

Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente

Evaluation of cellular immune response in patients with recurrent candidiasis

Lucas P. Carvalho¹, Olívia Bacellar¹, Nilma A. Neves¹,
Edgar M. Carvalho¹ e Amélia R. de Jesus¹

Resumo A candidíase recorrente cutânea ou mucosa é caracterizada pela ocorrência de, no mínimo, 4 episódios de candidíase no período de um ano. Não são conhecidos os fatores que levam à recorrência desta infecção. O presente estudo avaliou a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ de pacientes com candidíase recorrente. Os índices de estimulação da resposta linfoproliferativa em culturas de células de pacientes com candidíase recorrente estimuladas com antígeno de *Candida albicans*, PPD e TT foram respectivamente de 6 ± 8 , 17 ± 20 e 65 ± 30 . A adição de anticorpo monoclonal anti-IL-10 às culturas de células de 6 pacientes aumentou a resposta linfoproliferativa de 735 ± 415 para 4143 ± 1746 cpm. A produção de IFN- γ em culturas de células estimuladas com antígeno de *Candida*, foi 162 ± 345 pg/ml. Pacientes com candidíase recorrente apresentam uma deficiência na resposta linfoproliferativa e na produção de IFN- γ , podendo a resposta imune celular ao antígeno de *Candida* ser restaurada parcialmente através da neutralização da IL-10 in vitro.

Palavras-chaves: Candidíase. Linfoproliferação. IFN- γ . *Candida albicans*.

Abstract Recurrent cutaneous or mucosal candidiasis is characterized by the occurrence of at least four candidiasis episodes within a one-year period. The factors involved in recurrence of infection are still unknown. In the present study the lymphoproliferative response and the IFN- γ production by candidiasis patients were evaluated. The stimulation index of mononuclear cell cultures of candidiasis patients stimulated with *Candida albicans* antigen, PPD and TT were 6 ± 8 , 17 ± 20 and 65 ± 30 , respectively. The addition of monoclonal antibody anti-IL-10 to *Candida albicans* antigen stimulated cultures raised the lymphoproliferative response from 735 ± 415 to 4143 ± 1746 cpm. The IFN- γ production by cells of candidiasis patients stimulated with *Candida albicans* antigen was 162 ± 345 pg/ml. Candidiasis patients have an impairment in the lymphoproliferative response specific to *C. albicans* antigen and on IFN- γ production and the lymphoproliferative response can be partially restored, in vitro, by IL-10 neutralization.

Key-words: Candidiasis. Lymphoproliferation. IFN- γ . *Candida albicans*.

A maioria dos indivíduos infectados por *Candida* sp cura com terapia antifúngica. A ausência de resposta ao tratamento é uma característica de portadores da candidíase mucocutânea caracterizada pela presença de múltiplas lesões cutâneas e mucosas e está associada a poliendocrinopatias e doenças auto-imunes. Por outro lado, episódios repetidos de infecção por *Candida albicans* são observados na candidíase recorrente que é caracterizada pela ocorrência de, no mínimo, quatro episódios de vaginites no período de um ano. Dentre as mais de 180 espécies de *Candida*

descritas, a *C. albicans* é responsável por 90% das infecções em pacientes com candidíase recorrente e é a espécie isolada na grande maioria dos casos de candidíase mucocutânea^{6 15 17}. A forma mais comum de candidíase de repetição é a candidíase vaginal recorrente, que acomete cerca de 6% das mulheres sadias em idade reprodutiva^{10 11 12}.

O papel da imunidade celular no controle da infecção causada por *C. albicans* tem sido bem demonstrado em modelos experimentais nos quais a dicotomia da resposta imune do tipo CD4+ Th1 e CD4+

1. Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.
Endereço para correspondência: Dra. Amélia Ribeiro de Jesus. Serviço de Imunologia/Hospital Universitário Prof. Edgard Santos. R. João das Botas s/n, 5º andar, Canela, 40110-160 Salvador, BA, Brasil
Tel: 55.71.237-7353; Fax: 55 71 245-7110
e-mail: imuno@ufba.br
Recebido para publicação em 15/4/2002
Aceito em 8/8/2003

Th2 é considerada um fator importante para a suscetibilidade ou resistência à infecção por *Candida*. Enquanto uma resposta tipo Th1 com produção de IFN- γ e IL-2 está relacionada com resistência à *Candida*^{20 22 23}, a resposta tipo Th2, com secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, está relacionada com susceptibilidade a este patógeno^{19 21 23 25 26}.

