de condições clínicas nas quais ocorrem infecções repetidas ou prolongadas por *C. albicans*. Embora em ambas as doenças exista um aumento de susceptibilidade para esse fungo, as alterações imunológicas descritas nessas condições são diferentes. Enquanto a candidíase mucocutânea é uma doença caracterizada por um aumento da susceptibilidade à infecção por *C. albicans*, com comprometimento extenso de pele e mucosas e associada a uma disfunção neutrofílica e diminuição da resposta imune tipo Th1 (Kirkpatrick 1989, Lilić 1996, valdimarsson 1973), a candidíase vaginal recorrente humana ocorre em mulheres aparentemente saudáveis e ainda existem dúvidas a respeito da sua imunopatogênese. A vagina é composta de aproximadamente cinco camadas de células epiteliais e duas camadas basais de células epiteliais colunares acompanhadas da membrana basal. Existem inúmeros canais intercelulares, possibilitando a migração de fluidos, macromoléculas e células da membrana basal para o lúmen vaginal e vice-versa, o que garante a absorção e disseminação de proteínas em poucas horas. A presença de células de Langerhans, linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, neutrófilos, eosinófilos e anticorpos da classe IgG e IgA faz da vagina um órgão altamente imunocompetente (Fidel 1996). A principal diferença encontrada entre a população celular sistêmica e a localizada a nível vaginal é no número de linfócitos T $\gamma\delta$. A nível vaginal estes linfócitos representam cerca de 15 a 30% da população total linfocitária, enquanto no sangue periférico somente 3% dos linfócitos são T $\gamma\delta$ (Fidel 1996). Alguns estudos não evidenciam diferença entre a resposta imune tipo 1 e tipo 2 em pacientes com candidíase vaginal recorrente em relação a controles sem história de candidíase vaginal de repetição, havendo em ambas condições baixos níveis de IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-5 e IL-10 no sangue periférico (Fidel 1993). Outros trabalhos demonstram deficiência de proliferação linfocitária após estimulação com antígeno de *C. albicans* e ausência de resposta a teste de hipersensibilidade tardia ao

antígeno de *C. albicans* em pacientes com candidíase vaginal recorrente (Fong 1992, Hobbs 1977). Resposta alérgica de hipersensibilidade do tipo I compartimentalizada tem sido observada em algumas pacientes com candidíase vaginal recorrente, através da documentação de níveis aumentados de IgE e número elevado de eosinófilos a nível vaginal (Witkin 1989).

Alguns fatores podem explicar a divergência dos dados da literatura em relação à avaliação da resposta imune em pacientes com candidíase vaginal recorrente. Por exemplo, a natureza do antígeno utilizado é um fator de extrema importância na indução de resposta imune à *Candida* sp.. Neste caso tem sido mostrado que a presença de polissacarídeos no antígeno de *Candida* sp. pode explicar a inibição da proliferação linfocitária em culturas de células mononucleares (Syverson 1979, Lee 1986). As fases do ciclo menstrual (lútea ou folicular) também podem influenciar na resposta imune à *Candida* sp. ou PPD, sendo demonstrado por Corrigan e colaboradores. uma diminuição de produção de IFN- γ na fase folicular do ciclo menstrual em relação à fase lútea (Corrigan 1998). Esta modulação é exercida por monócitos que são as principais células produtoras da IL-1, citocina envolvida na ativação celular, de citocinas capazes de suprimir a resposta imune como a IL-10 e o TGF- β , e de substâncias como as prostaglandinas que inibem a resposta imune celular. Estes dados não são respaldados por um estudo in vitro, o qual documenta, que a adição da progesterona em concentrações semelhantes às encontradas na fase lútea, reduziu significativamente a resposta linfoproliferativa (Kalo-klein 1989). A progesterona modula a resposta imune através de ação a nível dos monócitos, desde que a remoção de monócitos destas culturas, elimina a capacidade da progesterona em diminuir a resposta linfoproliferativa (Kalo-Klein 1990). O efeito de hormônios femininos na resposta imune é variável na dependência da dose. Enquanto níveis elevados de progesterona inibem a resposta linfoproliferativa (Kalo-Klein 1990), baixas concentrações deste hormônio aumentam a proliferação linfocitária (Polan 1988). A modulação da resposta imune mediada pela progesterona pode estar relacionada com

a produção de IL-1 por monócitos, desde que IL-1 é necessária para a ocorrência de proliferação linfocitária (Dinarello 1988). Enquanto baixas concentrações de progesterona estimula a produção desta citocina por monócitos, níveis elevados de progesterona inibem a secreção de IL-1 por estas células (Polan 1988). Nenhum efeito tem sido documentado em relação à adição de estrógenos em concentrações similares às encontradas tanto na fase folicular como na fase lútea na resposta linfoproliferativa. Desta forma é possível que a flutuação nos níveis de progesterona durante o ciclo menstrual possa resultar em diminuição da resposta imune celular e fazer com que candidíase vaginal ocorra durante a fase lútea (Kalo-Klein 1989).

Ambas as células Th1 como Th2 devem ser estimuladas após uma imunização ou uma infecção, desde que estas células, além de participarem dos mecanismos de defesa, se regulem mutuamente permitindo um mecanismo de defesa eficaz e controlado. Contudo, existem exemplos, principalmente nas infecções causadas por agentes intracelulares, de situações onde uma diminuição de resposta Th1 secundária ou não a uma exacerbação de resposta tipo Th2 é maléfica para o hospedeiro. São exemplos clássicos destas situações a leishmaniose visceral (Carvalho 1985, Carvalho 1992), a leishmaniose cutânea difusa (Bomfim 1996) e a lepra wirchoviana (Kaplan 1989). A utilização de citocinas com a finalidade de aumentar a resposta imune tem sido feita isoladamente ou como adjuvante para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas (Badaró 1990). A hipótese do presente estudo é que pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentam uma deficiência na resposta imune celular do tipo 1. Esta hipótese será testada através da avaliação *in vivo* e *in vitro* da resposta imune celular com a utilização dos testes de hipersensibilidade cutânea tardia, transformação linfoblástica *in vitro* e produção de citocinas. Através da determinação do perfil de citocinas poderíamos também saber se existe uma predominância de resposta Th2 nesses pacientes, o que poderia explicar a supressão da resposta Th1. Neste estudo o papel de citocinas e antagonistas de

citocinas em modular a resposta imune será também avaliada, para um melhor entendimento sobre os mecanismos relacionados à alteração da resposta imune. A documentação da ocorrência de distúrbios imunológicos na candidíase vaginal recorrente pode não só contribuir para o entendimento da patogênese desta doença como servir de base para a utilização de citocinas ou antagonistas de citocinas no tratamento da candidíase vaginal recorrente, doença de grande importância clínica.

II JUSTIFICATIVA

A candidíase vaginal recorrente tem distribuição mundial e elevada prevalência (5%) em mulheres em idade reprodutiva, bem como em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida. Estudos contraditórios têm sido reportados a respeito da imunopatogênese da candidíase vaginal recorrente, não ficando claro o real papel da resposta imune celular no desenvolvimento da doença, nem os mecanismos envolvidos em uma diminuição da resposta imune nas pacientes. A maioria das mulheres com candidíase vaginal recorrente são tratadas freqüentemente com anti-fúngicos, apresentando, no entanto, recorrência da doença às vezes mensalmente ou a cada três ou quatro meses. Em muitas pacientes, a despeito da não documentação do patógeno após tratamento, a sintomatologia persiste. Estes dados sugerem que fatores imunológicos podem estar envolvidos tanto na persistência do agente, como na lesão tecidual e manifestações clínicas.

O Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos é um centro de referência regional para o atendimento e para avaliação da resposta imune de pacientes com imunodeficiência. Há cerca de 5 anos começaram a ser encaminhados a este serviço pacientes com candidíase de repetição e mais especificamente pacientes com candidíase vaginal recorrente não portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os estudos iniciais quantificando população de linfócitos não mostrou anormalidades da resposta imune do ponto de vista quantitativo, levando a que estudos da função das células envolvidas na resposta imunológica passassem a ser realizado. Pouco se conhece sobre a resposta imune em pacientes com candidíase vaginal recorrente e, mais especificamente, em relação ao perfil de citocinas secretadas por células mononucleares destas pacientes e o papel de citocinas ou antagonistas de citocinas em modular a resposta imune na candidíase vaginal. Estudos também não tem comparado a resposta imune destas pacientes a antígenos de *C. albicans* com

outros antígenos para os quais a maioria das pessoas tem células sensibilizadas, como o toxóide tetânico e o PPD.

Considerando a alta prevalência da candidíase vaginal principalmente nas mulheres na fase reprodutiva, o pouco conhecimento sobre o aumento da susceptibilidade de algumas pacientes em desenvolver a forma recorrente da candidíase, e o provável papel da resposta imune na gênese da doença, é importante que estudos sejam realizados para determinar o funcionamento das células de resposta imunológica nestes pacientes. O conhecimento da resposta imune na candidíase vaginal recorrente pode contribuir para o entendimento da patogênese dessa doença e poderá permitir a identificação de novas formas de tratamento, como imunoterapia, e trazer subsídios para o desenvolvimento de uma vacina.

III HIPÓTESE

H1- Pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentam deficiência na resposta imune celular tipo Th1 com baixa produção de IFN- γ em resposta a antígeno de *C. albicans*.

H0 - Pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentam uma resposta imune celular tipo Th1.

IV OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O principal objetivo deste trabalho é caracterizar a resposta imune celular e humoral de pacientes com candidíase vaginal recorrente e avaliar o papel de citocinas e antagonistas de citocinas em modular a resposta imune nestas pacientes.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Caracterizar a resposta imune de mulheres com candidíase vaginal recorrente, através da dosagem de IFN- γ , IL-5 e IL-10 em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com antígeno de *C. albicans*, PPD e toxóide tetânico.

2- Comparar a resposta imune celular a antígeno de *C. albicans* em mulheres com candidíase vaginal recorrente com as de mulheres com candidíase vaginal esporádica.

3- Avaliar o papel de citocinas e antagonistas de citocinas em modular a resposta imune em pacientes com candidíase vaginal recorrente

4- Determinar os títulos de anticorpos da classe IgE específicos para antígeno de *C. albicans* em soros de pacientes com candidíase vaginal recorrente e candidíase vaginal esporádica.

V MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Pacientes e controles

Participaram deste estudo pacientes com diagnóstico de candidíase vaginal recorrente acompanhadas em diversos serviços e encaminhadas ao Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos. A maioria destas pacientes foram selecionadas pela Dra. Nilma Neves, ginecologista que também foi responsável pela obtenção da história clínica e coleta de material para isolamento da *Candida* sp.. Outras pacientes foram encaminhadas diretamente ao Serviço de Imunologia por seus ginecologistas. Nestas pacientes os dados clínicos foram colhidos por um dos membros do Serviço de Imunologia e os exames complementares para comprovação do diagnóstico solicitados ao médico acompanhante. Os critérios de inclusão no estudo foram: 1- existência de uma história indicativa de candidíase vaginal recorrente. 2- diagnóstico clínico e micológico de *Candida* sp.. Em algumas pacientes foi realizada cultura para identificação da espécie de *Candida* e teste de sensibilidade ao anti-fúngico. A candidíase vaginal recorrente foi definida pela ocorrência de no mínimo quatro episódios de candidíase vaginal no período de um ano. Os critérios de exclusão foram: pacientes com sorologia positiva para HIV, portadoras de doenças debilitantes como insuficiência renal, insuficiência hepática, diabetes mellitus e uso de drogas imunossupressoras. Na ocasião da avaliação imunológica, todas as pacientes com candidíase vaginal recorrente estavam com doença ativa, e não estavam usando anti-fúngicos. Como controle foram avaliadas mulheres que tinham apresentado episódio recente (a menos de dois meses) de candidíase vaginal esporádica, definida como episódios isolados de infecção vaginal por *C. albicans*. Os mesmos critérios de exclusão foram seguidos para os controles.

5.2 Antígeno

O antígeno de *C. albicans* utilizado para os estudos "in vitro" foi preparado a partir de uma cepa isolada de uma paciente com candidíase vaginal recorrente, cultivada em meio de cultura Sabouroud e centrifugada a 3000g por 30 minutos. O material centrifugado foi lavado com salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, por três vezes, ressuspensão em NaOH 0.5N, e em seguida congelado e descongelado 30 vezes. Após centrifugação, o sobrenadante foi congelado a -20° C para uso posterior. Os antígenos de toxóide tetânico (TT) (Wyeth-Ayerst Lab, Marietta, PA, USA) e proteína purificada derivada do *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) (Connaught Laboratories, Ontario, Canada) e os mitógenos fitoemaglutinina (PHA) (Life Technologies. Inc. Grand Island, NY) e pokeweed (PWM) (Gibco, Grand Island, NY), foram também utilizados. A quantificação da proteína do antígeno de *C. albicans* foi realizada através do método de Lowry (Lowry 1951). Para a determinação da concentração ideal de antígeno a ser utilizada nos ensaios de proliferação celular e determinação de citocinas, uma curva dose-resposta foi realizada, com concentrações variando de 0,01 µg/ml a 0,5 µg/ml, utilizando pacientes com história pregressa de candidíase vaginal esporádica e controles que negavam história de infecção por esse fungo. A concentração considerada ideal foi aquela capaz de induzir respostas nas mulheres com candidíase esporádica e não induzir resposta nos controles negativos (0,05 µg/ml).

5.3 Teste cutâneo de hipersensibilidade tardia

O teste cutâneo de hipersensibilidade foi realizado através da inoculação de 0,1 ml do antígeno de *C. albicans* (1mg/ml) (BRL, RJ), na região anterior do antebraço por via intradérmica. O resultado foi obtido 48 horas após a realização do teste, sendo considerado positivo quando a induração foi maior do que 5 mm.

