ELISEU FRANK DE ARAUJO

INFLUÊNCIA DA ENZIMA INDOLAMINA-2,3-DIOXIGENASE NA DIFERENCIAÇÃO E FUNÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS E T REGULADORAS NA PARACOCCIDIODOMICOSE PULMONAR DE CAMUNDONGOS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

ELISEU FRANK DE ARAUJO

INFLUÊNCIA DA ENZIMA INDOLAMINA-2,3-DIOXIGENASE NA DIFERENCIAÇÃO E FUNÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS E T REGULADORAS NA PARACOCCIDIODOMICOSE PULMONAR DE CAMUNDONGOS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS AO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich

Versão original.

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Araujo, Eliseu Frank de.
Influência da enzima indolamina-2,3-dioxigenase na diferenciação e função das células dendríticas e T reguladoras na paracoccidiodomicose pulmonar de camundongos resistentes e suscetíveis ao *Paracoccidioides brasiliensis* / Eliseu Frank de Araujo. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia de micoses sistêmicas.

Versão do título para o inglês: Influence of the enzyme indolamine-2,3-dioxygenase in the differentiation and function of regulatory T and dendritic cells in the paracoccidioidomycosis of susceptible and resistant mice to *Paracoccidioides brasiliensis*.

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Células dendríticas 3. Células T 4. Indolamina 2,3-dioxigenase 5. 1 metil-DL-triptofano 6. I. Calich, Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0151/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eliseu Frank de Araujo.

Título da Tese: Influência da enzima indolamina-2,3-dioxigenase na diferenciação e função das células dendríticas e T reguladoras na paracoccidiodomicose pulmonar de camundongos resistentes e suscetíveis ao *Paracoccidioides brasiliensis*.

Orientador(a): Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **180** nas fls. **114** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Vera Lúcia Garcia Calich**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Paracoccidioidomicose pulmonar. Fatores do fungo e do hospedeiro que influenciam a resposta imune e a gravidade da doença "* do qual participam o(s) aluno(s) **Eliseu Frank de Araújo** e os pesquisadores **Claudia Feriotti, Flávio Vieira Loures,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **05.12.2011, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 07 de dezembro de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À Deus, que guiou meus passos, me protegeu com suas mãos misericordiosas e colocou pessoas iluminadas em meu caminho.

Aos meus pais, Manuel Francisco de Araújo Filho e Amélia Zolete Moutinho de Araújo (in memoriam) que me amaram, cuidaram de mim e me ofereceram o que eles tinham de melhor. Tenham certeza de que todas as minhas conquistas são mais de vocês do que minhas.

Á Daiana Almagro Castro de Aráujo, por compartilhar todos os meus sentimentos, pelo valioso apoio, pela dedicação e paciência em todos os momentos.

À minha orientadora Profa Dra.Vera Lúcia Garcia Calich, pela confiança no meu potencial e por ter sido essencial para esta conquista.

Aos colegas do laboratório pela convivência, pelos sorrisos e pela disponibilidade em ajudar: Claudia Feriotti, Flávio Loures, Sílvia Bazan, Tânia Costa, Israel Lima e Vanessa Santos Silva;

Ao Prof. Dr. Marcelo de Franco, Profa. Dra. Ana Lepique e Profa. Dra. Maria Heloisa Blotta pela rica participação no exame de qualificação de doutorado;

Aos professores do Departamento de Imunologia que ministraram aulas, palestras e assim contribuíram para o meu entendimento da imunologia;

À Sílvia Massironi pela disponibilidade de camundongos para a realização dos experimentos;

Aos funcionários da secretaria Jotelma Ribeiro, Amanda Souza e Maria Eni do Sacramento Santos;

Aos funcionários do Biotério do ICB IV pelo cuidadoso e árduo trabalho com os animais de experimentação;

Aos funcionários do SBiB que contribuíram na revisão da normas do texto e no suporte de informática para a elaboração desta tese;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste doutorado.

.

"Retém a instrução e não a largues: guarda-a, porque ela é a tua vida."

(Provérbios 4:13)

RESUMO

ARAUJO, E. F. **Influência da enzima indolamina-2,3-dioxigenase na diferenciação e função das células dendríticas e T reguladoras na paracoccidiodomicose pulmonar de camundongos resistentes e suscetíveis ao *Paracoccidioides brasiliensis*.** 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de evolução aguda, subaguda ou crônica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis.* Na PCM, os mecanismos de regulação mediada pela imunidade inata e celular ainda não estão totalmente esclarecidos. Em trabalho anterior verificamos que a enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) controla a carga fúngica e exerce atividade imunossupressora nos mecanismos de imunidade inata e adaptativa de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) à infecção pelo *P.brasiliensis*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o efeito do tratamento com 1-Metil-DL-Triptofano (1MT), um inibidor de IDO, na diferenciação e função de células dendríticas (DCs) e T reguladoras (Tregs) na paracoccidioidomicose. Assim, camundongos resistentes e sucestíveis foram tratados ou não com 1MT (5mg/ml) e infectados com *P.brasiliensis*. Após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção as DCs isoladas de pulmões foram estudadas quanto à sua carga fúngica, diferenciação, e atividade imunogênica. Além disso, como a IDO pode exercer atividade enzimática, usualmente induzida por IFN-γ, e sinalizadora geralmente induzida pelo TGF-β, estudamos os níveis de expressão gênica de moléculas envolvidas nestas duas funções em células totais e em DCs isoladas de pulmão. Comparadas aos grupos controle, as DCs de camundongos B10.A e A/J tratados por 1MT apresentaram maior carga fúngica, e níveis diminuídos de quinurenina. A infecção pelo fungo induziu expressão aumentada de IDO que, entretanto, foi diminuída pelo tratamento com 1MT. Inesperadamente, a expressão de mRNA para IDO pelas DCs de camundongos A/J controle foi maior que as de B10.A, que entretanto, produziam níveis mais maiores de quinurenina. O 1MT induziu a presença de maior número e menor frequência de DCs mielóides, plasmacitóides e linfóides nos pulmões de camundongos B10.A e A/J. O inibidor de IDO alterou a expressão de marcadores de ativação e moléculas co-estimulatórias em DCs de ambas as linhagens. O 1MT reduziu a produção de TGF-β, IL-12 e IL-1β e aumentou os níveis de TNF-α. O 1 MT diminuiu a expressão intracelular de IDO e TGF-β em ambas as linhagens, e de IL-12 somente em camundongos B10.A. Em contrapartida, os grupos tratados com 1MT tiveram maior expressão de IL-10 e TNF-α. Os ensaios de linfoproliferação demonstraram que as DCs de animais tratados com 1MT eram mais imunogênicas levando à maior expansão de células T e menor frequência de células Treg. Com relação às citocinas secretadas, verificamos que o 1MT induzia uma diminuição de IFN-γ e aumento de IL-2. Nos estudos da expressão dos mediadores envolvidos na ativação de DCs mediada por IFN-γ e TGF-β verificamos que o 1MT inibiu a expressão dos mediadores de ativação celular somente em camundongos B10.A indicando uma função de IDO prevalentemente catalítica, induzida por IFN-γ. Em contraste, em camundongos A/J, a IDO além da função catalítica, parece exercer atividade sinalizadora possivelmente induzida por TGF-β. Em conclusão, verificamos que a IDO exerce importante função imunorreguladora na PCM através da atividade das DCs e células Treg. Além disso, além da função catalítica observada em ambas as linhagens, somente em camundongos resistentes a IDO parece exercer uma função sinalizadora da ativação celular.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Indolamina-2,3-dioxigenase. 1-metil-triptofano. Células Dendríticas. Células T reguladoras.

ABSTRACT

ARAUJO, E. F. **Influence of the enzyme indolamine-2,3-dioxygenase in the differentiation and function of regulatory T and dendritic cells in the paracoccidioidomycosis of susceptible and resistant mice to *Paracoccidioides brasiliensis*.** 2013. 115 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the inhalation of *Paracoccidioides brasiliensis (Pb)* spores, is a major pulmonary fungal disease in South America. In PCM, the regulatory mechanisms mediated by innate and cellular immunity are still unclear. In a previous study, it was verified that the enzyme indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) controls the fungal loads and impairs the innate and adaptative immunity of resistant and susceptible mice to *P.brasiliensis* infection. The aim of the present work was to investigate the effect of treatment with 1-methyl-DL-tryptophan (1MT) on the expression of IDO and on the phenotype and behavior of dendritic cells (DCs) and regulatory T (Treg) cells in pulmonary PCM. Thus, A/J and B10.A mice were treated with 1MT (5mg/ml) or left untreated and infected with *P.brasiliensis*. After 96 hours, 2 and 8 weeks of infection the DCs were isolated from lungs and studied regarding fungal loads, phenotype and immunogenic activity. Moreover, as the IDO can exert enzymatic activities (usually induced by IFN-γ) and signaling (generally induced by TGF-β) we studied the expression of molecules involved in these functions were studied using in total lung cells and isolated DCs. Compared with control groups, the DCs of B10.A and A/J mice treated with 1MT showed higher fungal burden and decreased levels of kynurenine. The fungal infection induced increased expression of IDO, which, however, was decreased by treatment with 1MT. Unexpectedly, the expression of IDO mRNA in DCs from A/J mice was higher than in B10.A control mice which, however, produced elevated levels of kinurenine. The presence of 1MT induced a higher number and a lower frequency of myeloid, plasmacytoid and lymphoid DCs in the lungs of both mouse strains. The IDO inhibitor altered the expression of activation markers and costimulatory molecules on DCs from A/J and B10.A mice. 1MT reduced the production of TGF-β, IL-12 and IL-1β and increased the levels of TNF-α. 1MT decreased intracellular expression of IDO and TGF-β in both strains, and IL-12 in B10.A mice. In contrast, the 1MT-treated groups had higher expression levels of IL-10 and TNF-α. Lymphoproliferation assays demonstrated that DCs of treated animals were more immunogenic leading to higher T cell expansion and lower frequency of Treg cells. Regarding cytokines production, we showed that 1MT treatment led to decreased IFN-γ and increased IL-2 levels by cells of both mouse strains. The expression of markers involved in DC activation mediated by IFN-γ and TGF-β showed that 1MT inhibited the expression of cell activation markers only in B10.A mice indicating a prevalent catalytic function of IDO induced by IFN-γ. In contrast, in A/J mice, besides the catalytic function, IDO has possibly a signaling activity induced by TGF-β. In conclusion, we demonstrated that IDO plays an important immunoregulatory function in PCM through the activity of DCs and Treg cells. In addition to the catalytic function observed in both mouse strains, only in resistant mice IDO appears to exert a cell signaling function.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. Indoleamine-2,3-dioxygenase. 1-methyl-tryptophan. Dendritic cells. Regulatory T cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Efeito da inibição de IDO por 1MT na atividade fungicida, produção de NO e quinureninas e, expressão relativa de mRNA de IDO de DCs obtidas após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....41

Figura 2 - Efeito do tratamento com 1MT no número e frequência de células das sub-populações de DCs obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção.....45

Figura 3 - Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de diferentes marcadores de ativação (IA^K, CD86, CD11b, CD40) em DCs obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção.....46

Figura 4 - Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de DCs mielóides ($CD11c^+CD11b^+$) apresentando diferentes marcadores de ativação em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas e 8 semanas de infecção.....47

Figura 5 - Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de DCs linfóides ($CD11c^+CD8^+$) apresentando diferentes marcadores de ativação em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção.....48

Figura 6 - Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de DCs plasmacitóides ($CD11c^+B220^{low}$) apresentando diferentes marcadores de ativação (IA^K, CD86 e CD40) em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção.....49

Figura 7 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-12 nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....50

Figura 8 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-1β nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....51

Figura 9 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de TNF-α nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....52

Figura 10 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de TGF-β nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....53

Figura 11 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-6 nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....54

Figura 12 - Número e frequência de DCs IDO^+ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....56

Figura 13 - Número e frequência de DCs TNF-α^+ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....58

Figura 14 - Número e frequência de DCs IL-12$^+$ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção……....…….……60

Figura 15 - Número e frequência de DCs TGF-β$^+$ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....62

Figura 16 - Número e frequência de DCs IL-10$^+$ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção……..…..…..…...64

Figura 17 - Frequências da proliferação de linfócitos e análise fenotípica de co-cultura de DC + Linfócitos de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....67

Figura 18 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IFN-ɣ, IL-2, IL-4 e IL-10 nas co-culturas de DCs + Linfócitos de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.69

Figura 19 - Expressão relativa de mRNA de IFN-γ, JAK1, JAK2 e STAT1 em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....73

Figura 20 - Expressão relativa de mRNA de IL-6, SOCS3e NOS2 em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....74

Figura 21 - Expressão relativa de mRNA de TGF-β, SMAD2, SMAD3 e PI3K em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....75

Figura 22 - Expressão relativa de mRNA de SHIP, SHP1 e SHP2 em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....76

Figura 23 - Expressão relativa de mRNA de IFN-α e IFN-β em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.
.....77

Figura 24 - Expressão relativa de mRNA de IFN-γ, JAK1, JAK2 e STAT1 em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....80

Figura 25 - Expressão relativa de mRNA de IL-6, SOCS3e NOS2 em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....81

Figura 26 - Expressão relativa de mRNA de TGF-β, SMAD2, SMAD3 e PI(3)K em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção
.....82

Figura 27 - Expressão relativa de mRNA de SHIP, SHP1 e SHP2 em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....83

Figura 28 - Expressão relativa de mRNA de IFN-γ, JAK1, JAK2 e STAT1 em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção.....84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	**Anticorpo**
AcM	**Anticorpo monoclonal**
Ag	**Antígeno**
CD11b	**Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides ou Mac-1**
CD11c	**Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides, ou CR4**
CD25	**Marcador de ativação celular em linfócitos, cadeia α do receptor de IL-2**
CD4	**Marcador para linfócito Th1/Th2, co receptor para molécula MHC classe II**
CD40	**Molécula coestimuladora presente em MØ, DC, linfócito B, liga-se ao CD40L**
CD69	**Marcador de ativação celular inicial para linfócitos T e B**
CD8	**Marcador para linfócito T citotóxico, co receptor para molécula MHC classe I**
CD80	**Molécula coestimuladora ou B7.1, presente em monócitos, liga-se em CD28 e CTLA-4**
CD86	**Molécula coestimuladora ou B7.2, presente em monócitos, DC, liga-se ao CD28 e CTLA-4**
CpG	**Sequência de DNA com bases Citosina e Guanina**
CTLA-4	**"Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen"**
D.O.	**Densidade óptica**
DC	**Célula dendríticas**
DNAX12	**"DNAX activation protein of 12 kDa"**
E.P.M.	**Erro padrão da Média**
ELISA	**"Enzyme-linked-immunosorbent assay"**
FACS	**"Fluorescence-activated cell sorting"**
Foxp3	**"Forkhead family of transcriptional regulator Foxp3"**
FSC	**"foward scatter", tamanho celular**
GITR	**"Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor"**
	"general control nonrepressed 2"
GM-CSF	**"granulocyte macrophage colony-stimulating fator"**
GNC2	**"general control nonrepressed 2"**
i.p.	**Intraperitoneal**
i.t.	**Intratraqueal**
Ia^k	**Marcador para expressão de MHC classe II em monócitos**
iC3b	**Fragmento protéico integrante do sistema complemento**
IDO	**"indoleamine 2,3-dioxygenase"**
INDO	**Gene da indolamina-2,3-dioxigenase**
IFN-α	**Interferon-α**
IL-1β	**Interleucina 1β**
IL-2	**Interleucina 2**
IL-4	**Interleucina 4**
IL-5	**Interleucina 5**
IL-6	**Interleucina 6**
IL-10	**Interleucina 10**

IL-17	**Interleucina 17**
IL-23	**Interleucina 23**
1MT	**1-metil-triptofano**
iNOS	**Óxido nítrico sintase induzida**
ITIMS	**"immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif"**
LPS	**Lipossacáride de bactéria GRAM negativa**
MCP-1	**"Monocyte chemoattractant protein-1"**
MHC II	**Complexo principal de histocompatibilidade classe II**
MØ	**Macrófago**
mTOR	**mammalian target of rapamycin**
MR	**Receptor de manose**
NFκB	**"nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells"**
NK	**"*natural killer*"**
P. brasiliensis	***Paracoccidioides brasiliensis***
PAMPS	**"Pathogen-associated molecular patterns"**
Pb	***Paracoccidioides brasiliensis***
Pb 18	***Paracoccidioides brasiliensis*, isolado 18**
PBS	**Solução salina em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2**
PBS/AZIDA	**Solução salina em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2 + AZIDA**
PCM	**Paracoccidioidomicose**
PMN	**Neutrófilo polimorfonuclear**
PRR	**"Pattern recognition receptors"**
RPMI	**Meio para cultura celular, tampão bicarbonato, pH 6,8**
SFB	**Soro fetal bovino**
SHP-1	**"Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1"**
SHP-2	**"Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2"**
SHIP	**"Src homology 2-containing inositol 5 phosphatase"**
SOCS3	**Sinalizador de supressão de citocina 3**
SPF	**"Specific pathogen free"**
SSC	**"side scatter", granulosidade celular**
T $CD4^+$	**Linfócito T $CD4^+$ auxiliar**
T $CD8^+$	**Linfócito T $CD8^+$ citotóxico**
$TCD4^+CD25^+Foxp3^+$	**Linfócito T regulador do fenótipo $CD4^+CD25^+Foxp3^+$**
TCR	**"T cell receptor"**
TDO	**"Tryptophan 2,3-dioxygenase"**
TGF-β	**"Transforming growth factor β"**
Th2	**Linfócito T "helper" tipo 2**
Th3	**Linfócito T "helper" tipo 3**
Th17	**Linfócito T "helper" tipo 17**
TLR	**"Toll like receptor"**
TLR1	**"Toll like receptor" 1**
TNF-α	**"Tumor necrosis factor α"**
UFC	**Unidades formadoras de colônias**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

1.1 Justificativa 28

1.2 Objetivos 28

2 MATERIAIS E MÉTODOS 30

2.1 Animais 30

2.2 Fungo 30

2.3 Preparo do Inóculo de *Paracoccidioides brasiliensis* para a Infecção Intratraqueal .. 30

2.4 Tratamento de Animais com 1-Metil-DL-Triptofano 30

2.5 Preparo de Suspensões de Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP). 31

2.6 Purificação de Células Dendríticas (DCs) com CD11c$^+$ 31

2.7 Citometria de Fluxo para Caracterização de Subpopulações de Células Dendríticas 31

2.8 Ensaios de Linfoproliferação e Caracterização de Subpopulações Celulares 32

2.8.1 Análise da Linfoproliferação pelo Índice de Proliferação (IP) 32

2.8.2 Caracterização de Células T CD4$^+$ e TCD8$^+$ Naïve e Ativadas 33

2.8.3 Caracterização de Células T CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ 33

2.9 Culturas de Células Dendríticas Purificadas 33

2.10 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) 34

2.11 Dosagem de NO 35

2.12 Dosagem de Quinurenina 35

2.13 Ensaio de RT-PCR 35

2.14 Ensaio de PCR em Tempo Real (qPCR) 37

2.15 Avaliação Intracelular de Citocinas por Citometria de Fluxo 38

2.16 Caracterização de Citocinas por ELISA 38

2.17 Análise Estatística 38

3 RESULTADOS 39

3.1 Estudo do Efeito da Inibição de IDO na Atividade Fungicida de Células Dendríticas obtidas após 96 horas, 2 e 8 Semanas de Infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* 39

3.2 Caracterização Fenotípica de Células Dendríticas no Curso da Infecção 42

3.3 Efeito do Tratamento por 1MT na Produção de Citocinas por Células Dendríticas de Camundongos B10.A e A/J 50

3.3.1 Efeito na produção de IL-12 50

3.3.2 Efeito na produção de IL-1β 51

3.3.3 Efeito na produção de TNF-α 52

3.3.4 Efeito na produção de TGF-β 53

3.3.5 Efeito na produção de IL-6 54

3.4 Caracterização de IDO e das Citocinas Intracelulares de Células Dendríticas Purificadas de Animais Suscetíveis e Resistentes após 96 horas, 2 semanas e 8 Semanas de Infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* 55

3.4.1 Detecção de IDO$^+$ 55

3.4.2 Detecção de TNF-α$^+$ 57

3.4.2 Detecção de IL-12$^+$ 59

3.4.4 Detecção de TGF-β$^+$ 61

3.4.5 Detecção de IL-10$^+$ 63

3.5 Apresentação de Antígenos por Células Dendríticas de Camundongos B10.A e A/J tratados ou não com 1MT 65

3.5.1 Ensaios de Linfoproliferação e Caracterização de Linfócitos 65

3.6 Caracterização das Citocinas produzidas durante o Ensaio de Linfoproliferação utilizando Células Dendríticas de Camundongos tratados ou não com 1MT 68

3.7 Caracterização de Expressão Gênica por Células Totais e Células Dendríticas Isoladas do Pulmão de Camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT, nos Tempos de 96 horas, 2 e 8 Semanas Pós-Infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* 70

3.7.1 Estudo de Expressão Gênica em Células Totais do Pulmão de Camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT, nos Tempos de 96 horas, 2 e 8 Semanas Pós-Infecção por Paracoccidioides brasiliensis 70

3.7.2 Estudo de Expressão Gênica em Células Dendríticas Isoladas do Pulmão de Camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT, nos Tempos de 96 horas, 2 e 8 Semanas Pós-Infecção por Paracoccidioides brasiliensis 78

4 DISCUSSÃO 85

5 CONCLUSÃO..... 102

REFERÊNCIAS 103

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica autóctone da América Latina causada pelo *Paraccoccidioides brasiliensis*, um fungo dimórfico, conhecido apenas em sua forma assexuada, saprobiota do solo. Na natureza, o fungo apresenta a forma filamentosa que produz os conídios, as células infectantes. Uma vez inalados, os propágulos dão origem a formas leveduriformes do fungo que constituirão sua forma parasitária nos tecidos do hospedeiro (RESTREPO, 1985).

De caráter endêmico entre as populações de zona rural, a paracoccidioidomicose (PCM) acomete principalmente indivíduos do sexo masculino entre 30 e 60 anos, sendo rara a incidência abaixo de 14 anos de idade (RESTREPO et al., 1970). A via inalatória é considerada a principal porta de entrada da infecção, e a partir de um foco primário pulmonar, ocorreria disseminação linfática ou hematogênica para diferentes regiões do organismo, inclusive para a mucosa da orofaringe (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993; MCEWEN et al., 1987). O contato inicial do hospedeiro com o fungo costuma evoluir para uma infecção subclínica ou assintomática; se há progressão da infecção, duas formas clínicas são descritas: a forma aguda ou tipo juvenil e a forma crônica ou adulta. A primeira é menos frequente e é observada em crianças de ambos os sexos ou em adultos abaixo de 30 anos e suas manifestações clínicas são decorrentes do rápido e progressivo envolvimento de órgãos do sistema mononuclear fagocitário (DE CARVALHO et al., 1994; FRANCO, 1987). A PCM crônica do adulto é a forma de apresentação mais frequente e caracteriza-se por uma evolução de vários meses onde predominam a adinamia, emagrecimento, lesões tegumentares e às vezes linfoadenopatia. O pulmão, órgão mais frequentemente acometido, dá origem a manifestações clínicas de maneira muito insidiosa, compreendendo tosse seca, posteriormente produtiva, e dispnéia aos esforços (BRUMMER; CASTAÑEDA; RESTREPO, 1993; FRANCO, 1987).

Os pacientes com a forma crônica ou adulta da doença usualmente exibem baixos níveis de anticorpos específicos e apresentam uma adequada imunidade celular, enquanto aqueles com a forma aguda ou juvenil exibem tipicamente altos níveis de anticorpos específicos, ativação policlonal de células B e uma resposta imune celular deprimida (ARANGO; YARZABAL, 1982; CASTAÑEDA et al., 1988; FAZIOLI, 1997; MOTA et al., 1985; SINGER-VERMES et al., 1993). O padrão da resposta imune associado com a doença progressiva e grave na PCM é caracterizado pelas respostas celulares do tipo Th1/Th2, sendo

que as células Th2 estão preferencialmente associadas com a forma progressiva e grave e as células Th1 associadas com a forma benigna da infecção. Uma resposta imune inadequada de pacientes com a forma grave da PCM pode ser responsável pela anergia das células T (BAIDA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002).

Os linfócitos T $CD4^+$ do tipo Th1 produzem as citocinas IL-2 e IFN-γ e os do tipo Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. O predomínio das células Th1 e a liberação das citocinas pró-inflamatórias ativam a atividade microbicida dos macrófagos, já as células Th2 e a liberação das citocinas anti-inflamatórias desativam os macrófagos e estimulam a produção de anticorpos. Parece ser necessário um balanço dos diferentes grupos de citocinas para que ocorra uma proteção eficiente, formando um complexo circuito imunoregulatório (CALICH; KASHINO, 1998; KARHAWI; COLOMBO; SALOMÃO, 1999; ROMANI et al., 1997).

O uso de modelos murinos de infecção pulmonar e intraperitoneal de PCM tem facilitado a caracterização das células, citocinas e mecanismos reguladores que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da resposta imune protetora.

Calich et al. (1985) desenvolveram um modelo de infecção intraperitoneal, onde foram demonstradas diferenças significativas nos padrões de susceptibilidade e resistência ao fungo entre varias linhagens isogênicas de camundongos estudadas. A linhagem A/Sn foi caracterizada como a mais resistente enquanto que a linhagem B10.A demonstrou ser altamente susceptível à infecção pelo *P.brasiliensis.* Cano et al. (1995), desenvolveram um modelo de infecção pulmonar com as mesmas linhagens de camundongos utilizando a via intratraqueal de infecção onde foi demonstrado que camundongos A/Sn desenvolveram PCM crônica, benigna e restrita aos pulmões enquanto que animais B10.A desenvolveram doença disseminada e progressiva. Frente aos resultados obtidos foi possível verificar que os linfócitos T, macrófagos e células B mediadas por interferon-gama (IFN-γ) participavam da resposta à resistência a PCM. Em outro estudo, Cano et al. (1998) demonstraram que o IFN-γ é essencial na resistência a infecções fúngicas; para isso realizaram um estudo *in vivo* utilizando camundongos sensíveis e resistentes ao fungo os quais foram depletados de IFN-γ através do tratamento com anticorpos monoclonais anti-IFN-γ, o que resultou no agravamento da doença em ambas as linhagens, com marcante aumento da carga fúngica pulmonar, disseminação precoce para o fígado e baço e falência da imunidade celular.

Como descrito em outras doenças infecciosas, as quimiocinas produzidas por murinos e humanos na PCM parecem exercer um importante papel na regulação da migração de leucócitos específicos tanto nos processos inflamatórios agudos como nos crônicos. Um

recente estudo realizado por Souto et al. (2000) demonstrou haver uma associação entre altos níveis das quimiocinas MCP-1, IP-10 e Mig com o recrutamento de células mononucleares para os pulmões de camundongos da linhagem C57Bl/6 infectados com *P.brasiliensis*. Contudo, em animais da mesma linhagem nocauteados para o gene do IFN-γ houve a produção de baixos níveis de quimiocinas para células mononucleares e altos níveis de quimiocinas que atraem neutrófilos como KC e MIP-1α; demonstrou-se assim, o papel do IFN-γ na regulação da produção de quimiocinas e no recrutamento de leucócitos para os pulmões em modelo murino de PCM.

Os macrófagos, além de produzirem e liberarem mediadores inflamatórios e quimiotáticos, também são eficientes células apresentadoras de antígenos (APCs). Participam do processo de fagocitose de partículas e agentes microbianos e os carreia via linfáticos aos linfonodos, onde as respostas imunes específicas são geradas. Assim, os macrófagos podem estar envolvidos tanto nas respostas imunes inatas como nas adquiridas ao *P.brasiliensis* atuando como células efetoras da imunidade inata e adquirida. Macrófagos alveolares de camundongos resistentes e susceptíveis ao *P.brasiliensis* foram analisados após a infecção pulmonar e observou-se ausência da produção de peróxido de hidrogênio pelas células obtidas de camundongos suscetíveis, enquanto que os macrófagos de camundongos resistentes produziram níveis elevados destes metabólitos no curso da doença (CANO et al., 1995; KASHINO et al., 1985).

O óxido nítrico (NO) é gerado pela oxidação de um dos nitrogênios do aminoácido L-arginina e é um dos principais responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos (HIBBS; VAVRIN; TAINTOR, 1987; HIBBS et al., 1988). A enzima óxido-nítrico-sintetase induzida (iNOS ou NOS2) é produzida durante a ativação dos macrófagos pelos microrganismos ou produtos bacterianos como LPS, bem como por citocinas pró-inflamatórias como o IFN-γ, TNF-α e IL-12 (BERNARDINO et al., 2013; CORRALIZA et al., 1995; MACMICKING; XIE; NATHAN; 1997).

Brummer (1994) demonstrou que o mecanismo fungicida de macrófagos na PCM era independente da produção de reagentes intermediários do oxigênio produzidos pela explosão respiratória. Assim, a atividade fungicida não pôde ser abolida pelo tratamento das células com superóxido-dismutase, catalase ou azida sódica. A despeito de vários estudos terem mostrado que a morte do *P.brasiliensis* é dependente de NO produzido por macrófagos ativados por IFN-γ (CANO et al., 1995; GONZALEZ et al., 2000), foi também descrito que a síntese de NO está associada com a imunossupressão de células T (BOCCA et al., 1988;

NASCIMENTO et al., 2002). Em altas concentrações o NO pode inibir praticamente todas as células do sistema imune (células T, B, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos) via indução de apoptose, ou inibição da produção de fatores de transcrição, citocinas, proteína-quinases, moléculas do MHC, etc. O NO pode também impedir a migração de células ao tecido inflamado devido à inibição da síntese de moléculas de adesão pelo endotélio (BOGDAN, 2001). Segundo o estudo de Nascimento et al. (2002), a infecção com *P.brasiliensis* em camundongos depletados *in vivo* de NO bem como em camundongos deficientes do gene da NO-sintase induzida (iNOS) levou a doença mais grave e formação de lesões disseminadas e ricas em fungos.

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) atuam na imunidade inata e parecem proteger camundongos susceptíveis ao *P.brasiliensis*, enquanto que nos camundongos resistentes, a proteção ocorre somente no início da infecção. Em um trabalho recente realizado por Pina et al. (2006), foi observado que a depleção de PMN induzia doença muito grave nos camundongos suscetíveis, associada a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a ativação excessiva do sistema imune pode ser deletéria ao hospedeiro.

No nosso modelo experimental, várias observações indicam que o paradigma Th1/Th2 de ativação da resposta imune adaptativa não explica completamente os fenômenos de resistência e susceptibilidade ao fungo. Assim, a IL-4 é protetora para camundongos suscetíveis (ARRUDA et al., 2004), o tratamento com IL-12 exógena leva à menor disseminação do fungo, mas induz intensa patologia pulmonar associada com exuberante influxo de células inflamatórias (ARRUDA et al., 2002); a depleção de células T $CD4^+$ não altera o curso da doença de camundongos susceptíveis (CHIARELLA et al., 2007).

A resposta imune inata contra os fungos, por sua vez, baseia-se no reconhecimento de estruturas moleculares conservadas encontradas em inúmeros grupos de microrganismos, os PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002) que são reconhecidos pelos seus receptores, os PRR (*pattern recognition receptors*), sendo os TLR (*toll like receptors*) um dos grupos mais importantes. Os TLRs compreendem vários componentes designados de TLR1 a TLR9, que reconhecem diferentes estruturas moleculares nos patógenos, e estão presentes nas membranas celulares e endocelulares das células da imunidade inata; há ainda os receptores do tipo lectinas-c como os receptores para manose (MR), dectina 1 e 2 que reconhecem β-glucanas e os receptores tipo *scavenger* também presentes em células da imunidade inata, como neutrófilos (PMN), macrófagos (Mϕ) e células dendríticas (DCs) possibilitando a fagocitose dos patógenos (AKIRA; UEMATSU;

TAKEUCHI, 2006; BROWN; GORDON, 2003; GORDON, 2002). Os TLRs são importantes em inúmeros aspectos na eliminação de microrganismos. Sua ativação leva à produção de inúmeras moléculas de adesão e estimuladoras, dentre elas as quimiocinas que participam do recrutamento de fagócitos para o foco da infecção. A ativação de DCs, via TLRs, tornam estas células imunogênicas e com habilidade de induzir a ativação de linfócitos T "helper" Th1, Th2, ou Th17 responsáveis pela resposta imune adaptativa. Por exemplo, os TLR4 de DCs estimuladas com LPS produzem altos níveis de IL-12 e TNF-α, e baixos níveis de IL-10, favorecendo a resposta do tipo Th1 (REIS E SOUSA, 2004).

Recentemente têm sido descritos novos mecanismos de controle da resposta imune. Linfócitos reguladores T CD4+ parecem exercer um papel fundamental nos processos de contenção de respostas imunes excessivas que podem levar a intensa patologia tecidual, assim como na manutenção da tolerância a auto antígenos. Há várias subpopulações de células T reguladoras (Treg), mas dentre elas as chamadas T reguladoras naturais e as T reguladoras induzidas têm sido as mais estudadas. As células Treg induzidas são chamadas de TR1 quando produzem IL-10 ou "T helper 3" (Th3) quando associadas à produção de TGF-β; podem se desenvolver de células T $CD4^+$ convencionais quando expostas a condições estimulatórias especiais tais como a ausência de sinais co-estimulatórios ou citocinas desativadoras (BLUESTONE et al., 2003, MILLS et al., 2004). As células Treg naturais são originárias do timo, têm o fenótipo $CD4^+CD25^+$, e representam 5-10% dos linfócitos CD4+ em camundongos e em humanos normais (O'GARRA; VIEIRA, 2004). A expressão constitutiva de CD25, CTLA4 e GITR (receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide) caracteriza a subpopulação Treg natural. Entretanto, a expressão do fator de transcrição FoxP3, necessário para a geração destas células, tem sido considerado o melhor marcador fenotípico das Treg naturais (FONTENOT et al., 2005). Estas células são específicas para autoantígenos e críticas para a prevenção de doenças autoimunes, mas também exercem um controle efetivo de infecções, pois podem reconhecer antígenos de patógenos (BELKAID et al., 2005). Células Tregs foram caracterizadas como importantes no aumento da carga fúngica em camundongos infectados com *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii* e *Aspergillus fumigatus*. Nestes modelos experimentais, enquanto mantida a infecção, as células Treg limitaram a imunopatologia associada (FELONATO et al., 2012). Sabe-se ainda que um dos mecanismos inibitórios das células Treg utiliza a molécula co-estimulatória CTLA-4 através da sua interação com moléculas B7 presentes nas células apresentadoras de antígenos, em especial as células dendríticas. Essa interação induz a expressão da enzima

indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) que hidrolisa o triptofano, dando origem a metabólitos que inibem a imunidade mediada por linfócitos T (DE LUCA et al., 2013; FALLARINO et al., 2003).