Dentre os fatores predisponentes para a ocorrência da candidíase humana esporádica tem sido descritos o uso de antibióticos e contraceptivos, gravidez e diabetes mellitus. Contudo, ainda não foi determinada a

contribuição destes fatores para o desenvolvimento da candidíase recorrente²⁴. Adicionalmente, estudos controversos têm sido reportados sobre a imunopatogênese da candidíase vaginal recorrente tendo algumas observações mostrado uma baixa resposta linfoproliferativa e ausência de reatividade do teste cutâneo com antígeno de *Candida*^{7 9}, enquanto outras, detectado a existência de uma resposta do tipo 1 nesses pacientes⁴. O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ em pacientes com candidíase vaginal, e candidíase cutânea e mucosa recorrentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes. Participaram deste estudo pacientes com diagnóstico de candidíase vaginal recorrente (n=17), candidíase mucosa recorrente (n=3) e candidíase cutânea recorrente (n=1) acompanhados no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos. *Candida albicans* foi o agente etiológico encontrado nas culturas de 7 pacientes com candidíase vaginal recorrente, nas quais foi realizado teste para caracterização da espécie de *Candida*. Nos outros pacientes foi confirmada a presença de *Cândida* porém não foi realizada a caracterização da espécie. Todos os pacientes avaliados apresentavam sorologia negativa para HIV. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia.

Antígeno. O antígeno de *C. albicans* utilizado no estudo 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 tampão fosfato 3 vezes, re-suspenso em NaOH 0,5N, e em seguida congelado e descongelado 30 vezes. Após centrifugação, o conteúdo protéico foi determinado pela técnica de Lowry¹⁴ no sobrenadante e o material (antígeno solúvel de *C. albicans*) foi congelado a -20°C para uso posterior. Os antígenos protéicos toxóide tetânico (Wyeth-Ayerst Lab, Marietta, PA, USA) e PPD (Connaught Laboratories, Ontario, Canada), foram também utilizados.

Teste intradérmico. O teste intradérmico foi realizado com a inoculação de 0,1ml do antígeno de *Candida* (GIBCO, BRL, RJ, RJ) na região anterior do antebraço. O resultado foi obtido 48 horas após a realização do teste, e foi considerado positivo quando a induração foi maior do que 5mm.

Cultura de células, ensaios para citocina e transformação blástica. Células mononucleares foram obtidas do sangue periférico heparinizado (CMSP) através de gradiente de centrifugação com *ficoll*-

hpaque. Após lavagem com salina, as células foram ajustadas para concentração de 1×10^6 e cultivadas em meio RPMI 1.640 (GIBCO BRL, Grand Island, NY), suplementado com 10% de soro humano AB, 100IU/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina. Aliquotas de 200 μ l contendo 2×10^5 células foram adicionadas a placas de microtitulação (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e estimuladas com antígeno de *Candida* (0,05 μ g/ml), após ter sido realizada uma curva dose-resposta. Toxóide tetânico (5LF/ml), PPD (2 μ g/ml), ou mitógeno pokeweed (PWM) na diluição final de 1:100 foram também utilizados. Em algumas culturas foram adicionados anticorpos monoclonais anti-IL-4 ou anti-IL-10 (Dr. Coffman, DNAX Institute Palo Alto, CA) na concentração de 200 μ g/ml. Após 5 dias de incubação a 37°C e 5% CO₂, as culturas foram pulsadas com 1 μ Ci/ poço de 3H-timidina (New England Nuclear Research Products, Boston MA) durante 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). Para a dosagem de IFN- γ , as células foram ajustadas à concentração de 3×10^6 /ml e estimuladas com antígeno de *C. albicans* (0,05 μ g/ml) e antígeno de TT (5LF/ml). Após incubação por 72 horas, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -70°C. Os níveis de IFN- γ foram obtidos através da técnica de ELISA sandwich, utilizando-se anticorpos comercialmente vendidos (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e os resultados foram expressos em pg/ml, por interpolação numa curva padrão com IFN- γ recombinante.