5.4 Teste de transformação blástica

Células mononucleares do sangue periférico heparinizado foram obtidas através de gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque. Após lavadas três vezes com salina as células foram contadas e ajustadas para a concentração de 1×10^6 /ml e cultivadas em 200 μ l de meio RPMI 1640 com 10% de soro humano AB (GIBCO BRL, Grand Island, NY), 100 IU/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina por poço de placas de microtitulação de 96 orifícios (Becton Dickinson, NJ, USA). As culturas de células foram mantidas sem estímulos ou estimuladas com antígeno de *Candida albicans* (0,05 μ g/ml), toxóide tetânico (5LF/ml), PPD (2 μ g/ml), ou mitógeno pokeweed (PWM) na diluição final de 1:100. Em algumas culturas foram adicionados anticorpos monoclonais anti-IL-4, anti-IL-10 e isotipos controle gentilmente cedidos pelo Dr. Coffman (DNAX Institute Palo Alto, CA) ou IL-12 humana recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) na concentração de 200 μ g/ml. Após 5 dias de incubação a 37° C e 5% CO₂, as culturas foram pulsadas com 3H-timidina (New England Nuclear Research Products, Boston MA) na concentração de 1 μ Ci/poço e incubadas novamente por um período de 6 horas. As células foram então coletadas (PHD Cell Harvester; Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA), e processadas para determinação da incorporação de 3H-timidina através de cintilação líquida. Os resultados foram expressos em contagem por minutos (cpm) ou em índice de estimulação (IE) que corresponde a divisão da cpm de culturas estimuladas pela cpm de culturas não estimuladas.

5.5 Determinação de citocinas

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas como descrito acima. Após lavadas três vezes com PBS pH7,4 as células foram contadas e ajustadas para a concentração de 3×10^6 /ml em meio RPMI 1640 com 10% de soro humano AB (GIBCO BRL, Grand Island, NY), 100 IU/ml de penicilina e 100 μ g/ml de streptomicina. Aliquotas de 1 ml

foram colocadas em placas de 24 poços (Becton Dickinson, NJ, USA). As culturas de células foram mantidas sem estímulos ou estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 ug/ml), antígeno de TT (5 LF/ml), PPD (10 ug/ml) e mitógeno PHA (10 ug/ml). Após incubação por 48 horas a 37°C e a 5% CO₂, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -70° C. Os níveis de IFN- γ , IL-5 e IL-10 foram obtidos através da técnica de ELISA sanduíche, utilizando-se “kits” comercialmente vendidos (IFN- γ e IL-10) (R&D Systems) ou anticorpos monoclonais (IL-5) (Duo-set Pharmingen, San Diego, CA) e os resultados foram expressos em pg/ml, por interpolação numa curva padrão com as citocinas recombinantes.

5.6 Dosagem de IgE

Para a dosagem de IgE nos soros de pacientes com candidíase vaginal recorrente (n=20), foram utilizados soros controles de pacientes com candidíase esporádica (n=7) e soros de controles de indivíduos do sexo masculino (n=4) sem história de candidíase cutânea. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 40 ug/poço do antígeno de *C. albicans* na presença de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Os soros foram adicionados a cada poço (100 ul) na diluição de 1:50 em PBS com tween 20 a 0,05% e incubados durante a noite a 4°C. Para a depleção de IgG, os soros foram diluídos a 1:2 em PBS e tratados com “RF-absorbent” (Dade Bhering, Germany), reconstituído em 1,5 ml de PBS, numa concentração de 1:2. Depois de centrifugados os soros foram adicionados à placa (100 ul/poço) e incubados a 4°C durante a noite. Anticorpos anti-IgE humana (produzidos em cabra) foram utilizados na concentração de 1:100, 100 ul/poço. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, anticorpos anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase (1:1000, 100 ul/poço) foram adicionados aos poços e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi revelada com tetrametilbenzidine (ICN Biomedical, inc, Ohio) e H₂SO₄ foi utilizado para parar a reação.

5.7 Análise estatística

Para a comparação das respostas linfoproliferativas, produção de IFN- γ , IL-5 e IL-10 e produção de IgE entre os grupos de pacientes com infecção recorrente por *C. albicans* e o grupo controle foi realizado o teste de Mann-Whitney. Valores de α de 5% ($p= 0.05$) foram considerados para significância estatística.

5.8 Considerações Éticas

Termos de consentimento foram obtidos de todas as pacientes e controles estudados, após estes serem esclarecidos sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa (Anexo 1). Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia.

VI RESULTADOS

Das 20 pacientes com candidíase vaginal recorrente, *C. albicans* foi a espécie identificada como o agente causador em todos os 10 isolados nos quais foram realizados testes para a tipagem da espécie de *Candida*. Todas as pacientes apresentaram ausência ou baixa reatividade ao teste cutâneo de hipersensibilidade tardia a antígeno de *Candida*, com induração menor que 5 mm. A idade, a duração da doença e a produção de IFN- γ em resposta ao antígeno de *C. albicans* e à PHA das células mononucleares de 20 pacientes com candidíase vaginal recorrente estudadas estão mostradas na Tabela 1. Todas as pacientes encontravam-se em idade reprodutiva, variando entre 24 e 42 anos com média de 32 ± 6 anos. O tempo de doença foi de 6 ± 4 anos, variando entre 2 a 14 anos. A produção de IFN- γ em culturas não estimuladas foi ausente em 19 pacientes sendo a média e o desvio padrão de 3 ± 2 pg/ml. Células mononucleares de todas as pacientes produziram IFN- γ quando estimuladas com PHA com variação de 1884 a 3358 pg/ml. A média e desvio padrão dos níveis de IFN- γ nessas culturas foi de 2094 ± 545 pg/ml. Diferente das culturas estimuladas com PHA, a maioria das culturas de células de pacientes com candidíase vaginal recorrente secretaram baixos níveis de IFN- γ quando estimuladas com antígeno de *C. albicans*. A produção de IFN- γ em 19 pacientes variou de 0 a 1132 pg/ml com média e desvio padrão de 144 ± 329 pg/ml. Ausência de produção de IFN- γ foi observada em 8 pacientes, baixa produção foi observada em 9 pacientes e apenas 2 pacientes produziram níveis elevados de IFN- γ .

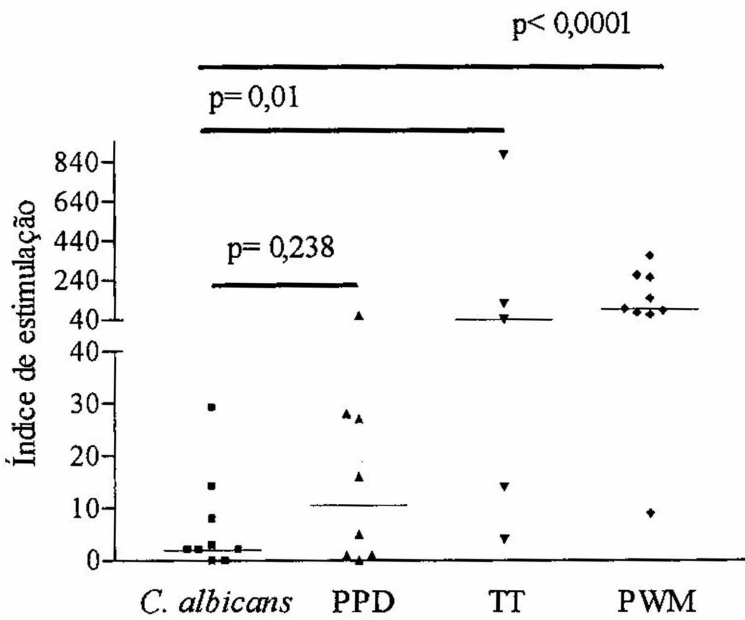
Tabela 1. Idade, duração de doença e concentração de IFN- γ de pacientes com candidíase vaginal recorrente.

# Paciente	Idade	Duração da Doença (anos)	IFN- γ (pg/ml)		
			Meio	<i>C. albicans</i>	PHA
1	30	02	0	0	2150
2	39	02	0	0	2901
3	30	02	0	75	NR *
4	39	03	0	0	1448
5	37	03	0	0	1662
6	25	03	0	148	2288
7	25	05	18	1132	1572
8	42	05	0	0	3358
9	26	06	39	997	1673
10	24	06	0	58	1700
11	29	10	0	0	2214
12	32	13	0	175	1997
13	32	14	0	0	1766
14	26	08	NR	NR	NR
15	41	05	NR	NR	NR
16	35	02	21	49	1391
17	46	01	0	10	NR
18	32	02	0	9	NR
19	30	06	0	0	NR
20	50	05	0	12	NR

NR – Não realizado

Resposta linfoproliferativa

A resposta linfoproliferativa específica para os antígenos de *C. albicans*, PPD e TT e para o mitógeno PWM, representada em IE, foi realizada em 9 pacientes com candidíase vaginal recorrente. O PPD e o TT foram utilizados como controle no sentido de comparar a proliferação linfocitária de culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* com outros antígenos. O PPD foi escolhido em virtude da vacinação com BCG ser amplamente realizada em recém nascidos e o TT pelo fato de que a maioria das pessoas ser vacinada com toxóide tetânico. O PWM foi escolhido por estimular proliferação em células humanas, principalmente linfócitos T, e pelo fato de que o período de incubação (5 dias) ser o mesmo que foi utilizado para os três antígenos. Nas culturas não estimuladas a média e o desvio padrão da resposta linfoproliferativa foi 932 ± 1317 cpm. Alta incorporação de timidina foram observados nas culturas de células mononucleares em sete pacientes nos quais as células foram estimuladas com o mitógeno PWM. A média e o desvio padrão das cpm destas culturas foi 29381 ± 8479 cpm. A resposta linfoproliferativa em culturas de células estimuladas com antígeno de *C. albicans* foi baixa em todas as 9 pacientes com candidíase vaginal recorrente (1239 ± 861 cpm). Os níveis de IFN- γ foram baixos ou ausentes em 5 das 7 pacientes nas quais a avaliação desta citocina foi realizada. O índice de estimulação de culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans*, PPD, TT e PWM estão representados no gráfico 1. Índices de estimulação mais elevados ($p < 0,05$) foram observados quando PPD (IE=4,5) ou TT (IE=32) foram utilizados como estímulo nas culturas destas pacientes, em comparação com culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* (IE=1,3). Estes resultados demonstram que, a despeito de uma ausência ou baixa resposta linfoproliferativa frente ao antígeno de *C. albicans*, linfócitos destas pacientes proliferam quando estimulados com PPD e TT.



Mann-Whitney

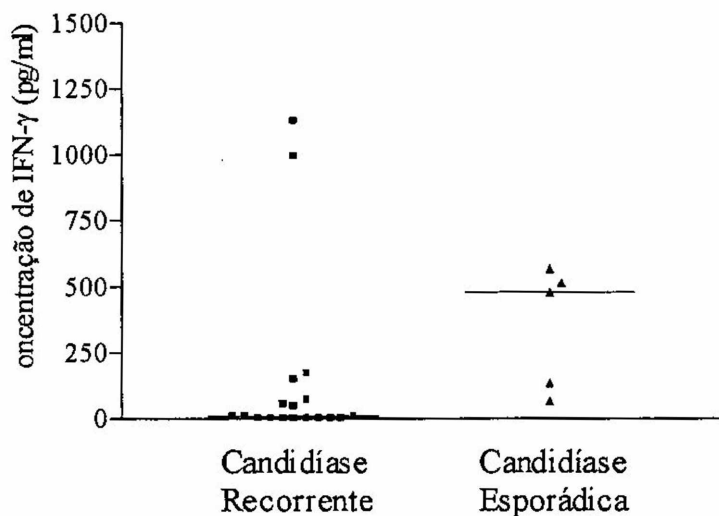
Figura 1. Resposta linfoproliferativa de pacientes com candidíase vaginal recorrente.

As culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 9 pacientes com candidíase vaginal recorrente foram estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05µg/ml), derivado protéico purificado do *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) (10µg/ml), toxoide tetânico (TT) (5 LF/ml) ou mitógeno pokeweed (PWM). Os resultados estão expressos em índice de estimulação (cpm de culturas estimuladas / cpm de culturas não estimuladas).

Avaliação da produção de IFN- γ

O IFN- γ é uma das principais citocinas produzidas por células T e devido a sua capacidade de ativar neutrófilos e macrófagos esta citocina tem participação nos mecanismos de defesa contra *C. albicans*.

A avaliação da produção de IFN- γ , realizada em sobrenadantes de culturas de 18 pacientes com candidíase vaginal recorrente e 7 controles com candidíase vaginal esporádica, é mostrada na Figura 2. A média dos níveis de IFN- γ em culturas de CMSP não estimuladas de pacientes com candidíase vaginal recorrente e de pacientes com candidíase vaginal esporádica foi 4 ± 2 pg/ml e 3 ± 2 pg/ml, respectivamente. Enquanto produção elevada de IFN- γ (353 ± 248 pg/ml) foram detectados nos sobrenadantes de CMSP das mulheres com candidíase vaginal esporádica, estimuladas com antígeno de *C. albicans* a produção de IFN- γ foi muito variável e predominantemente baixa com média e desvio padrão de 148 ± 338 pg/ml nos sobrenadantes de culturas de CMSP das mulheres estimuladas com antígeno de *C. albicans* com candidíase vaginal esporádica. Houve uma diferença estatisticamente significativa $p = 0,0466$, Mann Whitney, quando os valores de IFN- γ observados em culturas de pacientes com candidíase vaginal recorrente foram comparados com os observados em mulheres com candidíase vaginal esporádica.



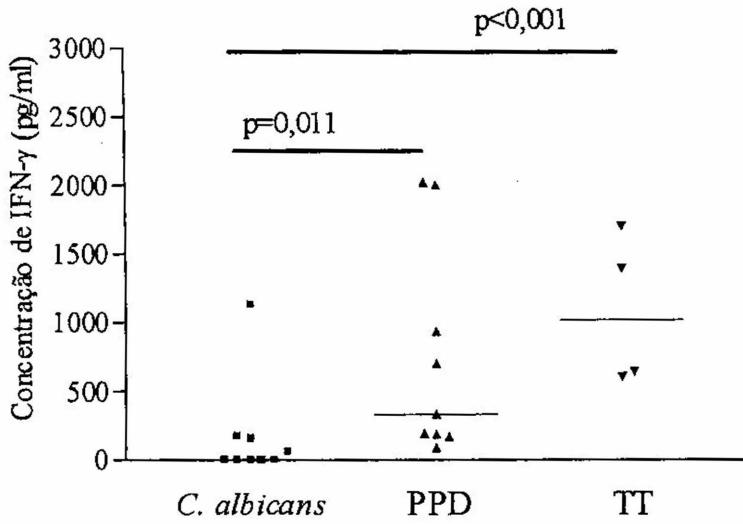
*p= 0,0466, Mann-Whitney.

Figura 2. Concentração de IFN- γ em pacientes com candidíase vaginal recorrente (n= 18) e mulheres com candidíase vaginal esporádica (n= 5).

A concentração de IFN- γ foi avaliada através da dosagem desta citocina em CMSP estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 μ g/ml) através da técnica de ELISA sanduíche. Os resultados estão expressos em pg/ml por interpolação numa curva padrão com IFN- γ recombinante.