Vários estudos têm demonstrado um importante papel do catabolismo do triptofano e da produção de seu metabólito, a quinurenina, na indução da tolerância periférica a antígenos (GROHMANN; FALLARINO; PUCCETTI, 2003; MELLOR; MUNN, 1999). Os mamíferos possuem duas enzimas intracelulares contendo o grupo heme, a indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e a triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) que catalisam o metabolismo oxidativo do triptofano (TAYLOR; FENG, 1991). Essas enzimas têm diferente padrão de expressão, mas de maneira interessante alguns trabalhos têm demonstrado que a IDO é predominantemente expressa pela subpopulação plasmocitóide de células dendríticas, subpopulação esta que medeia fenômenos imunoregulatórios (FALLARINO et al., 2002; GROHMANN et al., 2001; MUNN et al., 2002; SHORTMAN; LIU, 2002).

A IDO, e sua atividade nas células da imunidade inata tal como macrófagos, foi inicialmente associada com a defesa do hospedeiro contra patógenos tais como *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psitacci*, citomegalovírus (CMV) e na contenção do crescimento de células tumorais, por depletar triptofano e limitar a habilidade dos patógenos ou células de sintetizar proteínas (SEDLMAYR; BLASCHITZ;WINTERSTEIGER, 2002; TAYLOR; FENG, 1991; UYTTENHOVE; PILOTTE; THEATE, 2003). A IDO parece exercer duplo papel: a) apresenta efeito antimicrobiano por inibir o crescimento de microrganismos e possibilitar o desenvolvimento de infecções menos graves, e b) induz imuno-tolerância aos patógenos por ativar respostas imunes regulatórias (BABAN; PENBERTHY; MOZAFFARI, 2010).

A capacidade supressora da IDO sobre uma variedade de tipos celulares do sistema imune, particularmente linfócitos, tem atraído o interesse de pesquisadores no estudo da regulação da IDO, como uma possível via de tratamento de várias doenças como a candidíase vaginal, encefalomielite autoimune (EAE), artrite reumatóide, câncer, AIDS, Alzheimer, tolerância a transplantes, entre outras (BOASSO; SHEARER, 2007; CHOI et al., 2006; DE LUCA et al., 2013; HAYASHI et al., 2004; KWIDZINSKI; BUNSE; AKTAS, 2005; LOGAN; SMYTH; EARL, 2002; MELLOR; MUNN, 2004; MUNN; MELLOR, 2007; SAKURAI et al., 2002; SCHROECKSNADEL et al., 2007; TAYLOR; FENG, 1991).

Frumento et al. (2002) relataram que a atividade de IDO é efetiva na redução da proliferação de células $CD4^+$ e $CD8^+$, bem como de células NK, mas não de células B. Este trabalho sugere também que tanto a depleção de triptofano bem como o excesso de

metabólitos da via das quinureninas são necessários para que os efeitos antiproliferativos de IDO sejam completos (MULLEY; NIKOLIC-PATERSON, 2008).

IDO normalmente tem expressão basal baixa, mas é rapidamente induzida pelo interferon-γ (IFN-γ), que controla a ativação transcricional de *INDO*; entretanto, outros fatores como IL-1β, IL-10, TNF-α e LPS também induzem a expressão de IDO, porém num patamar inferior ou de forma sinérgica com IFN-γ (MELLOR; MUNN et al., 2004, MUNN; MELLOR, 2007). O eixo de IFN-γ-IDO é considerado um mecanismo filogeneticamente conservado para restringir o crescimento microbiano e evitar respostas hiper-inflamatórias potencialmente prejudiciais ao hospedeiro (PALLOTTA et al., 2011).

Ao nível do mRNA, a transcrição de IDO é promovida por fatores como *forkhead box O3* (FOXO3) e o fator de regulação de interferons (IRF)-8, e é suprimida pela proteína de ativação DNAX12, ao passo que, a nível pós-translacional, o CD28, outro ligante que sinaliza através das moléculas CD80/CD86 (B7.1/B7.2) inibe IDO via expressão aumentada de SOCS3 (sinalizador de supressão de citocinas 3), que liga a IDO levando à ubiquitinação e sua degradação rápida (ORABONA et al., 2006, 2008; ZELANTE et al., 2009).

Por outro lado, a atividade funcional de IDO nas células é regulada por vários fatores bioquímicos tais como a expressão de iNOS e a biosíntese de grupos heme. Citocinas como IL-6, IL-4 e IL-13 são apontadas como supressoras de IDO (ORABONA et al., 2005; YUAN et al., 1998). Outras citocinas, como as do eixo IL-17/IL-23 diminuem as atividades efetoras antifúngicas de PMN exatamente por contrapor a ativação IFN-γ-dependente de IDO, enzima que limita o comportamento pró-inflamatório de leucócitos PMN contra fungos. Assim, a síntese de IDO inibe a liberação de metaloproteinases e oxidantes de células fagocíticas, que provavelmente contribui para a elevada patologia inflamatória e destruição tecidual associada com ativação de células Th17, como explorado nos modelos de doença granulomatosa crônica (CGD) e candidíase mucocutânea crônica (CMC) (ZELANTE et al., 2009).

No nível molecular, a IDO promove a imunoregulação em duas maneiras: primeiro, ao depletar triptofano, IDO ativa a via de resposta ao estresse celular através da GCN2 quinase (também conhecida como EIF2AK4) e o alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR); e segundo, a enzima produz quinureninas, as quais se ligam naturalmente ao receptor Aril hidrocarboneto (AHR), potencializando a indução de células Tregs (MEDZHITOV et al., 2011; MEZRICH et al., 2010; MUNN et al., 2005).

A função enzimática de IDO é induzida principalmente pela ativação de DCs plasmacitóides pelo IFN-γ. O IFN-γ sinaliza via Jak quinase e os fatores de transcrição

STATS que ativam a síntese de IDO. A IDO ativada leva a depleção de triptofano e produção de quinureninas que inibem a resposta imune (PALOTTA et al., 2011).

IDO também tem sido descrita como uma molécula de sinalização intracelular em células dendríticas plasmacitóides (pDCs) quando ativada por TGF-β. Esta função de sinalização é independente da atividade enzimática (catalítica) de IDO e ocorre através da fosfolilação de domínios ITIMS (imunoreceptores de tirosina de caráter inibitório) da IDO por mecanismo Fyn-dependente. A IDO fosfolirada recruta então as fosfatases (SHP-1/SHP-2 – *tyrosine phosphatases*) e a fosfatase inositol polifosfato (SHIP) que promovem a indução da via não canônica do NFkB, desencadeando uma intensa e sustentada expressão de IDO, TGF-β, IFN-α e IFN-β; além disso, o complexo de IDO-SHP é necessário para o efeito tolerogênico sustentado de TGF-β sobre o fenótipo de DCs plasmacitóides murinas (MUNN; MELLOR et al., 2013; PALLOTTA et al., 2011).

A expressão fenotípica de células Tregs CD4+CD25+Foxp3+ constitutivas em humanos é mais evidenciada do que em camundongos. DCs imaturas, interagindo com Tregs constitutivas de uma forma contato-dependente, secretam a citocina imunosupressora IL-10. Este fato induz células T reguladoras ou supressoras, Tr1 e Th3, a exercer seus efeitos de forma contato-independente pela respectiva secreção de IL-10 ou TGF-β (DIECKMANN et al., 2002; JONULEIT et al., 2000; JONULEIT et al., 2002). Células T reguladoras CD4+ e CD8+ podem se desenvolver após estímulo primário de DCs plasmacitóides (pDC), um tipo de células dendríticas caracterizada por expressar marcadores como $CD11c^+$, $B220^+$, $GR1^+$ e mPDCA-1^+ (marcador específico de células dendríticas plasmacitóides). Todo esse processo de regulação tem participação efetiva da enzima IDO (WANG et al., 2013)

Outro aspecto importante demonstrado sobre a indução de IDO foi que o antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), ou seu recombinante solúvel sintético CTLA-4Ig, na ligação com as moléculas co-estimulatórias B7.1 e B7.2 (CD80 e CD86) de células apresentadoras de antígenos (APCs) induzem a expressão da enzima (GROHMANN et al., 2002, FALLARINO et al., 2003). Assim, células T-regulatórias contendo moléculas CTLA-4 de membrana podem induzir a expressão de IDO em células dendríticas convertendo-as em células dendríticas tolerogênicas ou regulatórias (ZELANTE et al., 2009).

Fallarino et al. (2006) apoiam a sugestão que a expressão de IDO pode induzir células T regulatórias via CTLA-4. Estes autores demonstraram a expansão de células regulatórias T $CD4^+$ expressando FoxP3 originárias de células T $CD4^+CD25^-$ näive depois de serem expostas à depleção de triptofano combinada com excesso de quinureninas. Ao mesmo tempo,

IDO se estabelece como um verdadeiro mecanismo imunoregulador em infecções fúngicas provocadas por *Candida albicans* ou *Aspergillus fumigatus*, controlando o balanço entre células Th17 e Tregs. Somado a isso é sugerido que IDO e quinureninas, na sua capacidade de induzir Tregs e inibir Th17, contribuem de forma fundamental para a definição da linhagem celular efetora nas infecções fúngicas (DE LUCA et al., 2013; ZELANTE et al., 2009).

O composto 1-metil-triptofano (1MT) que compete pela enzima, inibe o efeito da ação da IDO, levando a um aumento de células Th1 e uma diminuição de células Th2 e Tregs. Mais ainda, por bloquear IDO, 1MT inibe a produção de quinureninas, que têm sido mostradas como capazes de reduzir tanto a proliferação de células T como NK. Este mecanismo regulador é dependente de DCs e pode auxiliar no entendimento de como as células T-regulatórias podem inibir outras células T sem contato celular. A expressão de IDO em células apresentadoras de antígenos (APCs) se correlaciona com fraca proliferação de células T, aumento de apoptose e fracas respostas imunológicas in vivo (HWU et al., 2000; FALLARINO et al., 2002; MELLOR et al., 2002; MUNN et al., 1996; MUNN et al., 1999; MUNN et al., 2002; ROMANI et al., 2005). O inibidor 1MT, que pode ser encontrado nas formas estereoisômeras L-1MT (levo) e D-1MT (dextro) ou na mistura racêmica DL-1MT, restaura a proliferação de células T, aumenta as respostas destas células durante a gestação, e abole processos regulatórios que suprimem as respostas a antígenos tumorais, a auto-antígenos em doenças auto-imunes e a rejeição de aloenxertos (ALEXANDER et al., 2002; MELLOR et al., 2002; MIKI et al., 2001).

A expressão de IDO, induzida nos sítios inflamatórios *in vivo*, principalmente por IFN-γ, é considerada parte da resposta imune do hospedeiro associada a inflamações crônicas e a infecções persistentes, tendo como função impedir o crescimento de certos vírus, bactérias, patógenos intracelulares, e células tumorais via depleção de triptofano, o menos abundante de todos os aminoácidos essenciais (BEATTY; BYRNE; MORRISON, 1993; HAYASHI et al., 2001; MELLOR; MUNN, 2004; PFEFFERKORN, 1984; MACKENZIE; HADDING; DAUBENER, 1998; SANNI et al., 1998; SILVA et al., 2002; ROTTENBERG; GIGLIOTTI-ROTHFUCHS; WIGZELL, 2002; TAYLOR; FENG, 1991; THOMAS; STOCKER, 1999). A diminuição da concentração de triptofano disponível pode desempenhar efeito microbicida sobre patógenos cuja multiplicação seja triptofano-dependente, mas, concomitantemente, pode induzir o controle da resposta imune por células T-regulatórias o que pode resultar em respostas imunes menos eficientes que permitiriam a manutenção dos patógenos nos tecidos e a cronicidade da doença.

Neste cenário de imunoregulação, com participação direta da enzima IDO, as células dendríticas (DCs) são reconhecidas como as melhores ativadoras do sistema imunológico e mais ainda, desempenham papel crítico na indução de tolerância central, bem como na indução e manutenção da tolerância periférica. Vários sinais estão envolvidos na determinação da natureza do sinal de interação entre células T e as DCs, incluindo a interação antígeno específica entre o receptor da célula T (TCR) em células T e do peptídeo ligado à molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em DCs, sinal de contato mediado por receptores co-estimulatórios ou tolerogênicos, e de citocinas secretadas. Sob condições normais de equilíbrio fisiológico, as DCs mantêm a tolerância por induzir Tregs ou por causar anergia ou deleção de células T auto-reativas. A enzima tolerogênica IDO é um alvo da maioria, senão de todos os eventos de sinalização e se constitui um componente chave dentro dos mecanismos moleculares responsáveis por programar as DCs para um estado tolerogênico, tornando-se assim as chamadas DCs IDO+ (ANTIGNANO et al., 2011;WANG et al., 2013).

Identificadas originalmente por Steinman e Cohn, em 1973, as DCs passaram a constituir um foco de grande interesse para o desenvolvimento de protocolos de imunoterapia a partir do momento que se tornou possível obtê-las *in vitro* em meio de cultura contendo GM-CSF e IL-4 a partir de monócitos, e uso de TNF-α para a sua ativação (BARBUTO, 2004; NEVES et al., 2004; ROMANI et al., 1994; ZHEENG et al., 2004).

As DCs funcionam como sentinelas da vigilância imunológica, um fenômeno que acontece nos tecidos periféricos, incluindo superfícies de mucosas, tais como no pulmão e intestino (FONG; ENGLEMAN, 2000; MCWILLIAM et al., 1994). No pulmão, as DCs imaturas estão localizadas estrategicamente nas vias aéreas e alvéolos distais, onde elas podem funcionar como sentinelas para antígenos inalados ou circulantes (XIA et al., 1995).

A morfologia das DCs varia de acordo com o seu estágio de maturação. As DCs maduras caracterizam-se por uma forma irregular, exibindo numerosos prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados que partem do corpo celular seguindo direções variadas. Já as DCs imaturas apresentam-se com morfologia arredondada e prolongamentos citoplasmáticos curtos (ARDAVIN et al., 2001; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; CIRRINCIONE et al., 2002; HART, 1997; KELLER, 2001).

As DCs imaturas têm alta capacidade de capturar e processar antígenos, mas apresentam baixa capacidade para estimular células T, devido à baixa expressão de moléculas de MHC-II bem como moléculas acessórias tais como CD40, CD54, CD80 e CD86 que são

importantes para que aconteça a interação entre células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T (MCWILLIAM et al., 1994). Após exposição das vias aéreas a estímulos bacterianos ou antígenos solúveis (MCWILLIAM et al., 1994; XIA; PINTO; KRADIN, 1995), as DCs imaturas são rapidamente recrutadas para o epitélio pulmonar, permanecendo no local durante a resposta inflamatória aguda, período em que elas amadurecem e em seguida migram do pulmão para os linfonodos drenantes onde irão sensibilizar as células T. Nesta fase, as DCs perdem a sua capacidade de capturar e processar antígenos, mas adquirem a capacidade de estimular células T, sendo caracterizadas como DCs maduras, com alta expressão de moléculas de MHC-II, moléculas acessórias (MCWILLIAM et al., 1994) e grande capacidade de síntese de IL-12 (BANCHEREAU et al., 2000).

As DCs imaturas também expressam receptores de quimiocinas, tais como CCR1 (ligantes: MIP-1α, MCP-3, MCP-5 e RANTES), CCR2 (ligantes: família MCP), CCR4 (ligantes: TARC e MDC), CCR5 (ligantes: RANTES, MIP-1α, MIP-1β), CCR6 (ligante: MIP-3β) e CXCR1 (ligante: IL-8), os quais são responsáveis por conduzi-las para os sítios inflamatórios em resposta às quimiocinas secretadas. Por outro lado, as DCs em maturação diminuem a expressão de receptores de quimiocinas inflamatórias e aumentam a expressão de CCR7 (BIILYK; HOLT, 1993).

Ferreira et al. (2007), analisando a infecção fúngica provocada por *Paracoccidioides brasiliensis*, demonstrou que as DCs de camundongos suscetíveis (B10.A) à doença foram mais fagocíticas que as células de camundongos resistentes (A/J). Ainda, depois de fagocitar o fungo, as DCs não foram capazes de exercer atividade fungicida. Quando citocinas e moléculas co-estimulatórias foram analisadas, foi observado que as DCs de animais resistentes produziram baixas concentrações de IL-10, IL-12 e TNF-α e tiveram expressão aumentada de CD80. Em contraste, nos animais suscetíveis, altas produções de TNF- α e IL-10 foram encontradas bem como um aumento na expressão de CD80 e CD54, mostrando assim que a ligação de diferentes receptores na superfície de DCs de camundongos suscetíveis poderiam levar a perfis específicos de produção de citocinas.

Resultados de nosso grupo mostraram que *in vitro* as BMDCs de animais resistentes infectadas com *P.brasiliensis* diferenciaram-se com grande frequência para DCs de perfil mielóide ($CD11c^{high}CD11b^{+}$), de caráter predominantemente pro-inflamatório, e plasmacitóide ($CD11c^{low}B220^{+}$), enquanto que em camundongos suscetíveis houve a expansão prevalente da subpopulação mielóide ($CD11c^{high}CD11b^{+}$). As DCs mielóides de camundongos B10.A são altamente pró-inflamatórias (grande produção de NO e IL-12) mas,

induzem a apoptose e anergia das células T. Ao contrário, as DCs plasmacitóides de camundongos A/J expressam e sintetizam principalmente TGF-β, e estão associadas com a tolerância inicial desta linhagem ao crescimento fúngico. Apesar disso, as mDCs de camundongos A/J secretam grandes quantidades de TNF-α e IL-6 induzindo a ativação de linfócitos T com prevalência das subpopulações Th1 e Th17, acompanhados da expansão de células Treg. Assim, o comportamento das DCs é capaz de explicar a anergia da imunidade celular desenvolvida por camundongos suscetíveis, e a respostas imune eficiente (sem ser excessivamente pró-inflamatória) de camundongos resistentes (PINA et al., 2013).

1.1 Justificativa

No modelo murino de infecção pulmonar de PCM utilizado em nosso laboratório, temos nos dedicado a entender os mecanismos imunológicos associados aos fenômenos de resistência e susceptibilidade genética ao *P.brasiliensis*. Já havíamos demonstrado em trabalho anterior que a enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) participa dos mecanismos de imunidade inata e adaptativa contra o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Pudemos demonstrar que macrófagos de camundongos suscetíveis e resistentes ao fungo utilizam mecanismo IDO-mediado para exercer atividade fungicida. Este mecanismo leva à geração de quinureninas, metabólitos do triptofano produzidos pela ação da IDO que têm grande potencial imunomodulador por induzir a inativação e morte de linfócitos. Induz também a diferenciação de células T reguladoras através da ativação do fator de transcrição receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR). A depleção de triptofano por IDO leva à morte das leveduras independente da produção de óxido nítrico. Além disso, a ativação de IDO modula a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias por macrófagos ativados. Em experimentos *in vivo* verificamos que a enzima IDO controla a carga fúngica, a inflamação dos tecidos infectados e a expansão de linfócitos T CD4+ e T CD8+. Além disso, a IDO participa dos mecanismos de expansão de células T reguladoras que são importantes para o controle dos processos inflamatórios teciduais e controle da imunidade.

1.2 Objetivos

Baseado nos dados anteriormente obtidos, este trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito do tratamento com 1MT no fenótipo e comportamento de células

dendríticas e T reguladoras de camundongos suscetíveis e resistentes à infecção pelo *P.brasiliensis*. Este estudo foi realizado nas fases precoce (96 horas e 2 semanas) e tardia (8 semanas) da infecção. Assim, camundongos foram tratados ou não com 1MT e infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* pela via i.t. Após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção os leucócitos infiltrantes de pulmão foram obtidos, as células dendríticas foram isoladas por "beads" magnéticos revestidos por anticorpos anti-CD11c e estudadas quanto à caracterização das subpopulações das DCs ($CD11b^+$, $B220^+$, $CD8\alpha^+$), expressão de marcadores de ativação e moléculas co-estimulatórias (CD86, MHC II, CD40), produção de citocinas (IL-12, IL-1β, TGF-β, TNF-α, IL-6), presença de IDO e citocinas intracelulares (TNF-α, IL-12, IL-10, TGF-β), atividade fungicida e expressão de mRNA para IDO. Estas células também foram estudadas quanto à capacidade de ativação de linfócitos T naive, a sua diferenciação e produção de citocinas (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10). Foram também determinados os níveis de expressão gênica de moléculas envolvidas nas funções enzimática e sinalizadora de IDO em células totais do pulmão e também em DCs isoladas de camundongos resistentes e susceptíveis ao fungo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Camundongos isogênicos machos das linhagens A/J resistentes e B10.A suscetíveis ao *P.brasiliensis* (CALICH et al., 1985), foram utilizados, ao atingirem 8 a 10 semanas de idade e separados em grupos de 6 animais por grupo: A/J tratados, A/J controle, B10.A tratados e B10.A controle. Esses animais foram criados sob condições SPF (*specific pathogen free*) no Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

2.2 Fungo

Foi utilizada a cepa virulenta *P.brasiliensis* 18 (KASHINO et al., 1985). O fungo foi mantido na sua fase leveduriforme em meio de Fava Netto com passagens a cada sete dias e incubação a 36 ºC (FAVA NETTO, 1955).

2.3 Preparo do Inóculo de *Paracoccidiodes brasiliensis* para a Infecção Intratraqueal

As células leveduriformes do *Paracoccidiodes brasiliensis* obtidas após 1 semana de cultivo em meio de Fava Netto foram recolhidas e lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7.2) estéril. A contagem final foi acertada em $2x10^7$ células viáveis do fungo por ml para inoculação i.t., pela contagem em câmara de Neubauer e determinação da viabilidade pelo corante Vital Janus Green B. A inoculação i.t. envolveu um procedimento cirúrgico, com prévia anestesia dos animais de acordo com o procedimento previamente descrito (CANO et al., 1995). Foi feita uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço, traqueia foi exposta e o fungo foi administrado em um volume total de 50 µl (1 x 10^6 células) diretamente na traqueia (CANO et al., 1995).

2.4 Tratamento de Camundongos com 1-Metil-DL-Triptofano (1MT)

O composto 1-Metil-DL-Triptofano (1MT, Sigma Aldrich, Germany), conhecido inibido da enzima IDO, foi administrado aos camundongos pela via intraperitoneal. Para

tanto, uma solução de 1MT (5 mg/ml) foi inoculada nos animais desde o primeiro dia da infecção até duas semanas pós-infecção nos experimentos de 2 e 8 semanas e nas 96 horas de infecção dos experimentos de curto prazo.

2.5 Preparo de Suspensões de Leucócitos Infiltrantes de Pulmão (LIP)

As suspensões celulares dos pulmões foram preparadas de acordo com Huffnagle et al. (1991). Os pulmões foram removidos e digeridos por 60 minutos em meio RPMI-1640 Medium (Sigma) contendo colagenase (1mg/mL) e DNAse (30 µg/mL). Os eritrócitos foram lisados com tampão de lise (cloreto de amônio + TRIS). As células foram contadas e a viabilidade determinada pela marcação de azul de Trypan.

2.6 Purificação de Células Dendríticas com CD11c+

As células totais dos pulmões foram colocadas em novos tubos contendo células totais de 2 camundongos/tubo e assim foi possível aumentar o rendimento das células purificadas. As DCs foram assim purificadas por separação magnética usando Microbeads (Miltenyi Biotec, Germany) para isolamento de células CD11c positivas. As células foram contadas e centrifugadas em centrífuga refrigerada (800 g, 10 minutos, 4 ºC). O sobrenadante foi retirado completamente e o sedimento ressuspendido em 400 µL de tampão (PBS + BSA 0,5% + 2 mM de EDTA). A seguir foram adicionados 100 µL de microsferas recobertas por anti-CD11c (Microbeads) para cada 10^8 de células totais. A mistura foi incubada por 15 minutos na geladeira (2-8 ºC). As células foram lavadas adicionando 2 ml de tampão e centrifugadas a 800 g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspendido em 500 µL de tampão. Esta suspensão foi passada por colunas de separação magnética e, após a retirada da coluna, as células dendríticas foram obtidas e utilizadas conforme ensaio abaixo.

2.7 Citometria de Fluxo para Caracterização de Subpopulações de Células Dendríticas

Células infiltrantes dos pulmões (CANO et al., 2000) foram obtidas nos tempos de 96 horas e 8 semanas após infecção de camundongos B10.A e A/J infectados pelo fungo e tratados ou não com 1MT. A concentração celular foi ajustada, e as células dendríticas foram adicionadas à placas de fundo em U na quantidade de 1 x 10^6 céls/poço. Em seguida, as

células foram ressuspensas em PBS-azida (0,1%) contendo soro fetal bovino (SFB, 5%). As placas foram centrifugadas, os sobrenadantes foram dispensados e o Ac marcado (25 µL no título adequado) foi adicionado. Após incubação por 20 minutos em geladeira, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS-azida e transferidas para tubos de leitura de FACS. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo e protegidas da luz. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto e software FlowJo (Tree-Star). Foram usados anticorpos marcados com fluorocromos diferentes (BD Biociences) na combinação adequada para a população celular a ser analisada: CD11c, B220, CD86, CD40, MHCII, CD11b.

2.8 Ensaios de Linfoproliferação e Caracterização de Subpopulações Celulares

Linfócitos provenientes do baço de animais B10.A e A/J foram ressuspendidos (1 x 10^7) em 1 mL PBS-BSA (0,1%) estéril e 1µL de CFSE (*carboxyfluorescein diacetate, succinimidly ester*) na concentração de 5mM (Molecular Probes, USA). As células foram incubadas em temperatura ambiente no escuro, por 15 minutos (agitando o tubo constantemente). As células foram lavadas 2 vezes com 10 mL de meio RPMI suplementado, contadas e ressuspendidas na concentração de 1 x 10^6/mL. Em paralelo, as DCs purificadas de ambas as linhagens de camundongos foram centrifugadas e ressuspendidas em meio suplementado de forma que tivéssemos 1 x 10^5 células em cada 100 µL. As DCs foram irradiadas a 1250 rads (fonte de Césio ^{137}) e colocadas em uma placa de 96 poços (fundo U) na presença de linfócitos previamente corados com CFSE em uma relação 1:10 (100 µL de DCs + 100 µL de linfócitos).

Para este ensaio foi preciso realizar alguns controles, tais como:

- Linfócitos corados com CFSE + meio RPMI suplementado (controle)
- DCs purificadas + meio RPMI suplementado (controle)
- Linfócitos + ConA (controle de proliferação)

2.8.1 Análise da Linfoproliferação pelo Índice de Proliferação (IP)

Para a análise dos dados de proliferação, foi criado um índice de proliferação (IP), calculado da seguinte maneira:

$$\frac{\textit{Média geométrica da intensidade de fluorescência de linfócitos cultivados isoladamente}}{\textit{Média geométrica da intensidade de fluorescência das co-culturas}}$$

Este índice permite mensurar a queda na intensidade de fluorescência das células marcadas, que será tanto maior, quanto maior for o número de divisões.

2.8.2 Caracterização de Células TCD4 e TC8 Naïve e Ativadas

As células foram incubadas a 37 °C em 5% CO_2 por 3 dias. Após o período de incubação os sobrenadantes das culturas foram retirados e armazenados a -70 °C para determinação da presença de algumas citocinas e as células foram marcadas com anticorpos (CD4, CD8, CD44, CD62L, CTLA-4, GITR e CD25) e submetidas à leitura em citômetro de fluxo FACSCanto (Becton-Dickinson, USA). Após a aquisição dos dados, estes foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (Flow Jo Inc, USA).

2.8.3 Caracterização de Células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$

Utilizamos o mesmo protocolo de proliferação do item 2,8 e após o período de incubação os sobrenadantes das culturas foram retirados e armazenados a -70 °C para determinação da presença de algumas citocinas e as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD25, por 30 minutos a 4 ^{o}C. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão de coloração (*stainning buffer*) contendo 2% de soro fetal bovino, 0,1% de azida, 100 mL de PBS isotônico. A seguir, foi feita a permeabilização da membrana plasmática com a adição de 200 µL/poço de Cytofix/Cytoperm (Fixation/Permeabilization Kit BD Biosciences) em temperatura ambiente por 30 minutos, protegido da luz. Após a lavagem das células, realizou-se a permeabilização da membrana nuclear com a utilização de 130 µL/poço de solução contendo 750 µL de PBS 1x, 250 µL de paraformaldeído 4%, 5 µL de Tween 20 (Sigma) e as células, então, foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro.

Após lavagem das células com PBS (1x) gelado, prosseguiu-se a marcação com o anticorpo específico para o fator de transcrição nuclear Foxp3, diluído a 1/100 em tampão de

coloração. As células foram incubadas por 30 minutos a 4 ^{o}C, posteriormente lavadas com PBS gelado, fixadas com 2% de paraformaldeído e armazenadas a 4 ^{o}C no escuro até análise por citometria de fluxo. Foram feitos os "gates" primeiramente para linfócitos totais, depois para linfócitos T $CD4^{+}$, linfócitos T $CD4^{+}CD25^{+}$ e finalmente, o "gate" para linfócitos T $CD4^{+}CD25^{+}$Fox P3 $^{+}$.

A aquisição das células (100.000 eventos) foi feita pelo FACS Canto (BD Pharmingen®, USA) utilizando o software FACSDiva software (BD Pharmingen). A expressão do marcador $FoxP3^{+}$ foi apresentado através da frequência de células presente na população de linfócitos $TCD4^{+}CD25^{+}$ de cada grupo de ensaio. Após a aquisição dos dados, estes foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (Flow Jo Inc, USA).

2.9 Culturas de Células Dendríticas Purificadas

O número total de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, após a mistura de 90 µL do diluente Turk e 10 µL da suspensão celular. A viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando-se o corante Trypan Blue, e foi usada sempre quando superior a 80%. As suspensões celulares foram mantidas em gelo para contagem diferencial de células e então centrifugadas a 1200 rpm, a 4 ºC por 10 minutos e ressuspensas em 1,0 ml de meio de cultura (RPMI-1640 Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram ajustadas para 1 x 10^{6} /mL. Um volume de 500 µL de células foi dispensado em cada poço de placas de cultivo de 24 poços. As culturas foram incubadas a 37ºC em estufa contendo 5% CO2-95% de ar por 24 horas. Após este tempo as células foram removidas, centrifugadas. O sobrenadante foi recolhido para ensaios de óxido nítrico (NO), citocinas e quinureninas.

2.10 Determinação de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

As suspensões lisadas de DCs após 24 h de cultivo foram plaqueadas (100 µL/placa) em meio BHI-ágar contendo 5% de "fator de crescimento do fungo" e 4% de soro eqüino, especial para recuperação de *P.brasiliensis* viáveis (SINGER-VERMES et al., 1993). As placas foram incubadas a 35 ºC e as colônias contadas diariamente até que nenhum aumento em UFC fosse observado.

2.11 Dosagem de NO

A concentração de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas foi medida com o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% diidrocloreto de naftiletilenodiamina, 2,5% H_3PO_4), sendo utilizado um volume de 50 μL do sobrenadante da cultura e igual volume do reagente de Griess. Foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e então determinada a absorbância em equipamento Labsystems Multiskan MCC/340 (leitor). A concentração de óxido nítrico foi determinada utilizando-se curva padrão padronizada com diferentes concentrações de nitrito de sódio.

2.12 Dosagem de Quinurenina

Os níveis de quinurenina foram medidos para determinar a atividade da enzima IDO1, como previamente descrito (CURTI et al., 2010). As culturas de DCs purificadas de todos os grupos experimentais foram coletadas, lavadas e ressuspendidas em meio Hank's suplementado com 500 μM de L-triptofano e então incubadas por 4 horas. Sobrenadantes foram coletados e os níveis de quinurenina foram detectados por ensaio espectrofotométrico. Para tanto, uma quantidade de 50 μL de ácido tricloroacético 30% foi adicionado a 100 μL de sobrenadante de cultura, vortexado e centrifugado a 8000 g (10000 rpm) por 5 minutos. O volume de 75 μL deste sobrenadante foi então adicionado a igual volume de reagente de Erhlich (100 mg P-dimetilbenzaldeido, 5 mL de ácido acético glacial) em uma microplaca de 96 poços. Triplicatas das amostras foram colocadas contra uma curva padrão de concentrações de quinurenina (0 - 1000 μg/ml). A densidade óptica foi medida a 492 nm usando equipamento Labsystems Multiskan MCC/340 (leitor).

2.13 Ensaio de RT-PCR

Amostras de células dendríticas purificadas (1 x 10^6 células) de animais B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT, foram centrifugadas e ressuspendidas em 1 mL de reagente de TRIzol. As amostras homogenizadas foram incubadas por 5 minutos a 15 ºC até 30 ºC para permitir uma completa dissociação de complexos protéicos. Foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (Merck) por 1 ml de reagente de TRIzol. Os tubos foram vigorosamente agitados por 15 segundos e incubados por 3 minutos a 15 ºC até 30 ºC. A seguir as amostras foram centrifugadas por 15 minutos (12000 x *g* a 2 – 8 ºC). Observou-se então uma separação do conteúdo dos tubos em três camadas. A fase mais alta continha DNA, a fase intermediária

RNA em fase aquosa e uma terceira fase que continha proteína.A fase intermediária que continha RNA foi cuidadosamente transferida para um novo tubo eppendorf e o RNA foi precipitado adicionando-se 0,5 mL de álcool isopropílico (Merck, USA) por 1mL de TRIzol. Os tubos foram incubados por 10 minutos em banho de gelo e centrifugados a 12000 x *g*, a 4 ^{o}C, por 10 minutos.