Análise estatística. A comparação das respostas proliferativas e a produção de IFN- γ entre os grupos de pacientes com infecção recorrente por *C. albicans* e controle foi realizada utilizando-se o teste de Mann-Whitney, considerando que os dados não tinham uma distribuição gaussiana.

RESULTADOS

Dos 21 pacientes estudados, 17 tinham candidíase vaginal recorrente, 3 apresentavam candidíase mucosa de repetição e 1 paciente candidíase cutânea recorrente. Dentre os três pacientes com candidíase

mucosa, uma era criança de dois anos de idade com candidíase bucal desde os quatro meses de vida, admitida por apresentar febre, monilíase oral e pneumonia, sendo *C. albicans* isolada em hemocultura.

Os outros dois pacientes, um do sexo masculino e um do sexo feminino apresentavam candidíase esofágica, associada à disfagia, e candidíase intestinal associada à diarreia, respectivamente, sendo a *C. albicans* documentada em material obtido através de endoscopia digestiva alta ou colonoscopia. O paciente com candidíase cutânea de repetição apresentava uma micose superficial com cinco anos de duração que respondia a terapêutica tópica ou oral com antifúngico, havendo, entretanto, reaparecimento

das manifestações após o tratamento. A resposta ao teste intradérmico com antígeno de *Candida albicans* foi negativa em todos pacientes. A idade, forma clínica, duração da doença, resposta linfoproliferativa e níveis de IFN- γ de 21 pacientes com candidíase recorrente são mostrados na Tabela 1. Avaliação somente da resposta linfoproliferativa foi realizada em 4 pacientes. Níveis de IFN- γ isoladamente foram determinados em 10 casos, e em 7 pacientes determinados os níveis de IFN- γ e a resposta

Tabela 1 - Resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ de pacientes com candidíase recorrente

Idade	Sexo	Duração da doença (anos)	Forma clínica	Captação de Timidina (IE) ^a		IFN- γ (pg/ml)
				<i>C. albicans</i> (0,05 μ g/ml)	PWM ^b (1:100)	
3	F	1	CM	NR	NR ^c	0
30	F	2	CV	14	NR	0
34	M	2	CC	2	28	NR
41	F	2	CV	2	400	0
30	F	2	CV	NR	NR	0
39	F	2	CV	NR	NR	0
30	F	2	CV	NR	NR	75
25	F	3	CV	NR	NR	148
28	F	3	CV	3	108	NR
28	F	4	CV	2	71	170
21	M	4	CM	2	70	NR
25	F	5	CV	NR	NR	1132
26	F	6	CV	NR	NR	997
24	F	6	CV	NR	NR	58
26	F	8	CV	0	NR	NR
35	F	8	CV	NR	NR	0
29	F	10	CV	2	45	0
36	F	10	CV	29	NR	0
42	F	12	CM	NR	NR	15
32	F	13	CV	8	NR	175
32	F	14	CV	1	61	0

^a IE-Índice de estimulação = $\frac{\text{cpm das culturas estimuladas}}{\text{cpm das culturas não estimuladas}}$

^b PWM, Mitógeno Pokeweed

^c NR - Não Realizado

CM – Candidíase Mucosa

CV – Candidíase Vaginal

CC – Candidíase Cutânea

linfoproliferativa. A idade dos pacientes variou entre 3 e 42 anos (29 ± 8 anos) e o tempo de doença foi de 6 ± 4 anos, variando entre 1 a 14 anos. Não houve correlação entre idade e tempo de doença com resposta linfoproliferativa ou produção de IFN- γ . A resposta linfoproliferativa em culturas de CMSP estimuladas com antígeno de *C. albicans* foi ausente ou diminuída em 8 dos 11 pacientes (IE = 6 ± 8) (1239 ± 861 cpm). Altos níveis de incorporação de timidina foram observados nas culturas de CMSP em

sete pacientes nos quais as células foram estimuladas com PWM (IE = 111 ± 129) (29381 ± 8479 cpm) (Tabela 1). A resposta linfoproliferativa específica para os antígenos de *C. albicans*, PPD e toxóide tetânico de 11 pacientes com candidíase recorrente está representada na Figura 1. Culturas de células mononucleares de pacientes com candidíase vaginal recorrente ou candidíase mucosa e cutânea de repetição apresentaram baixos níveis de incorporação de timidina quando estas foram estimuladas com