Ausência de resposta a C. albicans é antígeno específica

As concentrações de IFN- γ para os antígenos de *C. albicans*, PPD e TT estão representados na figura 3. Nesse ensaio o nível de IFN- γ nas culturas não estimuladas foi de 17 ± 10 pg/ml. As concentrações de IFN- γ nas culturas de CMSP estimuladas com antígeno de *C. albicans* foi de 168 ± 367 pg/ml com variação de 0 a 1132 pg/ml. Nestes experimentos as culturas de pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentaram concentrações de IFN- γ mais altas do que a população total de pacientes com candidíase vaginal recorrente do estudo. Esta ocorrência deveu-se ao fato de que das 9 pacientes deste experimento 2 produziram altas concentrações de IFN- γ , 4 baixos níveis de IFN- γ e apenas 3 com ausência de produção desta citocina. A concentração de IFN- γ em culturas estimuladas com PPD foi de 739 ± 730 pg/ml com variação de 92 a 2026 pg/ml. O grande desvio padrão observado deveu-se ao fato de que culturas de três pacientes não responderam ou apresentaram respostas muito baixas a estimulação com PPD. A concentração de IFN- γ em culturas estimuladas com TT foi de 1085 ± 472 pg/ml, com variação de 645 a 1649 pg/ml. Houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0.001$) quando os valores de IFN- γ observados em culturas estimuladas com PPD ou TT foram comparadas com os encontrados em culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans*. Figura 3.



Mann-Whitney.

Figura 3. Imunodeficiência específica para o antígeno de *C. albicans*.

Avaliação das concentrações de IFN- γ em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico de 9 pacientes com candidíase vaginal recorrente estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 $\mu\text{g/ml}$), derivado protéico purificado do *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) (10 $\mu\text{g/ml}$) e toxóide tetânico (TT) (5LF/ml). Os resultados estão expressos em pg/ml.

Perfil de Citocinas

Com a finalidade de determinar o perfil de citocinas secretadas por células mononucleares de pacientes com candidíase vaginal recorrente após estimulação com antígeno de *C. albicans*, a determinação das concentrações de IFN- γ , IL-5 e IL-10 foi realizada em sobrenadantes de culturas de 13 pacientes com candidíase vaginal recorrente. O IFN- γ e a IL-5 foram escolhidos por ser o IFN- γ uma citocina representante de padrão tipo 1 e a IL-5 uma representante da ativação de células Th2. A IL-10 é também uma citocina tipo 2 mas sua escolha deveu-se ao fato de ser a IL-10 uma das mais importantes citocinas moduladoras da resposta imune. A média e desvio padrão dos níveis de IFN- γ , IL-5 e IL-10 em culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* está representada na figura 4. A produção de IFN- γ , IL-5 e IL-10 em culturas não estimuladas de pacientes com candidíase vaginal recorrente foi respectivamente 5 ± 2 pg/ml, 3 ± 1 pg/ml e 4 ± 2 pg/ml. A média e o desvio padrão da produção de IFN- γ em culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 μ g/ml) destas pacientes variou de 0 a 1132 pg/ml (média \pm desvio padrão = 198 ± 389 pg/ml). Das 13 pacientes avaliadas, apenas duas delas apresentaram altas concentrações de IFN- γ , quatro apresentaram baixos níveis de IFN- γ e sete tinham concentrações não detectáveis desta citocina. Todas as pacientes com candidíase vaginal recorrente estudadas apresentaram baixa resposta imune do tipo 2 após estímulo com antígeno de *C. albicans* (0,05 μ g/ml). A média e desvio padrão da produção de IL-5 e IL-10 após estímulo com antígeno de *C. albicans* foi de 39 ± 60 pg/ml e 16 ± 32 pg/ml, respectivamente.

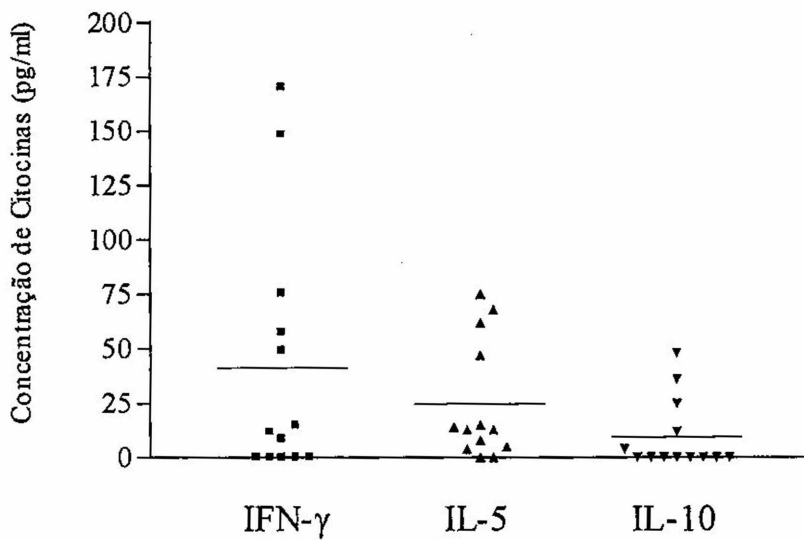
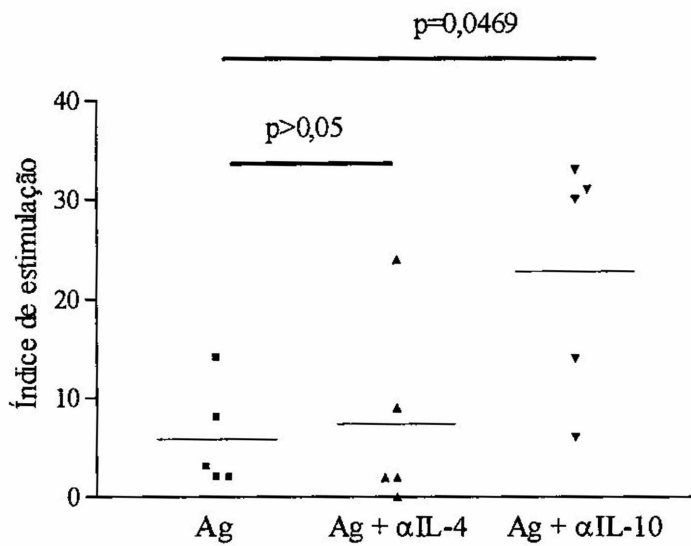


Figura 4. Concentrações de citocinas (IFN- γ , IL-5 e IL-10) em sobrenadante de cultura de células pacientes com candidíase vaginal recorrente estimuladas com antígeno de *C. albicans*.

As concentrações de citocinas (IFN- γ , IL-5 e IL-10) nos sobrenadantes de CMSP estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 $\mu\text{g/ml}$) de 13 pacientes com candidíase vaginal recorrente foram dosados através da técnica de ELISA sandwich. Os resultados estão expressos em pg/ml.

Tentativa de modulação da resposta imune através da neutralização ou adição de citocinas.

Com a finalidade de verificar se a baixa resposta linfoproliferativa observada em culturas de pacientes com candidíase vaginal recorrente poderia ser aumentada com a neutralização de citocinas tipo 2, anticorpos monoclonais anti-IL-4 (200 µg/ml) ou anti-IL-10 (200 µg/ml) e isótipos controles foram adicionados às culturas de células mononucleares de quatro pacientes com candidíase vaginal recorrente estimuladas com antígeno de *C. albicans*. Apesar da ausência de evidência de uma forte resposta tipo 2 nestes pacientes, os experimentos de neutralização foram realizados em virtude do papel importante de IL-4 e de IL-10 como moduladores da resposta imune. A média e o desvio padrão da resposta linfoproliferativa em culturas não estimuladas foi 369 ± 321 cpm. A resposta linfoproliferativa ao antígeno de *C. albicans* foi de 889 ± 339 com IE de 5 ± 8 . Esta resposta aumentou significativamente após a adição de anticorpo monoclonal anti-IL-10, tendo em média 3421 ± 1908 cpm (IE = 20 ± 11). Em todos os quatro pacientes cujas células foram testadas, a neutralização de IL-10 aumentou a resposta linfoproliferativa. A adição de anticorpo monoclonal anti-IL-4 ou de isótipos controles não restaurou significativamente a resposta linfoproliferativa de culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* (1682 ± 971 cpm; IE = 8 ± 13) (Figura 5). Os isótipos controles também não alteraram a resposta observada em culturas estimuladas com o antígeno de *C. albicans*. Estes experimentos demonstram a participação da IL-10 mais não da IL-4 na imunopatogênese da candidíase vaginal recorrente.

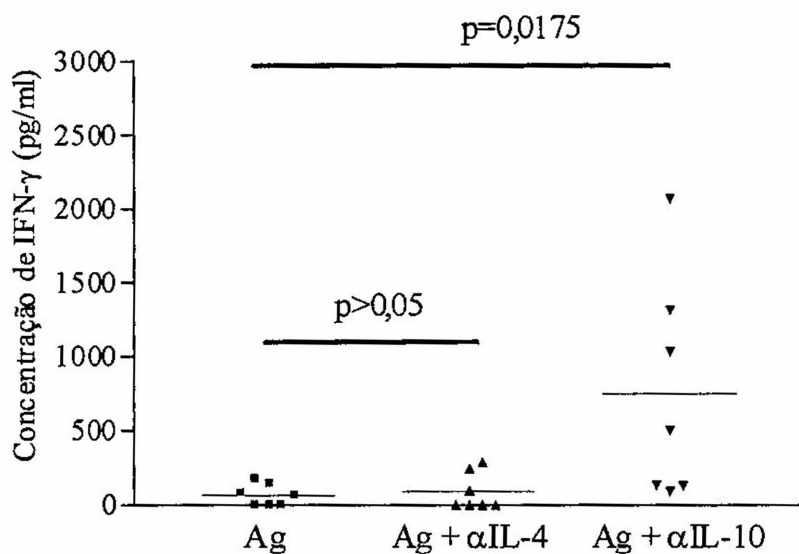


Mann-Whitney

Figura 5. Tentativa de restauração da resposta linfoproliferativa de pacientes com candidíase vaginal recorrente pela neutralização das citocinas IL-4 e IL10 com anticorpos monoclonais.

As culturas de CMSP de quatro pacientes com candidíase vaginal recorrente foram estimuladas com antígeno de *C albicans* (0,05µg/ml) (Ag) em presença ou ausência de anticorpos monoclonais anti-IL-4 (Ag + αIL4) e anti-IL-10 (200 µg/ml) (Ag + αIL-10). Os resultados estão expressos em índice de estimulação (cpm de culturas estimuladas / cpm de culturas não estimuladas).

Na tentativa de restaurar a produção de IFN- γ "in vitro" em pacientes com candidíase vaginal recorrente, anticorpos monoclonais anti-IL4 (200 $\mu\text{g/ml}$) ou anti-IL10 (200 $\mu\text{g/ml}$) foram adicionados às culturas de CMSP de 7 pacientes com candidíase vaginal recorrente estimuladas com antígeno de *C. albicans*. No presente experimento as concentrações de IFN- γ em culturas não estimuladas foi de 5 ± 2 pg/ml. As concentrações de IFN- γ em culturas de pacientes estimuladas apenas com antígeno de *C. albicans* foi de 64 ± 70 pg/ml. Após a adição de anticorpo monoclonal anti-IL4 as concentrações de IFN- γ foram de 100 ± 81 pg/ml, não sendo assim a modulação de IL-4 capaz de restaurar a resposta imune tipo Th1 nestas pacientes. A neutralização da IL-10, no entanto foi capaz de aumentar em 11 vezes a secreção de IFN- γ , elevando o nível desta citocina para 750 ± 753 pg/ml (Figura 6).

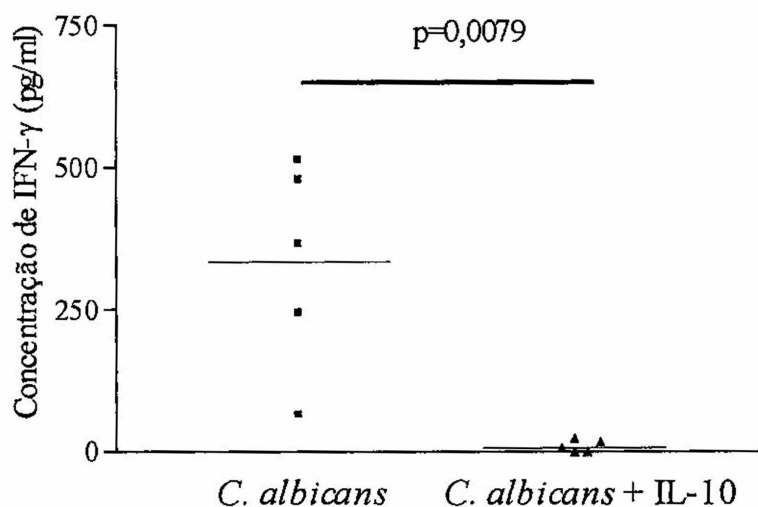


Mann-Whitney

Figura 6. Efeito da neutralização de IL-4 ou IL-10 na produção de IFN- γ

Concentrações de IFN- γ em sobrenadantes de culturas de CMSP de pacientes com candidíase vaginal recorrente ($n = 7$) estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 μ g/ml) isoladamente ou em presença dos anticorpos monoclonais anti-IL-4 ou anti-IL-10 (200 μ g/ml). Os resultados estão expressos em pg/ml.

Como os experimentos com anticorpos monoclonais anti-IL-10 mostraram uma importante participação desta citocina na imunossupressão observada na candidíase vaginal recorrente, foi avaliada a capacidade da IL-10 em suprimir a produção de IFN- γ em mulheres com candidíase vaginal esporádica. Para a realização deste experimento, IL-10 recombinante humana (10 $\mu\text{g/ml}$) foi adicionada às culturas de células de cinco mulheres com candidíase vaginal esporádica estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 $\mu\text{g/ml}$). As concentrações de IFN- γ em culturas de células não estimuladas foi de 10 ± 5 pg/ml. A produção de IFN- γ em culturas de células mononucleares estimuladas com antígeno de *C. albicans* foi de 334 ± 182 pg/ml. Após a adição de IL-10 recombinante humana a produção de IFN- γ diminuiu para 10 ± 10 pg/ml.