Após desprezar cuidadosamente o sobrenadante adicionamos 1 mL de etanol 75% (Merck) aos tubos que foram agitados em Vortex e centrifugados à 7500 x *g*, a 4 ^{o}C, por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento de RNA pôde ser solubilizado com a adição de 50 µl de H_2O livre de RNAse (Life Technologies, USA). Em seguida o RNA total foi quantificado utilizando o aparelho Nanodrop (Thermo Scientific - USA) que mostra a concentração de RNA em ng/µL (DO 260/280). Por fim, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% para verificação da integridade do RNA extraído.

Para a obtenção da fita molde de cDNA a partir do RNA total extraído foi utilizado o Kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, USA). As amostras foram colocadas em tubos no aparelho Mastercycler (Eppendorf, USA) e as fitas de cDNA foram obtidas de acordo com seguinte perfil térmico: 60 minutos à 37 °C e 5 minutos a 95 °C.

Para amplificação da fita molde de DNA foi utilizada a técnica de PCR, em que são usadas elevadas temperaturas para separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de oligonucleótidos iniciadores (primers), também em cadeia simples obtidos por síntese química. Para amplificar uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA, nos seus terminais 3', de modo a permitir a atuação da DNA polimerase durante a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA que foi amplificada. Em um microtubo eppendorf foi colocado um mix contendo dNTPs, enzima DNA polimerase, água, tampão de reação com $MgCl_2$, primers *sense* e *antisense* de β-actina e cDNA Em seguida utilizamos o aparelho Mastercycler que fez a seguinte ciclagem: 5 min à 95 ºC, 1 min à 68 ºC e 2 min à 72 ºC em 30 ciclos. Para validação do PCR todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1%.

2.14 Ensaio de PCR em Tempo Real (qPCR)

A expressão gênica para os genes da indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), IL-6, IFN-γ, SOCS3 (*Suppressor of cytokine signaling* 3), NOS2 *(Nitric oxide sintase*), JAK1, JAK2 (*Janus kinase 1 and 2*), STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription*), TGF-β, SHIP (*Inositol polyphosphate phosphatase*), SHP1, SHP2 (*Tyrosine phosphatases 1 and 2*), SMAD2, SMAD3 (S*mall mothers against decapentaplegic* 2 and 3), PI(3)K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), IFN-α (*Interferon alpha*), IFN-β (*Interferon beta*) e para o gene endógeno GAPDH *(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenas*) foi caracterizada através da técnica de reação de cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) (Applied Biosystems, Foster City, CA). As amostras foram colocadas em microtubos específicos para o ensaio de qPCR e neles colocamos 2 µL de cDNA das amostras + 10 µL de Taqman PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Em seguida, os microtubos foram acondicionados no aparelho Stratagene Mx3500p (Agilent Technologies, USA) que fez a leitura das amostras de acordo com seguinte perfil térmico: desnaturação à 95 °C por 15 segundos, anelamento à 60 °C por 15 segundos, e extensão à 72 °C por 15 segundos. As curvas de fluorescência emitidas a partir do ciclo em que o gene começou a ser expresso foram obtidas tanto dos genes de interesse como do seu controle endógeno. As sequências dos primers para *Indo* (Mm00492506_m1), *il6* (Mm00446190_m1), *ifng* (Mm01168134_m1), *socs3* (Mm00545913_s1), *Nos2* (Mm00440502_m1), *Jak1* (Mm00600614_m1), *Jak2* (Mm01208489_m1), *Stat1* (Mm00439531_m1), *Tgfb1* (Mm01178820_m1), *Inpp5d* (Ship - Mm00494987_m1), *Nr0b2* (Shp1 - Mm00442278_m1), *Ptpn11* (Shp2 - Mm00448434_m1), *Smad2* (Mm00487530_m1), *Smad3* (Mm01170760_m1), *Pik3r1* (PI3K - Mm00803160_m1), Ifna1 (Mm03030145_gH), Ifnb1 (Mm00439552_s1) e o gene endógeno, transcritos em todos os tipos de células, *GaPDH* (Mm99999915_g1), foram obtidos de ensaios prontos da Applied Biosystems. Os resultados foram apresentados como expressão relativa entre o mRNA do gene alvo e mRNA de GaPDH (razão). Os dados normalizados de mRNA foram expressos como o mRNA relativo de camundongos infectados versus camundongos infectados e tratados com 1MT.

2.15 Avaliação Intracelular de Citocinas por Citometria de Fluxo

As DCs obtidas dos pulmões como descrito no item 5 foram ajustadas para um total de 1x106 células e mantidas em meio contendo PMA 100 ng/mL, Ionomicina (500 ng/mL) e tratadas com Monensina ou Brefeldina (1/1000) durante 6 horas. A seguir, as células foram marcadas com anticorpos previamente titulados para CD11c (PercP), IDO (Alexa), IL-10 (Pacific Blue), TNF-α (PE-Cy7), IL-12 (APC) e TGF-β (PE). O número de células e a frequência de cada uma das citocinas foi analisada no FACSCanto (BD Pharmigen) dentro do "gate" da população duplo-positiva. Após a aquisição dos dados, estes foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (Flow Jo Inc, USA).

2.16 Caracterização de Citocinas por ELISA

A dosagem de citocinas de algumas citocinas foi realizada no sobrenadante do cultivo de DCs e do co-cultivo de DCs e linfócitos. A presença e concentração de citocinas foram determinadas por testes de ELISA de captura utilizando-se pares de AcM para cada citocina murina (BD Bioscience ou Ebiosciences). As concentrações previamente determinadas para cada um dos AcM primário e secundário no ELISA, contra cada citocina, foram previamente determinadas em nosso laboratório.

Foi utilizada metodologia preconizada pelo fornecedor (BD Bioscience, USA ou Ebiosciences, USA) e adaptadas para o nosso laboratório como descrito por Cano et al. (1998). As concentrações de cada citocina foram determinadas tendo como base a reta de regressão linear feita para a curva-padrão obtida com o padrão adequado de citocina recombinante.

2.17 Análise Estatística

As comparações entre os diferentes tratamentos foram feitas utilizando teste t de Student e ANOVA one way com pós-teste de Tukey. Foi utilizado o programa Prisma 6.0 (GraphPad Software, USA). Como nível de significância foi considerado $p<0,05$.

3 RESULTADOS

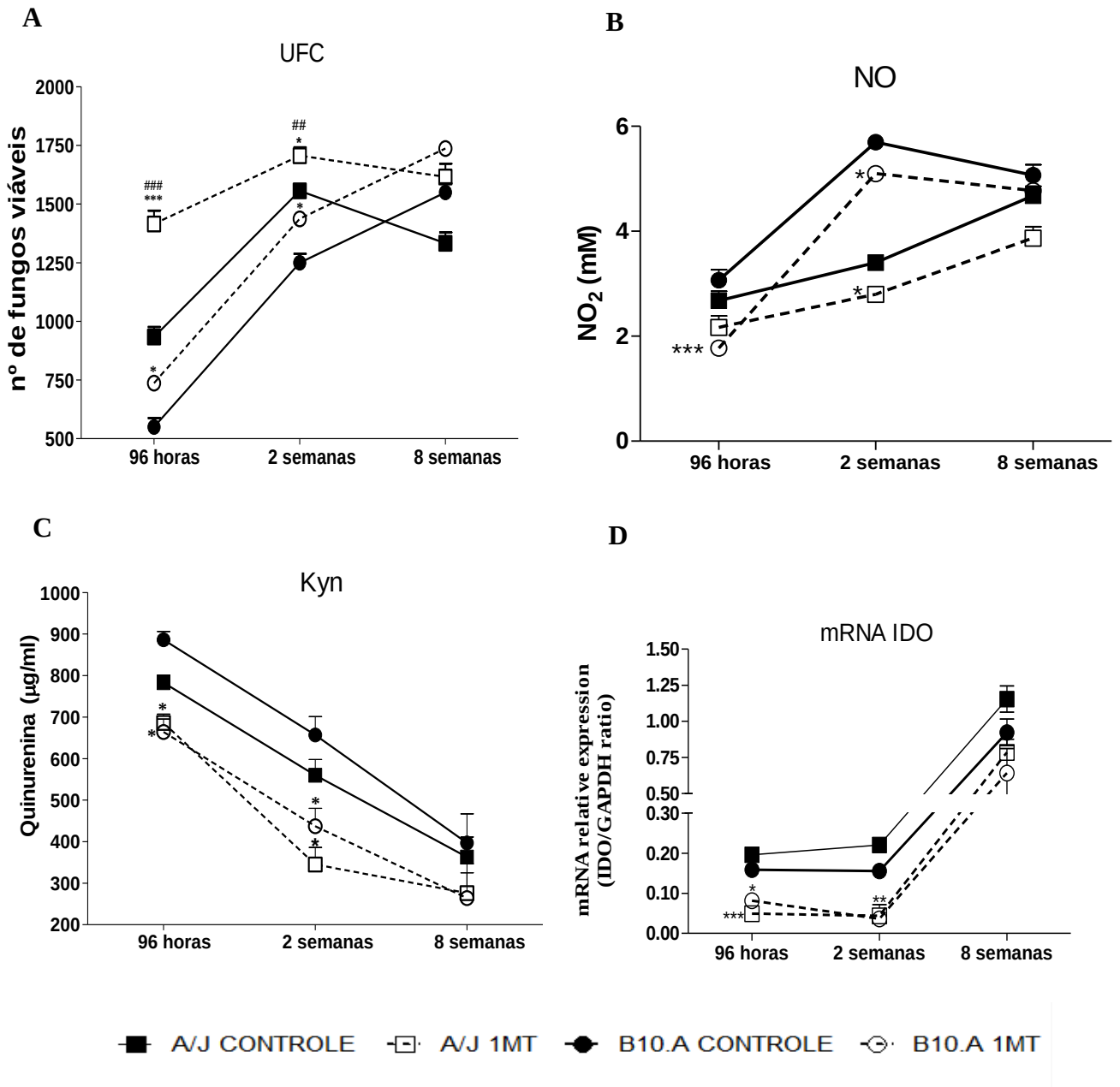
3.1 Estudo do Efeito da Inibição de IDO na Atividade Fungicida de Células Dendríticas (DCs) Obtidas após 96 horas, 2 e 8 Semanas de Infecção por *P.brasiliensis*

Inicialmente estudamos a influência do tratamento de camundongos com 1-metil-triptofano (1MT) no número de fungos recuperados nas culturas de DCs dos camundongos A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com *P.brasiliensis*. As células dendríticas (1 x 10^6 cels) oriundas de camundongos infectados, tratados ou não com 1MT foram cultivadas por 24 horas em placas de 24 poços. Verificamos que após 96 horas de infecção as DCs de camundongos A/J e B10.A apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nas DCs de animais infectados por duas semanas, ou seja, o tratamento com 1MT levou à maior recuperação de fungos das DCs. Estes dados sugerem que as DCs de ambas as linhagens utilizam mecanismo IDO-mediado para conter o crescimento de *P.brasiliensis*. Este efeito é perdido nas infecções de 8 semanas, uma vez que o tratamento com 1MT foi interrompido após duas semanas. Neste caso, mesmo com um número maior de fungos recuperados não encontramos diferenças entre os grupos (Figura 1A). Quanto à produção de óxido nítrico (NO) no tempo de 96 horas pós-infecção (p.i.), foi encontrada uma maior síntese de NO nas DCs de animais suscetíveis do grupo controle comparado com o tratado com 1MT. Já após duas semanas de infecção o tratamento com 1MT levou as DCs de ambas as linhagens estudadas a produzirem níveis mais baixos de NO que os controles. Os dados de produção de NO indicam que nos tempos de 96 h e 2 semanas este mediador poderia contribuir para o controle da carga fúngica mediado por IDO. Quando analisamos o comportamento de DCs da oitava semana não encontramos nenhuma alteração significante nos níveis de NO entre os grupos (Figura 1B).

Estudamos ainda nas culturas de DCs a produção de quinureninas. Este metabólito é originado a partir do catabolismo do triptofano depois da ação da enzima IDO. Os sobrenadantes das culturas de DCs de B10.A e A/J foram avaliados e detectamos que houve menor produção de quinurenina nos grupos de DCs de animais tratados com 1MT quando comparados com o sobrenadante de DCs de animais controle, tanto às 96 horas como em 2 semanas pós-infecção. Já na oitava semana, houve redução na produção de quinurenina, contudo não houve diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 1C).

Realizamos ainda um ensaio para monitorar a expressão de mRNA de IDO usando a técnica de *Real Time* em tempo real (qPCR) como demonstrado na Figura 1D. O RNA total foi extraído das DCs purificadas dos dois grupos experimentais. Logo após, realizamos a síntese de cDNA a partir do RNA extraído. A finalidade da conversão de mRNA para cDNA é sua estabilidade. Este cDNA foi usado para ensaio de PCR utilizando primers *sense* e *antisense* de β-actina. Em seguida, a expressão gênica de IDO (*Indo*) foi quantificada usando como controle endógeno o gene *GapDH* (gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase). Como podemos verificar na figura 1D, 96 horas e também 2 semanas p.i., o tratamento com 1MT levou à diminuição acentuada da expressão relativa de mRNA de IDO em comparação ao seu grupo controle, tanto em camundongos A/J como B10.A. Já na oitava semana, há uma maior expressão dos níveis de IDO em todos os grupos, sem ocorrer contudo, diferença entre eles.

Figura 1 - Efeito da inibição de IDO por 1MT na atividade fungicida, produção de NO e quinureninas e, expressão relativa de mRNA de IDO de DCs obtidas após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Recuperação de fungos viáveis Unidades Formadoras de Colônias – UFC/ml (A), produção de NO (B) e de quinurenina (C). As culturas de DCs de camundongos A/J e B10.A tratados ou não com 1MT *in vivo* foram cultivadas em meio RPMI por 24 horas e o número de fungos viáveis foi caracterizado no sedimento de células lisadas enquanto que os níveis de quinurenina e NO foram determinados nos sobrenadantes de cultivo. Expressão relativa de mRNA de IDO em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT (D). O nível de transcrição do gene *Indo* foi determinado por real-time PCR. O asterisco (*) representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.2 Caracterização Fenotípica de Células Dendríticas (DCs) no Curso da Infecção.

Camundongos A/J e B10.A tratados ou não por 1MT foram infectados i.t. com um milhão de leveduras do *P.brasiliensis*. Após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção as DCs obtidas do pulmão destes animais foram purificadas usando separação magnética por esferas conjugadas com anti-$CD11c^+$. As células foram analisadas quanto à expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo.

A análise do perfil fenotípico das DCs destes experimentos foi feita no aparelho FACS Canto II (BD Biosciences) a partir das DCs pulmonares marcadas com anticorpos conjugados a isotiocinado de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), pacific blue (PB), aloficocianina (APC), ficoeritrinaCy7 (PE-Cy7), aloficocianinaCy7 (APC-Cy7) e ficoeritrinaCy5 (PerCP-Cy5) na combinação adequada. Considerando o "gate" de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), identificamos no quadrante de células duplo positivas $CD11c^+CD11b^+$ as DCs do tipo mielóide, no $CD11c^+B220^+$ as DCs chamadas de plasmocitóides e ainda as células duplo positivas $CD11c^+CD8^+$, as DCs linfóides (O'GARRA; TRINCHIERI, 2004; WU; LIU, 2007) (Figura 2). Recentemente, as análises das subpopulações de células dendríticas receberam uma caracterização mais específica no quadrante de células duplo positivas (high e low), permitindo uma caracterização de acordo com a quantidade de fluorocromo emitida pela população alocada em cada setor deste quadrante. Dessa forma, as células dendríticas convencionais ou mielóides são identificadas como $CD11c^{high}CD11b^+$, as plasmacitóides são $CD11c^{low}B220^+$ e as linfóides são as que apresentam $CD11c^{high}CD8^+$ (DARO et al., 2000; GAUTIER et al., 2009; JOHANNS et al., 2010; SUZUKI et al., 2004). Por sua vez, os marcadores de ativação e moléculas co-estimulatórias (Ia^k, CD86, CD40) foram caracterizados pela mediana da intensidade de fluorescência (MFI) utilizando o quadrante de células duplo positivas para o marcador $CD11c^+$ e o marcador em questão.

Nossos resultados mostraram que a infecção com o fungo *P.brasiliensis* por 96 horas, 2 e 8 semanas induz a maturação das DCs com aumentos da expressão das moléculas co-estimulatórias. Na figura 2 pode-se observar que em ambas as linhagens de camundongos há um predomínio de expansão de DCs mielóides, seguido das DCs plasmacitóides, enquanto as DCs linfóides aparecem em pequena quantidade. Esse fato e é evidenciado quando analisamos o número total de DCs de cada subpopulação nos três tempos de infecção observado nas 96 h e 2 semanas de infecção. Este aumento no número absoluto de DCs após o tratamento com 1MT deve-se, provavelmente, ao aumento do afluxo celular para os pulmões, uma vez

diminuída a atividade supressora de IDO.

Verificamos também que, em 96 horas e 2 semanas de infecção, houve uma diminuição significativa da frequência de DCs mielóides $CD11c^{high}CD11b^{+}$, em camundongos A/J e B10.A tratados com 1MT quando comparados aos camundongos controle. Este fato se repete também quando analisamos os outros perfis de células dendríticas. Assim, pudemos verificar que o tratamento com 1MT favoreceu o aumento no número absoluto de DCs nas duas linhagens, devido ao aumento do número de células que afluiu aos pulmões em decorrência da maior resposta imune que se estabelece nos animais tratados. Já no tempo de 8 semanas após a infecção com *P.brasiliensis* verificamos que não houve diferença estatística significante entre os grupos (Figuras 2B, 2D e 2F).

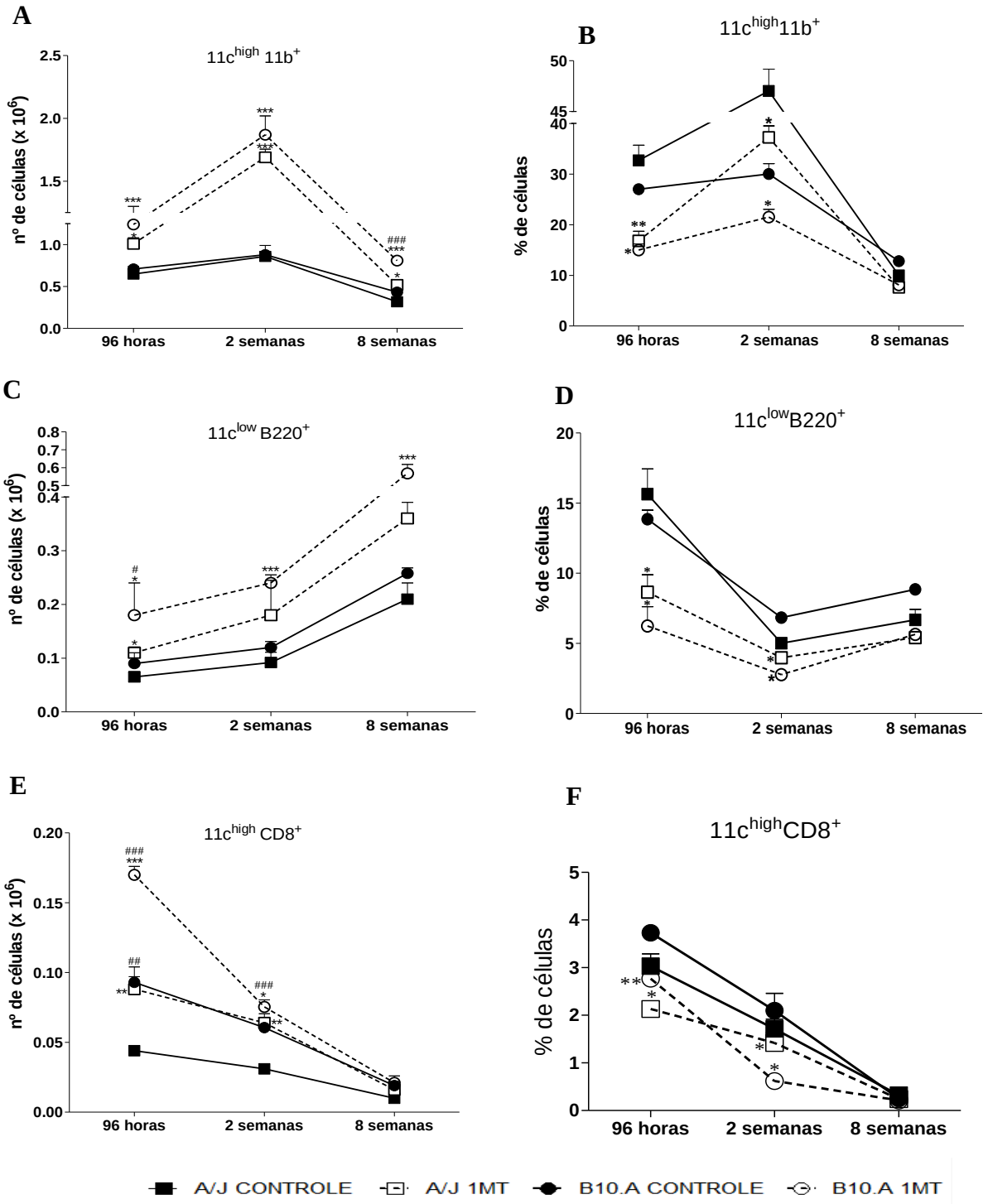
Analisamos então a ativação destas células através da mediana de intensidade de fluorescência (MIF) num "gate" de DCs totais ($CD11c^{+}$) através da expressão dos marcadores IA^{K}, CD86, CD11b e CD40. Verificamos que em DCs de camundongos A/J e B10.A houve menor expressão de IA^{K} (96 h e 2 semanas), CD86 (96 h), CD11b (96 h, 2 emana) e CD40 (96 h, 2 e 8 semanas) nos grupos tratados com 1MT. Na oitava semana p.i. (pós-infecção), camundongos B10.A tratados expressaram também menores níveis de IA^{K}, CD11b e CD40. Quando comparamos os grupos controles das duas linhagens estudadas, observamos que às 96 h p.i. nos camundongos resistentes houve maior expressão dos marcadores IA^{K}, CD86 e CD40 do que nos camundongos suscetíveis. Já em relação ao CD11b as DCs oriundas de animais B10.A mostraram maior valor de MIF quando comparadas às DCs de A/J. De forma diferente, observamos que no tempo de 2 semanas pós-infecção os animais resistentes, tratados ou não com 1MT, expressaram maior intensidade dos marcadores IA^{K}, CD11b e CD40 quando comparados com os animais suscetíveis (Figura 3). Na oitava semana p.i., verificamos uma redução muito acentuada da mediana de intensidade de fluorescência dos marcadores de ativação IA^{K} e CD11b em relação às 96 h p.i. e aumento de CD40. Na comparação entre as linhagens no tempo de 8 semanas, as DCs de camundongos A/J apresentaram MFI de IA^{K} e CD86 maiores que as de camundongos suscetíveis. De forma equivalente ao observado aos tempos agudos, os camundongos B10.A expressaram maiores valores de CD11b do que os camundongos A/J. Outro dado que nos chamou a atenção foi o aumento de praticamente 6 vezes na expressão do marcador CD40 nas duas linhagens após 2 semanas de infecção e de 9 vezes na oitava semana, tanto para animais tratados como para animais controle.

Para aprofundar nosso estudo fizemos uma análise dos marcadores de ativação em DCs levando em consideração os fenótipos mielóide (mDC), plasmacitóide (pDCs) e linfóide; usamos os "gates" das sub-populações $CD11c^{+}CD11b^{+}$, $CD11c^{+}CD8^{+}$ e $CD11c^{+}B220^{+}$, e analisamos a expressão dos marcadores IA^{K}, CD86 e CD40. Pudemos comprovar que o tratamento com 1MT interfere de forma marcante na diminuição da expressão destes marcadores nos três perfis fenotípicos, em todos os tempos de infecção estudados (Figuras 4, 5 e 6). Vimos que a expressão dos marcadores IA^{K}, CD86 e CD40 nas DCs mielóides ($CD11c^{+}CD11b^{+}$) em 96 horas e 2 semanas, medidos por MFI, são estatisticamente menores nas DCs oriundas de grupos tratados com 1MT. Em contrapartida, em 8 semanas de infecção as diferenças foram mantidas apenas nas DCs de camundongos suscetíveis após tratamento com 1MT, excetuando-se o marcador CD86 em A/J, que também diminuiu neste tempo de infecção. Novamente o marcador CD40 após a oitava semana apresentou valores de MIF maiores que os de tempo curto.

Analisamos também as DCs linfóides ($CD11c^{+}CD8^{+}$) e verificamos que 96 horas após a infecção de camundongos B10.A e A/J o tratamento com 1MT levou à diminuição de IA^{K}, CD86 e CD40. De forma semelhante, as diminuições ocorreram nos animais submetidos a tratamento com 1MT após 2 semanas de infecção, chamando a atenção a queda acentuada da mediana de intensidade de fluorescência nos marcadores dos animais resistentes. Na oitava semana, foram verificados baixos níveis de IA^{K}, CD86 e CD40 nas DCs de ambas as linhagens de camundongos e não houve diferença entre os grupos.

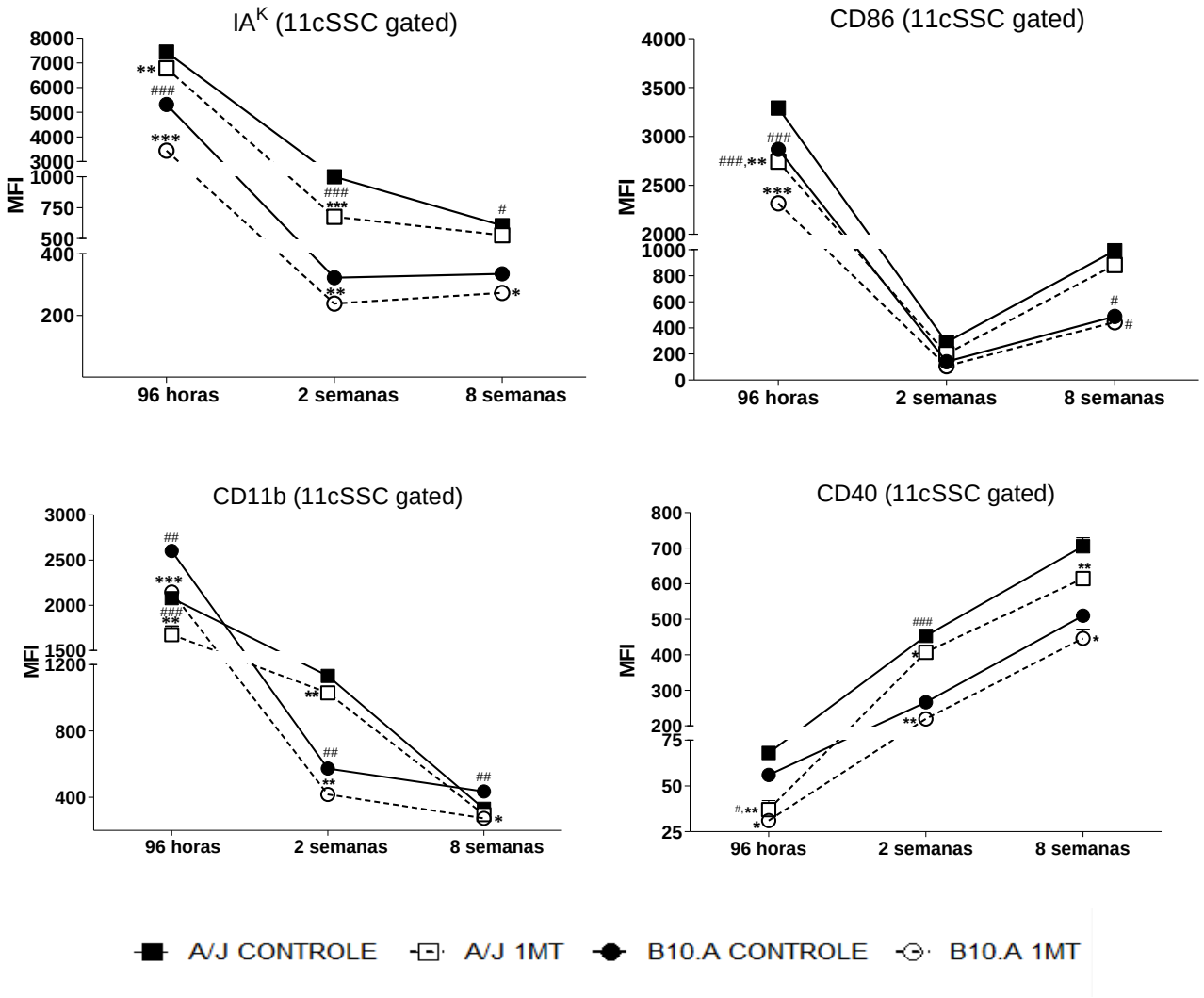
Por fim, fizemos a análise de DCs plasmacitóides. Nos tempos de 96 horas e 2 semanas, o tratamento com 1MT nos camundongos A/J e B10.A levou à diminuição da intensidade de fluorescência dos marcadores de ativação estudados. Na oitava semana, vimos aumento de CD86 em camundongos B10.A e A/J e diminuição significativa de CD40 em A/J.

Figura 2 - Efeito do tratamento com 1MT no número e frequência de células das sub-populações de DCs obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção



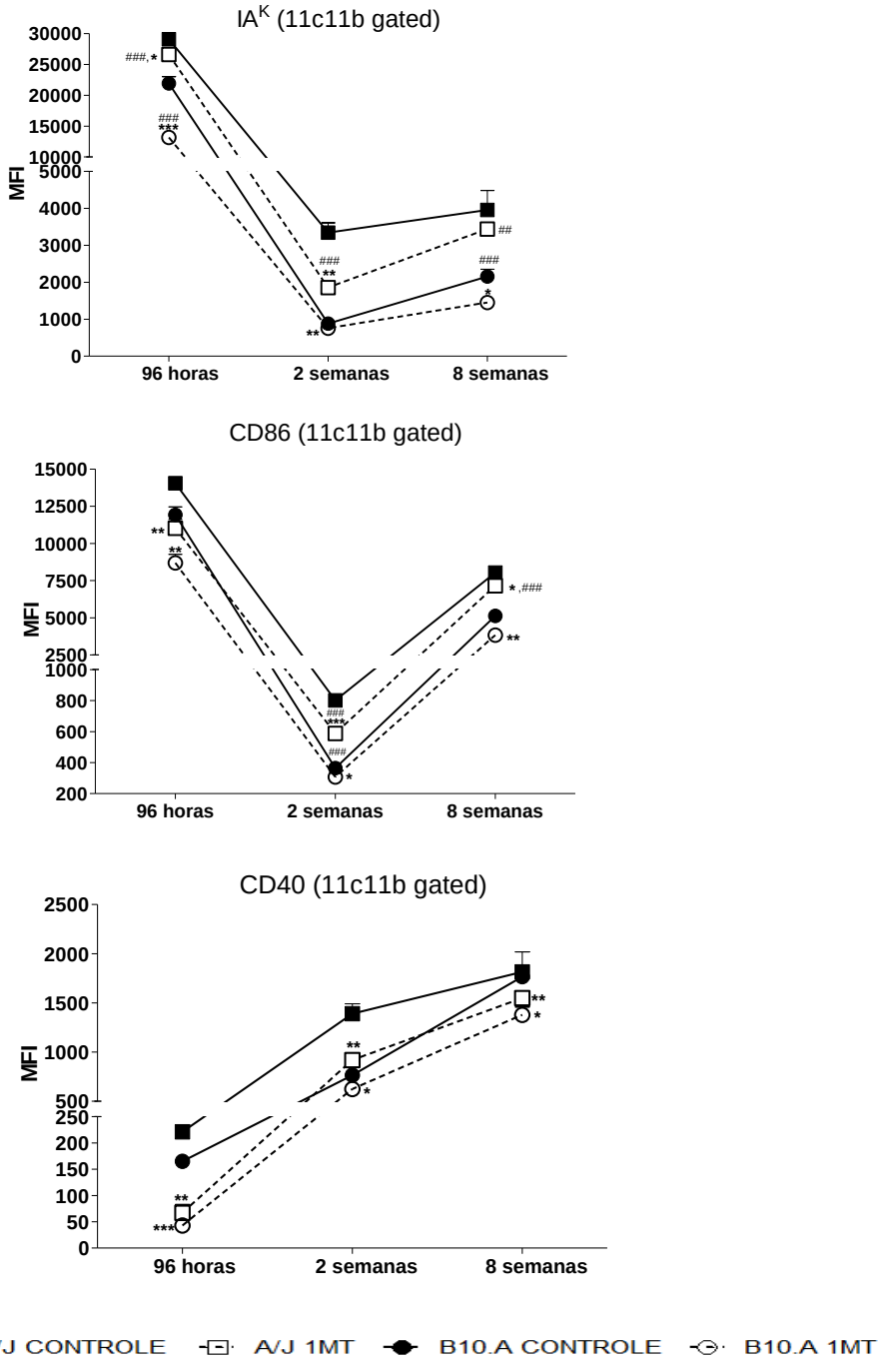
Número de células (A, C, E) e frequência de células (B, D, F) das diferentes sub-populações de DCs obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t. As DCs foram obtidas por fracionamento com esferas magnéticas contendo anti-CD11c e a frequência foi determinada por citometria de fluxo. As DCs mielóides foram caracterizadas como $CD11c^{high}$ $CD11b^{+}$, as plasmacitóides como $CD11c^{low}$ $B220^{+}$ e as linfóides $CD11c^{high}$ $CD8^{+}$. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco (*) representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 3 - Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de diferentes marcadores de ativação (IAK, CD86, CD11b, CD40) em DCs obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção