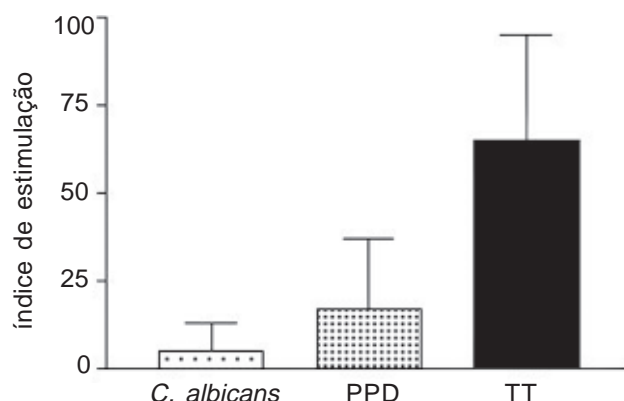


Figura 1 - Média e desvio padrão da resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Candida albicans* (0,05 µg/ml), PPD (2 µg/ml) e toxóide tetânico (5 LF/ml) de pacientes com candidíase recorrente (n = 11).

Índice de estimulação = cpm das culturas estimuladas/cpm das culturas não estimuladas.

antígeno de *Candida albicans* (IE = 6±8). Níveis significativamente mais elevados foram observados quando PPD (IE = 17±20) ou TT (IE = 65±30) foram utilizados como estímulo nas culturas destes pacientes caracterizando uma imunossupressão específica para o antígeno de *C. albicans*.

Com a finalidade de verificar se a baixa resposta linfoproliferativa estava relacionada com uma predominância de resposta tipo 2 ao antígeno de *C. albicans*, anticorpos monoclonais anti-IL-4 ou anti-IL-10 foram adicionados a algumas culturas de células estimuladas com antígeno de *C. albicans* de 4 pacientes. A resposta linfoproliferativa, representada pelo índice de estimulação, ao antígeno de *C. albicans* (IE = 4,8 ± 5) aumentou significativamente após a adição de anticorpo monoclonal anti-IL-10 (IE = 21±11).

A adição de anticorpo monoclonal anti-IL-4 não restaurou significativamente a resposta linfoproliferativa de culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* (IE = 8,5 ± 9) (Figura 2). A adição isolada de isotipos controles não induziu proliferação linfocitária.

A resposta imune celular tipo Th1 foi avaliada através da dosagem de IFN-γ. Na Figura 3 estão expressos os níveis de proliferação linfocitária em 11 pacientes e os níveis de IFN-γ encontrados nos sobrenadantes de culturas estimuladas com antígeno de *C. albicans* em 17 pacientes. Em adição à baixa resposta linfoproliferativa, baixa produção de IFN-γ foi encontrada em 15 dos 17 pacientes estudados (42 ± 67 pg/ml). Apenas dois pacientes apresentaram elevada produção de IFN-γ (1132 e 997 pg/ml, respectivamente) em resposta ao antígeno de *C. albicans*.

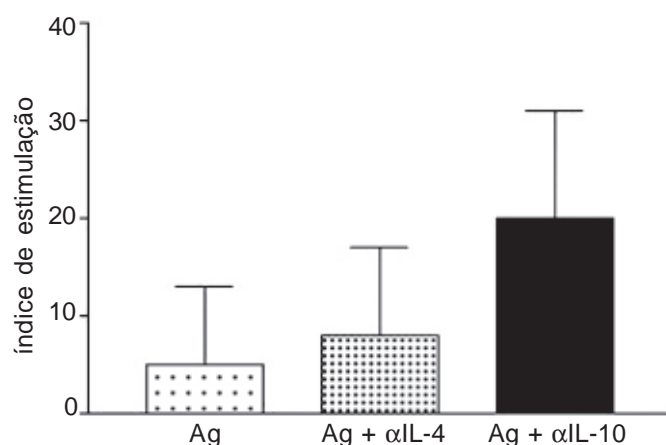


Figura 2 - Resposta linfoproliferativa antes e após a adição de anticorpos monoclonais anti-IL-4 (200 µg/ml) e anti-IL-10 (200 µg/ml) em culturas de células mononucleares estimuladas com antígeno de *Candida albicans* (0,05 µg/ml) de 6 pacientes com candidíase vaginal recorrente.