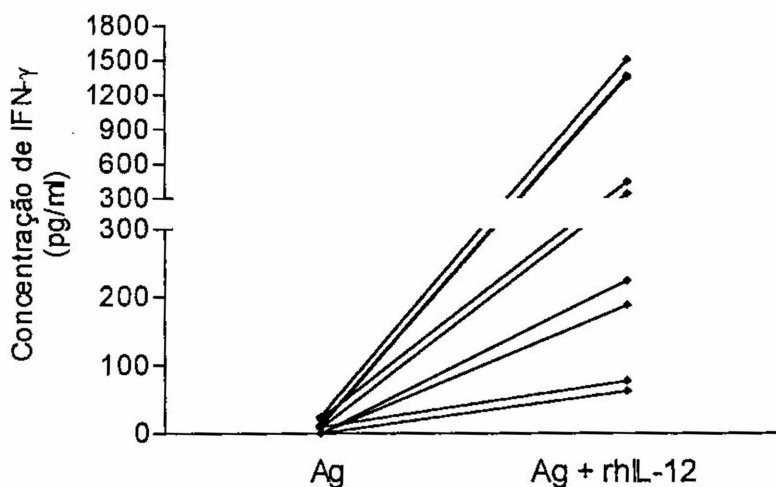


* $p = 0,0079$, Mann-Whitney.

Figura 7. Efeito da adição de IL-10 às culturas de CMSP de mulheres com candidíase vaginal esporádica estimuladas com antígeno de *C. albicans*

Concentrações de IFN- γ em sobrenadantes de culturas de CMSP de mulheres com candidíase vaginal esporádica ($n = 5$) estimuladas com antígeno de *C. albicans* ($0,05 \mu\text{g/ml}$) isoladamente ou em presença de IL-10 recombinante humana ($20 \mu\text{g/ml}$). Os resultados estão expressos em pg/ml.

A IL-12 é a principal citocina envolvida na derivação da resposta Th0 para Th1. Com a finalidade de determinar se a adição exógena desta citocina poderia restaurar a produção de IFN- γ em pacientes com candidíase vaginal recorrente, IL-12 recombinante humana (40 ng/ml) foi adicionada às culturas de CMSP estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 μ g/ml) de 9 pacientes com candidíase vaginal recorrente. A produção de IFN- γ nos sobrenadantes de CMSP não estimuladas foi de 0 pg/ml. A adição de IL-12 às culturas de células não estimuladas não aumentou a produção de IFN- γ (0 pg/ml). No gráfico 8 são mostrados a média e desvio padrão da produção de IFN- γ de culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* na ausência e na presença de IL-12. As concentrações de IFN- γ em culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* foi de 9 ± 30 pg/ml. Após a adição de IL-12 recombinante humana a produção de IFN- γ nas culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* aumentou para 342 ± 605 pg/ml. Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0004$) quando foi feita a comparação entre culturas com presença de IL-12 e culturas com ausência de IL-12. A adição de IL-12 recombinante humana às culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* humana foi capaz de restaurar a produção IFN- γ em todas as pacientes com um aumento que variou de 9 a 224 vezes. Em média a adição de IL-12 aumentou a produção de IFN- γ em 38 vezes.



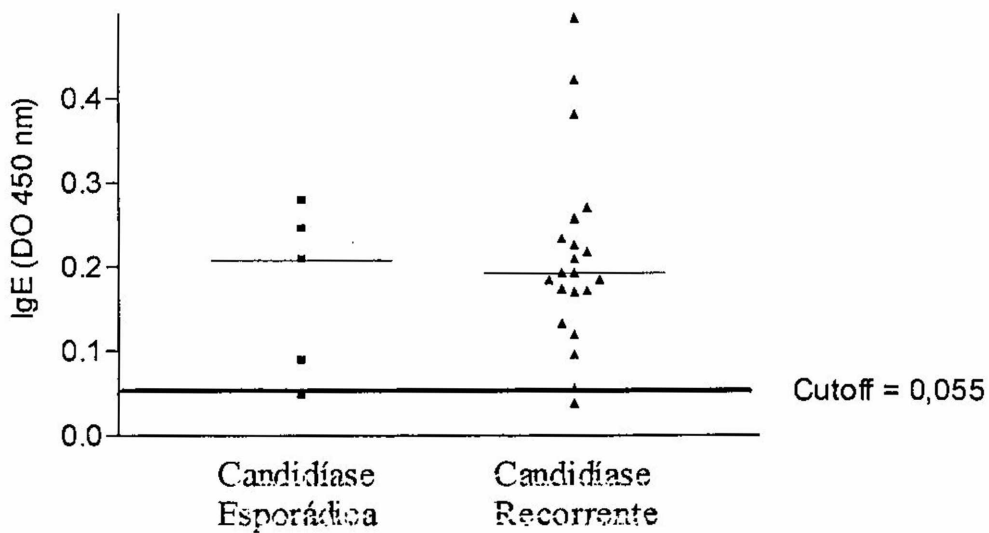
*p= 0,0004, Mann-Whitney.

Figura 7. Efeito da IL-12 recombinante humana na produção de IFN- γ

IL-12 recombinante humana (40 ng/ml) foi adicionada às culturas de CMSP estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 μ g/ml) de 9 pacientes com candidíase vaginal recorrente. IFN- γ foi dosado no sobrenadante destas culturas através da técnica de ELISA de sanduíche e os resultados expressos em pg/ml através de interpolação em uma curva com IFN- γ recombinante.

Dosagem de IgE

Devido a associação entre candidíase vaginal recorrente e resposta alérgica compartimentalizada, (Witkin 1989) foi realizada a dosagem de IgE de 21 pacientes com candidíase vaginal recorrente e cinco mulheres com candidíase vaginal esporádica, afim de comparar os níveis desta imunoglobulina no soro destas pacientes. Para a determinação do "cut off" foram utilizados soros de 5 homens sadios. 19 pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentaram níveis de IgE sérica específica para o antígeno de *Candida* acima do "cutoff", e apenas 2 pacientes tiveram níveis de IgE abaixo do "cut off". A média dos níveis de IgE sérica específica para o antígeno de *C. albicans* em pacientes com candidíase vaginal recorrente foi de DO= 0,1843. Não houve diferença significativa entre níveis de IgE sérica das pacientes com candidíase vaginal recorrente em relação às mulheres com candidíase vaginal esporádica. A média dos níveis de IgE sérica específica para o antígeno de *C. albicans* em pacientes com candidíase vaginal recorrente foi de DO= 0,1740. Figura 9.



*p= 0,8501, Mann-Whitney.

Figura 9. Níveis séricos de IgE em pacientes com candidíase vaginal recorrente e controles com candidíase vaginal esporádica.

Os níveis séricos de IgE específica para o antígeno de *C. albicans* em pacientes com candidíase vaginal recorrente (n= 19) e mulheres com candidíase vaginal esporádica (n= 5) foram dosados através da técnica de ELISA. Os soros foram previamente depletados de IgG utilizando-se "RF-absorbent" e incubados em placas contendo antígeno de *C. albicans*. Anticorpos anti-IgE humana foram adicionados e a reação revelada com tertrametilbenzidine, sendo a densidade óptica medida a 450 nm. O "cut off" representa a média + 2 desvios padrões da DO a 450 nm dos valores de IgE no soro de 5 homens sadios sem história de candidíase. As barras representam as medianas das produções de IgE de cada grupo.

DISCUSSÃO

A candidíase vaginal recorrente é uma doença com alta prevalência, de distribuição mundial e devido à ausência de resposta ao tratamento ou recidiva logo após ao término desse, a cura das pacientes é sem dúvida um desafio para a ciência. No presente estudo a resposta imune celular e humoral de pacientes com candidíase vaginal recorrente foi caracterizada e foi avaliado o papel de citocinas e de antagonistas de citocinas em modular a resposta imunológica nessas pacientes.

Participam dos mecanismos de defesa contra a *C. albicans* a resposta imune inata mediada principalmente por neutrófilos, a resposta imune mediada por células, onde há participação principalmente de células T CD4 e a resposta imune humoral através dos anticorpos da classe IgA e IgG (Rogers 1980 Ferrante 1979 Kagaya 1981 Yamamura 1977). Evidências indiretas sugerem que a resposta imune mediada por células é o principal mecanismo de defesa contra fungos, desde que indivíduos com doenças que causam deficiência da imunidade celular, têm dificuldade em se livrar destes microrganismos (Macher 1988). Embora a deficiência da resposta imune celular seja considerada teoricamente o principal mecanismo envolvido na patogênese da candidíase vaginal recorrente, resultados contraditórios tanto em relação a resposta linfoproliferativa como em relação a produção de citocinas tem sido reportados em pacientes com candidíase vaginal recorrente. Em estudos com mulheres as quais apresentavam esta doença, presença ou ausência tanto da resposta linfoproliferativa a antígenos de *C. albicans*, como produção de citocinas tipo 1 tem sido documentada (Fidel 1993, Fong 1992). Fatores que contribuem para esta discrepância incluem a fase da doença em que foi realizado o estudo imunológico, o tipo de antígeno utilizado e a natureza do material (sangue periférico ou fluido vaginal) usado para avaliar a resposta imune (Lilic 1996). Incapacidade de resposta ao teste de hipersensibilidade tardia ao antígeno de

Candida tem sido mostrada nas pacientes com candidíase vaginal recorrente pelo menos durante os episódios da doença (Syverson 1979, Fong 1992, Fidel 1993). No presente estudo todas as pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentaram teste intradérmico de hipersensibilidade tardia negativo, indicando uma deficiência da resposta imune celular "in vivo" ao antígeno de *Candida*. Adicionalmente, a ausência de resposta linfoproliferativa de todas as sete pacientes com candidíase vaginal recorrente testadas indica a ocorrência de uma imunossupressão específica para o antígeno de *C. albicans*, desde que foram observados altos índices de respostas linfoproliferativas quando células mononucleares destas pacientes foram estimuladas com PPD, toxóide tetânico ou o mitógeno "pokeweed". Estes dados estão em concordância com outros estudos publicados anteriormente (Witkin 1986, Witkin 1986, Hobbs 1977), que também mostram uma diminuição da resposta linfoproliferativa em pacientes com candidíase vaginal recorrente.

Um dos mecanismos propostos para explicar a ausência de resposta linfoproliferativa nestas pacientes é através da ação da histamina, liberada por basófilos, a qual induz a produção de PGE₂ (Witkin 1991). A PGE₂ é um produto do metabolismo do ácido aracdônico com reconhecido efeito anti-linfoproliferativo (Snijdwint 1993, Goodwin 1983). A possibilidade de que macrófagos, por mecanismos não explicados, ou pela produção de prostaglandinas, estejam envolvidos na modulação da resposta imune mediada por células tem sido sugerido, desde que a remoção de monócitos de culturas de células mononucleares estimuladas com antígeno de *Candida* aumentou a resposta linfoproliferativa de mulheres sadias (Kalo-Klein 1991).

Alguns fatores internos ou externos são ditos capazes de influenciar na resposta imune das pacientes com candidíase vaginal: a fase do ciclo menstrual e a natureza do antígeno utilizado nos experimentos são dois desses. Neste aspecto, poucos estudos, muitas vezes contraditórios, tem sido publicados a respeito da imunopatogênese da candidíase vaginal

recorrente. Alguns trabalhos sugerem que a fase folicular do ciclo menstrual (dias 1 a 15) ou a fase lútea (dias 16 a 30) podem influenciar na resposta imunológica devido às altas concentrações de estrógeno ou progesterona respectivamente. Existem, evidências de que os altos níveis de progesterona secretados na fase lútea são capazes de suprimir em cerca de 30% a resposta linfoproliferativa (Kalo-Klein 1991). Essa diminuição da resposta linfoproliferativa seria mediada pela síntese de PGE2 e inibição da síntese de IL-1 por monócitos. Contudo, contradizendo estes dados, em estudo avaliando a resposta imune de pacientes com candidíase vaginal, a supressão da produção de IFN- γ e resposta linfoproliferativa para o antígeno de *Candida* e PPD foi observada na fase folicular e não na fase lútea do ciclo menstrual (Corrigan 1998). No presente estudo, apenas duas pacientes apresentaram altos níveis de IFN- γ . Embora não tenha sido questionada a fase do ciclo menstrual das pacientes, seria atípico que apenas essas duas se encontrassem em fase do ciclo menstrual diferente das demais pacientes. Além do mais, essas duas pacientes apresentaram baixos índices de linproliferação para o antígeno de *C. albicans*. Adicionalmente, as pacientes com candidíase vaginal esporádica que não foram questionadas acerca do período do ciclo que se encontravam, apresentaram altos níveis de IFN- γ em resposta ao antígeno de *C. albicans*. Considerando que a fase do ciclo menstrual represente um aspecto importante com relação a magnitude da resposta imune, as alterações dependentes deste fator não devem ser antígeno específica, esperando-se desta maneira que anormalidades da resposta imune a outros antígenos e a mitógenos pudessem se observadas de acordo com a fase do ciclo menstrual. A documentação de uma resposta imune normal contra outros antígenos e a PHA nestas pacientes não dão suporte a hipótese de que a fase do ciclo menstrual interfere de modo significativo nos resultados observados nas culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans*.

Outro fator que poderia influenciar a resposta imune dessas pacientes é o tipo de antígeno utilizado nos ensaios (Fisher 1977, Lee 1986). Infelizmente até o momento não

disponíveis de antígenos padronizados para avaliação da resposta imune não só de *C. albicans* como de outros agentes causadores de doenças infecciosas. Na superfície da *Candida* existe a presença de polissacarídeos capazes de suprimir a resposta imune celular. O antígeno utilizado em nosso estudo foi uma fração solúvel da *C. albicans* semelhante ao utilizado por Lilic (Lilic 1996). Naquele trabalho Lilic mostra um aumento da produção de IFN- γ em pacientes com candidíase vaginal recorrente em resposta a este antígeno. O nosso preparado antigênico foi capaz de induzir altos níveis de IFN- γ em duas das pacientes com candidíase vaginal recorrente e em mulheres com candidíase vaginal esporádica após estímulo com antígeno de *C. albicans*, afastando a possibilidade deste antígeno ter sido o responsável pela imunossupressão encontrada nessas pacientes.