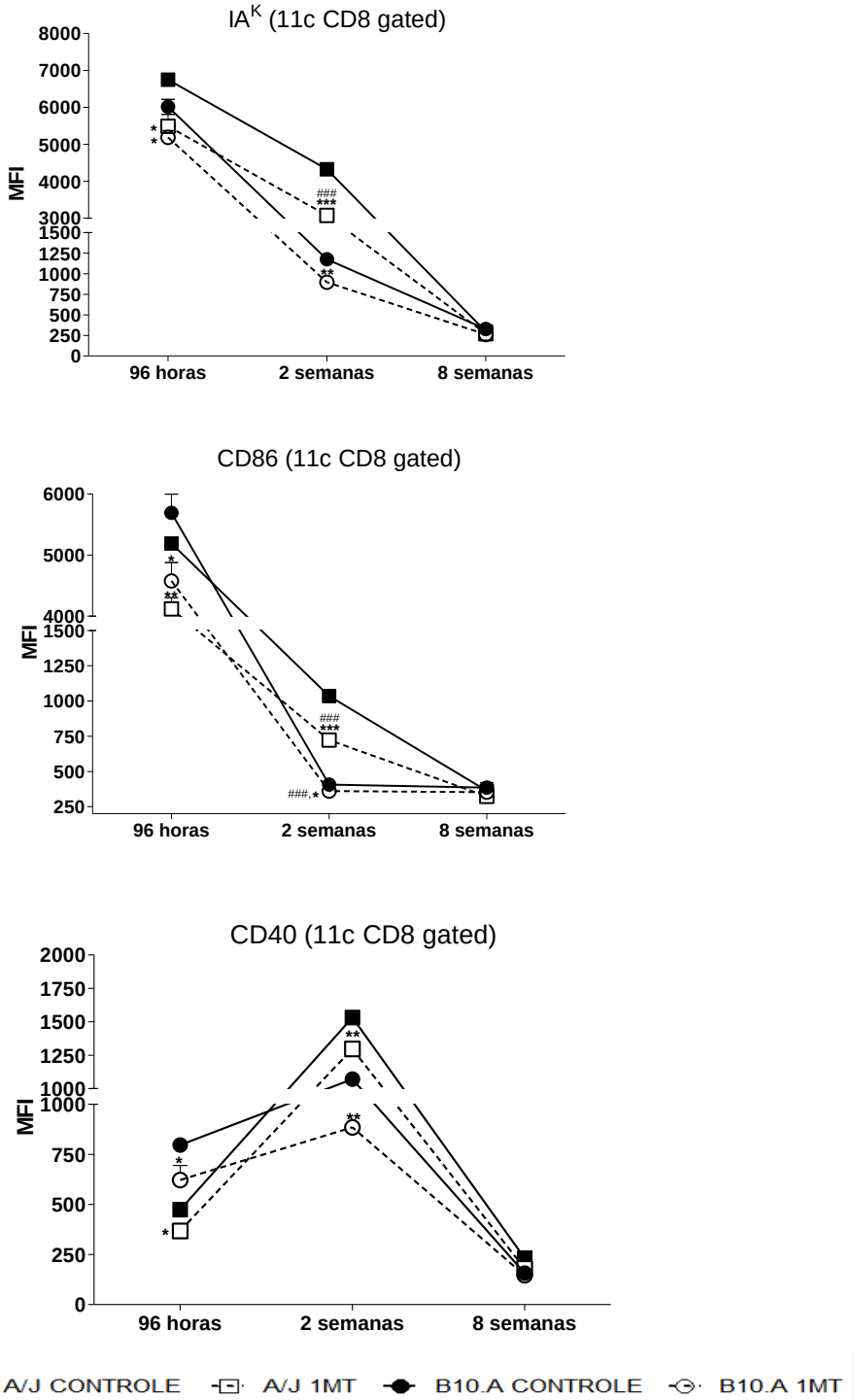
A mediana da intensidade de fluorescência foi determinada por citometria de fluxo e as DCs isoladas por "magnetic beads". Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco (*) representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 4 - Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de DCs mielóides ($CD11c^{+}CD11b^{+}$) apresentando diferentes marcadores de ativação em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas e 8 semanas de infecção



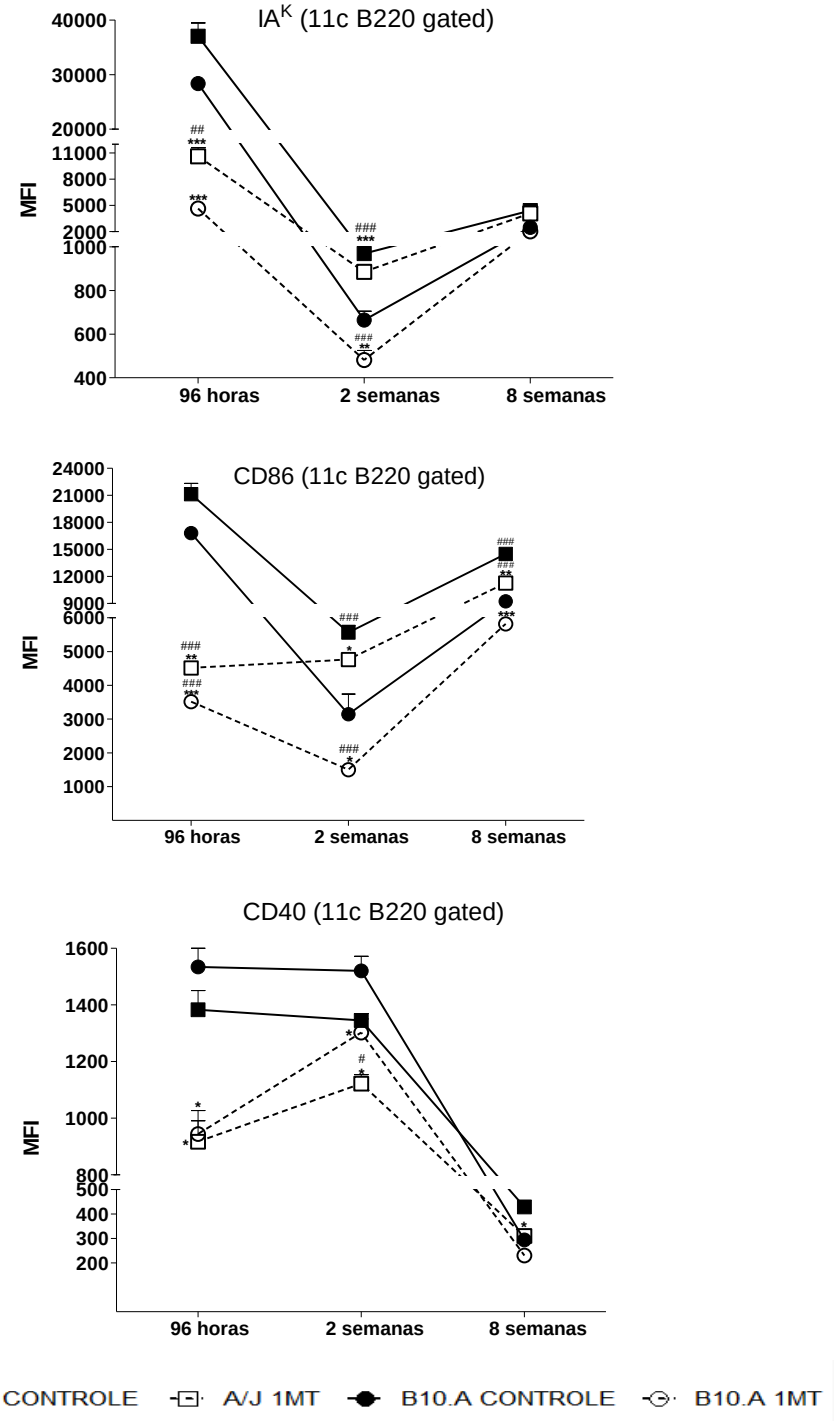
A mediana da intensidade de fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 5 - Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de DCs linfóides (CD11c+CD8+) apresentando diferentes marcadores de ativação em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção



A mediana da intensidade de fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 6 - Mediana da Intensidade de Fluorescência (MFI) de DCs plasmacitóides (CD11c+B220low) apresentando diferentes marcadores de ativação (IAK, CD86 e CD40) em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 semanas e 8 semanas de infecção



A mediana da intensidade de fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

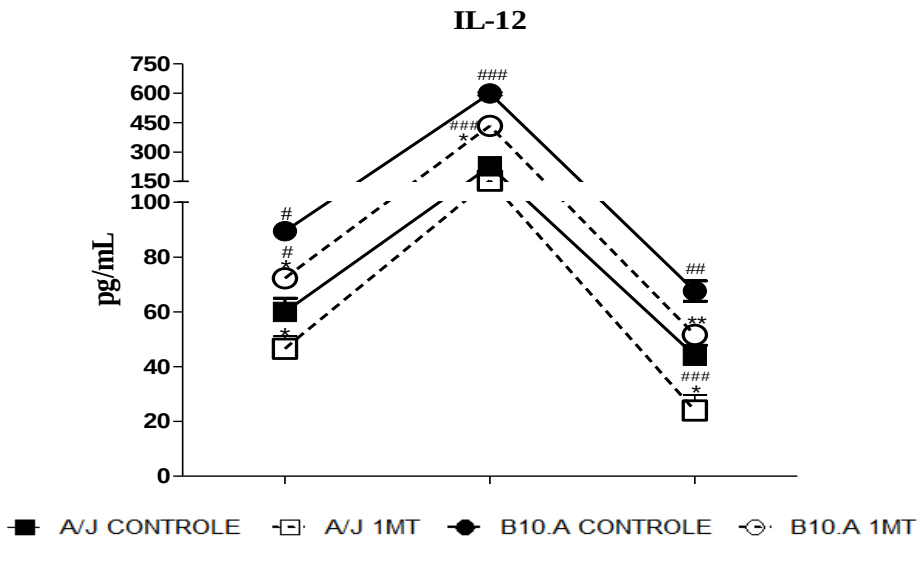
3.3 Efeito do 1MT na Produção de Citocinas por DCs de Camundongos B10.A e A/J

3.3.1 Efeito na Produção de IL-12

A análise dos níveis da citocina IL-12 medidos dos sobrenadantes após 24 horas de cultivo de DCs de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A, oriundos de infecção por *P.brasiliensis*, tratados ou não com 1MT nos tempos de 96 horas, 2 e 8 semanas, estão demonstrados na figura 7.

Em nossos resultados, como observado em trabalhos anteriores (PINA et al., 2013), foi verificada uma maior produção de IL-12 pelas DCs provenientes de animais suscetíveis comparadas às dos animais resistentes. Mais ainda, o tratamento com 1MT levou à um decréscimo na produção de IL-12 em ambas as linhagens nos três tempos de infecção por *P.brasiliensis*. Em resumo, o maior efeito do tratamento com 1MT foi a indução de menores níveis de IL-12 por DCs de camundongos B10.A e A/J infectados com o *P.brasiliensis.*

Figura 7 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-12 nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção

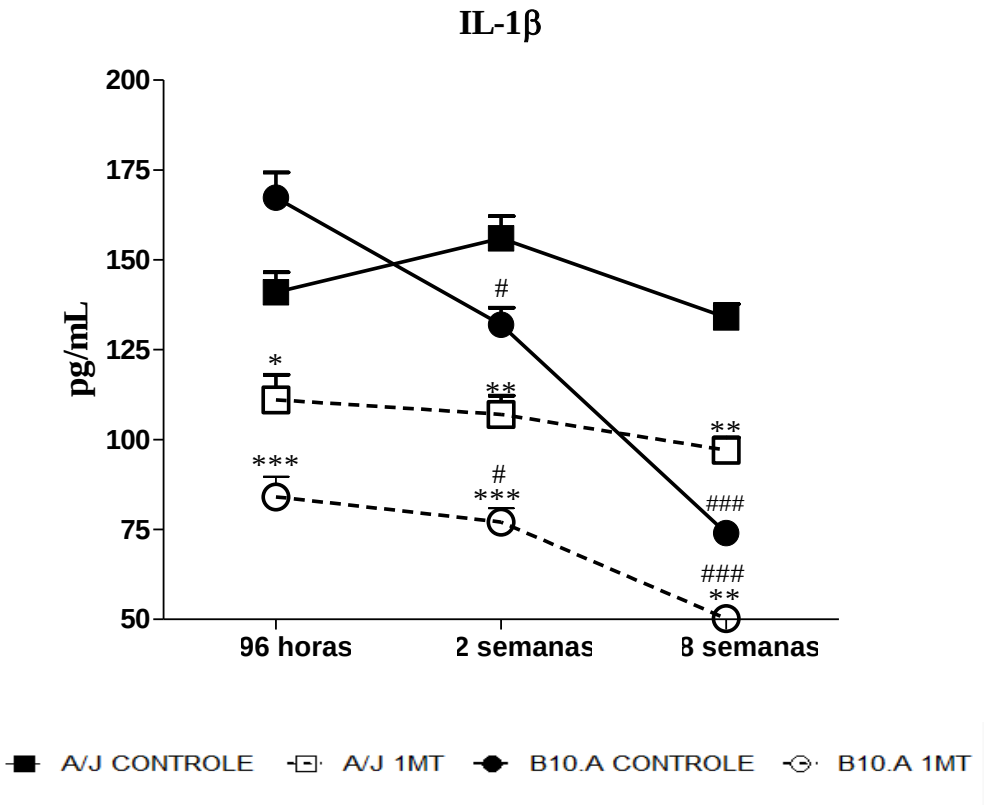


Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-12 nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t., tratados ou não com 1MT. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01 e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.3.2 Efeito na Produção de IL-1β

Os resultados da análise dos níveis da citocina IL-1β medidos dos sobrenadantes após 24 horas de cultivo de DCs estão mostrados na figura 8. Comparado a seus grupos controle, houve menor expressão da citocina IL-1β nas culturas de ambas as linhagens infectadas com fungo e tratadas com 1MT, nos três tempos de infecção. Já quando observamos os resultados entre as linhagens vimos que nas 2 e 8 semanas p.i. os camundongos B10.A apresentaram níveis significantemente menores de IL-1β que os camundongos A/J.

Figura 8 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-1β nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



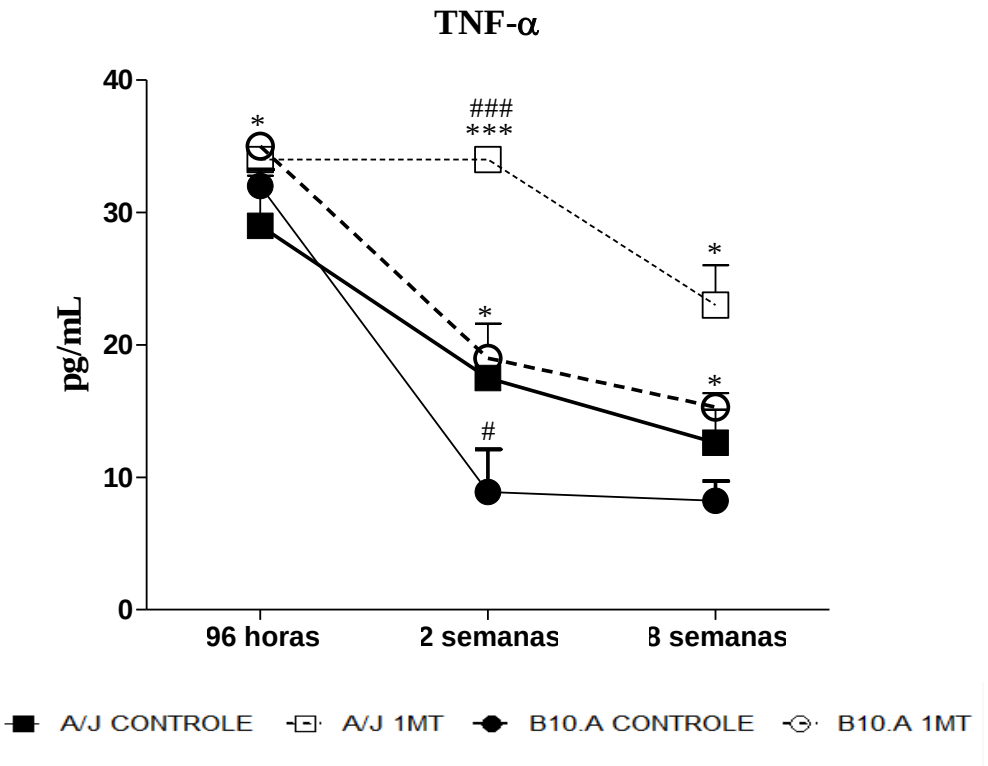
Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-1β nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t., tratados ou não com 1MT. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco (*) representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.3.3 Efeito na Produção de TNF-α

Os resultados dos níveis da citocina TNF-α estão mostrados na figura 9.

O tratamento com 1MT levou a um aumento da concentração de TNF-α nas linhagens resistente e suscetível, nos tempos de infecção estudados, sendo que a maior produção dessa citocina ocorreu nos camundongos A/J nos tempos de 2 e 8 semanas p.i.. Quando comparamos as linhagens estudadas vimos que apenas 2 semanas pós-infecção houve diferença, sendo a maior produção realizada pelos camundongos A/J.

Figura 9 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de TNF-α nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção

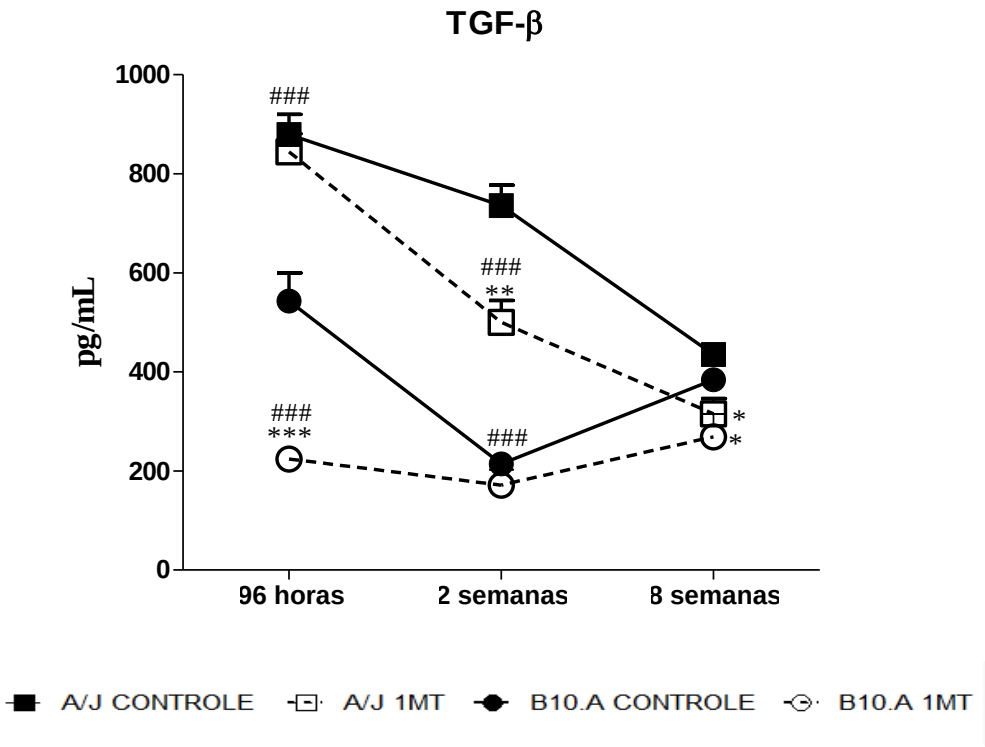


Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de TNF-α nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t., tratados ou não com 1MT. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.3.4 Efeito na Produção de TGF-β

Comparadas a seus grupos controle, houve menor produção da citocina TGF-β nas culturas de DCs da linhagem suscetível, previamente tratadas *in vivo* com 1MT. Já nas culturas de camundongos A/J obtidas de animais tratados com 1MT foi observada uma diminuição na síntese de TGF-β apenas no tempo de oito semanas pós-infecção (Figura 10). Pudemos também verificar maior produção de TGF-β por camundongos A/J controle em todos os tempos de infecção estudados. Pudemos anda comprovar que entre as linhagens as diferenças se concentraram nos tempos de 96 horas e 2 semanas. Na oitava semana não houve diferença entre as linhagens.

Figura 10 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de TGF-β nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



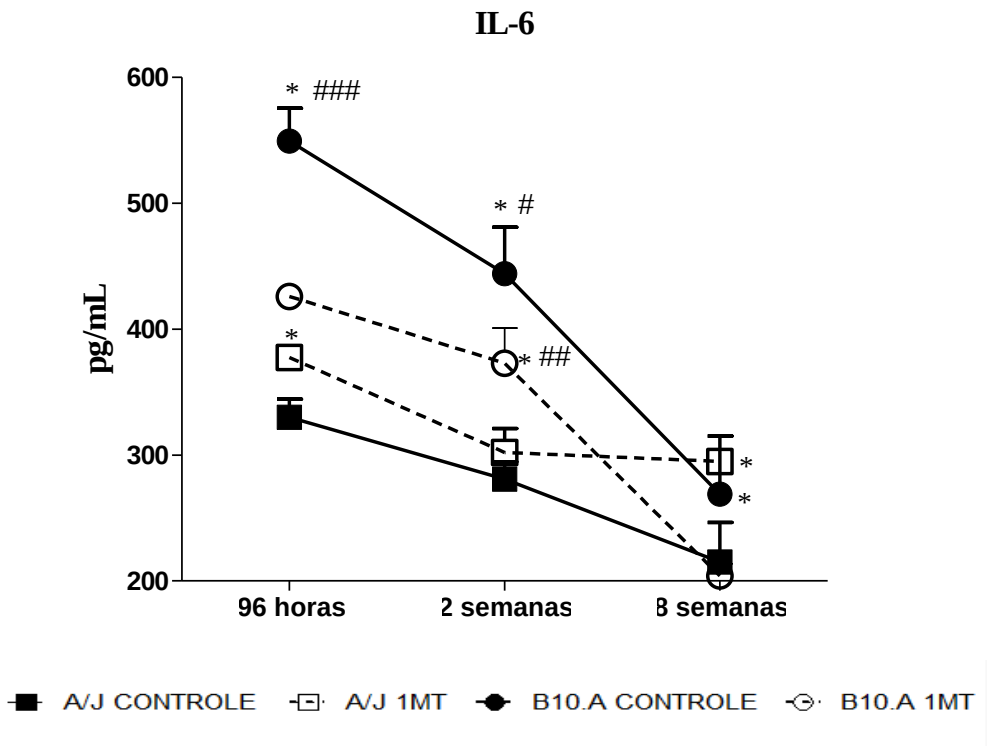
Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de TGF-β nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t., tratados ou não com 1MT. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.3.5 Efeito na Produção de IL-6

Os níveis da citocina IL-6 medidos nos sobrenadantes de cultivo de 24 h de DCs estão apresentados na figura 11.

Os resultados mostraram que as DCS de camundongos B10.A controle, nos tempo de 96 horas e 2 semanas, apresentaram níveis de IL-6 muito mais significativos que seu grupo tratados com 1MT. Nos resultados entre as linhagens, quando comparados com os animais A/J os valores foram ainda mais expressivos. Na oitava semana observamos diminuição de e A/J e B10.A, controle e tratado, com diferença estatística.

Figura 11 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-6 nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-6 nas culturas de DCs de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t., tratados ou não com 1MT. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.4 Caracterização de IDO e das Citocinas Intracelulares de DCs Purificadas de Camundongos Suscetíveis e Resistentes após 96 Horas, 2 Semanas e 8 Semanas de Infecção por *P.brasiliensis*

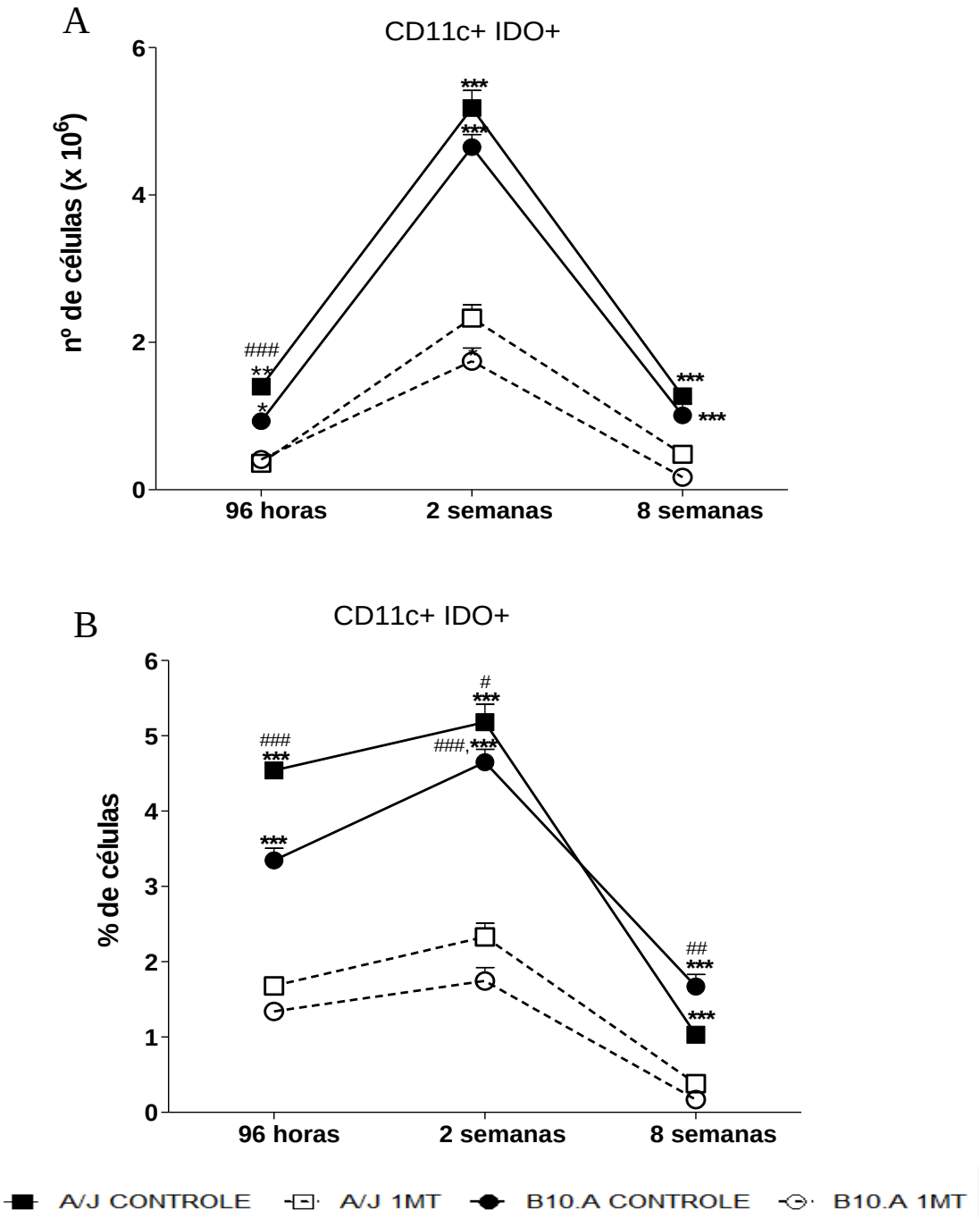
Camundongos A/J e B10.A foram infectados i.t. com um milhão de leveduras do *P.brasiliensis*. Após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção as DCs obtidas do pulmão destes animais foram purificadas usando separação magnética por esferas conjugadas com anti-CD11c$^+$. As células foram analisadas quanto à presença intracelular de citocinas (TNF-α, IL-12, TGF-β e IL-10) e da enzima IDO por citometria de fluxo após serem marcadas com anticorpos conjugados a fluorocromos.

3.4.1 Detecção de IDO$^+$

Analisando a presença intracelular de IDO nas DCs de animais tratados ou não com 1MT nos tempos de infecção acima descritos, observamos que, 96 horas pós-infecção o número e a frequência de células DCs IDO$^+$ nos animais controle de ambas as linhagens foram significantemente maiores do que nos animais submetidos ao tratamento com o inibidor da enzima, o 1MT. Na segunda semana de infecção, observamos o mesmo padrão de número e a frequência de células DCs IDO$^+$ nos camundongos controle A/J e B10.A que sempre foram maiores do que aqueles tratados com 1MT. Da mesma forma, como nos resultados de expressão de mRNA de IDO, o número e a frequência das células IDO$^+$ foram maiores nos animais resistentes comparados aos grupos de animais suscetíveis (Figuras 12A, B).

Já na oitava semana verificamos uma diminuição no número e frequência de DCs IDO$^+$ nas duas linhagens estudadas, destacando que neste tempo de infecção a frequência de células IDO$^+$ em animais B10.A controle foi maior que em animais A/J controle (Figura 12B)

Figura 12 - Número e frequência de DCs IDO+ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção

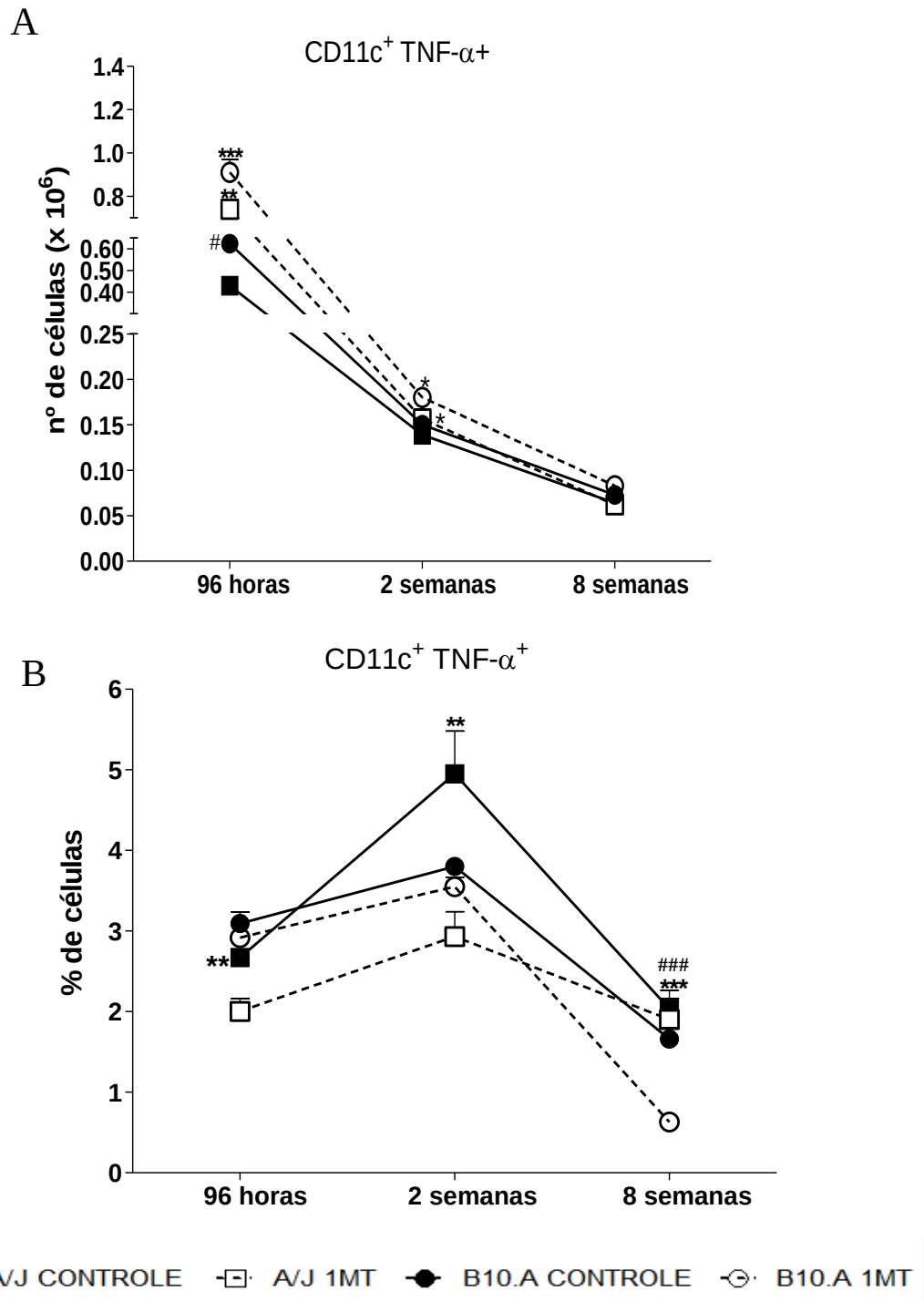


Número (A) e frequência (B) de DCs IDO^{+} obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^{6} leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t.., tratados ou não com 1MT. O número e a frequência de células foram determinados por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.4.2 Detecção de TNF-α$^+$

Quando analisamos a produção intracelular de TNF-α pelas DCs purificadas de leucócitos do pulmão verificamos que o número de células contendo TNF-α foi significativamente maior nas DCs de animais suscetíveis e resistentes tratados com 1MT, após 96 horas e também na segunda semana p.i., mas não vimos essa diferença na oitava semana (Figura 13A). Contudo, aos resultados mais expressivos foram encontrados na frequência de células CD11c$^+$TNF-α$^+$. Nas primeiras 96 horas de infecção os grupos controle tiveram uma maior frequência deste tipo celular comparado aos seus grupos tratados em ambas as linhagens estudadas. Já a segunda semana p.i. mostrou que nas DCs de camundongos controle de ambas as linhagens foi maior quando comparada aos animais tratados com 1MT. Contudo na oitava semana, foi obtido maior frequência de DCs expressando TNF-α intracelular nas DCs dos grupos controles de camundongos B10.A (Figura13B). Já na comparação dos resultados de produção de TNF-α entre as linhagens observamos que houve diferença na frequência de células CD11c$^+$TNF-α$^+$entre os camundongos A/J e B10.A tratados com 1MT neste tempo mais longo de infecção.

Figura 13 - Número e frequência de DCs TNF-α$^+$ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Análise da produção de citocina intracelular TNF-α de DCs em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t.., tratados ou não com 1MT. O número (A) e a frequência (B) de células foram determinados por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#\#\#}$P< 0,001).