Índice de estimulação = cpm das culturas estimuladas/cpm das culturas não estimuladas.

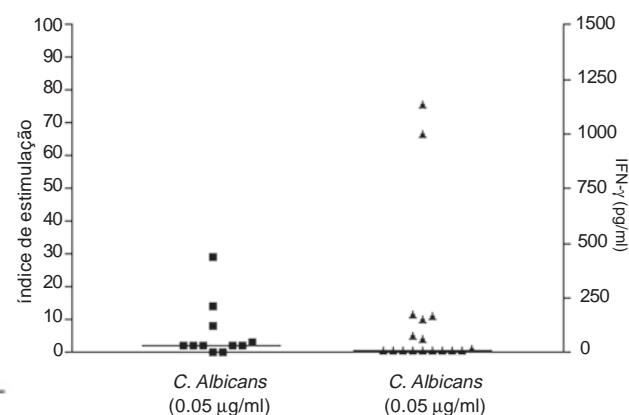


Figura 3 - Comparação dos níveis de IFN-γ (n = 17) com a resposta linfoproliferativa (n = 11) em culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígeno de *Candida albicans* (0,05 µg/ml), em pacientes com candidíase recorrente.

DISCUSSÃO

Estudos a respeito do perfil imunológico da candidíase mucocutânea evidenciam uma inabilidade de ativação da resposta imune celular, com baixa produção de IFN- γ e de IL-2, e incapacidade de linfoproliferação, o que impossibilita a eliminação deste patógeno¹³. Estudos contraditórios têm sido reportados sobre a imunopatogênese da candidíase vaginal recorrente. Enquanto alguns estudos apontam uma atividade linfoproliferativa reduzida com ausência de hipersensibilidade ao teste intradérmico em pacientes com candidíase vaginal recorrente^{7,9}, outros relataram a existência de uma resposta do tipo Th1 com produção de IL-2 e IFN- γ ⁴. O principal achado do presente estudo foi a constatação de uma imunodeficiência celular específica para o antígeno de *C. albicans* encontrada em pacientes com candidíase cutânea, candidíase mucosa, e candidíase vaginal recorrente, e que esta alteração da resposta imune pode ser restaurada pela neutralização da IL-10. A ausência de resposta linfoproliferativa e produção de IFN- γ é antígeno-específica desde que uma resposta normal foi documentada quando as células foram estimuladas com antígenos não relacionados (PPD e TT). Depressão da resposta imune foi observada no único paciente com candidíase cutânea, nos três pacientes com candidíase mucosa e na maioria das pacientes com candidíase vaginal recorrente. Não pode ser afastada que nestes pacientes com evidências de resposta imune no sangue periférico a nível local exista uma alteração da resposta imune. Compartimentalização da resposta imune celular e humoral têm sido reportada em outras doenças infecciosas^{2,18}. Desde que esta imunodeficiência é periférica, pois foi restaurada com a neutralização da

IL-10, é possível que a persistência do agente infeccioso contribua para a perpetuação da anormalidade imunológica.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra *C. albicans* estão representados pela atividade microbicida de fagócitos e pela citotoxicidade celular mediada por células NK^{8,17}. Embora fagócitos e células NK sejam componentes da resposta imune inespecífica ou inata, a atividade plena destas células é dependente da resposta imune adaptativa, desde que IL-2 e IFN- γ , produzidos pelas células CD4+ Th1 e células CD8+, ativam células NK e o IFN- γ ativa os fagócitos¹⁶. A IL-10 é uma citocina moduladora da resposta tipo 1⁵ e a IL-2 é a principal citocina indutora de proliferação celular. Através da neutralização *in vitro* de IL-10, a resposta linfoproliferativa foi restaurada em sobrenadantes de cultura de células de 4 pacientes estudados, evidenciando o papel desta citocina em suprimir a proliferação linfocitária em pacientes com candidíase recorrente. O papel da IL-10 em suprimir a resposta imune tipo 1 tem sido observado em outras doenças infecciosas como a leishmaniose visceral e a esquistossomose^{1,3}. Além disso, níveis baixos ou ausentes de IFN- γ em resposta ao antígeno de *C. albicans* confirmam a ausência de resposta do tipo 1.