Uma outra via que poderia explicar a imunossupressão observada em pacientes com candidíase vaginal recorrente seria a presença de uma resposta predominante tipo 2, com produção de IL-4 ou IL-10. Dando suporte a esta hipótese, estudos em modelos experimentais de candidíase tem mostrado que, enquanto camundongos resistentes à infecção por *C. albicans* apresentam uma resposta tipo 1, animais susceptíveis apresentam uma resposta tipo 2 (Rommani 1992). Apesar da maioria dos trabalhos realizados em seres humanos apontarem para uma deficiência da resposta imune celular em pacientes com candidíase vaginal recorrente, alguns estudos mostram expressão forte de citocinas tipo 1 em resposta ao antígeno de *Candida* se comparada com controles sadios (Fidel 1993, Fidel 1998). No presente estudo, a produção de IFN- γ nas culturas de células mononucleares de mulheres com candidíase vaginal esporádica estimuladas com antígeno de *C. albicans* foi significativamente maior do que nas pacientes com candidíase vaginal recorrente. A documentação de uma imunossupressão específica para o antígeno de *C. albicans* foi reforçada pelos altos níveis de IFN- γ encontrados em sobrenadantes de culturas de células mononucleares estimuladas com PPD, tétanus toxóide ou fitohemaglutinina, ao contrário da baixa ou ausência de produção de

IFN- γ nas culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* nas pacientes com candidíase vaginal recorrente. Embora não tenha sido observado que as pacientes com candidíase vaginal recorrente produzissem citocinas tipo 2 em concentrações elevadas, a possibilidade de que esta incapacidade de documentar estas citocinas pudesse ser explicada pela rápida captação destas por células, levou-nos a avaliar se a neutralização de IL-4 e de IL-10 poderia interferir na resposta ao antígeno de *C. albicans*. A forte expressão de IL-4 e baixa produção de IFN- γ em modelos experimentais de leishmaniose em infecção causada pela *L. major* tem enfatizado o papel da IL-4 em modular negativamente a resposta tipo 1 (Scott 1988). No presente estudo, presença de IL-4 não foi demonstrada em sobrenadantes de culturas, mas a neutralização desta citocina com utilização de anticorpos monoclonais não restaurou a produção de IFN- γ . Os achados no presente estudo de que a IL-4 não exerce papel importante na imunidade contra a candidíase vaginal recorrente, desde quando a sua neutralização *in vitro* não foi capaz de restaurar a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ , é sustentada pelo fato de que a IL-4 pode ter um papel benéfico em determinado momento da doença, como demonstrado em animais resistentes e susceptíveis à toxoplasmose (Suzuki 1996) e em modelo experimental de candidíase vaginal (Mencancci 1998). Uma outra especulação para justificar a incapacidade do anticorpo monoclonal anti-IL-4 de modular a resposta imune, seria pela dificuldade do acesso dos anticorpos à IL-4, pelo fato da liberação desta citocina ser feita em íntimo contato com a membrana celular (Kupfer 1994). Enquanto a neutralização da IL-4 não aumentou a resposta imune *in vitro* ao antígeno de *C. albicans*, estes experimentos mostraram uma participação da IL-10 na supressão da resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ na candidíase vaginal recorrente, desde que estas respostas foram observadas com a adição de anticorpo monoclonal anti-IL10 nas culturas de CMSP estimuladas com antígeno de *C. albicans* destas pacientes. Por outro lado, a adição de rhIL-10 em culturas de células de mulheres com candidíase vaginal esporádica estimuladas com antígeno de *C. albicans*

diminuiu significativamente a produção de IFN- γ . A IL-10 é uma citocina regulatória secretada por macrófagos, células CD4⁺ Th2 e linfócitos B e está envolvida na imunomodulação tanto da resposta imune inata como da resposta adaptativa. A IL-10 inibe a secreção de citocinas por macrófagos e linfócitos (de Waal Malefyt 1991, Fiorentino 1991, Oswald 1992), inibe a produção de TNF- α em culturas de células estimuladas com LPS e reduz a mortalidade de camundongos no modelo experimental de choque séptico induzido por LPS (Howard 1993). A nível da resposta imune adaptativa, a IL-10 tem sido a principal citocina no homem em induzir depressão de resposta Th1 (Carvalho 1994, Araújo 1996). A nível da fase efetora da resposta imune, também é evidenciado o papel da IL-10 em modular a resposta imune, desde que ela induz uma diminuição da atividade microbicida de macrófagos (Bogdan 1991). Embora em modelos experimentais de doenças causadas por agentes intracelulares ênfase têm sido dada ao papel da IL-4 de inibir a resposta tipo I (Sher 1992, Liew 1991), no homem, a IL-10 parece ser a principal citocina responsável pela modulação da resposta Th1. Na leishmaniose visceral, na esquistossomose e na leishmaniose cutânea recente tem sido documentado que a produção de IFN- γ pode ser restaurada através da neutralização da IL-10 *in vitro* (Carvalho 1994, Araújo 1996, Rocha 1999). Por outro lado a adição de IL-10 suprime a produção de IFN- γ em culturas de CMSP de indivíduos curados de leishmaniose visceral (Carvalho 1994). Tem sido também documentado de que os mecanismos de ativação linfocitária e macrofágica através da secreção de IL-1 β e as vias microbicidas do macrófago dependentes de óxido nítrico envolvidos na morte da *Candida* e outros patógenos como o *Schistosoma mansoni* são diminuídos após adição de IL-10 às culturas de células (Cenci 1993, Gazzinelli 1992). Embora a neutralização da IL-10 ter aumentado a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ , o nível desta citocina foi baixo nas pacientes com candidíase vaginal recorrente. Estes dados, contudo, são concordantes com estudos na leishmaniose e na esquistossomose, onde apesar de IL-10 não ser muito elevada em sobrenadantes de culturas, a

neutralização desta citocina tem efeito restaurador da produção de IFN- γ e na resposta linfoproliferativa (Carvalho 1995, Araújo 1996), sugerindo que esta citocina possa estar sendo captada rapidamente pelas células e por isso não estar sendo detectada no sobrenadante. Por outro lado, a IL-10 é uma citocina que auto regula a sua produção (de Waal Malefyt 1991). Neste caso, a dosagem desta citocina em sobrenadantes pode não ser relacionada com os efeitos produzidos pela mesma.

A IL-12 é a principal citocina envolvida na derivação da resposta imune Th0 para o perfil Th1. A IL-12 é produzida principalmente por macrófagos e tem sua síntese aumentada após a ligação de moléculas co-estimulatórias CD40 e CD40L expressas em células apresentadoras de antígeno e em células T respectivamente (Hsieh 1993, Macatonia 1993, Seder 1993, Chatelain 1992). Além do seu papel em derivar a resposta para Th1, a IL-12 age a nível de células NK aumentando a citotoxicidade natural e a síntese de IFN- γ por estas células. A adição "in vitro" de IL-12 a culturas de células de pacientes com leishmaniose visceral (Bacellar 1996) e de pacientes com leishmaniose cutânea recente (Almeida 1986) aumentou a resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ . No presente estudo a adição da rhIL-12 às culturas estimuladas com o antígeno de *C. albicans* aumentou a produção de IFN- γ em todas culturas de células de pacientes às quais esta citocina foi adicionado. Desde que a adição de IL-12 em culturas não estimuladas não aumentou a produção de IFN- γ , é possível que o efeito da IL-12 tenha sido a nível de células Th0, as quais, na presença de IL-12 e antígeno de *C. albicans*, foram induzidas a se diferenciar em Th1. Como foi documentado que a adição de IL-12 e a neutralização da IL-10 aumentam a resposta imune celular *in vitro* nestas pacientes, é possível que a ausência de produção de IL-12 esteja relacionada com produção exacerbada de IL-10, que modularia negativamente a produção de citocinas por macrófagos (de Waal Malefyt 1991, Fiorentino 1991, Oswald 1992). Considerando que níveis elevados de IL-10 não foram encontrados em sobrenadantes de culturas de pacientes com

candidíase vaginal recorrente, experimentos futuros devem ser realizados afim de avaliar a expressão de mRNA desta citocina em células mononucleares destas pacientes. Em outras doenças tem sido mostrado que, a despeito da IL-10 não ser documentada em níveis elevados em sobrenadantes de culturas, existe uma forte expressão de RNAm desta citocina (Carvalho 1994).

A participação de anticorpos da classe IgG e IgA na neutralização *in vitro* da *Candida* foi observada em estudos prévios (Rogers 1980). A importância da resposta imune humoral *in vivo* no controle da infecção por *Candida* é questionada, desde que não há maior susceptibilidade à infecção por este fungo em indivíduos com anormalidades congênitas ou adquiridas de linfócitos B. Anticorpos são entretanto produzidos durante as infecções por *Candida*. Níveis elevados de IgG e de IgA tem sido observados em pacientes com candidíase oral (Epstein 1984). Estudos isolados tem também mostrado a presença de anticorpos da classe IgE em pacientes com candidíase vaginal recorrente (Witkin 1989). Embora a IgE participe do processo inflamatório, esta imunoglobulina está principalmente relacionada com a hipersensibilidde imediata. Presença de IgE e eosinófilos no fluido vaginal de pacientes com candidíase vaginal recorrente tem sido documentada (Witkin 1989), e pode explicar o quadro clínico de prurido, edema e hiperemia nas pacientes com candidíase vaginal recorrente (Sobel 1990), além de trazer alguns questionamentos acerca do papel da histamina, promovendo a indução de prostaglandinas, em reduzir a resposta tipo 1 ou mesmo a possibilidade de que uma resposta "alérgica" propicie um ambiente predominantemente Th2, contribuindo para suprimir a resposta Th1 à *Candida*. No presente estudo, a dosagem de IgE no soro mostrou que 90% das pacientes com candidíase vaginal recorrente possuem níveis acima do "cutoff" dessa imunoglobulina, a nível sistêmico. Embora não ter havido diferença significativa entre níveis de IgE em pacientes com candidíase vaginal recorrente em relação a mulheres com candidíase vaginal esporádica, não é descartada a hipótese de que a IgE participe da

imunopatogênese da candidíase vaginal recorrente. Esta área de estudo precisa ser melhor abordada, através da análise da resposta imune compartimentalizada a nível vaginal. Resposta imune compartimentalizada tem sido demonstrada na tuberculose (Arruda 1998) e na leishmaniose (Pirmez 1990), situações nas quais a resposta imunológica a nível de líquido pleural e na pele, respectivamente, é diferente daquela observada no sangue periférico.

Em resumo, o presente estudo mostra que pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentam uma supressão da resposta imune celular caracterizada por baixa ou ausência de proliferação linfocitária e produção de IFN- γ em resposta ao antígeno de *C. albicans*. Os níveis elevados de IgE anti-antígeno de *C. albicans* e o fato da neutralização de IL-10 levar a aumentar a produção de IFN- γ e a resposta linfoproliferativa são indicadores de que a resposta tipo 2 ocorre nestas pacientes e que a IL-10 está suprimindo a resposta Th1 protetora. Embora a IL-10 tenha a capacidade de modular a resposta imune negativamente em diversos níveis, é provável que a modulação mais importante desta citocina seja na síntese IL-12. Desta forma, a IL-10 e a IL-12 se destacam como importantes citocinas na resposta imune da candidíase vaginal recorrente. A observação de que pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentam anormalidades na resposta imune celular contribui para o conhecimento da patogênese desta doença e abre perspectivas para a realização de imunoterapia visando o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficaz.

SUMÁRIO DE RESULTADOS

- 1- Pacientes com candidíase vaginal recorrente apresentam uma deficiência da resposta linfoproliferativa e da produção de IFN- γ específica para o antígeno de *C. albicans*.
- 2- Diferente de pacientes com candidíase vaginal recorrente, mulheres com candidíase vaginal esporádica apresentam altos níveis de IFN- γ em sobrenadantes de culturas estimulados com antígeno de *C. albicans*.
- 3- A neutralização, da IL-10, mas não de IL-4, com anticorpos monoclonais, foi capaz de restaurar a produção de IFN- γ em pacientes com candidíase vaginal recorrente.
- 4- A adição de IL-12 às culturas de pacientes com candidíase vaginal recorrente aumentou a produção de IFN- γ nas culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans*.
- 5- Tanto as pacientes com candidíase vaginal recorrente como com candidíase vaginal esporádica apresentam altos níveis de IgE sérica *Candida*-específica, não havendo diferença significativa entre os grupos estudados.

CONCLUSÕES

- 1- A deficiência da resposta linfoproliferativa e da produção de IFN- γ específicas para o antígeno de *C. albicans* de pacientes com candidíase vaginal recorrente indicam que estas alterações da resposta imune participam da patogênese da candidíase vaginal recorrente.
- 2- Não foi documentado a importância da IL-4 na supressão da resposta imune na candidíase vaginal recorrente desde que a adição de anticorpo monoclonal anti-IL-4 não foi capaz de aumentar a produção IFN- γ .
- 3- A IL-10 desempenha um papel importante na modulação da resposta imune na candidíase vaginal recorrente desde que a sua neutralização aumenta a produção de IFN- γ e resposta linfoproliferativa em culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans*.
- 4- A IL-12 mostrou ser uma importante citocina na regulação da resposta imune de pacientes com candidíase vaginal recorrente, desde que, a sua adição às culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* restaurou a produção de IFN- γ .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M. I.; DE JESUS, A.R.; BACELLAR, O.; SABIN, E.; PEARCE, E.; CARVALHO, E.M. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.**, **26**:1399, 1996.

ARRUDA, S.; CHALHOUB, M.; CARDOSO, S.; BARRAL-NETTO, M. Cell-mediated immune responses and cytotoxicity to mycobacterial antigens in patients with tuberculous pleurisy in Brazil. **Acta Trop** **71**:1, 1998.

BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C.H.; COFFMAN, R.L.; JOHNSON, W.D.; CARVALHO, E.M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **173**:1515, 1996.

BADARO, R.; FALCOFF, E.; BADARO, F.S.; CARVALHO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL, A.; CARVALHO, J.S.; BARRAL-NETTO, M.; BRANDELY, M.; SILVA, L.M.; ET AL... Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **N. Engl. J. Med.**, **322**:16, 1990.

BETZ, M.; FOX, S. Regulation and development of cytochrome c-specific IL-4-producing T cells. **J. Immunol.**, **145**:1046, 1990.

- BOGDAN, C.; Y. VODOVOTZ, Y., NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, **174**:1549, 1991.
- BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, **84**:188, 1996.
- CARPENTER, C. C.; MAYER, K. H.; FISHER, A.; DESAI, M.B.; DURAND, L. Natural history of acquired immunodeficiency syndrome in women in Rhode Island. **Am. J. Med.**, **86**:771, 1989.
- CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R.L.; REED, S.G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, **152**:5949, 1994.
- CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; REED, S.G.; JONES, T.C.; JOHNSON JUNIOR, W.D. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J. Clin. Invest.**, **76**:2066, 1985.
- CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL-NETTO, M.; BADARO, R.; ROCHA, H.; JOHNSON JUNIOR, W.D. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. **J. Infect. Dis.**, **165**:535, 1992.