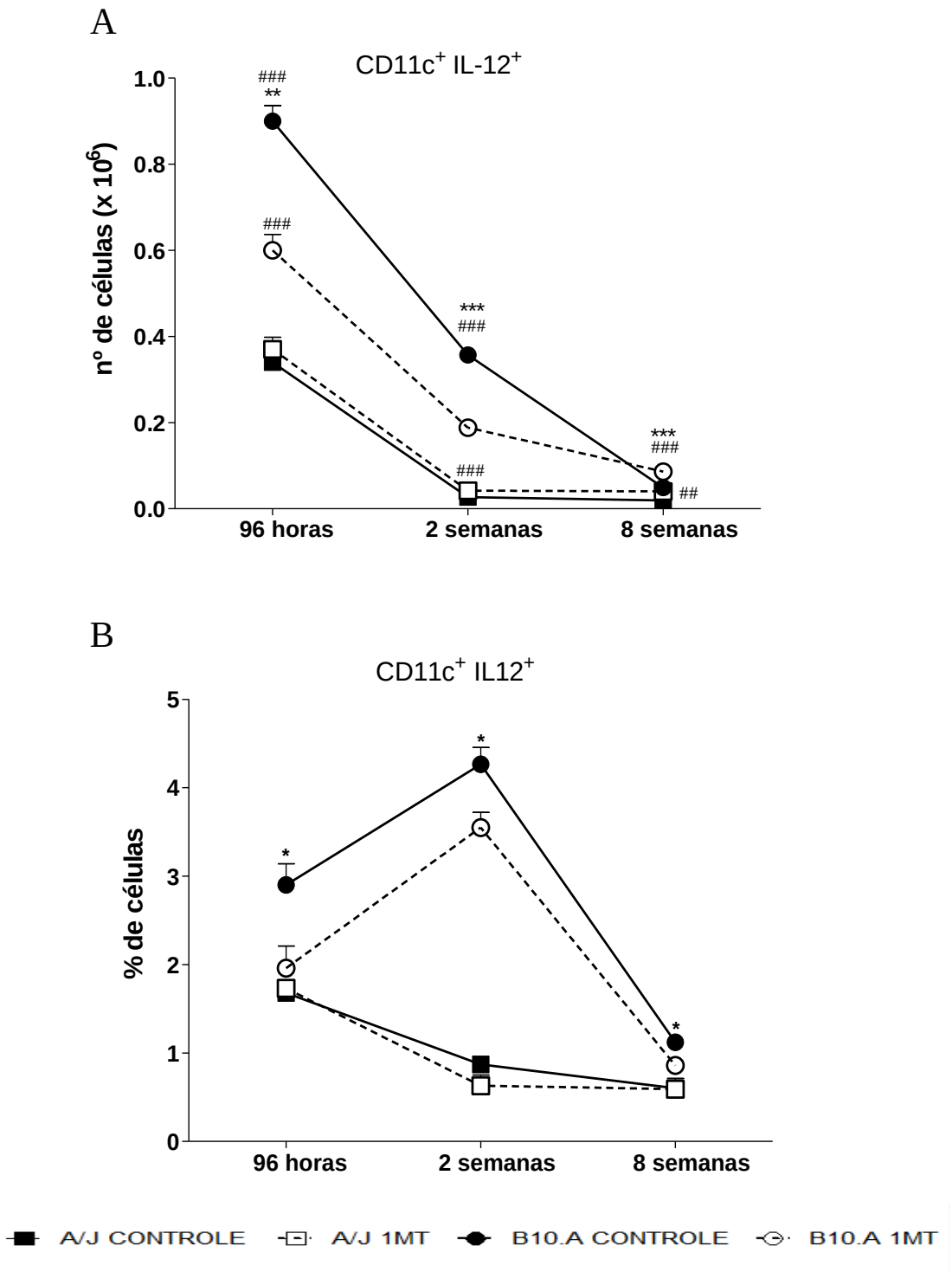
3.4.3 Detecção de IL-12$^+$

Os resultados da presença de células de IL-12$^+$ mostraram que nas DCs de animais B10.A, tratadas ou não com 1MT a frequência de células foi sempre maior quando foram comparadas às de animais A/J, nos três tempos de infecção estudados. Contudo, quando analisamos o número de células, observamos que somente nos animais B10.A controle observou-se um maior número de células produzindo IL-12$^+$ em relação aos animais tratado nos tempos de 96 horas e 2 semanas de infecção (Figura 14A). Já nos animais resistentes, tanto o número de células como a frequência de DCs IL-12$^+$ não mostraram alterações estatisticamente significativas induzidas pelo tratamento com 1MT (Figura 14B). Os resultados na oitava semana p.i. mostraram que neste tempo de infecção, há uma redução expressiva no número de DCs IL-12$^+$ nos animais suscetíveis controle que se mostra menor que no grupo tratado (Figuras 14A, B).

Quando observamos os resultados entre as linhagens verificamos em 96 horas e na segunda semana que o número e a frequência de DCs IL2$^+$ de camundongos B10.A, tratados e controle, são significantemente maiores que as de camundongos A/J.

Na oitava semana p.i., observamos maior número de DCs IL-12$^+$ no grupo de camundongos B10.A tratados em comparação com A/J tratados. Quanto à frequência, camundongos B10.A controle apresentaram valores significantemente maiores que os controles A/J (Figuras 14A, B).

Figura 14 - Número e frequência de DCs IL-12^{+} obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



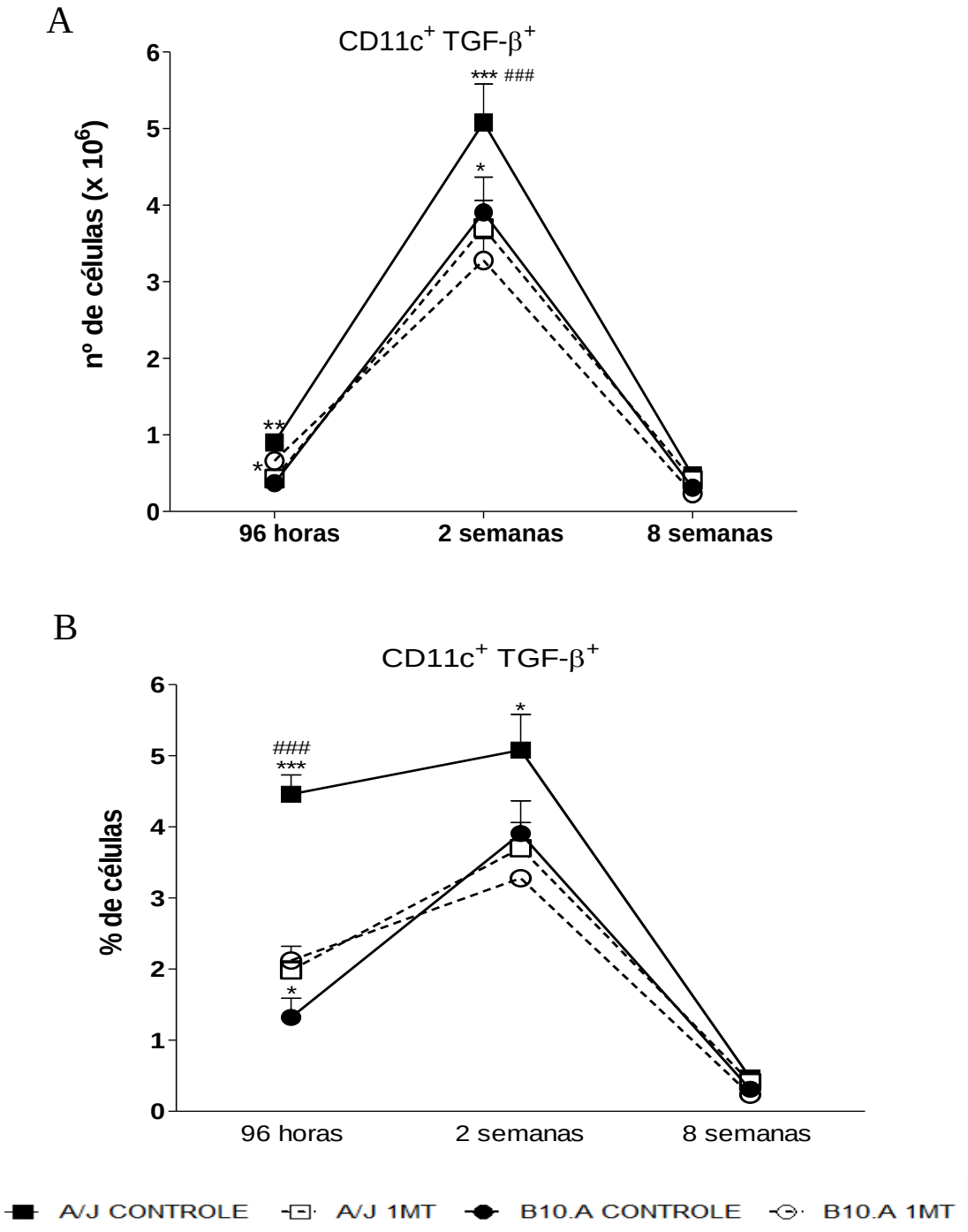
Análise da presença intracelular IL-12 em DCs em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^{6} leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t.., tratados ou não com 1MT. O número (A) e a frequência (B) de células foram determinados por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens (($^{\#\#}$P< 0,01$^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.4.4 Detecção de TGF-β$^+$

Nossos resultados mostraram que o número de DCs produzindo TGF-β$^+$, após 96 horas de infecção foram mais significativos em A/J controle do que em B10.A controle. Ainda, nos animais B10.A tratados com 1MT encontramos a presença maior desse tipo celular comparado com os animais B10.A tratados. Já na segunda semana de infecção, o numero de células encontradas com o fenótipo DCs TGF-β$^+$ foi menor nos camundongos suscetíveis e resistentes tratados com 1MT quando comparados aos grupos controle. Contudo, houve um maior número de DCs TGF-β$^+$ em animais A/J em relação aos B10.A. Já na oitava semana de infecção a presença de DCs TGF-β$^+$ foi reduzida, não havendo diferença entre tratamento e linhagens (Figura 15A).

Com relação à frequência de DCs TGF-β$^+$ nossos resultados de 96 horas e 2 semanas de infecção também mostraram que o tratamento com 1MT diminuiu a presença destas células em ambas as linhagens. Na oitava semana, observamos uma redução da frequência de células TGF-β$^+$ nas DCs de animais resistentes e suscetíveis sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 15B).

Figura 15 - Número e frequência de DCs TGF-β$^+$ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Análise da produção de citocina intracelular TGF-β de DCs em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t., tratados ou não com 1MT. O número (A) e a frequência (B) de células foi determinado por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#\#\#}$P< 0,001).

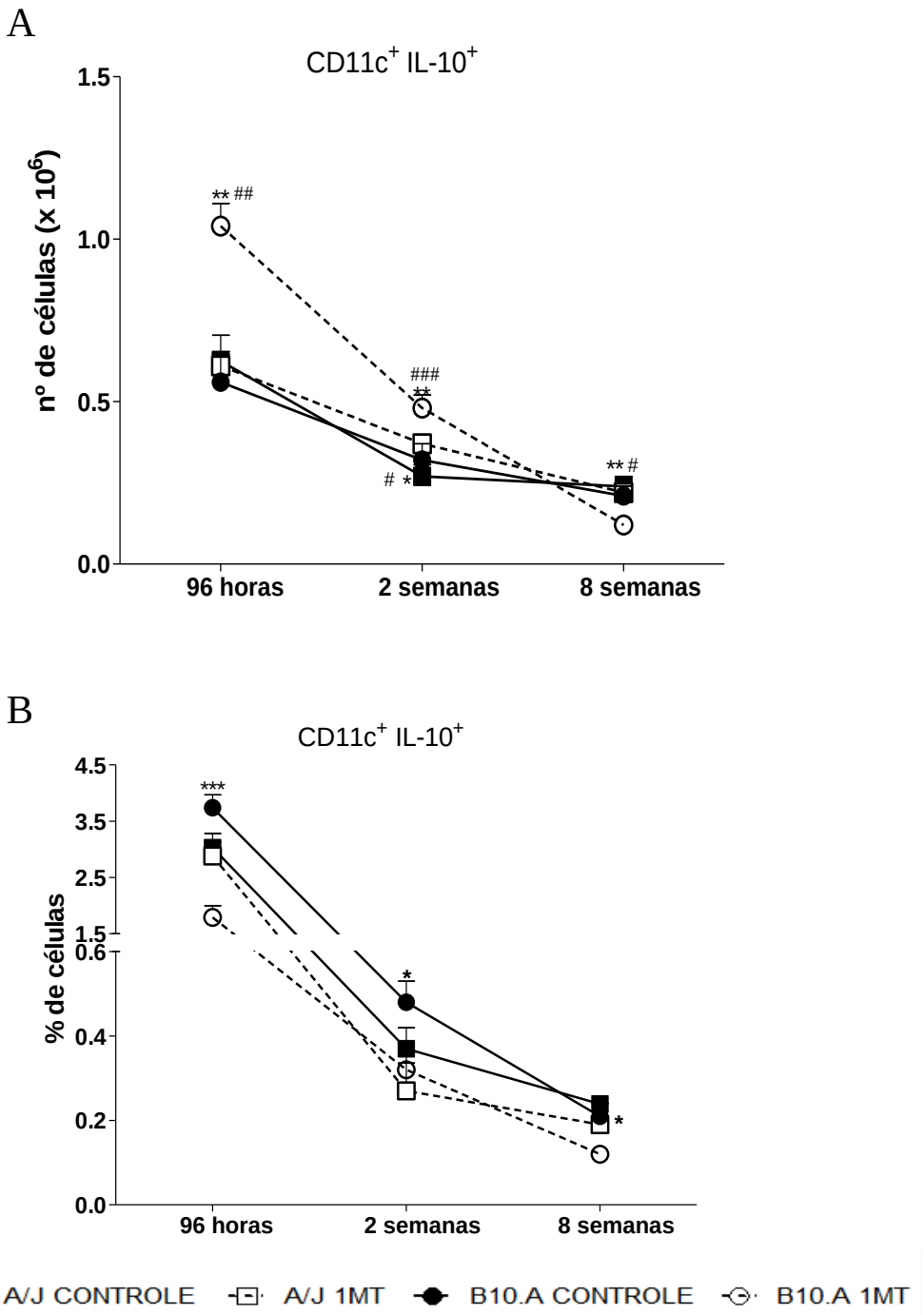
3.4.5 Detecção de IL-10$^+$

Os resultados da presença de células DCs IL-10$^+$ mostraram que no tempo de 96 horas e na segunda semana p.i, o numero em DCs de camundongos B10.A tratados com 1MT foi estatisticamente maior quando comparado às DCs de animais B10.A controle. Já para a linhagem A/J verificamos resultado semelhante na segunda semana, contudo o número de DCs foi menor que nos camundongos suscetíveis (Figura16A). Quanto à frequência de DCs, encontramos nos animais controle de ambas as linhagens maior frequência de células produtoras de IL-10$^+$ (Figura 16B). Na oitava semana há uma redução no número de DCs IL-10$^+$ em animais suscetíveis. Na linhagem resistente, o número de DCs não se alterou significantemente nem no tempo nem no tratamento (Figura 16A).

Após 96 horas e também na oitava semana p.i. os camundongos resistentes tratados com 1MT tem maior frequência de DCs IL-10$^+$ que camundongos resistentes, fato que não foi observado na segunda semana pós-infecção. Não observamos diferenças entre as DC de camundongos A/J (Figura 16A, B).

.

Figura 16 - Número e frequência de DCs IL-10$^+$ obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Análise da presença de citocina intracelular IL-10 em DCs em células obtidas dos pulmões de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t., tratados ou não com 1MT. O número (A) e a frequência (B) de células foram determinados por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P< 0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.5 Apresentação de Antígenos por DCs de Camundongos B10.A e A/J Tratados ou não com 1MT

3.5.1 Ensaios de Proliferação e Caracterização de Linfócitos

Neste trabalho pudemos ainda verificar a capacidade das DCs purificadas dos animais A/J e B10.A, tratados ou não com 1MT, de estimular linfócitos naïve das mesmas linhagens em ensaios de proliferação. Medimos ainda a frequência de células T naïve, T ativadas e T reguladoras nos ensaios com DCs obtidas após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção. Para tanto, as DCs purificadas de animais B10.A e A/J foram incubadas com linfócitos do baço marcados com CFSE (5mM) em uma placa de 96 poços por um período de 3 dias a 37ºC em 5% de CO_2. Após o co-cultivo (linfócitos-DCs), as células foram removidas da placa e analisadas por citometria de fluxo quanto à fluorescência. A perda de marcação corresponde à atividade proliferativa dos linfócitos. Assim, as células linfóides foram inicialmente definidas através de um "gate" levando em consideração o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC). Foram então analisados os índices de proliferação (IP) dos linfócitos das duas linhagens de camundongos quando ativados pelas DCs purificadas de animais que receberam tratamento com 1MT ou não, nos tempos de infecção estudados.

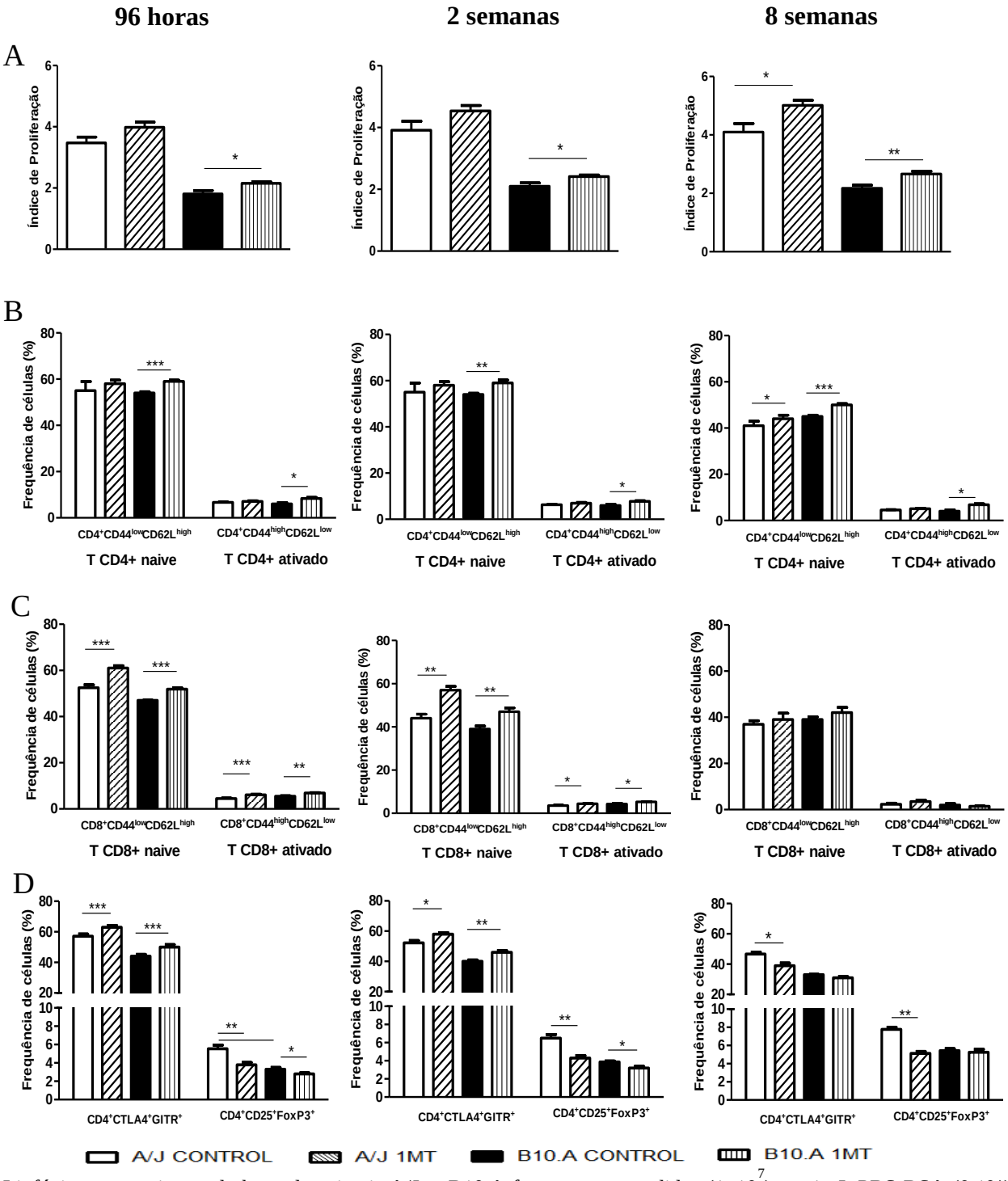
Verificou-se que as DCs de camundongos A/J, nos tempos de 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção, induziram uma maior proliferação de linfócitos normais quando comparados com camundongos B10.A (Figura 17A). Este dado já era esperado, visto que este perfil de ativação celular é característico da linhagem resistente (PINA et al., 2013). O tratamento com 1MT aumentou a proliferação de linfócitos de camundongos B10.A estimulados com DCs obtidas após 96 horas e 2 semanas de infecção. Não houve diferença estatística, nestes tempos, com células provenientes de camundongos A/J. Entretanto, na oitava semana pós-infecção, as DCs de camundongos A/J e B10.A tratados com 1MT induziram a maior proliferação de linfócitos A/J. Este fato sugere que a IDO foi inibidora da proliferação de linfócitos B10.A desde o início da infecção e para camundongos A/J a inibição ocorreu apenas na 8ª semana pós-infecção.

As células que foram co-cultivadas no ensaio de proliferação também foram tratadas com anticorpos marcados com fluorocromos que permitiram a análise da frequência de células $TCD4^+$ naïve ($CD4^+CD44^{low}CD62L^{high}$), $TCD4^+$ ativada ($CD4^+CD44^{high}CD62L^{low}$), $TCD8^+$ naïve ($CD8^+CD44^{low}CD62L^{high}$) e $TCD8^+$ ativada ($CD8^+CD44^{high}CD62L^{low}$). Observamos após 96 horas e 2 semanas pós-infecção a influência do tratamento com 1MT

somente nos animais suscetíveis, com significativo aumento na frequência de células TCD4 naïve e ativadas (Figura 17B). Em oito semanas, além da redução da frequência celular em todos os grupos experimentais, nos animais resistentes o tratamento com 1MT aumentou a frequência de células $TCD4^+$ naive, enquanto que nos camundongos B10.A houve aumento na frequência de linfócitos $TCD4^+$ naïve e ativados. Já para células $TCD8^+$, observamos as DCs obtidas de camundongos tratados com 1MT (96 h e 2 semanas p.i.) induziram um aumento na frequência de células naïve e ativadas de ambas as linhagens. Na oitava semana este efeito foi perdido em ambas as linhagens (Figura 17C).

Em outro ensaio de linfoproliferação pudemos caracterizar a presença de células T reguladoras nas co-culturas de DCs purificadas-linfócitos. A figura 17D mostra que após 96 horas e 2 semanas de infecção, a frequência de células T reguladoras ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) em animais A/J e B10.A tratados com 1MT foi menor que seus grupos controles. Entretanto, nestes tempos de infecção a capacidade de restaurar a proliferação de linfócitos $TCD4^+$ em camundongos tratados com 1MT levou a um aumento dos marcadores de ativação $CTLA4^+$ e $GITR^+$, típicos de linfócitos T ativados e T reguladores. Na oitava semana, o tratamento com 1MT diminuiu a frequência de células Treg em camundongos A/J (Figura 17D). As DCs da oitava semana de camundongos A/J tratados induziram menor proliferação de células $TCD4^+$ expressando CTLA-4 e GITR. Em camundongos B10.A não foram observadas diferenças nesta subpopulação celular (Figura 17D).

Figura 17 - Frequências da proliferação de linfócitos e análise fenotípica de co-cultura de DC + Linfócitos de animais A/J e B10.A tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Linfócitos provenientes do baço de animais A/J e B10.A foram ressuspendidos ($1x10^7$) em 1mL PBS-BSA (0,1%) estéril e tratados com 1 µL de CFSE na concentração de 5 mM. Em paralelo, as DCs purificadas de ambas as linhagens de camundongos, tratados ou não com 1MT, após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com *P.brasiliensis* foram centrifugadas e ressuspendidas em RPMI e colocadas na presença dos linfócitos corados com CFSE em uma relação 1:10. Após 3 dias de co-cultura as células foram removidas, marcadas com anticorpos específicos e analisadas quanto à proliferação dos linfócitos (A) e frequência celular dos subtipos $CD4^+CD44^+CD62L^+$ (B), $CD8^+CD44^+CD62L^+$ (C), CD4+$CTLA4^+GITR^+$ e $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (D). A análise do fenótipo e da proliferação dos linfócitos foi medida por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± EP de 3 experimentos independentes. (*P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001).

3.6 Caracterização das Citocinas Produzidas durante o Ensaio de Linfoproliferação Utilizando DCs de Camundongos Tratados ou não com 1MT

Os sobrenadantes dos ensaios de linfoproliferação foram recolhidos e usados para medir a produção de IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10, citocinas representantes das subpopulações tipo 1 e tipo 2 de linfócitos tanto T $CD4^+$ como T $CD8^+$. O pequeno volume de sobrenadante obtido não permitiu a dosagem de outras citocinas.

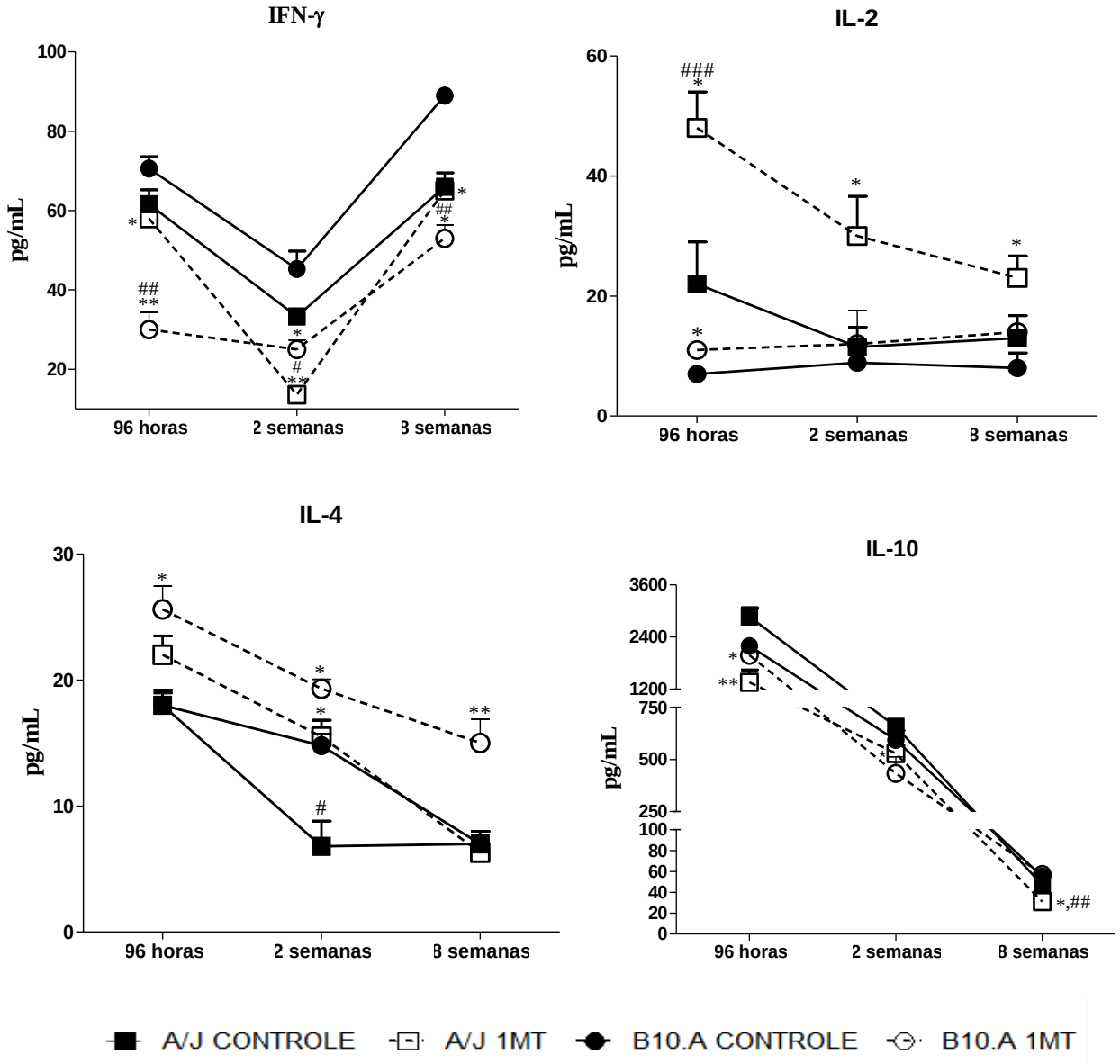
De acordo com a figura 18, verifica-se que, nos três tempos de infecção, os linfócitos de ambas as linhagens quando estimulados por DCs oriundas de camundongos A/J e B10.A tratados com 1MT produzem níveis mais reduzidos de IFN-γ quando comparados aos grupos de linfócitos ativados por DCs provenientes de animais controle.

Por outro lado, os linfócitos estimulados por DCs de camundongos A/J tratados com 1MT por 96 horas, 2 e 8 semanas apresentaram um aumento significativo na produção de IL-2 em relação aos grupos não tratados. Os linfócitos de camundongos B10.A estimulados por DCs de 96 horas de infecção por *P.brasiliensis* e tratados com 1MT mostraram um aumento estatisticamente significante de IL-2.

Da mesma forma, o tratamento prévio com 1MT dos camundongos nos tempos de infecção estudados, fizeram com que as DCs de camundongos A/J estimulassem os linfócitos A/J a produzir mais IL-4 somente no tempo de 2 semanas de infecção, ao passo que DCs de camundongos B10.A estimularam linfócitos B10.A a produzir níveis maiores de IL-4 em todos os tempos de infecção. Além disso, somente na segunda semana as DCs de camundongos A/J controle induzem menor produção de IL-4 que as de camundongos B10.A controle.

Já a dosagem de IL-10 demonstrou que houve redução da produção por linfócitos de camundongos A/J quando estimulados por DCs de animais tratados com 1MT. Este fato, em camundongos B10.A só ocorreu no tempo de 96 horas pós-infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*.

Figura 18 - Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IFN-ɣ, IL-2, IL-4 e IL-10 nas co-culturas de DCs + Linfócitos de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IFN-ɣ, IL-2, IL-4 e IL-10 nas co-culturas de DCs + Linfócitos de animais A/J e B10.A após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção com 1 x 10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t., tratados ou não com 1MT. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.7 Caracterização de Expressão Gênica de Células Totais e DCs do Pulmão de Camundongos A/J e B10.A, Tratados ou não com 1MT, nos Tempos de 96 horas, 2 Semanas e 8 Semanas Pós-Infecção por *P.brasiliensis*

Buscamos entender melhor os fenômenos imunológicos no nosso modelo de infecção tal como a intensa expressão de IDO em camundongos A/J infectados por *P.brasiliensis*, visto que nosso conhecimento prévio apontava uma dependência de IFN-γ como propulsor da via catalítica IDO-triptofano-quinureninas em camundongos susceptíveis, e uma via não catalítica mediada por TGF-β em camundongos resistentes. Para tal, realizamos ensaios para monitorar a cascata de fatores de transcrição, enzimas e citocinas induzidos por TGF-β, sinalizando uma expressão sustentada de IDO. Caracterizamos também a cascata de genes induzidos pela ativação celular mediada de IFN-γ que estimula a síntese de IDO, sua função catalítica e supressora observada em animais B10.A. Assim, verificamos a expressão de mRNA utilizando "primers" adequados e a técnica de *Real Time* em tempo real (qPCR) em três tempos de infecção em animais previamente tratados ou não com 1MT. Primeiramente estudamos e expressão gênica em células totais do pulmão, e em seguida em DCs obtidas por processo de separação por *beads* magnéticos. O RNA total foi extraído das células totais do pulmão e das DCs purificadas dos vários grupos experimentais. Logo após, realizamos a síntese de cDNA a partir do RNA extraído. A finalidade da conversão de mRNA para cDNA é sua estabilidade. Este cDNA foi usado para ensaio de PCR utilizando como marcador *house-keeping* primers *sense* e *antisense* de β-actina. Em seguida, a expressão gênica dos genes de interesse foi quantificada usando como controle endógeno o gene *GapDH* (gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase).

Para melhor entendimento dos resultados mostramos a expressão gênica do eixo IFN-γ-IDO e em seguida do eixo TGF-β-IDO.

3.7.1 Estudo de Expressão Gênica de Células Totais do Pulmão de Camundongos A/J e B10.A, Tratados ou não com 1MT, nos Tempos de 96 horas, 2 Semanas e 8 Semanas Pós-Infecção por *P.brasiliensis*

Como podemos verificar na figura 19, 96 horas, 2 e 8 semanas p.i., o tratamento com 1MT levou à diminuição acentuada da expressão relativa de mRNA de IFN-γ, Jak1, Jak2 e Stat1 de camundongos B10.A em comparação ao seu grupo controle. Este fato indica que a função catalítica da IDO regula a função pro-inflamatória mediada por IFN-γ em camundongos suscetíveis. Nos camundongos A/J não foram observadas diferenças após

tratamento com o inibidor de IDO, indicando que a função catalítica de IDO mediada por IFN-γ não é tão importante em camundongos resistentes. Outro importante aspecto observado foi a maior expressão dos genes da via IFN-γ-IDO nos camundongos suscetíveis somente infectados (controle) em relação aos camundongos A/J somente infectados.

Na figura 20 os resultados mostram a expressão de mRNA de genes envolvidos com a degradação proteossomal da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (SOCS3 e IL-6) e a expressão do gene NOS2 que é induzida por ativação de IFN-γ. Como podemos observar, os níveis de expressão de IL-6 nos animais suscetíveis do grupo controle são estatisticamente maiores que dos animais A/J do mesmo grupo, nos tempos de infecção estudados. Este resultado também é observado quanto à expressão de SOCS3. Já o tratamento com 1MT levou ao aumento de IL-6 nas duas linhagens e tempos de infecção demonstrando o provável envolvimento desta citocina na indução da resposta Th17 observado em camundongos tratados com 1MT. A expressão de SOCS3 mostrou-se aumentada em camundongos A/J e B10.A tratados com 1MT apenas no tempo de duas semanas após infecção com *Paracoccidioides brasiliensis*. A expressão de NOS2, que é sintetizado pela mesma via que induz IDO após estímulo de IFN-γ, mostrou-se aumentada nos animais suscetíveis em comparação com os animais resistentes (nos grupos controle). Após tratamento com 1MT, os níveis de NOS2 se apresentaram mais expressivos e estatisticamente significantes em camundongos B10.A.