A documentação de que pacientes com candidíase recorrente apresentam uma baixa resposta imune celular para antígenos de *C. albicans*, contribui não só para o entendimento da patogênese da candidíase recorrente como abre perspectivas para a utilização de agentes imunomoduladores com a finalidade de restaurar a resposta imune destes pacientes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Robert L. Coffman (DNAX Institute, Palo Alto, CA) por nos ter cedido os anticorpos monoclonais anti-IL-4 e anti-IL-10, a Elbe M. Silva pela revisão do texto e a Lúcia Reis e Jackson Lemos pelo apoio administrativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araujo MI, Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology* 26:1399-1403, 1996.
2. 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 Tropica* 71:1-15, 1998.
3. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* 152:5949-5956, 1994.
4. Fidel Júnior PL, Lynch ME, Sobel JD. Candida-specific Th1-type responsiveness in mice with experimental vaginal candidiasis. *Infection and Immunity* 61:4202-4207, 1993.
5. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology* 147:3815-3822, 1991.
6. Fleury FJ. Adult vaginitis. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 24:407-438, 1981.
7. Fong IW, McCleary P, Read S. Cellular immunity of patients with recurrent or refractory vulvovaginal moniliasis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 166:887-890, 1992.
8. 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* 142:3487-3496, 1996.
9. Hobbs JR, Brigden D, Davidson F, Kahan M, Oates JK. Immunological aspects of candidal vaginitis. *Proceedings of Royal Society of Medicine* 70 (supl 4):11-14, 1977.

10. Hurley R. Candidal vaginitis. *Proceedings of Royal Society of Medicine* 70:1-2, 1977.
11. Hurley R. Recurrent *Candida* infection. *Clinical Obstetrics Gynecology* 8:209-214, 1981.
12. Hurley R, De Louvois J. *Candida* vaginitis. *Postgraduate Medical Journal* 55:645-647, 1979.
13. 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. *Clinical Experimental Immunology* 105:205-212, 1996.
14. Lowry OH, Rousembrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 245-248, 1951.
15. Morton RS, Rashid S. Candidal vaginitis. Natural history, predisposing factors and prevention. *Proceedings of Royal Society of Medicine* 70:3-6, 1977.
16. Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *Journal of Clinical Investigation* 72:1506-1510, 1983.
17. Odds FC, Webster CE, Mayuranathan P, Simmons PD. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *Journal of Medical Veterinary Mycology* 26:277-283, 1988.
18. Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *Journal of Immunology* 145:3100-3104, 1990.
19. Puccetti P, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Mosci P, Enssle KH, Romani L, Bistoni F. Cure of murine candidiasis by recombinant soluble interleukin-4 receptor. *Journal of Infectious Disease* 169:1325-1331, 1994.
20. Romani L, Cenci E, Mencacci A, Spaccapelo R, Grohmann U, Puccetti P, Bistoni F. Gamma interferon modifies CD4+ subset expression in murine candidiasis. *Infection and Immunity* 60:4950-4952, 1992.
21. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Mosci P, Puccetti P, Bistoni F. CD4+ subset expression in murine candidiasis. Th responses correlate directly with genetically determined susceptibility or vaccine-induced resistance. *Journal of Immunology* 150:925-931, 1993.
22. Romani L, Mencacci A, Grohmann U, Mocci S, Mosci P, Puccetti P, Bistoni F. Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *Journal of Experimental Medicine* 176:19-25, 1992.
23. Romani L, Puccetti 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*. *Journal of Immunology* 152:3514-3521, 1994.
24. Sobel JD. *Candida* vulvovaginitis. *Seminars in Dermatology* 15:17-28, 1996.
25. Spaccapelo R, Romani L, Tonnetti L, Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, Tognellini R, Reed SG, Puccetti P, Bistoni F. TGF-beta is important in determining the *in vivo* patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. *Journal of Immunology* 155:1349-1360, 1995.
26. Tonnetti L, Spaccapelo R, Cenci E, Mencacci A, Puccetti P, Coffman RL, Bistoni F, Romani L. Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. *European Journal of Immunology* 25:1559-1565, 1995.