CARVALHO, E. M.; CORREIA FILHO, D.; BACELLAR, O.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **53**:273, 1995.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W.D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P.D.; COSTA, J.L.; REED, S.; ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**, **135**:4144, 1985.

CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; BISTONI, F.; ROMANI, L. Induction of protective Th1 responses to *Candida albicans* by antifungal therapy alone or in combination with an interleukin-4 antagonist. **J. Infect. Dis.**, **176**:217, 1997.

CENCI, E.; ROMANI, L.; MENCACCI, R.; SPACCAPELO, E.; SCHIAFFELLA, P.; PUCETTI, BISTONI, F. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. **Eur. J. Immunol.**, **23**:1034, 1993.

CHALLACOMBE, S. J. Immunologic aspects of oral candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, **78**:202, 1994.

CHATELAIN, R.; VARKILA, K.; COFFMAN, R.L. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. **J. Immunol.**, **148**:1182, 1992.

CHATHAM, W. W.; KIMBERLY, R.P. Treatment of lupus with corticosteroids. **Lupus** **10**:140, 2001.

CLIFT, R. A. Candidiasis in the transplant patient. **Am. J. Med.**, 77:34, 1984.

CORRIGAN, E. M.; CLANCY, R.L.; DUNKLEY, M.L.; EYERS, F.M.; BEAGLEY, K.W. Cellular immunity in recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clin. Exp. Immunol.**, 111:574, 1998.

CRESTI, S.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; GUGLIELMETTI, P.; ROSSOLINI, G.M.; MORACE, G.; FADDA, G. Molecular typing of *Candida* spp. by random amplification of polymorphic DNA and analysis of restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA repeats. **New Microbiol.**, 22:41, 1999.

DAHL, K. M.; KEATH, E.J.; FRASER, V.J.; POWDERLY, W.G. Molecular epidemiology of mucosal candidiasis in HIV-positive women. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, 13:485, 1997.

DE WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M.G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.**, 174:915, 1991.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1. **Dig. Dis. Sci.**, 33:25S, 1988.

- DOREY, J. L.; BLASBERG, B.; MACENTEE, M.I.; CONKLIN, R.J. Oral mucosal disorders in denture wearers. **J. Prosthet. Dent.**, **53**:210, 1985.
- DUTRA, M.; MARTINELLI, R.; DE CARVALHO, E.M.; RODRIGUES, L.E.; BRITO, E.; ROCHA, H. 1985. Renal involvement in visceral leishmaniasis. **Am. J. Kidney Dis.**, **6**:22, 1985.
- EPSTEIN, J. B.; TRUELOVE, E.L.; IZUTZU, K.T. Oral candidiasis: pathogenesis and host defense. **Rev. Infect. Dis.**, **6**:96, 1984.
- FERRANTE, A.; THONG, Y.H. Requirement of heat-labile opsonins for maximal phagocytosis of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, **17**:293, 1979.
- FIDEL, JUNIOR, P. L.; CUTRIGHT, J.L.; TAIT, L.; SOBEL, J.D. A murine model of *Candida glabrata* vaginitis. **J. Infect. Dis.**, **173**:425, 1996.
- FIDEL JUNIOR, P. L.; GINSBURG, K.A.; CUTRIGHT, J. L.; WOLF, N.A.; LEAMAN, D.; DUNLAP, K.; SOBEL, J.D. Vaginal-associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen. **J. Infect. Dis.**, **176**:728, 1997.
- FIDEL JUNIOR, P. L.; LYNCH, M.E.; REDONDO-LOPEZ, V.; SOBEL, J.D.; ROBINSON, R. Systemic cell-mediated immune reactivity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. **J. Infect. Dis.**, **168**:1458, 1993.

FIDEL JUNIOR, P. L.; LYNCH, M.E.; SOBEL, J.D. Candida-specific Th1-type responsiveness in mice with experimental vaginal candidiasis. **Infect. Immun.**, **61**:4202, 1993.

FIDEL JUNIOR, P. L.; SOBEL, J.D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, **9**:335, 1996.

FIDEL JUNIOR, P. L.; SOBEL, D. Protective immunity in experimental Candida vaginitis. **Res. Immunol.** **149**:361, 1998.

FIorentino, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, **170**:2081, 1989.

FIorentino, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.**, **147**:3815, 1991.

FIorentino, D. F.; ZLOTNIK, A., VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R., HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O'GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J. Immunol.**, **146**:3444, 1991.

FISCHER, J. Optical polarization reveals different ultrastructural molecular arrangement of polysaccharides in the yeast cell walls. **Acta Biol.**, **28**:49, 1977.

FLEURY, F. J. Adult vaginitis. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **24**:407, 1981.

FONG, I. W.; BANNATYNE, R.M.; WONG, D.P. Lack of in vitro resistance of *Candida albicans* to ketoconazole, itraconazole and clotrimazole in women treated for recurrent vaginal candidiasis. **Genitourin Med.**, **69**:44, 1993.

FONG, I. W.; MCCLEARY, P.; READ, S. Cellular immunity of patients with recurrent or refractory vulvovaginal moniliasis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **166**:887, 1992.

FULURIJA, A.; ASHMAN, R.B.; PAPADIMITRIOU, J.M. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. **Microbiology**, **142**:3487, 1996.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L.; SHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. **J. Immunol.**, **148**:1792, 1992.

GEIGER, A. M.; FOXMAN, B.; SOBEL, J.D. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *C. glabrata* and no candida. **Genitourin Med.**, **71**:304, 1995.

GOODWIN, J. S.; CEUPPENS, J. Regulation of the immune response by prostaglandins. **J. Clin. Immunol.**, **3**:295, 1983.

GREENFIELD, R. A.; ABRAMS, V.L.; CRAWFORD, D.L.; KUHL, T.L. Effect of abrogation of natural killer cell activity on the course of candidiasis induced by intraperitoneal administration and gastrointestinal candidiasis in mice with severe combined immunodeficiency. **Infect. Immun.**, **61**:2520, 1993.

HERBST, H.; FOSS, H.D.; SAMOL, J.; ARAUJO, I.; KLOTZBACH, H.; KRAUSE, H.; AGATHANGGELOU, A.; NIEDOBITEK, G.; STEIN, H. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. **Blood** **87**:2918, 1996.

HOBBS, J. R.; BRIGDEN, D.; DAVIDSON, F.; KAHAN, M.; OATES, J.K. Immunological aspects of candidal vaginitis. **Proc. R. Soc. Med.**, **70**:11, 1977.

HOWARD, M.; MUCHAMUEL, T.; ANDRADE, S.; MENON, S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. **J. Exp. Med.**, **177**:1205, 1993.

HSIEH, C. S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K.M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, **260**:547, 1993.

HURLEY, R. Candidal vaginitis. **Proc. R. Soc. Med.**, **70**:1, 1977.

HURLEY, R. Recurrent Candida infection. **Clin. Obstet. Gynaecol.**, **8**:209, 1981.

HURLEY, R.; DE LOUVOIS, J. *Candida vaginitis*. **Postgrad. Med. J.**, **55**:645, 1979.

KAGAYA, K.; FUKAZAWA, Y. 1981. Murine defense mechanism against *Candida albicans* infection. II. Opsonization, phagocytosis, and intracellular killing of *C. albicans*. **Microbiol. Immunol.**, **25**:807, 1981.

KALO-KLEIN, A.; WITKIN, S.S. *Candida albicans*: cellular immune system interactions during different stages of the menstrual cycle. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **161**:1132, 1989.

KALO-KLEIN, A.; WITKIN S.S. Prostaglandin E2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, **58**:260, 1990.

KALO-KLEIN, A.; WITKIN, S.S. Regulation of the immune response to *Candida albicans* by monocytes and progesterone. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **164**:1351, 1991.

KAPLAN, G.; MATHUR, N.K.; JOB, C.K.; NATH, I.; COHN, Z.A. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **86**:8073, 1989.

KIRKPATRICK, C. H. Chronic mucocutaneous candidiasis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, **8**:448, 1989.

KLEIN, R. S.; HARRIS, C.A.; SMALL, C.B.; MOLL, B.; LESSER, M.; FRIEDLAND, G.H. Oral candidiasis in high-risk patients as the initial manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, **311**:354, 1984.

KUPFER, H., MONKS, C.R.; KUPFER, A. Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. **J. Exp. Med.**, **179**:1507, 1994.

LEE, W. M.; HOLLEY JUNIOR, H.P.; STEWART, J.; GALBRAITH, G.M. Refractory esophageal candidiasis associated with a low molecular weight plasma inhibitor of T-lymphocyte function. **Am. J. Med. Sci.**, **292**:47, 1986.

LIEW, F. Y. The effector mechanism and vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Behring Inst. Mitt.** 239, 1991.

LILIC, D.; CANT, A.J.; ABINUN, M.; CALVERT, J.E.; SPICKETT, G.P. Chronic mucocutaneous candidiasis. I. Altered antigen-stimulated IL-2, IL-4, IL-6 and interferon-gamma (IFN-gamma) production. **Clin. Exp. Immunol.**, **105**:205, 1996.

LYNCH, M. E.; SOBEL, J.D; FIDEL JUNIOR, P.L. Role of antifungal drug resistance in the pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **J. Med. Vet. Mycol.**, **34**:337, 1996.

MACATONIA, S. E.; HSIEH, C.S.; MURPHY, K.M.; O'GARRA, A. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from alpha beta TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN-gamma production is IFN-gamma-dependent. **Int.Immunol.**, **5**:1119, 1993.

MACHER, A. M. The pathology of AIDS. **Public Health Rep.**, **103**:246, 1988.

MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; CENCI, E.; D'OSTIANI, C.F.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; KOPF, M.; L. ROMANI, L. Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4+ T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. **J. Exp. Med.**, **187**:307, 1998.

MORAES, P. S.; GOIABA, S.L.; TAKETOMI, E.A. *Candida albicans* allergen immunotherapy in recurrent vaginal candidiasis. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, **10**:305, 2000.

MORTON, R. S.; RASHID, S. Candidal vaginitis: natural history, predisposing factors and prevention. **Proc. R. Soc. Med.**, **70**:3, 1977.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, **136**:2348, 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, 7:145, 1989.

MURRAY, H. W.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. **J. Clin. Invest.**, 72:1506, 1983.

ODDS, F. C. Problems in the laboratory assessment of antifungal activity. **Postgrad. Med. J.**, 55:677, 1979.

ODDS, F. C.; WEBSTER, C.E.; MAYURANATHAN, P.; SIMMONS, P.D. Candida concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, 26:277, 1988.

OSWALD, I. P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89:8676, 1992.

PERRY, C. M.; WHITTINGTON, R.; D. MCTAVISH, D. Fluconazole. An update of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties, and therapeutic use in vaginal candidiasis. **Drugs**, 49:984, 1995.

PIRMEZ, C.; COOPER, C.; PAES-OLIVEIRA, M.; A. SCHUBACH, A.; TORIGIAN, V.K.; MODLIN, D. R. L. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **J. Immunol.**, **145**:3100, 1990.

POLAN, M. L.; DANIELE, A.; KUO, A. Gonadal steroids modulate human monocyte interleukin-1 (IL-1) activity. **Fertil. Steril.**, **49**:964, 1988.

PUCETTI, P.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; MOSCI, P.; ENSSLE, K.H.; ROMANI, L.; BISTONI, F. Cure of murine candidiasis by recombinant soluble interleukin-4 receptor. **J. Infect. Dis.**, **169**:1325, 1994.

PUCETTI, P.; ROMANI, L.; BISTONI, F. A TH1-TH2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. **Trends Microbiol.**, **3**:237, 1995.

RINGDAHL, E. N. Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Am. Fam. Physician**, **61**:3306, 2000.

ROCHA, P. N.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; DE JESUS, A.R.; FILHO, D.C.; FILHO, A.C.; BARRAL, A.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO, E.M. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, **180**:1731, 1999.

ROGERS, T. J.; BALISH, E. Immunity to *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.**, **44**:660, 1980.

ROMANI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; SPACCAPELO, R.; GROHMANN, U.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Gamma interferon modifies CD4+ subset expression in murine candidiasis. **Infect. Immun.**, **60**:4950, 1992.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; GROHMANN, U.; MOCCI, S.; MOSCI, P.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. **J. Exp. Med.**, **176**:19, 1992.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; MOSCI, P.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. CD4+ subset expression in murine candidiasis. Th responses correlate directly with genetically determined susceptibility or vaccine-induced resistance. **J. Immunol.**, **150**:925, 1993.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONNETTI, L.; GROHMANN, U.; BISTONI, F. Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. **J. Immunol.**, **152**:3514, 1994.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Biological role of Th cell subsets in candidiasis. **Chem. Immunol.**, **63**:115, 1996.

ROSENBAUM, A. L.; PHELPS, D.L.; ISENBERG, S.J.; LEAKE, R.D.; DOREY, F. Retinal hemorrhage in retinopathy of prematurity associated with tocopherol treatment. **Ophthalmology**, **92**:1012, 1985.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.**, **168**:1675, 1988.

SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W.E. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**:10188, 1993.

SHER, A.; GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M.; PEARCE, E.J.; BERZOFSKY, J.A.; MOSMANN, T.R.; JAMES, S.L.; MORSE, H.C. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunol. Rev.**, **127**:183, 1992.

SNIJDEWINT, F. G.; KALINSKI, P.; WIERENGA, E.A.; BOS, J.D.; KAPSENBERGM.L. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. **J. Immunol.**, **150**:5321, 1993.

SOBEL, J. D. Candida infections in the intensive care unit. **Crit. Care Clin.**, **4**:325, 1988.

SOBEL, J. D. Candida vulvovaginitis. **Semin. Dermatol.**, **15**:17, 1996.

- SOBEL, J. D. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. **Ann.N. Y. Acad. Sci.**, **544**:547, 1988.
- SOBEL, J. D. Vaginitis in adult women. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, **17**:851, 1990.
- SOBEL, J. D.; CHAIM, W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. **J. Clin. Microbiol.**, **34**:2497, 1996.
- SOBEL, J. D.; CHAIM, W.; LEAMAN, D. Recurrent vulvovaginal candidiasis associated with long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women. **Obstet. Gynecol.**, **88**:704, 1996.
- SOBEL, J. D.; J. A. VAZQUEZ J.A. Symptomatic vulvovaginitis due to fluconazole-resistant *Candida albicans* in a female who was not infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, **22**:726, 1996.
- SPACCAPELO, R.; ROMANI, L. TONNETTI, E.; CENCI, A.; MENCACCI, G.; DEL SERO; TOGNELLINI, R.; REED, S.G.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. **J. Immunol.**, **155**:1349, 1995.
- SUZUKI, Y.; YANG, Q.; YANG, S.; NGUYEN, N.; LIM, S.; LIESENFELD, O.; KOJIMA, T.; REMINGTON, J.S. IL-4 is protective against development of toxoplasmic encephalitis. **J. Immunol.**, **157**:2564, 1996.