Os resultados de expressão gênica da via TGF-β-IDO mostraram que nos animais resistentes, conforme esperado, os níveis de TGF-β foram sempre maiores do que nos animais suscetíveis do grupo controle. O tratamento com 1MT aumentou a expressão gênica de TGF-β nos animais B10.A levando a níveis comparáveis de expressão dos animais A/J, que parecem utilizar TGF-β como fonte de estímulo para a cascata de sinalização (Figura 21).

Os mediadores citoplasmáticos dependentes de TGF-β, as chamadas proteínas SMADS fazem parte da via de sinalização canônica desta citocina. Na figura 21, pode-se verificar que os níveis de expressão gênica de SMAD2 e SMAD3 que estimulam fosfatases, estão aumentados em camundongos A/J controle em comparação com B10.A, nos três tempos de infecção. Nos animais tratados com 1MT houve diminuição significativa nos tempos de 2 e 8 semanas nos animais resistentes e em 96 horas nos animais suscetíveis.

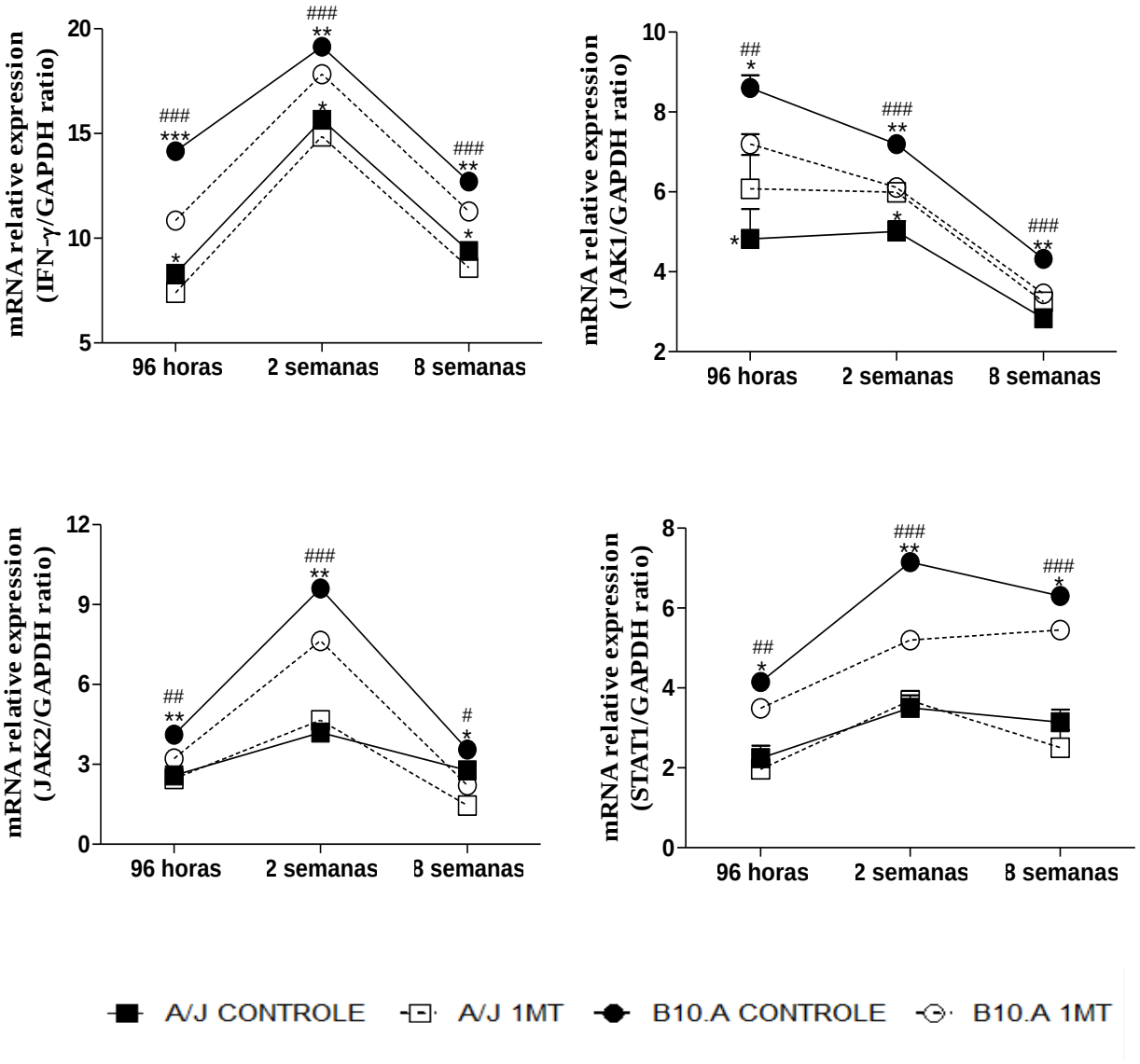
A fosfoinositol 3 quinase (PI3K) responde à ativação de TGF-β e tem a função de estimular fosfatases que atuam na via sinalizadora da IDO fosforilada. Como observado para as proteínas SMADS, encontramos nos camundongos A/J controle, nos três tempos de

infecção estudados, níveis de expressão gênica de PI(3)K mais elevados do que em animais B10.A controle. O tratamento com 1MT levou à diminuição significativa da expressão desta quinase, enquanto que em camundongos B10.A tratados não houve alteração entre o grupo controle e o tratado com 1MT (Figura 21).

Quando fomos verificar a expressão gênica das fosfatases envolvidas na sinalização de IDO – SHIP, SHP1 e SHP2 – observamos nos três tempos da infecção que estas enzimas estimuladas por TGF-β tinham níveis mais elevados em camundongos A/J do que os observados em camundongos suscetíveis. Após o tratamento com 1MT, há uma diminuição significativa dos níveis de expressão destas enzimas nos animais A/J, porém em B10.A apenas nos tempos de 96 horas para SHP1 e 2 semanas para SHP2 (Figura 22).

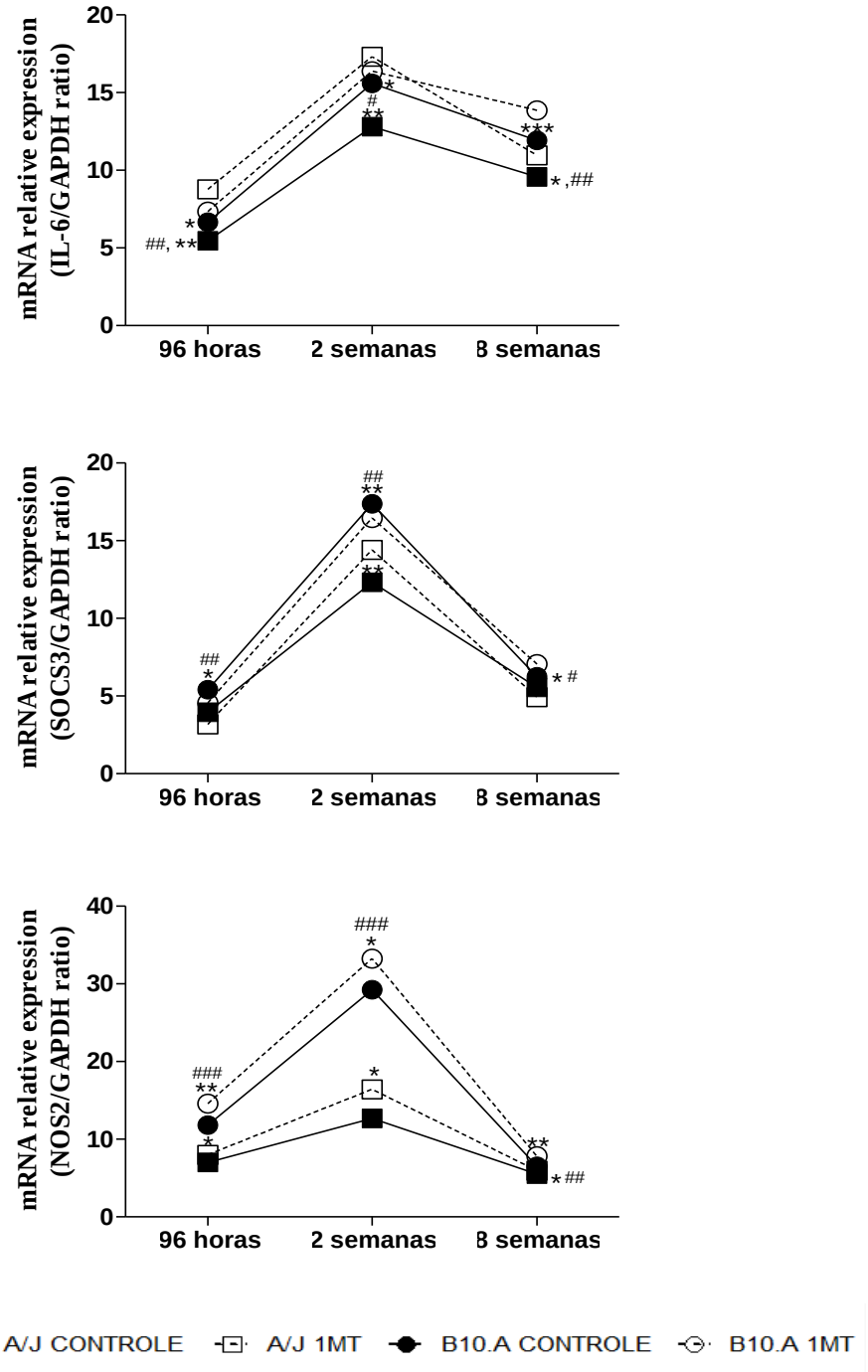
A enzima IDO fosforilada envia sinais para que fatores de transcrição da via não canônica do NFκB atuem no núcleo e aumentem a transcrição de mRNA de IDO. Para que o mecanismo seja eficiente é necessária a expressão de IFN-α e IFN-β que potenciam esse circuito. Nossos resultados de expressão de mRNA de IFN-α e IFN-β mostraram que animais resistentes do grupo controle (somente infectados) utilizam essa via de regulação intracelular de forma preferencial em relação aos animais suscetíveis. Após o tratamento com 1MT, vimos uma redução bastante significativa de expressão gênica de IFN-α e IFN-β, enquanto que nos animais B10.A tratados não houve alteração com o inibidor de IDO (Figura 23).

Figura 19 - Expressão relativa de mRNA de IFN-γ, JAK1, JAK2 e STAT1 em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



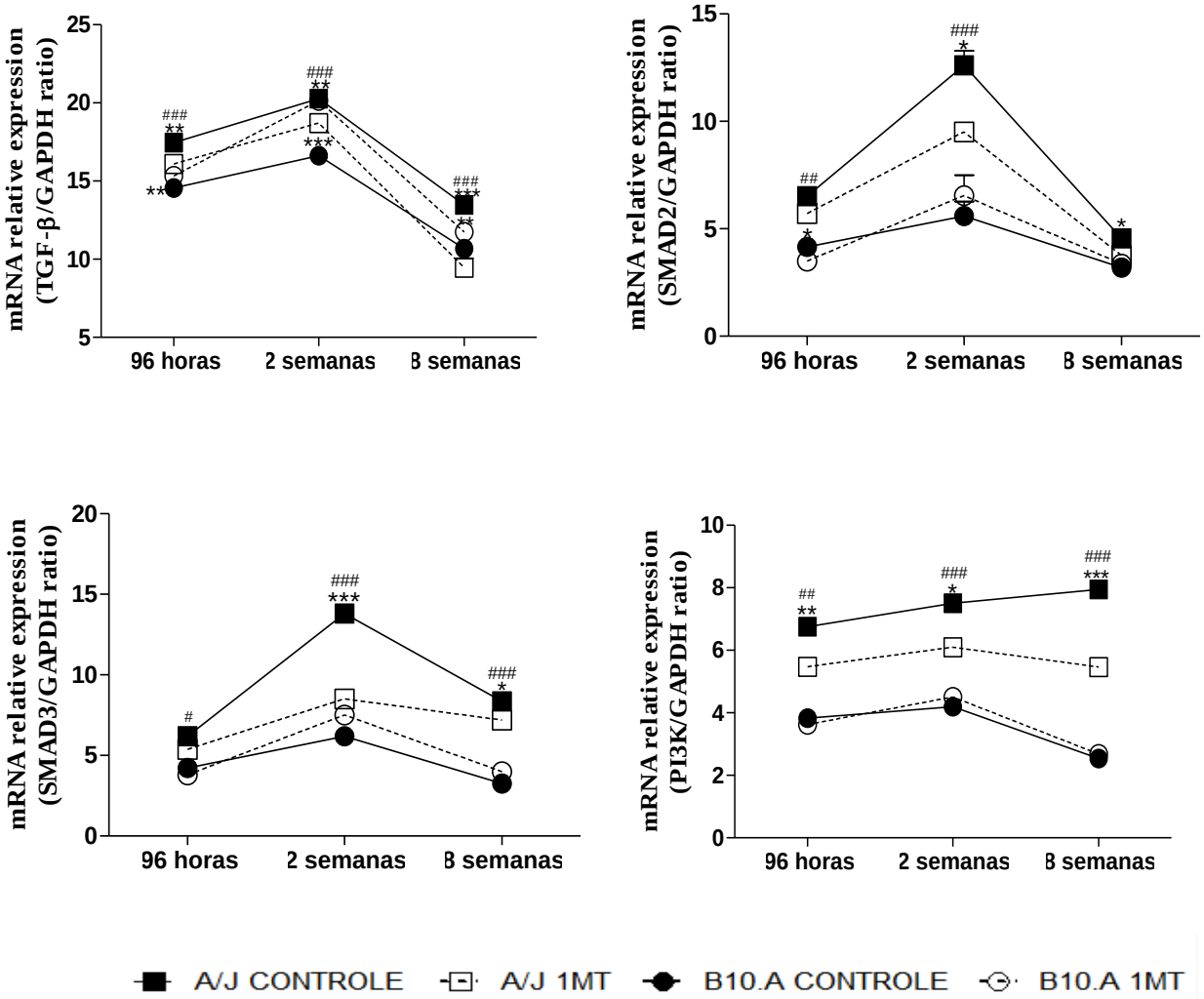
O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 20 - Expressão relativa de mRNA de IL-6, SOCS3e NOS2 em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



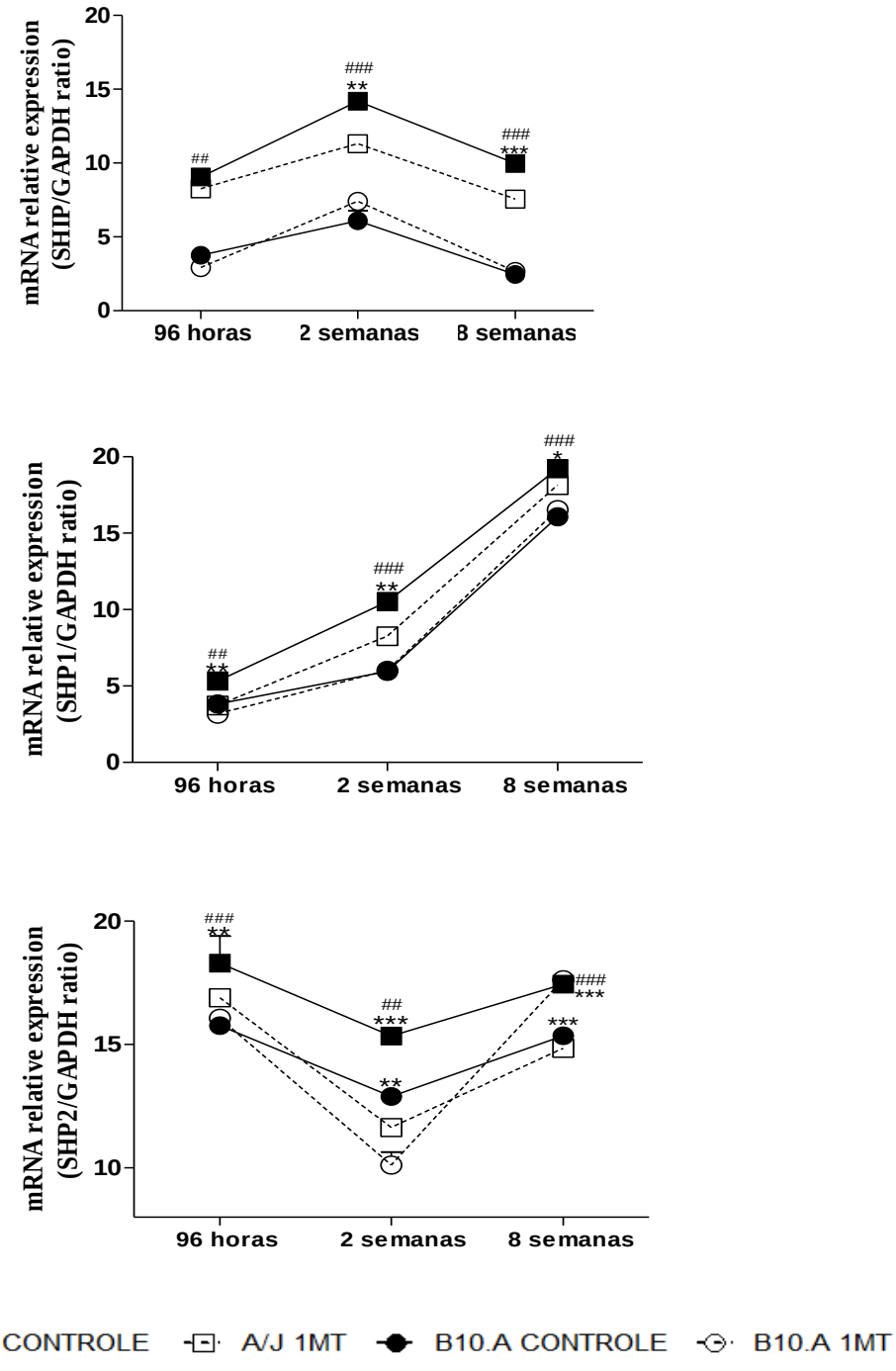
O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 21 - Expressão relativa de mRNA de TGF-β, SMAD2, SMAD3 e PI3K em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



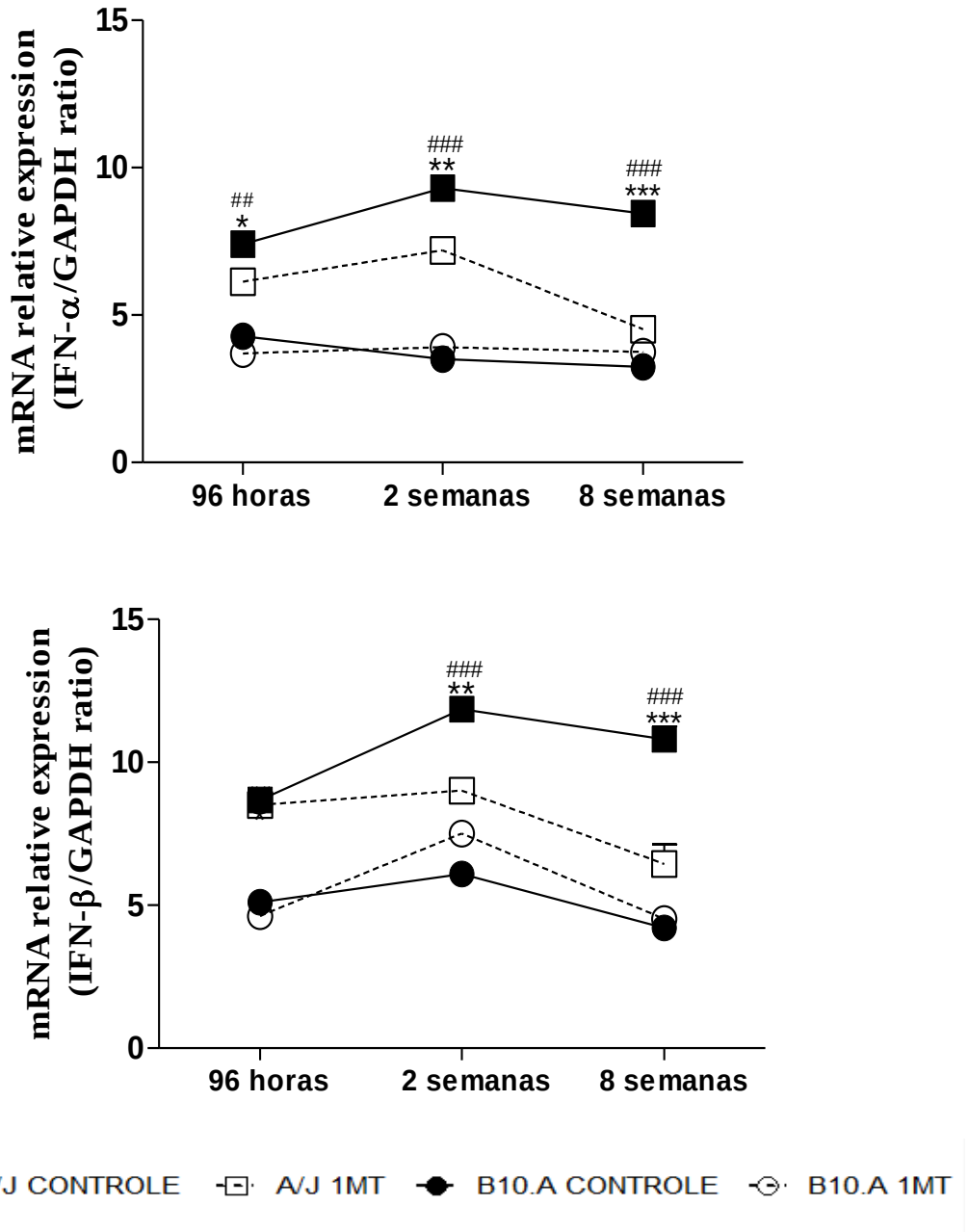
O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 22 - Expressão relativa de mRNA de SHIP, SHP1 e SHP2 em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 23 - Expressão relativa de mRNA de IFN-α e IFN-β em células totais do pulmão de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

3.7.2 Estudo de Expressão Gênica em DCs de Camundongos A/J e B10.A, Tratados ou não com 1MT, nos Tempos de 96 Horas, 2 Semanas e 8 Semanas Pós-Infecção por *P.brasiliensis*

Após o estudo da expressão de mRNA de quinases, fosfatases e fatores de transcrição envolvidos na transcrição de IDO induzidos por IFN-γ e TGF-β em células totais do pulmão resolvemos verificar se estes mecanismos de regulação também se repetiam em DCs isoladas do pulmão. De forma geral, resultados equivalentes aos observados com células totais de pulmão foram obtidos com DCs isoladas. Assim, camundongos B10.A utilizam preferencialmente a atividade catalítica da IDO induzida por IFN-γ, enquanto que a via sinalizadora de IDO é preferencialmente utilizada por camundongos A/J. O tratamento com 1MT interfere com a síntese dos mediadores da via catalítica.

Na figura 24, nos tempos de 96 horas, 2 e 8 semanas p.i., encontramos que o mecanismo de ativação JAK-STAT induzido por IFN-γ se mostrou bastante evidente em DCs de animais B10.A, contudo em níveis de expressão mais baixos comparativamente aos apresentados com células totais do pulmão. Tanto para IFN-γ como Jak1, Jak2 e STAT1 os valores de expressão gênica são mais robustos e significantemente maiores nas DCs de camundongos suscetíveis controle do que nas DCs de animais resistentes também do grupo controle. O tratamento com 1MT, assim como em células totais do pulmão, levou à diminuição acentuada da expressão relativa de mRNA de IFN-γ, Jak1, Jak2 e Stat1 em DCs de camundongos B10.A em comparação ao seu grupo controle, enquanto que em camundongos A/J não foram observadas diferenças após tratamento com o inibidor de IDO.

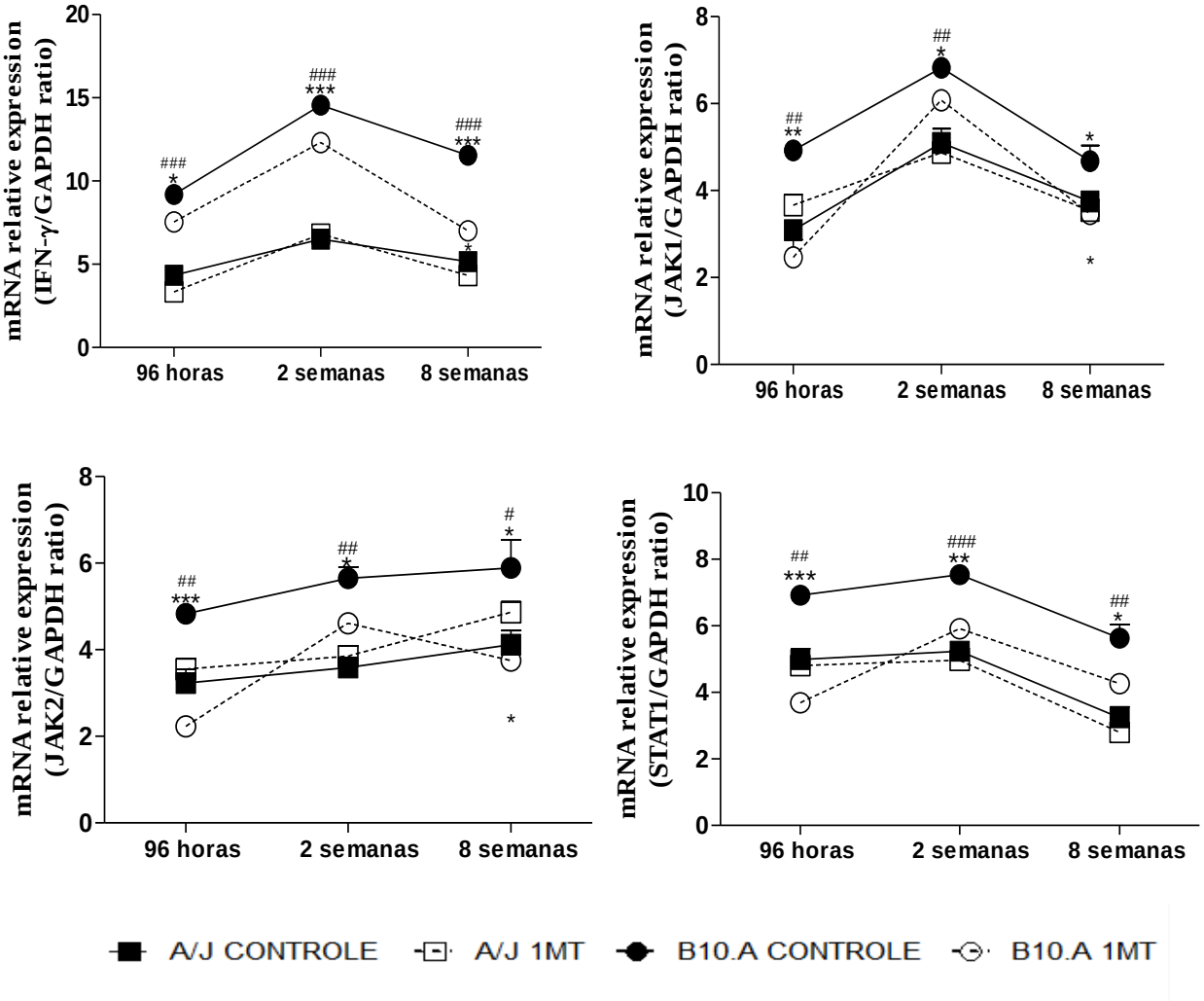
Os resultados de mRNA de genes envolvidos com a degradação via proteossoma estão descritos na figura 25. Verificamos que houve novamente uma maior expressão de IL-6 e SOCS3 nas DCs de camundongos suscetíveis controle e tratados com 1MT quando comparados com A/J. Ainda, vimos que 1MT potenciou uma maior expressão de mRNA de IL-6 em relação ao seu grupo controle em todos os tempos de infecção estudados. De forma semelhante aos achados da expressão de mRNA de NOS2 encontrados em células totais de pulmão, observamos que em DCS purificadas os valores de mRNA de camundongos B10.A foram sempre maiores do que em animais A/J. Nas DCs de animais tratados com 1MT houve aumento da expressão de IL-6 em camundongos A/J nos três tempos e em animais B10.A vimos aumento em 96 horas. Verificamos também uma redução significativa nos tempos mais longos de infecção.

Na figura 26 mostramos os resultados dos transcritos de mRNA de TGF-β e das proteínas SMAD2 e 3, além da quinase responsável pela mobilização e ativação de fosfatases envolvidas na sinalização de IDO, a PI(3)K. Os dados mostraram que nas DCs de animais resistentes, de forma semelhante aos resultados em células totais do pulmão, os níveis de TGF-β, SMAD2, SMAD3 e PI(3)K foram sempre maiores do que nos animais susceptíveis do grupo controle. Com o tratamento com 1MT vimos uma redução na linhagem resistente após 96h, 2 e 8 semanas de infecção. Na linhagem suscetível não encontramos diferença significativa na expressão desses marcadores de sinalização.

Com relação à expressão de fosfatases ativadas via SMADS e PI(3)K, encontramos níveis mais baixos do que nas células totais do pulmão, contudo as diferenças entre as linhagens resistente e suscetível se mantiveram. Os níveis gênicos de mRNA de SHIP, SHP1 e SHP2 foram mais expressivos nas DCs oriundas de camundongos A/J em todos os tempos de infecção estudados quando comparados com B10.A. Após o tratamento com 1MT, há uma diminuição significativa dos níveis de expressão nos animais A/J nos tempos estudados e em B10.A houve aumento para SHP1 após 8 semanas (Figura 27).

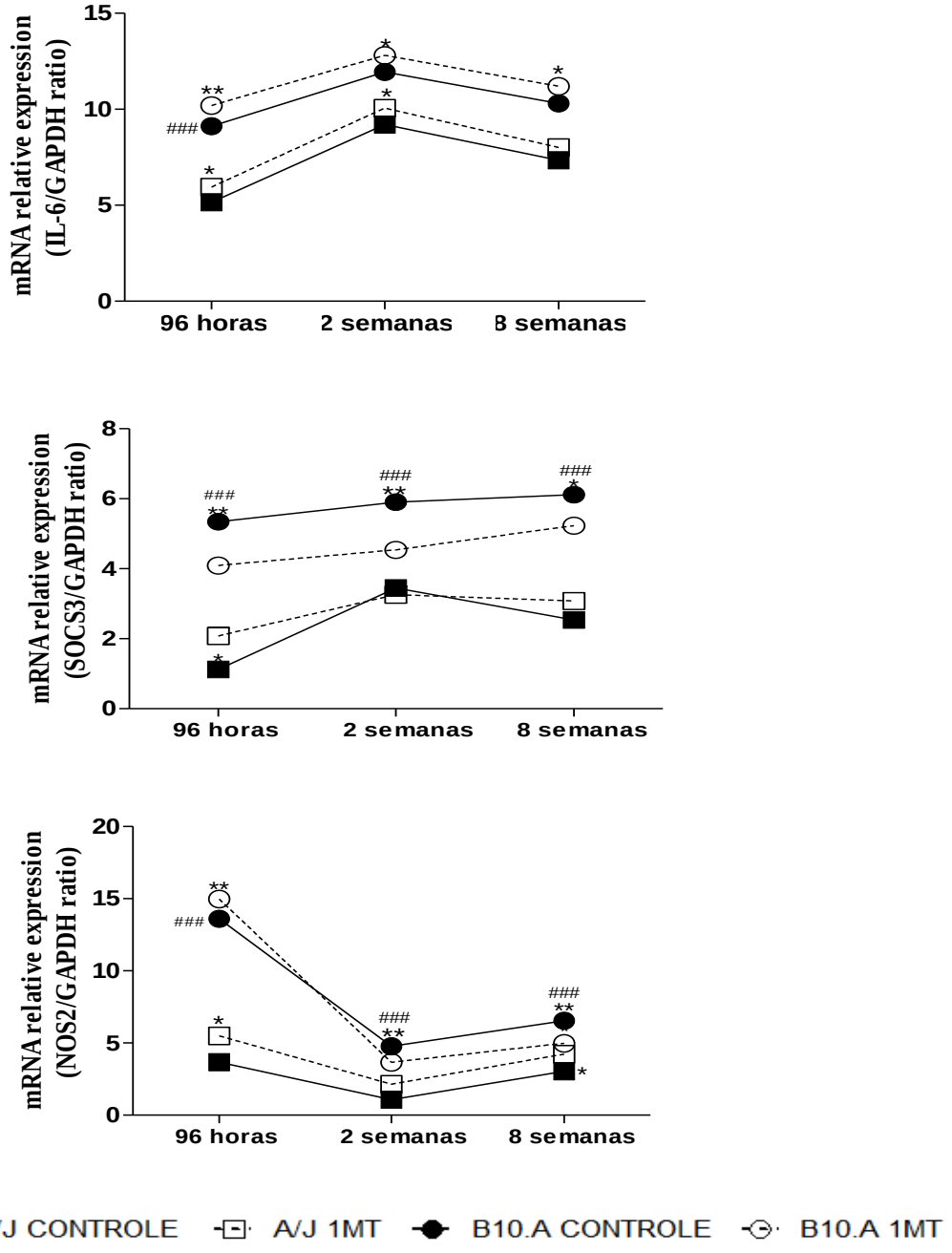
Quando estudamos a expressão de IFN-α e IFN-β nas DCs purificadas, observamos novamente e de forma muito evidente a utilização dessa via de transcrição da enzima pelos camundongos resistentes. Novamente, após o tratamento com 1MT vimos uma diminuição significativa da expressão gênica de IFN-α e IFN-β em camundongos resistentes, enquanto que nos animais B10.A tratados não houve alteração com o inibidor de IDO (Figura 28).

Figura 24 - Expressão relativa de mRNA de IFN-γ, JAK1, JAK2 e STAT1 em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



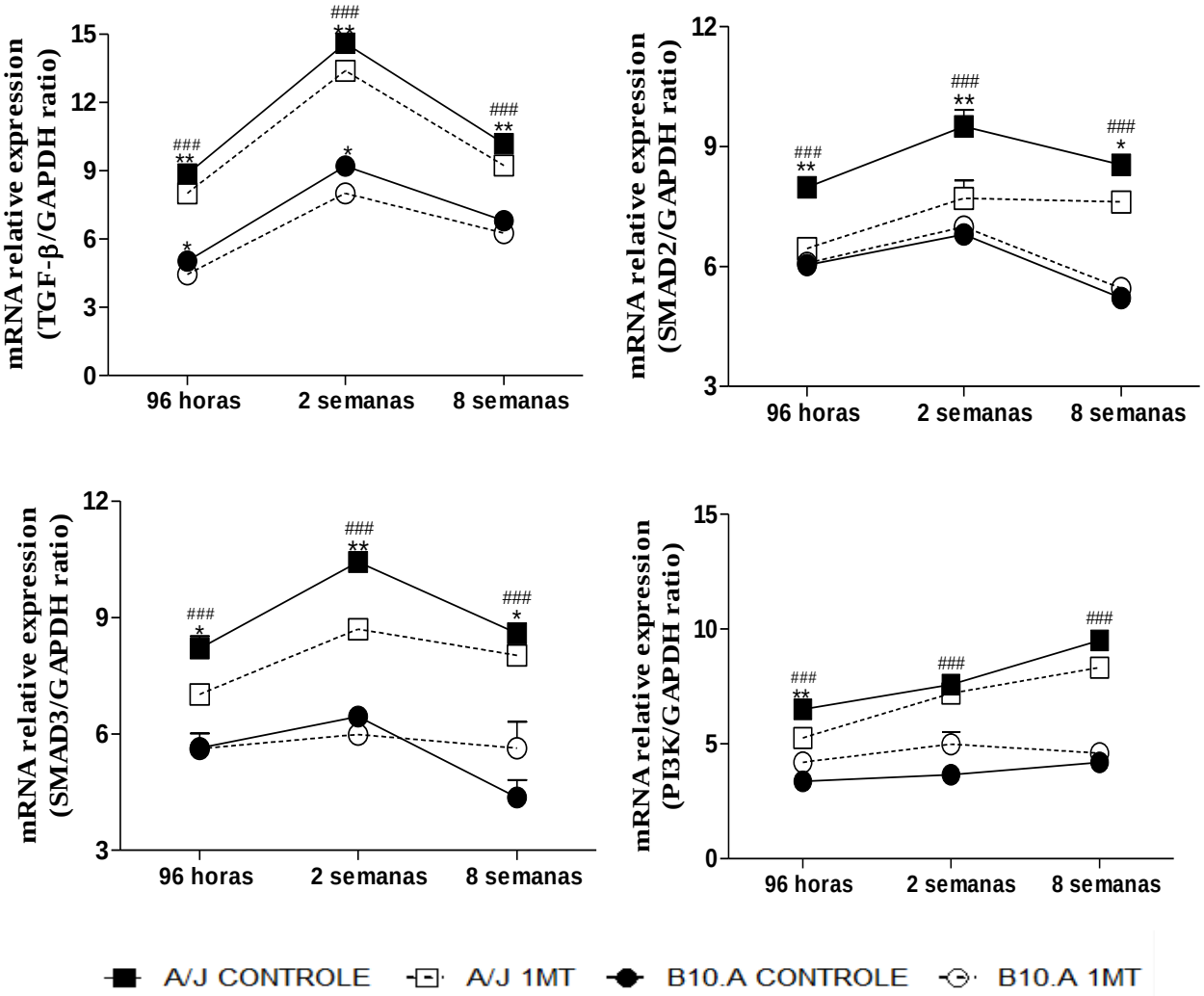
O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#}$P<0,05, $^{\#\#}$P<0,01 e $^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 25 - Expressão relativa de mRNA de IL-6, SOCS3 e NOS2 em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



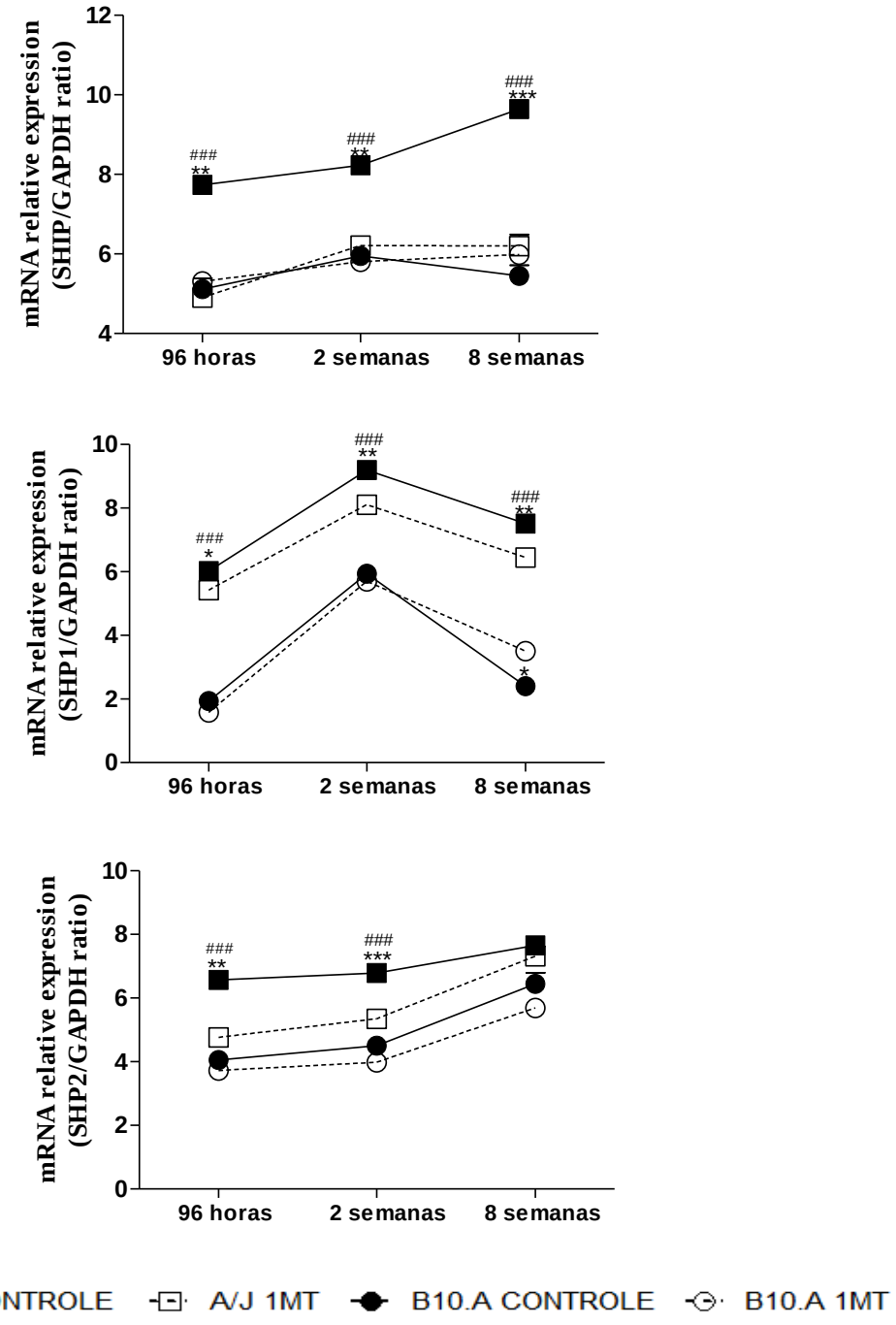
O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 26 - Expressão relativa de mRNA de TGF-β, SMAD2, SMAD3 e PI(3)K em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



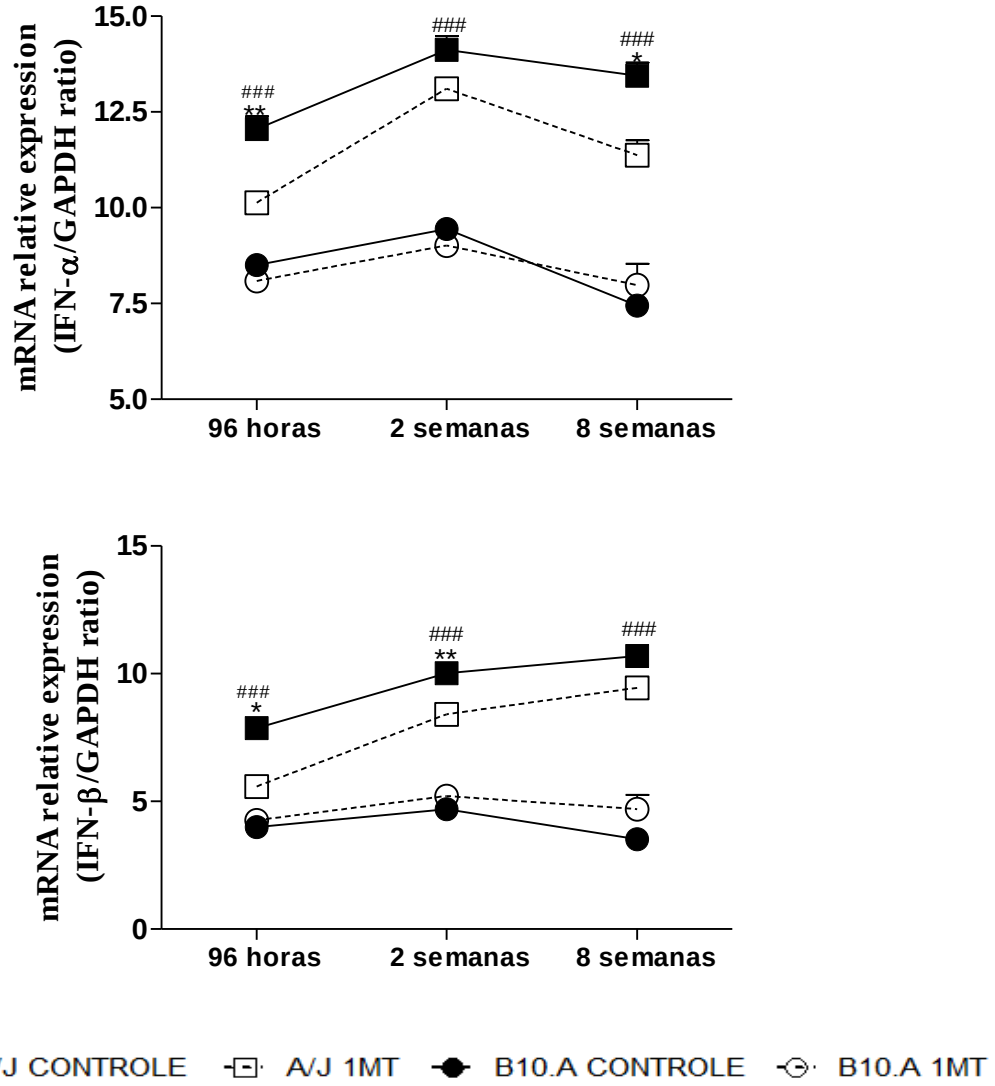
O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 27 - Expressão relativa de mRNA de SHIP, SHP1 e SHP2 em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Expressão relativa de mRNA de SHIP, SHP1 e SHP2 em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção. O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05, **P< 0,01 e ***P< 0,001) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{\#\#\#}$P< 0,001).

Figura 28 - Expressão relativa de mRNA de IFN-α e IFN-β em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção



Expressão relativa de mRNA de IFN-α, IFN-β, SOCS1 e ARG1 em DCs de camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção. O nível de transcrição dos genes foi determinado por real-time PCR. Os dados representam a média ± EPM de 3 experimentos independentes sendo que o asterisco representa diferença estatisticamente significante dentro de cada linhagem (*P<0,05 e **P< 0,01) e a cerquilha (#) representa a diferença entre as linhagens ($^{###}$P< 0,001).

4 DISCUSSÃO

Um mecanismo regulatório exercido pelas DCs é a supressão da proliferação de linfócitos pela expressão e ativação da indolamina 2,3-dioxigenase (IDO). Esta enzima foi originalmente estudada por sua capacidade antimicrobiana pela depleção de triptofano do *pool* intracelular e no microambiente local (MELLOR et al., 1999). IDO cataboliza o nutriente, triptofano, oxidando o anel de indolamina (PARK et al., 2010).

Entre as APCs com o potencial para expressar IDO podem ser incluídos os macrófagos derivados de monócitos humanos, células dendríticas derivadas de monócitos humanos cultivadas sob condições específicas e certos subtipos de células dendríticas murinas. Além destes tipos celulares, podemos encontrar a enzima IDO expressa em células B, células endoteliais e epiteliais. Em modelos tumorais murinos, as DCs IDO^{+} com o fenótipo plasmacitóide ($CD11c^{low}B220^{+}$) foram encontradas em níveis aumentados nos linfonodos drenantes tumorais. Estas células têm se mostrado supressoras de respostas de células T *in vitro* inibindo a sua proliferação ou induzindo apoptose e desta maneira favorecem a anergia de células T antígeno-específico *in vivo* (MUNN; MELLOR, 2007). Na candidíase experimental, as pDCs também têm sido associadas a mecanismos tolerogênicos para linfócitos T (FALARINO et al., 2006).

A IDO pode ser induzida por estímulos inflamatórios, tais como citocinas liberadas por células Th1 (principalmente IFN-γ) ou certos reagentes, como CTLA-4 solúvel (CTLA4-Ig) e ainda ligantes de TLR (LIU; LIU; LIU, 2009). A enzima IDO foi primariamente envolvida com propriedades tolerogênicas de DCs plasmocitóides (pDCs) isoladas de linfonodos drenantes tumorais. Os efeitos imunosupressores da enzima IDO estão ligados à redução da concentração local de triptofano e pela produção de metabólitos do triptofano com função de modulação do sistema imune e que podem participar na diferenciação e ativação de células Tregs. Estas DCs são responsáveis pela ativação de células T reguladoras naturais, mas podem também ser responsáveis pela conversão continuada de células T naïve em Treg (MATTEOLI et al., 2009).

Em trabalho anterior, estudou-se a participação da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) nos mecanismos de imunidade inata contra o *P.brasiliensis* utilizando experimentos *in vitro* de inibição desta enzima por seu conhecido inibidor 1-metil-triptofano (1MT).

Verificou-se que macrófagos de camundongos B10.A e A/J quando submetidos à inibição de IDO e infectados com *P.brasiliensis* apresentavam maior carga fúngica, mesmo quando previamente ativados por IFN-γ. Experimentos com inibidores de IDO e iNOS demonstraram que a maior ação microbicida de macrófagos quando infectados com *P.brasiliensis* se deveu ao óxido nítrico (NO), contudo a via da IDO também exercia controle do crescimento do fungo. Vimos ainda a importância do direcionamento da imunidade inata nos mecanismos da imunidade adquirida, quando, em experimentos *in vivo*, camundongos das linhagens estudadas após serem tratados com o 1MT apresentaram maior carga fúngica do que seus controles não tratados. No estudo das subpopulações de linfócitos infiltrantes de pulmão observou-se um incremento no afluxo de linfócitos TCD4 e TCD8, em duas semanas pós-infecção de camundongos suscetíveis tratados com o inibidor de IDO, 1MT, apontando assim para uma restauração da imunidade celular, típico efeito da inibição da indolamina-2,3-dioxigenase. Em contraste, vimos uma marcante diminuição nos marcadores de ativação associados a células Treg (CTLA-4 e GITR) sugerindo uma ação eficiente da imunidade TCD4 e TCD8 após inibição com 1MT. Por outro lado, vimos que em camundongos A/J, porém na oitava semana de infecção, um afluxo consistente de células TCD4 com uma concomitante diminuição de CTLA-4 e GITR, marcadores de ativação de células T e, em especial, Treg. Este fato demonstrou que em camundongos resistentes A/J a IDO não controlava a expansão de linfócitos Treg e TCD4 e TCD8 ao início da infecção (semana 2), ao passo que na oitava semana ocorreu um efeito tardio de IDO apenas sobre a expansão de células TCD4. Desta forma, pudemos caracterizar os efeitos biológicos mais marcantes da ação da IDO em camundongos suscetíveis e resistentes ao fungo (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1].

A partir desses achados pudemos caracterizar neste trabalho o efeito do tratamento com 1MT no fenótipo e comportamento de células dendríticas e T reguladoras de camundongos suscetíveis e resistentes quanto à expressão da IDO. Dessa forma, confirmamos a atividade biológica da IDO através da determinação dos níveis de expressão gênica pela avaliação de mRNA, produção de quinurenina e NO nos sobrenadantes celulares, além da recuperação de fungos nas culturas de DCs em três tempos de infecção distintos.

Nos resultados de carga fúngica observamos um maior número de fungos recuperados a partir das culturas de DCs de camundongos A/J e B10.A tratados com 1MT, 96 horas e 2 semanas pós-infecção, em comparação com o grupo controle. Este resultado é consistente

[1](ARAUJO, E. F., artigo em fase de preparação)

com os dados de Montagnoli et al. (2006) trabalhando com o fungo *Aspergillus fumigatus*; estes autores mostraram que o tratamento com 1MT levava a um aumento tanto da carga fúngica como na produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos WT mas não em camundongos B7.1$^{-/-}$. Nossos dados demonstraram que a maior carga fúngica nas culturas de DCs pode ser atribuída à menor capacidade destas células tratadas com 1MT de depletar triptofano, contribuindo assim para o crescimento de *P.brasiliensis*.

O aumento da carga fúngica demonstrada nesses tempos agudos de infecção foi acompanhada da diminuição dos níveis de produção de NO em DCs provenientes de camundongos B10.A tratados com 1MT, fato este não verificado em DCs de camundongos A/J. Nosso laboratório mostrou em trabalho prévio que os macrófagos alveolares de animais suscetíveis ao *P.brasiliensis* eram os que apresentavam eficiente atividade fungicida concomitante com níveis elevados de NO, sendo que os macrófagos de animais resistentes tinham baixa atividade fungicida, pequena produção de NO e altos níveis de TGF-β (PINA et al., 2008). Sendo assim, em DCs de camundongos B10.A a menor síntese de NO parece ter contribuído com a baixa atividade fungicida conferida pela inibição de IDO por 1MT.

Outro resultado que merece ser discutido é a produção de metabólitos a partir do catabolismo do aminoácido triptofano, as quinureninas. Elas são resultantes da ação da IDO sobre esse aminoácido essencial e que pode ser inibida pela ação do 1MT, que ao competir pelo sítio ativo da enzima diminui a síntese da via das quinureninas, por limitar a hidrólise do triptofano, prejudicando assim, a atividade da enzima IDO e consequentemente interrompendo os efeitos de tolerância imunológica das DCs (NGUYEN et al., 2010). De fato, o tratamento com 1MT levou à menor produção de quinurenina em relação aos grupos controle nas culturas de DCs de ambas as linhagens de camundongos, nos tempos mais iniciais de infecção (96h e 2 semanas). Estes resultados são equivalentes àqueles encontrados *in vitro* que mostraram que nas culturas de macrófagos peritoneais de camundongos B10.A e A/J tratadas com 1MT a conversão de triptofano em N-formil-quinurenina é diminuída. Este fato se repetiu também *in vivo* nos homogenatos de pulmões das duas linhagens (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1].

Quando analisamos os resultados nas DCs de camundongos A/J e B10.A após 8 semanas de infecção encontramos um número de fungos viáveis semelhante tanto nos camundongos tratados com 1MT como nos grupos controle. Este achados são similares àqueles encontrados na nossa investigação *in vivo* com camundongos A/J e B10.A no mesmo tempo pós-infecção em que os efeitos inibitórios de 1MT são perdidos, uma vez que houve

interrupção do tratamento com 1MT duas semanas após a infecção. Neste período é restabelecida a ação de IDO no controle da carga fúngica, que se iguala nos grupos tratados e não tratados. Somado a isto, nesta fase mais tardia da infecção encontramos maior produção de óxido nítrico em ambas as linhagens estudadas, entretanto, este aumento não resultou em maior controle da carga fúngica pulmonar.

Em relação à produção de quinureninas, na oitava semana, as DCs apresentaram níveis mais baixos que nos tempos agudos, contudo foram similares entre os grupos estudados. Este resultado não foi o equivalente ao encontrado *in vivo* em trabalho anterior no qual os níveis de quinurenina nos sobrenadantes de homogenatos pulmonares de oito semanas de infecção apresentaram-se menores nos camundongos tratados, porém mais baixos que os de segunda semana pós-infecção, refletindo uma ação prolongada, porém de menor intensidade do 1MT no metabolismo do triptofano (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1]. Somado a isso, comparativamente, os níveis de quinurenina nos homogenatos pulmonares foram mais baixos (80 µg/ml) do que os das culturas de DCs no mesmo tempo de infecção (400 µg/ml).

A seguir realizamos ensaios para a detecção da expressão de mRNA de IDO nas DCs purificadas de ambas as linhagens infectadas, após tratamento ou não com 1MT. Já havia sido demonstrado que tanto em macrófagos infectados por *P.brasiliensis* em cultura, como também nos macerados de pulmões de camundongos A/J e B10.A infectados havia uma queda na expressão da enzima IDO após tratamento com 1MT (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1]. Com as DCs purificadas, os efeitos de 1MT na expressão da enzima se repetiram, mostrando que as DCs de camundongos A/J e B10.A, em 96 horas e 2 semanas pós-infecção, receberam estímulos gênicos ainda suficientes para a expressão residual de mRNA de IDO. Ao adicionarmos um inibidor que compete pelo sítio ativo da enzima IDO esse mecanismo não é prejudicado de forma completa, visto que observamos uma diminuição parcial na função de IDO e não a sua total eliminação. A partir do momento em que não tratamos mais os camundongos com 1MT, é restabelecido o mecanismo descrito acima com aumento da expressão de mRNA de IDO na oitava semana pós-infecção, eliminando as diferenças entre os grupos tratados e controles de camundongos A/J e B10.A. Contudo, nas DCs obtivemos um resultado que ainda não havia sido visto em nossos estudos anteriores: os níveis de expressão relativa de mRNA de IDO encontrados na oitava semana aumentaram sobremaneira em relação aos dados de 96 horas e 2 semanas de infecção e, mais ainda, comparados aos homogenatos pulmonares neste tempo de (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1]. Este aumento, entretanto, não foi acompanhado de uma maior produção de

quinurenina, nos levando a supor que a enzima, mesmo com alta expressão de mRNA, não se expressou na forma de proteína, não havendo portanto conversão do aminoácido triptofano em N-formil-quinurenina em níveis compatíveis com a sua expressão; podemos sugerir ainda um mecanismo de competição onde o maior crescimento fúngico se deu pela captura do triptofano disponível pelo patógeno, diminuindo a capacidade da enzima IDO em quebrar o substrato. Pode-se ainda considerar que outros mecanismos pós-translacionais tenham afetado a atividade funcional de IDO.

O estudo dos subtipos, maturação e da atividade apresentadora de antígenos por DCs de camundongos tratados por 1MT e seus controles, nos trouxe informações adicionais sobre a função da IDO na PCM.

Os resultados de 96 horas pós-infecção apontaram, neste estudo com DCs purificadas de camundongos A/J e B10.A tratados com 1MT, que as três subpopulações estudadas, mielóide ($CD11c^{high}CD11b^{+}$), plasmacitóide ($CD11c^{low}B220^{+}$) e linfóide ($CD11c^{high}CD8^{+}$) apresentaram-se em maior número de células e menor frequência celular. Este fato pode ser explicado pelo maior afluxo de células inflamatórias para os pulmões nos animais tratados com 1MT diminuindo então a frequência de DCs. Entretanto, nos camundongos suscetíveis, a influência do 1MT nas DCs mielóides foi menos acentuada, sugerindo que nessa linhagem o perfil mielóide das DCs tem um papel menos relevante na expressão de IDO. Constatamos ainda que as DCs de camundongos A/J controle e B10.A controle apresentaram às 96 horas pós-infecção, uma frequência maior de DCs plasmocitóides que camundongos B10.A tratados nos levando a considerar que o tratamento com um inibidor de IDO levou a uma menor diferenciação de DCs plasmacitóides imunorreguladoras ou tolerogênicas (PALLOTTA et al., 2011).

Na segunda semana de infecção os resultados mostraram que camundongos resistentes, infectados e tratados com 1MT, apresentaram menor frequência de DCs mielóides ($CD11c^{high}CD11b^{+}$), plasmacitóides ($CD11c^{low}B220^{+}$) e linfóides ($CD11c^{high}CD8^{+}$) nos grupos tratados com 1MT, resultados estes bem semelhantes aos de tempo mais agudo de infecção (96 horas) mostrado acima. Por outro lado, diferente de 96 horas, o número de células neste tempo de infecção se mostrou aumentado para as DCs mielóides dos grupos tratados, deixando claro que houve um estímulo para a diferenciação ou proliferação celular de DCs mielóides. Este resultado também se repetiu para o subtipo plasmacitóide, porém com menor intensidade no aumento celular dos grupos tratados com 1MT. Já com relação às DCs

linfóides ($CD11c^{high}CD8^{+}$), constatamos que houve uma redução da frequência e número de DCs após o tratamento com 1MT nas duas linhagens.

A caracterização dos marcadores de ativação e moléculas co-estimulatórias das DCs totais permitiu uma maior clareza sobre os efeitos do tratamento com o inibidor de IDO sobre as DCs. Sendo assim, fizemos a caracterização destes marcadores nas DCs totais usando a expressão da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) e verificamos após 96 horas e duas semanas de infecção que o tratamento com 1MT reduziu em camundongos A/J e B10.A a expressão das moléculas de ativação CD86, IA^{K} e CD40. Resultados similares foram encontrados *in vivo* em trabalho anterior para estas linhagens mostrando que nos camundongos A/J e B10.A as diferenças se resumiram à expressão de CD86, que foi menor nos camundongos tratados (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1]. Novamente, no estudo de homogenato de pulmão, resultados equivalentes foram obtidos, acrescidos de diferenças ainda na expressão de IA^{K}, em duas semanas de infecção. Por outro lado, O número total de DCs, nestes tempos de infecção se apresentou maior nos grupos tratados com 1MT, mostrando que de algum modo o efeito inibitório de 1MT levou ao aumento de células, contudo com menor frequência.

Para as subpopulações de DCs de camundongos A/J e B10.A, nos tempos de 96 h, 2 e 8 semanas, também usamos a expressão da mediana da intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores de ativação citados acima usando gates para as subpopulações de DCs. Verificamos que a expressão da molécula MHC-II, CD86 e CD40 sofreu redução nas duas linhagens tratadas com 1MT. Estes dados demonstram que o tratamento com 1MT alterou o perfil de todas as subpopulações de DCs obtidas. A redução dos marcadores de ativação levaria ao aumento da frequência de células Treg induzidas *in vitro*, pois DCs imaturas potenciam o desenvolvimento destas células reguladoras. Isso levaria então, a uma diminuição da proliferação de células T efetoras. Este fato, entretanto, não foi observado em nossos achados.

Então nos perguntamos, por que DCs pouco estimuladas induzem uma melhor resposta imune tanto em camundongos A/J como B10.A?

Talvez a melhor função imunogênica das DCs de camundongos tratados possa ser atribuída a um novo balanço entre células, citocinas e carga fúngica.

Nos camundongos tratados houve evidente aumento da carga fúngica o que aponta para uma atividade diferente nas DCs que devem conter e processar maior número de fungos. Além disso, em camundongos B10.A e A/J foi marcante a diminuição da síntese de IL-12

induzida por 1MT. Esta IL-12 diminuída poderia ter influenciado na síntese de IFN-γ por células NK e outros linfócitos da imunidade inata, diminuindo a expressão de marcadores de ativação de DCs. Contrária a esta explicação foi o concomitante aumento de TGF-β que induziria uma maior ativação celular. Entretanto, o efeito sobre IL-12 poderia sobrepujar àquele sobre TGF-β.

Os dados de citocina intracelular talvez possam melhor explicar o fenótipo das DCs de camundongos tratados. Estes ensaios mostraram que o 1MT induz em camunsognos B10.A uma redução proeminente de IL-12 que é a principal citocina pró-inflamatória relacionada com a supressão da imunidade destes animais. Ao contrário, em camundongos A/J há a redução preferencial de TGF-β, a citocina envolvida com a tolerância inicial destes animais ao fungo e inibição dos fenômenos imunes.

Assim, tanto em camundongos suscetíveis e resistentes o 1MT reduz os mediadores envolvidos com a inibição da resposta imune, restaurando a diferenciação e migração de linfócitos por mecanismos diferentes.

Os nossos resultados após a oitava semana de infecção mostraram que houve uma diminuição no número e frequência de DCs (exceção ao número de DCs plasmacitóides) e de MFI em muitos dos marcadores de ativação e moléculas co-estimulatórias estudados (exceção ao marcador CD40 na análise de DCs totais e também no perfil mielóide), em ambas as linhagens. Nossos dados anteriores *in vivo*, com suspensões de células neste tempo de infecção, indicaram que o tratamento com 1MT diminuiu as moléculas de ativação CD86, IA^K e CD40 de camundongos A/J (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1]. Contudo, mesmo com a interrupção do tratamento com 1MT após duas semanas, foi mantida nas DCs totais de camundongos suscetíveis, bem como nos subtipos mielóide, linfóide e plasmacitóide (exceção CD11b das DCs totais; CD40 nas DCs linfóides e, IA^K nas plasmacitóides) a menor expressão dos marcadores de ativação dos grupos tratados, compatível com resultados *in vivo* de células pulmonares com o marcador CD86 em B10.A, neste tempo de infecção. De forma geral, a enzima IDO regulou a ativação das DCs de camundongos suscetíveis nas fases precoce e tardia da infecção. Já nos camundongos resistentes as reduções de MFI não se mantiveram para a maioria dos marcadores de ativação estudados, mostrando que neste tempo de infecção a resposta imune em camundongos A/J se tornou mais eficiente. Dessa forma, as DCs obtidas após 8 semanas de infecção poderiam então possibilitar a expansão da população TCD4 de camundongos A/J em fases mais tardias da infecção, como aqui observado.

Fomos ainda investigar a produção de citocinas e realizamos três tipos de ensaios: citocinas solúveis obtidas de cultura de DCs purificadas (IL-12, IL1- β, TNF-α, TGF-β e IL-6) analisadas por ELISA; citocinas intracelulares presentes em DCs purificadas (IDO, TNF-α, IL-12, TGF-β e IL-10) analisadas por FACS; citocinas de sobrenadantes de cultivo de DCs purificadas cultivadas com linfócitos (IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10) analisadas por ELISA, que serão discutidas mais adiante.

A dosagem de citocinas por ELISA no sobrenadante de cultivo de DCs nos revelou que o tratamento com 1MT induziu níveis menores de citocinas inflamatórias IL-12 e IL-1β. Este resultado da citocina IL-1β concorda com Murakami et al. (2012) que no modelo de infecção pulmonar de camundongos por *Toxoplasma gondii* encontrou nos animais tratados com 1MT níveis mais baixos de expressão de mRNA para esta citocina. Quando observamos os resultados dos níveis de TGF-β nas culturas de DCs vimos que o tratamento com 1MT diminuiu a produção da citocina, principalmente na linhagem resistente. Este resultado concorda com os achados de Ravishankar et al. (2012) que observaram o mesmo efeito estudando apoptose de macrófagos da zona marginal de baço murino. Da mesma forma, DCs plasmacitóides murinas tratadas com TGF-β e 1MT conferiram efeitos regulatórios sobre IDO que foram mecanisticamente separados da sua atividade enzimática induzida principalmente por IFN-γ, ou seja, não diminuíram a síntese de IDO (quebra de triptofano – via das quinureninas – imunoregulação) como se esperava após sua inibição por 1MT (PALLOTTA et al., 2011).

Já para a citocina TNF-α nossos resultados mostraram que a inibição de IDO por 1MT nos camundongos infectados, nos tempos de infecção estudados, levou a um aumento na sua produção. A produção aumentada de TNF-α deve estar relacionada à maior ativação do sistema imune, maior expressão de moléculas de adesão e maior afluxo de células inflamatórias para o pulmão como mostramos em recente trabalho onde a ausência da enzima iNOS leva à síntese aumentada de TNF-α, aumento da resposta imune e melhor organização das lesões (BERNARDINO et al., 2013).

Resolvemos continuar nossa investigação através da caracterização intracelular de citocinas nas DCs obtidas de pulmões de camundongos A/J e B10.A infectados e submetidos ou não ao tratamento por 1MT e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram apresentados sob a forma de frequência de células positivas e pelo número total de células que leva em consideração o número total de células obtidas nos grupos após o fracionamento em colunas magnéticas. Caracterizamos também a expressão intracelular de IDO.

Observamos que as DCs obtidas de camundongos suscetíveis e resistentes, 2 semanas pós-infecção por *P.brasiliensis*, produziram níveis maiores de IDO do que as de camundongos tratados com 1MT, sendo que DCs de camundongos A/J apresentaram os maiores níveis de IDO. Este resultado já era esperado por serem as DCs, principalmente a subpopulação de DCs plasmacitóides, produtoras da enzima IDO de forma endógena (MUNN et al., 2004). Quanto à presença de células TNF-α^+ encontramos um maior número em camundongos B10.A e A/J tratados, concordando com os resultados encontrados no ensaio de citocina por ELISA.

Camundongos B10.A apresentaram maior número de DCs IL-12^+ que os camundongos A/J. Essa produção exacerbada de IL-12 por camundongos B10.A já foi descrita em trabalhos anteriores do nosso grupo (PINA; BERNARDINO; CALICH, 2008). Já as DCs de camundongos A/J tratados com 1MT apresentaram menor número de células TGF-β^+ que os animais A/J controle da mesma linhagem. Este resultado concorda com os resultados da citocina TGF-β analisada na cultura de DCs e também com o trabalho de Pallotta et al. (2011) que identifica uma função adicional para IDO em pDCs, mostrando que IDO pode atuar como um transdutor de sinal envolvido em eventos de sinalização intracelular e confere um fenótipo tolerogênico para as pDCs em resposta à citocina TGF-β. Podemos sugerir ainda que a maior expressão de mRNA de IDO nas DCs de camundongos A/J encontrados em nosso trabalho possa ser explicada pela outra função de IDO induzida por TGF-β e não somente pela degradação de triptofano induzida por IFN-γ.

Já na oitava semana, nossos resultados mostraram que houve diminuição no número de células IDO^+. Este resultado de diminuição na expressão da proteína intracelular contrasta com nosso achado de maior expressão de mRNA para IDO nas de DCs da oitava semana p.i. Podemos sugerir que houve estímulo gênico para a formação do mRNA, contudo a maior parte não foi transcrita em proteína, ou foi degradado de maneira muito rápida.