SYVERSON, R. E.; BUCKLEY, H.; GIBIAN, J.; RYAN JUNIOR, G.M. Cellular and humoral immune status in women with chronic *Candida* vaginitis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **134**:624, 1979.

TONNETTI, L.; SPACCAPELO, R.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; PUC CETTI, P.; COFFMAN, R.L.; BISTONI, F.; ROMANI, L. Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. **Eur. J. Immunol.**, **25**:1559, 1995.

TRINCHIERI, G.; GEROSA, F. Immunoregulation by interleukin-12. **J. Leukoc. Biol.**, **59**:505, 1996.

VALDIMARSSON, H.; HIGGS, J.M.; WELLS, R.S.; YAMAMURA, M.; HOBBS, J.R.; HOLT, P.J. Immune abnormalities associated with chronic mucocutaneous candidiasis. **Cell. Immunol.**, **6**:348, 1973.

WEISSENBACHER, S.; WITKIN, S.S.; TOLBERT, V.; GIRALDO, P.; LINHARES, I.; HAAS, A.; WEISSENBACHER, E.R.; LEDGER, W. J. Value of *Candida* polymerase chain reaction and vaginal cytokine analysis for the differential diagnosis of women with recurrent vulvovaginitis. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, **8**:244, 2000.

WITKIN, S. S. Inhibition of *Candida*-induced lymphocyte proliferation by antibody to *Candida albicans*. **Obstet. Gynecol.**, **68**:696, 1986.

WITKIN, S. S.; HIRSCH, J.; LEDGER, W. J. A macrophage defect in women with recurrent *Candida* vaginitis and its reversal in vitro by prostaglandin inhibitors. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **155**:790, 1986.

WITKIN, S. S.; JEREMIAS, J.; LEDGER, W. J. Vaginal eosinophils and IgE antibodies to *Candida albicans* in women with recurrent vaginitis. **J. Med. Vet. Mycol.**, **27**:57, 1989.

WITKIN, S. S.; KALO-KLEIN, A.; GALLAND, L.; TEICH, M.; LEDGER, W. J. Effect of *Candida albicans* plus histamine on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. **J. Infect. Dis.**, **164**:396, 1991.

YAMAMURA, M.; VALDIMARSSON, H. Participation of C3 in intracellular killing of *Candida albicans*. **Scand. J. Immunol.**, **6**:591, 1977.

CASO N°:

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROTOCOLO: Candidíase Vaginal Recorrente: Avaliação da Resposta Imune

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal da Bahia

INVESTIGADOR: Edgar Marcelino de Carvalho Filho

TELEFONE: 2377353 / 2459411

NATUREZA E PROPOSTA DO ESTUDO

Neste momento você está sendo convidada a participar de um estudo. O investigador irá responder qualquer dúvida que você tenha sobre este consentimento ou sobre o estudo em questão.

A finalidade deste estudo é determinar se existem diferenças na resposta imunológica entre pacientes com Candidíase Vaginal Recorrente e mulheres com história de Candidíase Vaginal esporádica.

Sua participação neste estudo é voluntária. A decisão de não participar, ou de se retirar do estudo depois do mesmo já ter iniciado, não ocasionará nenhum problema no tratamento médico de sua doença ou de seus familiares nesta instituição, clínica ou hospital, hoje ou no futuro.

EXPLICAÇÕES DOS PROCEDIMENTOS A SEREM SEGUIDOS

Procedimentos ou Tratamentos Experimentais:

Inicialmente o médico irá colher sua história clínica incluindo doenças que você já teve e medicações que você utiliza. Você será submetida a um exame físico e ginecológico e o médico irá colher uma amostra de material vaginal para que possa ser efetuado exames microbiológicos. O médico irá avaliar se você preenche todos os critérios para participação neste estudo e caso isto ocorra, seu sangue será colhido para realizar os exames imunológicos. Uma nova avaliação será feita 6 meses após o tratamento, que será com fluconazol 150mg administrada uma vez por semana. A quantidade de sangue a ser colhida será de 30ml (aproximadamente duas colheres de sopa).

Duração do Estudo e Número de Participantes :

Você será uma das 20 pacientes que irão participar deste estudo.

O período deste estudo é de 6 meses de tratamento e 6 meses de acompanhamento após o final do tratamento.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESTE ESTUDO

Embora o estudo de resposta imune não venha a trazer benefício imediato para você a documentação de que você tem uma defeito na resposta imune celular poderá contribuir para a utilização futura de medicamentos que melhorem o mecanismo de defesa.

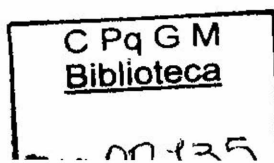
CONFIDENCIALIDADE

As informações de seu histórico médico assim como de seus dados pessoais serão obtidos e processados exclusivamente para fins de pesquisa e sendo os mesmos confidenciais, serão tomadas todas as precauções para preservá-los. A menos que requerido judicialmente, apenas os investigadores, terão acesso aos dados confidenciais de seu prontuário médico e dados que o identifiquem pelo nome.

Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

Assinando este consentimento você estará autorizando o investigador, o acesso ao seu prontuário médico e aos seus dados sem no entanto renunciar aos direitos assegurados por leis de proteção de dados vigentes. Você concorda em não restringir o uso desses dados, mesmo que você venha a se afastar do estudo.

Todo o material biológico coletado será utilizado apenas neste estudo para realização dos exames laboratoriais especificados no próprio protocolo (avaliação imunológica e exames laboratoriais de segurança). Este material não será utilizado em outros estudos ou para outros fins.



PESSOAS PARA CONTATO

O investigador e seus auxiliares irão responder a todas as suas dúvidas. Se você tiver dúvidas adicionais durante o decorrer do estudo de seus direitos como participante da pesquisa, você pode contatar:

Dr. Edgar Marcelino de Carvalho (Tels. 2377353 / 2459411)

Em um caso de um evento adverso ou de uma injúria relacionada a pesquisa ou qualquer outro problema que surgir, por favor contate imediatamente o médico do estudo.

DECLARAÇÃO DA PACIENTE

Eu, voluntariamente concordo em participar do estudo: **Candidíase Vaginal Recorrente: Avaliação de Reposta Imune a Antígeno de *Candida albicans*.**

Declaro ter lido e compreendido esta declaração de consentimento, na qual foram me informados todos os dados importantes sobre a conduta deste estudo. Foi me oferecido ampla oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram totalmente. Se eu não participar ou se eu decidir suspender minha participação neste estudo, não serei penalizada e não renunciarei de quaisquer direitos legais.

Nome da Paciente:

Assinatura da Paciente:

Nome do Investigador:

Assinatura do Investigador:

Pessoa que apresentou o consentimento livre e esclarecido:

Nome:

Assinatura:

Downregulation of IFN- γ production in patients with recurrent vaginal candidiasis

Lucas P. Carvalho, BSc, Olívia Bacellar, PhD, Nilma Neves, MD, Amélia R. de Jesus, MD, PhD, and Edgar M. Carvalho, MD, PhD Salvador, Brazil

Background: Recurrent vaginal candidiasis (RVC) is an important health problem with unknown pathogenesis. Although impairment of the T-cell response is associated with persistent or recurrent candidiasis, data on immunologic responses in patients with RVC are controversial.

Objectives: To evaluate the T-cell response in patients with RVC and the ability of cytokines and cytokine antagonists to modulate IFN- γ production in cultures stimulated with *Candida albicans* antigens.

Methods: Participants in the study included 13 patients with RVC and 7 control women with sporadic candidiasis.

Cytokines were determined by ELISA in supernatants of mononuclear cells with *C. albicans*, purified protein derivative, or tetanus toxoid antigen.

Results: IFN- γ production was absent or low in 11 of 13 women (84.6%) with RVC. Absent or low IFN- γ production was specific to *C. albicans* antigens (189 ± 389 pg/mL), because high IFN- γ levels were found in cultures stimulated with purified protein derivative (739 ± 774 pg/mL) or tetanus toxoid antigens (1085 ± 546 pg/mL). Monoclonal antibody anti-IL-10 enhanced IFN- γ levels (750 ± 753 pg/mL), and IL-10 suppressed this cytokine production in patients with sporadic candidiasis.

Conclusions: Mononuclear cells from patients with RVC stimulated with *C. albicans* antigen have low or absent IFN- γ production. IL-10 plays an important role in downregulation of the T-cell response in these patients. (J Allergy Clin Immunol 2002;109:102-5.)

Key words: Recurrent vaginal candidiasis, cytokines, immune regulation

Recurrent vaginal candidiasis (RVC) is an important health problem and has been observed in up to 5% of women who have vulvovaginal infection caused by *Candida* species.^{1,2} Although several species of *Candida* can cause disease in humans, RVC is predominantly associated with *Candida albicans*.³⁻⁵ Several factors such as use of antibiotics, pregnancy, uncontrolled diabetes mel-

Abbreviations used

PPD: Purified protein derivative
RVC: Recurrent vaginal candidiasis
TT: Tetanus toxoid

litus, and use of estrogens are associated with development of candidiasis. Additionally, it has been shown that impairment of cell-mediated immunity and neutrophil dysfunction can increase susceptibility to *C. albicans* infection.⁶ In experimental models of candidiasis, CD4+ T (T_H1 or T_H2) cells have been determined to play a central role in the outcome of infection.⁷ Protection correlates with the occurrence of T_H1 -type responses,^{8,9} whereas T_H2 -like responses are associated with disease exacerbation and pathology.^{10,11} Evidence for the role of human T-cell responses in the control of candidiasis includes high frequency and severity of this fungal infection in patients with HIV infection^{12,13} and documentation of an impaired cell-mediated immune response in patients with mucocutaneous candidiasis.¹⁴⁻¹⁶ In spite of the strong association between severe candidiasis and an abnormal T_H1 -type immune response, the pathogenesis of RVC is not well established. Although absent or low lymphoproliferative responses to *C. albicans* antigen have been noted,¹⁷⁻¹⁹ similar levels of IL-2 and IFN- γ have been detected in women with RVC and control patients with sporadic candidiasis.²⁰ Additionally, expression of T_H1 cytokines has been documented in cells recovered from vaginal fluid in patients with RVC.²¹ Other studies of patients with RVC have documented increased levels of *C. albicans*-specific IgE in vaginal fluid,²² as well as an association between respiratory allergies and vaginitis.²³⁻²⁵ The aims of this study were to characterize the cytokine profile in the supernatant of mononuclear cells obtained from patients with RVC and stimulated with *C. albicans* antigens and to determine the ability of IL-4 and IL-10 to modulate T-cell immunologic responses to *C. albicans* antigen.

METHODS

Subjects

Participants in this study included 13 women who were referred to the immunology service of Hospital Universitário Professor Edgard Santos because of recurrence of vaginal candidiasis despite

From Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

Received for publication April 9, 2001; revised September 6, 2001; accepted for publication September 25, 2001.

Reprint requests: Edgar M. Carvalho, MD, PhD, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia, 5º andar, Rua João das Botas s/nº, Canela 40110-160, Salvador, Bahia, Brazil.

Copyright © 2002 by Mosby, Inc.

0091-6749/2002 \$35.00 + 0 1/84/120555

doi:10.1067/mai.2002.120555

TABLE I. Age, duration of illness, and levels of IFN- γ in 13 women with recurrent vaginal candidiasis in cultures stimulated with *C albicans* antigen or PHA

Patient No.	Age (y)	Duration of disease (y)	Levels of IFN- γ (pg/mL)		
			Media	<i>C albicans</i>	PHA
1	30	2	0	0	2150
2	39	2	0	0	2901
3	30	2	0	75	ND
4	39	3	0	0	1448
5	37	3	0	0	1662
6	25	3	0	148	2288
7	25	5	18	1132	1572
8	42	5	0	0	3358
9	26	6	39	997	1673
10	24	6	0	58	1700
11	29	10	0	0	2214
12	32	13	0	175	1997
13	32	14	0	0	1766

ND, Not done.

antimycotic therapy. The diagnosis of candidiasis was based on identification of *Candida* organisms on cytologic examination. In the 7 patients for whom the *Candida* species was characterized, *C albicans* was the causal agent. All the patients had negative serology to HIV infection, and none had diabetes or renal or liver failure. Control patients were 7 women with sporadic candidiasis. These patients had no history of vulvovaginal candidiasis and no evidence of *C albicans* infection during a 1-year follow-up period. The study followed the guidelines of the ethical committee of the Hospital Universitário Professor Edgard Santos, and informed consent was obtained from all patients.

C albicans antigen preparation

C albicans isolate from a patient with RVC was cultured in Sabouraud's media. The cultures were centrifuged at 3000g for 30 minutes, and the pellet was washed 3 times with PBS. The pellet was resuspended in 0.5N sodium hydroxide and then frozen (-70°C) and thawed at 37°C about 20 times. After the suspension was centrifuged at 3000g for 30 minutes, the supernatant was collected and the pH was adjusted to 7.3. The protein content was determined by using the method of Lowry et al.²⁶

Delayed-type hypersensitivity response

Intradermal skin testing was performed by inoculation with 0.1 mL of *C albicans* antigen (Alergofar, Rio de Janeiro, Brazil) on the forearm. The responses were evaluated after 48 hours, and results were considered positive when induration was greater than 5 mm.

Cell culture and cytokine assay

PBMCs were isolated from heparin-treated venous blood by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation (LSM; Organon Teknika Corporation, Durham, NC). After PBMCs were washed 3 times in 0.9% sodium chloride, they were resuspended in RPMI-1640 culture medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% human AB serum, 100 IU/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Cells were adjusted to 3×10^6 cells/mL, put in 24-well plates, and stimulated with *C albicans* antigen (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetanus toxoid (TT) (5 LF/mL), purified protein derivative (PPD) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), or PHA in a final dilution of 1:100. In the cultures of PBMCs from some of these patients, monoclonal antibodies anti-IL-4 and anti-IL-10 or isotype controls (kindly provided by Dr Coffman, DNAX Institute, Palo Alto, Calif) were added in a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In a few cultures of PBMCs obtained from women with sporadic candidiasis and stimulated with *C albicans* antigen, recombi-

nant human IL-10 was added (200 ng/mL). After incubation for 72 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 , supernatants were collected and stored at -70°C . The levels of IL-5, IL-10, and IFN- γ were measured by an ELISA (R&D Systems, Minneapolis, Minn) sandwich method, and the results are expressed as picograms per millimeter.

Statistical analysis

The statistical comparisons were performed by using the Mann-Whitney *U* test.

RESULTS

The age, duration of illness, and the IFN- γ production in cultures stimulated with *C albicans* antigen and PHA for the patients studied are shown in Table I. The age of the patients ranged from 24 to 42 years (32 ± 6 years); the median illness duration was 5 years (range, 2-14 years). Although high levels of IFN- γ (526 ± 329 pg/mL) were observed in the supernatants of lymphocyte cultures obtained from women with sporadic candidiasis and stimulated with *C albicans* antigen, absent or low production of IFN- γ was observed in 11 of 13 women (84.6%) with RVC. However, high levels of IFN- γ were observed in the cultures of all 12 patients with RVC whose cells were stimulated with PHA (2094 ± 545 pg/mL). Results of intradermal skin tests with *C albicans* antigen were negative in all patients with RVC and positive in 5 of 7 patients with sporadic candidiasis. The immunosuppression observed in patients with RVC was specific to *C albicans* antigens, because cells from these patients secreted high levels of IFN- γ when stimulated with PPD or TT (Fig 1). The production of IFN- γ in lymphocyte cultures from patients with RVC when stimulated with PPD was 739 ± 774 pg/mL, and when stimulated with TT, 1085 ± 546 pg/mL. These values were higher ($P < .05$) than those observed in cultures stimulated with *C albicans* antigen (198 ± 389 pg/mL).

Levels of IL-5 and IL-10 were measured in supernatants of lymphocyte culture to evaluate the possibility that the decrease in IFN- γ production was related to a strong $\text{T}_\text{H}2$ -like immune response. Low levels of both IL-5 (39 ± 60 pg/mL) and IL-10 (16 ± 32 pg/mL) were detect-

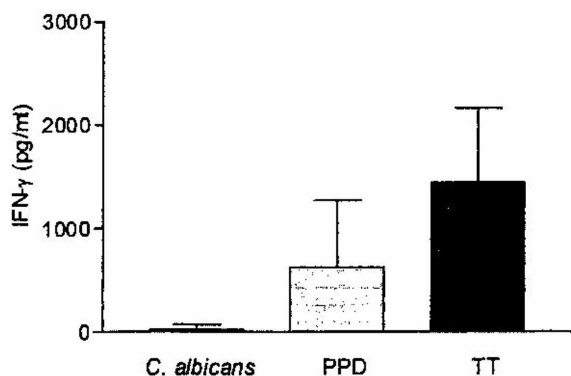


FIG 1. Levels of IFN- γ in supernatants of PBMCs from patients with RVC stimulated with *C albicans* (n = 13), PPD (n = 9), and TT (n = 4). Data represent mean and SD of IFN- γ production in cultures stimulated with *C albicans* antigen (0.05 μ g/mL), PPD (2 μ g/mL), or TT (5 LF/mL).

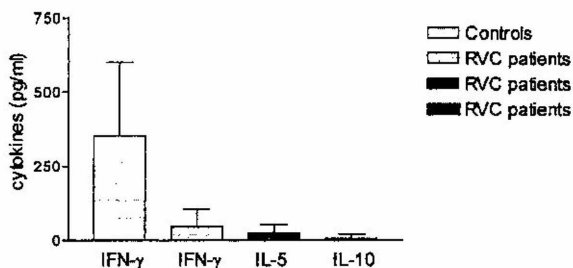


FIG 2. Cytokine profile in patients with RVC (n = 13) and control patients (n = 7). Data represent mean and SD of IFN- γ , IL-5, and IL-10 production in supernatants of PBMCs stimulated with *C albicans* antigen (0.05 μ g/mL).

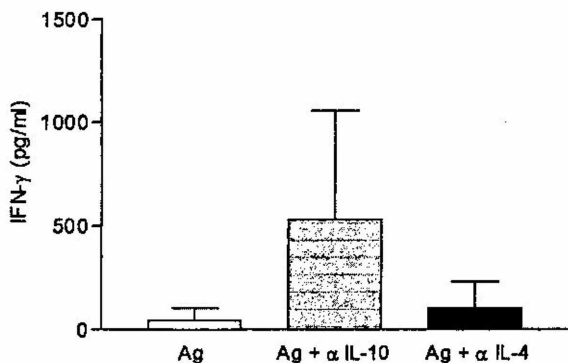


FIG 3. Evaluation of the ability of monoclonal antibodies against IL-4 and IL-10 to restore IFN- γ production in patients with RVC (n = 6). Cultures were stimulated with *C albicans* antigen (0.05 μ g/mL) in the absence or presence of monoclonal antibodies anti-IL-4 (200 μ g/mL) and anti-IL-10 (200 μ g/mL). Ag, Antigen.

ed in cultures stimulated with *C albicans* antigen (Fig 2).

Monoclonal antibodies anti-IL-4 and anti-IL-10 were added to the cultures stimulated with *C albicans* antigens to determine whether the inability to produce IFN- γ in patients with RVC was due to suppressive effects of regulatory cytokines (Fig 3). IFN- γ production in cultures of PBMCs

from 6 women with RVC stimulated with *C albicans* antigens was 64 ± 70 pg/mL. Addition of monoclonal anti-IL-4 antibody had modest effects on IFN- γ production (100 ± 81 pg/mL). In contrast, neutralization of IL-10 enhanced IFN- γ production 10-fold (750 ± 753 pg/mL). Although it was variable, enhancement of IFN- γ production after IL-10 neutralization was observed in all 6 patients. Isotype controls had no effect on IFN- γ production. IL-10 was added to lymphocyte cultures of patients with sporadic candidiasis to evaluate this cytokine's ability to downregulate the immune response to *C albicans* antigen. The IFN- γ levels after stimulation with *C albicans* antigen were 353 ± 248 pg/mL but were reduced significantly to 10 ± 12 pg/mL after the addition of recombinant human IL-10 (200 μ g/mL).

DISCUSSION

The main findings of this study are that the majority of the women with RVC had an antigen-specific impairment of IFN- γ production and that neutralization of IL-10 enhanced the production of this cytokine. All patients studied were young non-malnourished women without a history of debilitating disease and with negative HIV serology. We chose to evaluate IFN- γ production because this cytokine is produced by natural killer and T_H1 cells and is associated with a host defense mechanism against *C albicans*.³ Although there was great variability in levels of IFN- γ production, it was clear that in the majority of the women with RVC, IFN- γ production was absent or low.

Factors involved in the impairment of T-cell responses to *C albicans* antigen include the nature of the antigen preparation, the phase of the menstrual cycle during which the evaluation is performed,²⁷ increased synthesis of PGE₂,¹⁷ and an imbalance in T_H1 and T_H2 subpopulations of cells. The antigen used was the same throughout the study, and reproducibility of the results was documented. Additionally, although polysaccharidic antigens may suppress the T-cell response,^{28,29} our antigen was prepared in such a way that it should predominantly contain protein, and based on Lilic studies, it should induce more IFN- γ and lymphocyte proliferation.¹⁴ Although we did not inquire about the phase of the menstrual cycle, this variable would not be expected to affect our results, because the chance of being in the same phase of the menstrual cycle would be equal for both groups of patients (those with sporadic candidiasis and those with RVC). High activity of T_H2 cells suppress IFN- γ production,³⁰ but because of the difficulty in detecting IL-4 in supernatants of human lymphocyte cultures, IL-5 was used as a marker of T_H2 activation. The observation in the present study of low levels of IL-5 in supernatants of PBMCs from these patients argues against the possibility that a strong T_H2 response was involved in the downregulation of IFN- γ production. Although IL-10 levels were not elevated, the effect of neutralization of this cytokine in IFN- γ production was evident. The observation that anti-IL-10 antibody restores immune response in patients, in spite of the very small amount of this cytokine in supernatants, may be explained in two ways: (1) IL-10 can be used

quickly by the cells and (2) IL-10 production can be autoregulated.³¹ In such cases, the low levels of IL-10 did not rule out that this cytokine had been produced in great amounts. We have observed similar findings in patients with visceral leishmaniasis³² and schistosomiasis.³³

Our data indicate that patients with RVC have an immunosuppression specific to *C albicans* antigens, because normal T-cell responses were documented in cultures with unrelated antigens such as TT and PPD. Considering that a predominant TH2 response was not observed, it is possible that the unresponsiveness to *C albicans* antigen may be related to anergy and that IL-10 may play an important role in the modulation of the immune response of these patients. IL-10, one of the most important regulatory cytokines, decreases both lymphocyte proliferation³⁴ and cytokine secretion by both macrophages and lymphocytes.^{30,35} The potential role of IL-10 in the pathogenesis of infectious diseases such as visceral leishmaniasis,³² schistosomiasis,³³ and diffuse cutaneous leishmaniasis³⁶ has been documented.

Considering that downregulation of the TH1-type immune response was not observed in all patients with RVC, the absence of IFN- γ production and the downregulation mediated by IL-10 only may explain in part the pathogenesis of RVC. It is possible that although a T-cell response is observed in peripheral blood, an impairment in T-cell function may occur in the vaginal fluid or vaginal mucosa. Alternatively, it can not be ruled out that other suppressor factors may act at the neutrophil and macrophage levels, decreasing the killing of *C albicans*.

We thank Dr Robert L. Coffman (DNAX Institute, Palo Alto, Calif) for providing the monoclonal antibody anti-human IL-4 and anti-human IL-10. We also thank Elbe Myrtes de S. Silva for secretarial assistance.

REFERENCES

- Hurley R. Candidal vaginitis. *Proc R Soc Med* 1977;70(Suppl 4):1-2.
- Sobel JD. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. *Ann N Y Acad Sci* 1988;544:547-57.
- Odds FC. *Candida* and candidosis. Baltimore: University Park Press; 1979. p. 104-10.
- Fleury FJ. Adult vaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 1981;24:407-38.
- Morton RS, Rashid S. Candidal vaginitis: natural history, predisposing factors and prevention. *Proc R Soc Med* 1977;70(Suppl 4):3-6.
- Fulurija A, Ashman RB, Papadimitriou JM. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic and vaginal candidiasis in mice, and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. *Microbiology* 1996;142:3487-96.
- Puccetti P, Romani L, Bistoni F. A TH1-TH2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. *Trends Microbiol* 1995;3:237-40.
- Romani L, Mencacci A, Grohmann U, Moccis S, Mosci P, Puccetti P, et al. Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J Exp Med* 1992;176:19-25.
- Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Mosci P, Puccetti P, et al. CD4+ subset expression in murine candidiasis. Th responses correlate directly with genetically determined susceptibility or vaccine-induced resistance. *J Immunol* 1993;150:925-31.
- Romani L, Puccetti P, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Tonnetti L, et al. Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. *J Immunol* 1994;152:3514-21.
- Spaccapelo R, Romani L, Tonnetti L, Cenci E, Menacci A, Del Sero G, et al. TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. *J Immunol* 1995;155:1349-60.
- Dahl KM, Keath EJ, Fraser VJ, Powderly WG. Molecular epidemiology of mucosal candidiasis in HIV-positive women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:485-91.
- Duerr A, Sierra MF, Feldman J, Clarke LM, Ehrlich I, DeHovitz J. Immune compromise and prevalence of *Candida* vulvovaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *Obstet Gynecol* 1997;90:252-6.
- Lilic D, Cant AJ, Abinun M, Calvert JE, Spickett GP. Chronic mucocutaneous candidiasis. I. Altered antigen-stimulated IL-2, IL-4, IL-6 and interferon-gamma (IFN-gamma) production. *Clin Exp Immunol* 1996;105:205-12.
- Valdimarsson H, Higgs JM, Wells RS, Yamamura M, Hobbs JR, Holt PJ. Immune abnormalities associated with chronic mucocutaneous candidiasis. *Cell Immunol* 1973;6:348-61.
- Kirkpatrick CH. Chronic mucocutaneous candidiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:448-56.
- Witkin SS, Hirsch J, Ledger WJ. A macrophage defect in women with recurrent *Candida* vaginitis and its reversal in vitro by prostaglandin inhibitors. *Am J Obstet Gynecol* 1986;155:790-5.
- Witkin SS. Inhibition of *Candida*-induced lymphocyte proliferation by antibody to *Candida albicans*. *Obstet Gynecol* 1986;68:696-9.
- Hobbs JR, Brigden D, Davidson F, Kaban M, Oates JK. Immunological aspects of candidal vaginitis. *Proc R Soc Med* 1977;70(Suppl 4):11-4.
- Fidel PL Jr, Lynch ME, Redondo-Lopez V, Sobel JD, Robinson R. Systemic cell-mediated immune reactivity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 1993;168:1458-65.
- Fidel PL Jr, Ginsburg KA, Cutright JL, Wolf NA, Leaman D, Dunlap K, et al. Vaginal-associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen. *J Infect Dis* 1997;176:728-39.
- Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJ. Vaginal eosinophils and IgE antibodies to *Candida albicans* in women with recurrent vaginitis. *J Med Vet Mycol* 1989;27:57-8.
- Kudelko NM. Allergy in chronic monilial vaginitis. *Ann Allergy* 1971;29:266-7.
- Palacios HJ. Hypersensitivity as a cause of dermatologic and vaginal moniliasis resistant to topical therapy. *Ann Allergy* 1976;37:110-3.
- Moraes PS. Recurrent vaginal candidiasis and allergic rhinitis: a common association. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;81:165-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Corrigan EM, Clancy RL, Dunkley ML, Evers FM, Beagley KW. Cellular immunity in recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Exp Immunol* 1998;111:574-8.
- Fischer A, Ballet JJ, Griscelli C. Specific inhibition of in vitro *Candida*-induced lymphocyte proliferation by polysaccharidic antigens present in the serum of patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Clin Invest* 1978;62:1005-13.
- Lee WM, Holley HP Jr, Stewart J, Galbraith GM. Refractory esophageal candidiasis associated with a low molecular weight plasma inhibitor of T-lymphocyte function. *Am J Med Sci* 1986;292:47-52.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-95.
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-20.
- Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1994;152:5949-56.
- Araujo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabín E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol* 1996;26:1399-403.
- de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarola MG, te Velde A, Figdor C, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991;174:915-24.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-22.
- Bornftm G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Baral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1996;84:188-94.