Para melhor entender o comportamento das DCs purificadas de camundongos infectados, tratados ou não com 1MT, investigamos ainda a capacidade destas células de apresentar antígenos a linfócitos T naïve. Dessa forma, pudemos verificar se a inibição da IDO por 1MT nos tempos de 96 horas, 2 e 8 semanas levaria ao aumento na indução da proliferação desses linfócitos marcados com CFSE. Este fato explicaria a maior resposta imune e o afluxo de linfócitos e macrófagos nos pulmões de camundongos tratados com 1MT (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1].

Nossos experimentos de linfoproliferação, entretanto, demonstraram que a menor ativação das DCs (como constatado pela expressão de moléculas de MHC II e co-estimulatórias) resultou em maior expansão de células T e menor frequência de células Treg. Assim, a menor produção de quinurenina mediada pelo tratamento com 1MT parece ter sido mais importante do que a redução das moléculas apresentadoras de antígenos e co-estimulatórias nas DCs. Além disso, a maior carga fúngica nas DCs de camundongos tratados com 1MT pode também ter influenciado neste comportamento.

Nossos resultados *in vitro* mostraram que as DCs de camundongos de ambas as linhagens, em contato com linfócitos naïve, induziram a proliferação de linfócitos em todos os grupos estudados; contudo, nos linfócitos estimulados por DCs de camundongos B10.A tratados com 1MT após 96 horas e 2 semanas de infecção, os índices de proliferação foram significativamente maiores que em seu grupo controle. Este resultado concorda com o que foi descrito em nosso modelo de infecção *in vivo*, em que verificamos após duas semanas de infecção os camundongos B10.A tratados com 1MT exibirem a restauração da migração dos linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ para os pulmões. Em contrapartida, esse efeito não foi detectado nos pulmões de camundongos A/J, neste tempo de infecção (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1].

O estudo de fenótipo dos linfócitos $TCD4^+$, caracterizados após a co-cultura com DCs de camundongos A/J e B10.A, tratados ou não com 1MT, após 96 horas e 2 semanas de infecção mostrou uma maior frequência de linfócitos naïve ($CD4^+CD44^{low}CD62^{high}$) e ativados ($CD4^+CD44^{high}CD62^{low}$) nos camundongos B10.A tratados, como também uma maior frequência de linfócitos TCD8 naïve ($CD8^+CD44^{low}CD62^{high}$) e ativados ($CD8^+CD44^{high}CD62^{low}$) em camundongos A/J e B10.A tratados.

Quando analisamos os resultados das DCs obtidas 8 semanas pós-infecção colocadas em co-cultura com linfócitos naïve, verificamos que o tratamento com 1MT levou à índices de proliferação mais altos na linhagem resistente. Este resultado é consistente com nossos resultados anteriores quando detectamos a restauração de migração de células T em pulmões de camundongos A/J tratados somente na oitava semana pós-infecção, mostrando um efeito tardio de IDO sobre a expansão de células $TCD4^+$ (ARAUJO, 2013, artigo em preparação)[1]. Da mesma forma, Vaccari et al., estudando o vírus da imunodeficiência em macacos encontrou resultados semelhantes na proliferação de linfócitos $TCD4^+$ e CTLA-4 após inibição da IDO por 1MT (2012). Em concordância, analisando o fenótipo dos linfócitos

constatamos que houve expansão de linfócitos naïve ($CD4^{+}CD44^{low}CD62^{high}$) na linhagem A/J.

A seguir, pudemos também verificar que o tratamento com 1MT em ambas as linhagens interferia na expansão de células T reguladoras através da sua fenotipagem utilizando seu fator característico de transcrição, o FoxP3. Esta caracterização do fenótipo é pertinente, pois altas concentrações de quinurenina induzem a conversão de células $TCD4^{+}$ naïve para o fenótipo Treg. A enzima IDO, sintetizada por DCs, não se constitui em um mecanismo funcional das células T reguladoras, mas sim participa da função desta células através de um mecanismo de *feedback* positivo (ANDERSSON et al., 2008).

Publicações recentes implicam o receptor aril hidrocarboneto (AHR) como tendo um papel central na diferenciação de células T. Mais ainda, AHR regula IDO que ao metabolizar triptofano e formar quinureninas pode ser agonista do receptor aril hidrocarboneto. Sendo assim, a quinurenina induz AHR a diferenciar células T em células T reguladoras, com IDO desempenhando um papel importante neste contexto (MELLOR et al., 2012; MEZRICH et al., 2010).

A atividade aumentada de IDO provoca tolerogenicidade de APCs e priva as células T de triptofano, levando à queda de proliferação de células T e a sua apoptose (HOSHI et al., 2010). Outros resultados também demonstraram que metabólitos do triptofano foram capazes de induzir transcricionalmente o gene que codifica Foxp3 e suprimir o gene que codifica RORγt, o fator de transcrição da linhagem Th17, no modelo de infecção fúngica (DE LUCA et al., 2007). Este efeito foi totalmente abolido após inibição com L-1MT ou em camundongos C57BL/6J $IDO^{-/-}$, restaurando a proliferação de linfócitos T (HOSHI et al., 2010). Neste trabalho, mostramos que as DCs obtidas de camundongos A/J e B10.A após 96 horas e 2 semanas de infecção com Pb e, colocadas em cultura por 3 dias com linfócitos naïve levaram, à expansão de células Treg nas duas linhagens. A maior concentração de quinureninas nos grupos controle deve ter contribuído para a maior frequência de Tregs em comparação com os grupos tratados com 1MT. Estes resultados dão consistência aos apresentados em nosso estudo *in vivo* nas 2 semanas de infecção no qual observamos que camundongos IDO-inibidos apresentaram menor número de células com perfil T regulador ($CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$). Já na oitava semana, foi observada em camundongos A/J, uma diminuição de linfócitos $CD4^{+}CTLA4^{+}GITR^{+}$, em paralelo à diminuição de células T reguladoras após tratamento com 1MT (ARAUJO, 2013, artigo em preparação[1]; CHEN et al., 2008).

Foi descrito que IDO, ao depletar triptofano, prejudica o ciclo celular de algumas populações, incluindo as células T, favorecendo a geração de Tregs (FALLARINO et al., 2006). A expressão do marcador CTLA-4 pelas Tregs e a sua ligação com os ligantes B7.1 e B7.2 das DCs pode induzir a expressão da enzima IDO num processo de "feedback" (MULLEY et al., 2008). Em nosso trabalho, a inibição de IDO diminuiu a expansão de Tregs, que por sua vez podem ter contribuído para a menor expressão de IDO nas DCs. Como descrito anteriormente, este resultado corrobora com alguns trabalhos que demonstram as DCs podem atuar como moduladoras da resposta imune adaptativa no pulmão, promovendo tolerância ao patógeno pela inibição de células T efetoras e indução de células T reguladoras, sendo a IDO das DCs participante ativa neste processo (DE HEER et al., 2004; DEMEDTS et al., 2005; ORISS et al., 2005).

Fomos ainda investigar as citocinas liberadas nos ensaios de linfoproliferação, (IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10) após 96 horas, 2 e 8 semanas de infecção. Verificamos que nas DCs de camundongos A/J e B10.A não tratados, os níveis de IFN-γ foram maiores mostrando que no inicio da infecção camundongos B10.A e A/J são produtores desta citocina. Os níveis de IFN-γ foram sempre maiores para camundongos B10.A. Este achado também sugere que a maior concentração de IFN-γ produzido por animais B10.A contribua para dependência do eixo IFN-γ/IDO/Imunossupressão por estes camundongos.

Já para a citocina IL-2, a citocina que atua como fator de crescimento para linfócitos T, sejam eles T efetoras ou T reguladoras, verificamos que as DCs de camundongos A/J e B10.A tratados com 1MT induziam maior produção de IL-2 e maior estímulo para a proliferação de linfócitos. Já para IL-4 e IL-10, citocinas de perfil Th2, nossos resultados foram antagônicos nas duas linhagens e condições experimentais, não permitindo explicar a relação das citocinas com a inibição de IDO por 1MT.

Nossos resultados mostraram que a anergia de células T desenvolvida por camundongos suscetíveis após a infecção com o fungo *P.brasiliensis* não é devida a deficiência das suas APCs e tampouco à produção aumentada de citocinas do tipo Th2, por exemplo, IL-4 e IL-10. A anergia das células T é induzida pela ativação excessiva da imunidade inata devido à ação combinada de mediadores inflamatórios secretados por seus linfócitos e células dendríticas (PINA et al., 2008, 2013).

De forma geral, a análise do porquê das DCs de camundongos A/J serem ativadoras eficientes de células T naïve, é um pouco contraditório, já que DCs sintetizam IDO, uma enzima que pode resultar em inibição da proliferação de células T. Entretanto, além de DCs

plasmacitóides TGF-β e IDO^+, camundongos A/J desenvolvem DCs mielóides e elevada produção de TNF-α que resgataria em tempo adequado a ativação da imunidade adaptativa (PINA et al., 2013). Várias hipóteses podem explicar este fenômeno. IDO pode também fazer parte do "feedback" negativo pelo qual as DCs podem regular respostas imunes excessivas e deletérias devido a presença de um grande número de células T ativadas expressando CD40L e IFN-γ (HWU et al., 2000). Uma explicação alternativa é que IDO pode ser produzida por um subconjunto de DCs inibitórias dentre a população total de DCs, uma vez que existem evidências para a presença destas DCs tolerogênicas. Outra hipótese interessante é a de que a produção de IDO por DCs ativadas possa resultar em uma inibição transitória da proliferação protegendo as células T contra a morte celular induzida por ativação. Desde que a morte celular induzida por ativação ocorre paralelamente à proliferação de células T, a depleção transitória de triptofano poderia inibir o auge de proliferação de células T, evitando assim a sua morte (BOEHME et al., 1993, HWU et al., 2000).

Alguns trabalhos mostraram o papel tolerogênico das DCs imaturas dos tecidos sobre linfócitos T (STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003). Mais ainda, DCs expostas *ex vivo* a antígenos, na ausência de estímulos de maturação completa, regularam negativamente a imunidade e induziram células Tregs. Fica claro que as DCs podem não ser somente imunogênicas, mas também tolerogênicas, intratimicamente e nos tecidos periféricos (STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003). Uma série de estudos tem relatado que as DCs tolerogênicas influenciam a expansão das Tregs através da secreção de TGF-β e/ou o envolvimento de receptores inibitórios (ANDERSSON et al., 2008; JOHANNS et al., 2010; PERIASAMY et al., 2011).

Nossos dados demonstraram que camundongos A/J, às 96 horas e 2 semanas pós-infecção, apresentaram maior frequência de células Tregs que camundongos B10.A. Pode-se então sugerir que em camundongos A/J a produção de IDO pelas DCs e TGF-β pelas DCs e pelos macrófagos alveolares (PINA et al., 2008) contribuam para a pequena expansão inicial de células T em paralelo à maior frequência de células T reguladoras (FELONATO et al., 2013).

Este fato pode ser ainda justificado na medida em que os altos índices de expressão gênica da enzima IDO se traduzem em efetiva quebra de triptofano e produção de quinureninas que induzem células Tregs. Apesar da imunidade inata ineficiente, as DCs de camundongos A/J expressam níveis suficientes de molécula MHC-II e co-estimulatórias, como observado pela alta intensidade de fluorescência das moléculas co-estimulatórias IA^K e

CD86 nas análises de DCs totais e nos subtipos mielóide e plasmacitóide, e são capazes ainda de induzir resposta imune celular protetora.

Já a infecção de camundongos suscetíveis (B10.A) pelo *P.brasiliensis* leva a grande ativação da imunidade inata (CALICH et al., 2008). Os macrófagos alveolares (PINA et al., 2008) e células dendríticas (PINA et al., 2013) são ativados intensamente e produzem grandes quantidades de NO e IDO resultando em eficiente controle da carga fúngica (ARAUJO, 2013, artigo em preparação[1];CANO et al., 1995). Esse fato é reforçado pela síntese precoce de IFN-γ (provavelmente por células NK) que atua na indução de IDO e iNOS (CANO et al., 1998). Este quadro resulta em anergia permanente da imunidade celular devido à ação supressora concomitante de NO e dos metabólitos do triptofano. Deve-se também levar em consideração a presença de células Treg que possivelmente auxiliam no processo de anergia da imunidade de camundongos B10.A.

Dessa forma, nossos estudos no tempo de 96 horas, 2 e 8 semanas mostraram que as DCs de animais suscetíveis e resistentes à PCM apresentaram comportamentos similares principalmente em relação ao número de células, à frequência de marcadores de ativação e de subtipos de DCs após tratamento com 1MT. Entretanto, a ação de IDO traduz-se em inibição precoce (96 h e 2 semanas) de células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ em camundongos B10.A. Em camundongos A/J, IDO parece ter pequeno efeito na proliferação de células T quando são usadas DCs de 96 horas e 2 semanas. Observamos somente um pequeno aumento da população $TCD8^+$. Mais tardiamente, a IDO parece influenciar igualmente a proliferação de células T de camundongos A/J e B10.A. Contudo, na cultura de DCs de 8 semanas tratadas com 1MT houve maior proliferação de células $TCD4^+$ somente na linhagem resistente.

Por outro lado, no inicio da infecção os camundongos A/J são tolerantes ao crescimento fúngico e isso pode ser devido ao grande número de células T reguladoras induzidas pela expressão de IDO, que impedem o desenvolvimento da imunidade celular. O controle parcial do fungo, entretanto, pode ser mediado por IDO, uma vez que a sua inibição leva a cargas fúngicas maiores.

O nosso trabalho permitiu caracterizar a função da IDO na anergia de células T de camundongos suscetíveis e resistentes. Os resultados obtidos sugerem a ação concomitante de IDO e NO participando da anergia precoce de células T de camundongos suscetíveis.

Todos os resultados discutidos neste trabalho mostraram que os fenômenos biológicos do comportamento das DCs frente à infecção de animais A/J e B10.A com *P.brasiliensis* são marcantes e concordaram com aqueles encontrados em trabalho anterior *in vivo*. Em suma, os

achados deste estudo nos levaram a entender que a função catalítica de IDO é um importante mecanismo regulatório que atua tanto na linhagem resistente como suscetível, porém é mais importante nesta última.

Estudos realizados por Pallota et al. (2011) demonstraram que DCs plasmacitóides estimuladas por TGF-β apresentam um mecanismo de sinalização mediado por IDO fosforilada que culmina com a síntese sustentada da enzima IDO, IFN-α e IFN-β. Como nossos dados sugeriam que este mecanismo era utilizado por camundongos resistentes, aprofundamos os estudos dos mediadores das sinalizações mediadas por IFN-γ e TGF-β para melhor estabelecer os mecanismos da atividade da IDO na paracoccidiodomicose. A nossa hipótese para esta parte de nosso trabalho era a de que camundongos suscetíveis usavam principalmente a função catalítica de IDO induzida por IFN-γ enquanto que em camundongos resistentes, além da função catalítica, IDO exerceria uma função sinalizadora induzida por TGF-β. Realmente, em nosso modelo de infecção, os animais resistentes são produtores de altos níveis de TGF-β e IDO, além de expandirem grande número de células Tregs. Por outro lado, em animais suscetíveis observamos grande produção de IFN-γ, sugerindo que a via catalítica da IDO induzida por esta citocina era prevalente nesta linhagem.

Já está bem descrito que enquanto respostas agudas inflamatórias são controladas de forma mais eficiente pelo eixo IFN-γ-IDO, a presença de TGF-β é crítica para estabelecer um perfil tolerogênico em DCs plasmacitóides levando-as a gerar e sustentar a função das Tregs através de efeitos combinados da quebra do triptofano em quinureninas atuando sobre as células T via receptores de aril hidrocarboneto (FALLARINO et al., 2002, MEZRICH et al., 2010).

De forma abrangente, estudamos primeiramente os mecanismos envolvidos na atividade catalítica e sinalizadora de IDO em nosso modelo de infecção *in vivo* antes dos estudos diretos com DCs isoladas de camundongos A/J e B10.A. Assim, investigamos se as diferentes funções da IDO induzidas por IFN-γ e TGF-beta manifestavam-se em células totais de pulmão. Foram estudados três tempos de infecção (96 horas, 2 e 8 semanas), em pulmões de camundongos suscetíveis e resistentes infectados, tratados ou não com 1MT.

Verificamos que os animais suscetíveis utilizam preferencialmente a via de sinalização Jak-STAT induzida por IFN-γ, levando à intensa expressão da via catalítica de IDO, que hidrolisa o triptofano para quinureninas e leva à diminuição da proliferação de células T. A inibição de IDO por 1MT levou à diminuição de expressão de IDO, possivelmente em nível pós-transcricional. A expressão marcante de Janus quinases 1 e 2 e STAT1 em células totais

de camundongos B10.A, acrescido da maior expressão de IL-6 e SOCS3 sugerem que em camundongos susceptíveis a degradação de IDO ocorre via proteassomal, induzida por mecanismos pró-inflamatórios. Além disso, o uso de vias sinalizadoras que utilizam fosfatases como as da família das SHIP e SHP ocorre, mas não é intensa em animais suscetíveis. Este fato sugere que nestes animais não existe uma única via de indução de IDO, mas sim uma preferência pela via induzida pelo IFN-γ.

Por outro lado, a produção inata de TGF-β faz com que os animais da linhagem resistente utilizem com forte intensidade a via de sinalização das proteínas SMAD e PI(3)K, que fosforilam resíduos ITIMs da IDO e recrutam fosfatases do tipo SHIP, SHP-1 e SHP2, que promovem a indução da via não canônica do NFkB, desencadeando uma intensa e sustentada expressão de IDO, TGF-beta, IFN-α e IFN-β. Esta cascata de eventos resulta em um *loop* de expressão continuada de TGF-β e IDO que favorece a conversão de células T naive CD4+ em células Treg (PALLOTA et al., 2011). Estes mecanismos puderam ser caracterizados em animais A/J, pela elevada expressão de mRNA encontrada nos genes que compõem essa via de sinalização. Mais ainda, a inibição de IDO por 1MT pouco interferiu nos eventos de sinalização dos animais resistentes, mostrando que a função sinalizadora da IDO tem predominância sobre a via catalítica.

Os resultados obtidos com células totais de pulmões nos levaram a confirmar estes interessantes achados utilizando as DCs purificadas por *beads* magnéticos a partir das células totais do pulmão de camundongos A/J e B10.A, nos tempos de infecção de 96 horas, 2 e 8 semanas, em grupos infectados controle e em grupos infectados tratados com 1MT. Com todos os parâmetros estudados, encontramos resultados consistentes, sugerindo que, como previamente demonstrado *in vitro* por Pallota et al. (2011), em nosso modelo de infecção camundongos resistentes utilizam de forma acentuada a via sinalizadora de IDO enquanto que nos animais suscetíveis há destacada preferência pela via catalítica de IDO como mecanismo de imunoregulação. Enquanto IFN-γ pode ser importante instrumento na geração de células Treg através das funções enzimáticas da IDO, TGF-β sustenta uma forma constitutiva de expressão da enzima IDO na interface entre DCs e células T reguladoras (FALLARINO; GROHMANN; PUCCETTI, 2012) Este fato é original e, no nosso conhecimento, nunca foi descrito em modelo de resposta imune a patógeno. Mais ainda, nossos resultados demonstram que, inesperadamente, funções tolerogênicas de DCs estão envolvidas com mecanismos de resistência ao fungo, enquanto que mecanismos pró-inflamatórios estão associados com susceptibilidade.

Em conjunto, os estudos realizados no modelo de susceptibilidade e resistência ao *P.brasiliensis* têm demonstrado que a ativação balanceada do sistema imune é necessária para que ocorra proteção dos hospedeiros e que o excesso da ativação seja ela do tipo pró ou anti-inflamatória leva a doenças graves induzidas pelo fungo (CALICH et al., 2008a,b; PINA et al., 2008). Em camundongos suscetíveis a inativação da imunidade adaptativa ocorre por excessiva atividade pró-inflamatória da imunidade inata, que, entretanto é hábil no controle da carga fúngica inicial. Em camundongos resistentes, ao contrário, observa-se uma atividade tolerogênica inicial mediada por TGF-β que impede o controle inicial do crescimento dos fungos. Esta atividade, entretanto, está balanceada pela síntese acentuada de TNF-α e IL-1β por DCs mielóides que induzem a diferenciação de respostas mistas Th1/Th17, sempre fortemente controladas pela expansão acentuada de células Treg. Este padrão de imunidade adaptativa confere proteção através do controle do crescimento fúngico, mas evita lesão tecidual por excesso de atividade do sistema (CALICH et al., 2008a,b; PINA et al., 2008).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho pudemos verificar que a atividade imunoreguladora da IDO na paracoccidioidomicose pulmonar é mediada, pelo menos em parte, pelo controle da expansão e atividade das células dendríticas e subsequente expansão de células T efetoras e T reguladoras.

Assim, utilizando um inibidor da atividade catalítica da enzima IDO pudemos verificar que IDO controla em animais suscetíveis e resistentes ao fungo: a carga fúngica em DCs, a migração e ativação das várias subpopulações de DCs para os pulmões, a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias e a atividade imunogênica das DCs.

Mais ainda, estudando os mediadores envolvidos na indução de IDO mediados por IFN-γ e TGF-β pudemos verificar que em camundongos suscetíveis a síntese de IDO é preferencialmente mediada por IFN-γ. Nestes animais a atividade catalítica da IDO parece ser prevalente sobre a atividade sinalizadora. Já em camundongos resistentes a IDO é preferencialmente mediada por TGF-β. Nestes animais a atividade sinalizadora da IDO parece prevalecer sobre a catalítica.

REFERÊNCIAS*

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition an innate immunity. **Cell**, v. 124. p. 783-801, 2006.

ALEXANDER, A. M.; CRAWFORD, M.; BERTERA, S.; RUDERT, W. A.; TAKIKAWA, O.; ROBBINS, P. D.; TRUCCO, M. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. **Diabetes**, v. 51, p. 356, 2002.

ANDERSSON, J.; TRAN, D. Q.; PESU, M.; DAVIDSON, T. S.; RAMSEY, H.; O'SHEA, J. J.; SHEVACH, E. M. CD4+FoxP3+regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-β-dependent manner. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 1975–1981, 2008.

ANGULO-ORTEGA, A. Calcifications in paracoccidioidomycosis: are they morphological manifestation of subclinal infections? **PAHO Cient. Publ.**, v. 254, p. 129-133, 1972.

ANTIGNANO, F.; HAMILTON, M.; PATTERSON, S.; HO, V.; COHEN, C. SHIP-Deficient Dendritic Cells, Unlike Wild Type Dendritic Cells, Suppress T Cell Proliferation via a Nitric Oxide-Independent Mechanism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21893. 2011.

ARDAVIN, C.; MARTINEZ DEL HOYO, G.; MARTIN, P.; ANJUERE, F.; ARIAS, C. F.; MARIN, A. R.; RUIZ, S.; PARRILLAS, V.; HERNANDEZ, H. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 691-700, 2001.

ARANGO, M.; YARZABAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. **Mycophatologia**, v**.** 79, p**.** 115-123, 1982.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S.; NASCIMENTO, F. R. F.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 185-195, 2002.

ARRUDA, C.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A.; KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; FRANCO, M. F.; CALICH, V. L. G. Dual role of IL-4 in pulmonary paracoccidioidomycosis. Endogenous IL-4 can induce protection or exacerbation of disease depending on the host genetic pattern. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 3932-3940, 2004.

BABAN, B.; PENBERTHY, W. T.; MOZAFFARI, M. S. The potential role of indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO) as a predictive and therapeutic target for diabetes treatment: a mythical truth. **EPMA Journal**, v. 1, p. 46–55, 2010.

BAIDA, H.; BISELLI, P. J. C.; JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G. M.; MENDES-GIANNINI, M. J.; DUARTE, A. J.; BENARD, G. Differential antibody isotype expression to

[2]De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 273-278, 1999.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-252, 1998.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BARBUTO, J. A. M. **Imunoterapias e vacinas**. In: Oncologia Molecular. Eds: Ferreira, C.G. & Rocha, J.C.; Editora Atheneu, São Paulo, Brasil, p. 102-112, 2004.

BEATTY, W. L.; BYRNE, G. I.; MORRISON, R. P. Morphologic and antigenic characterization of interferonγ-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 3998, 1993.

BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 353-360, 2005.

BLUESTONE, J. A.; ABBAS, A. K. Natural versus adaptative regulatory T cells. Nat. Rev. **Immunol.**, v. 3, p. 253-257, 2003.

BOASSO, A.; SHEARER, G. M. How does indoleamine 2,3-dioxygenase contribute to HIV-mediated immune dysregulation. **Curr. Drug. Metab.**, v.8, p. 217–223, 2007.

BOCCA, A. L.; HAYASSHI, E. E.; PINHEIRO, A. G.; FURIANETTO, A. B.; CAMPANELLI, A. P.; CUNHA, F. Q.; FIGUEIREDO, F. Treatment of *paracoccidioides brasiliensis*-infected mice with a nitric oxide inhibitor prevents the failure of cell-mediated immune response. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3056–3063, 1998.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, v.2, p. 907-916, 2001.

BOEHME, S. A., LENARDO, M. J. Propriocidal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle. **Eur. J. Immunol.**, v.7, p. 1552-1560, 1993.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v.19, p. 311-315, 2003.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 89, 1993.

BRUMMER, E.; STEVENS, D,A. Macrophage colony-stimulating factor induction of enhanced macrophage anticryptococcal activity: synergy with fluconazole for killing. **J. Infect. Dis.**, v.1, p. 173-179, 1994.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 585-594, 1985.

CALICH, V. L. G.; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623, 1998.

CALICH, V. L. G.; PINA, A.; FELONATO, M.; BERNARDINO, S.; COSTA, T. A.; LOURES, F. V. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR2, TLR4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1-7, 2008.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 1777-1783, 1995.

CANO, L. E.; KASHINO, S. S.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D.; XIDIEH, C. F.; SINGER-VERMES, L. M.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 800-806,1998.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; MENGEL, J. A.; XIDIEH, C. F.; ARRUDA, C.; ANDRÉ, D. C.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Depletion of CD8+ T cells in vivo impairs host defense of resistant and susceptible mice to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 352-359, 2000.

CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PAPPAGIANIS, D.; STEVENS, D. A. Impairment of cellular but not humoral immune response in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1771-1777, 1988.

CHEN, W.; LIANG, X.; PETERSON, A. J.; MUNN, D. H.; BLAZAR, B. R. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. **J. Immunol.**, v. 181, n. 8, p. 5396-5404, 2008.

CHIARELLA, A. P.; ARRUDA, C.; PINA, A.; COSTA, T. A.; FERREIRA, R. C.; CALICH, V. L. The relative importance of CD4+ and CD8+T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 9, p. 1078-1088, 2007.

CHOI, B. K.; ASAI, T.; VINAY, D. S.; KIM, Y. H.; KWON, B. S. 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. **Cytokine**, v. 34, p. 233–242, 2006.

CIRRINCIONE, C.; PIMPINELLI, N.; ORLANDO, L.; ROMAGNOLI, P. Lamina propria dendritic cells express activation markers and contact lymphocytes in chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 45-52, 2002.

CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 17, n. 206, 667-673. 1995.

CURTI. A.; TRABANELLI, S.; ONOFRI, C.; ALUIGI, M.; SALVESTRINI, V.; OCADLIKOVA, D.; CURTI, E. C.; RUTELLA, S.; DE CRISTOFARO, R.; OTTAVIANI, E.

Indoleamine 2,3 dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair leukemia specific immune response by inducing potent T regulatory cells. **Haematologica**, v. 95, p. 2022, 2010.

DARO, E.; PULENDRAN, B.; KENNETH, B.; TEEPE, M.; PETTIT, D.; LYNCH, D. H.; MALISZEWSKI, C. R.; MARASKOVSKY, E. Polyethylene Glycol-Modified GM-CSF Expands $CD11b^{high}CD11c^{high}$ But Not $CD11b^{low}CD11c^{high}$ Murine Dendritic Cells In Vivo: A Comparative Analysis with Flt3 Ligand. **J. Immun.**, v. 165, p. 49–58, 2000.

DE CARVALHO, M. G.; RODRIGUES, M. A.; MARQUES, M. E.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. [Lesions of the gastrointestinal tract in acquired immunodeficiency syndrome: study of 45 consecutive necropsies]. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, n. 3, p. 135-141, 1994.

DE HEER, H. J.; HAMMAD, H.; SOULLIÉ, T.; HIJDRA, D.; VOS, N.; WILLART, M. A. M.; HOOGSTEDEN, H. C.; LAMBRECHT, B. N. Essential Role of Lung Plasmacytoid Dendritic Cells in Preventing Asthmatic Reactions to Harmless Inhaled Antigen. **J. Exp. Med.**, v. 200, n. 1, p. 89-98, 2004.

DE LUCA, A.; MONTAGNOLI, C.; ZELANTE, T.; BONIFAZI, P.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; D'ANGELO, C.; VACCA, C.; BOON, L.; BISTONI, F. Functional yet balanced reactivity to Candida albicans requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. **J. Immunol.**, v. 179, p. 5999–6008, 2007.

DE LUCA, A.; MONTAGNOLI, C.; ZELANTE, T.; BONIFAZI, P.; BOZZA, S.; MORETTI, S.; D'ANGELO, C.; VACCA, C.; BOON, L.; BISTONI, F. IL-22 and IDO1 Affect Immunity and Tolerance to Murine and Human Vaginal Candidiasis. **PLoS Pathog.**, v. 7, p. e1003486, 2013.

DEMEDTS, I. K.; BRUSSELLE, G. G.; VERMAELEN, K. Y.; PAUWELS, R. A. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 32, n. 3, p. 177-184, 2005.

DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; BERCHTOLD, S.; BERGER, T.; SCHULER, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4+CD25+T cells with regulatory properties from human blood. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1303-1310, 2001.

FALLARINO, F., VACCA, C., ORABONA, C., BELLADONNA, M. L., BIANCHI, R., MARSHALL, B., KESKIN, D. B., MELLOR, A.L., FIORETTI, M. C., GROHMANN, U., PUCCETTI, P. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8a+ dendritic cells. **Int. Immunol.**, v. 14, p. 1206, 2002.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; HWANG, K. W.; ORABONA, C.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M. L.; FIORETTI, M. C.; ALEGRE, M. L.; PUCCETTI, P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 1206, 2003.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; YOU, S.; MCGRATH, B. C.; CAVENER, D. R.; VACCA, C.; ORABONA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M. L.; VOLPI, C. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell

receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 6752–6676, 2006.

FALLARINO F, GROHMANN U, PUCCETTI P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function. **Eur. J. Immunol.**, v. 8, p. 932-937, 2012.

FAVA NETTO, C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. **Arq. Cir. Clin. Exp.**, v. 18, p. 197-254, 1955.

FAZIOLI, R. A. **Paracoccidioidomicose experimental murina, estudo da proliferação e da contribuição de células TCD4$^+$ e TCD8$^+$ na resposta imune de camundongos resistentes e susceptíveis.** Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 1997.

FELONATO, M.; PINA, A.; DE ARAUJO, E. F.; LOURES, F. V.; BAZAN, S. B.; FERIOTTI, C.; CALICH, V. L. Anti-CD25 treatment depletes Treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS One,** v. 7, n. 11, p. e51071, 2012.

FONG, L.; ENGLEMAN, E. G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu. Rev. Immunol.**, v.18, p. 245-273, 2000.
.
FONTENOT, J. D., RUDENNKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.** v.6, n. 4, p. 331-337, 2005.

FRANCO, M. Host parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5, 1987.

FRANCO, M. F.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Baillières Clin. Trop. Med. Comum. Dis.**, v. 4, p. 185-220, 1989.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G.; BENATTI, U.; FERRARA, G. B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J. Exp. Med.**, v**.** 196, p. 459–468, 2002.

GAUTIER, E. L.; HUBY, T.; SAINT-CHARLES, F.; OUZILLEAU, B.; PIRAULT, J.; CHAPMAN, J.; LESNIK, P. Conventional Dendritic Cells at the Crossroads Between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis. **Circulation,** n. 119, p. 2367-2375, 2009.

GONZALEZ, A.; DE GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A.; CANO, L. E. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of interferon-gamma activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2546–2552, 2000.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune responses. **Cell**, v. 111, p. 927-930, 2002.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M. L.; VACCA, C.; ORABONA, C.; UYTTENHOVE, C.; FIORETTI, M. C.; PUCCETTI, P. IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8α+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **J. Immunol.**, v. 167, p. 708, 2001.

GROHMANN, U.; ORABONA, C.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; CALCINARO, F.; FALORNI, A.; CANDELORO, P.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; FIORETTI, M. C.; PUCCETTI, P. **Nat. Immunol.,** v. 3, p. 1097–1101, 2002.

GROHMANN, U.; F. FALLARINO, F.; PUCCETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends Immunol**., v. 24, p. 242, 2003.

HART, D. N. J. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **J. Amer. Soc. Hematol.**, v. 90, p. 3245-3287, 1997.

HAYASHI, T.; BECK, L.; ROSSETTO, C.; GONG, X.; TAKIKAWA, O.; TAKABAYASHI, K.; BROIDE, D. H.; CARSON, D. A.; RAZ, E. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 270–279, 2004.

HAYASHI, T.; RAO, S. P.; TAKABAYASHI, K.; VAN UDEN, J. H.; KORNBLUTH, R. S.; BAIRD, S. M.; TAYLOR, M. W.; CARSON, D. A.; CATANZARO, A.; RAZ, E. Enhancement of innate immunity against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6156, 2001.

HAYASHI, T.; BECK, L.; ROSSETTO, C.; GONG, X.; TAKIKAWA, O.; TAKABAYASHI, K.; BROIDE, D. H.; CARSON, D. A.; RAZ, E. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2, 3-dioxygenase. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 270–279, 2004.

HIBBS, J. B.; VAVRIN, Z. JR.; TAINTOR, R. R. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **J. Immunol.**, v. 138, p. 550-565, 1987.

HIBBS, J.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. JR.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 157, p. 87-94, 1988.

HOSHI, M.; SAITO, K.; HARA, A.; TAGUCHI, A.; OHTAKI, H.; TANAKA, R.; FUJIGAKI, H.; OSAWA, Y.; TAKEMURA, M.; MATSUNAMI, H.; ITO, H.; SEISHIMA, M. The absence of IDO upregulates type I IFN production, resulting in suppression of viral replication in the retrovirus-infected mouse. **J. Immunol.**, v. 185, n. 6, p. 3305-3312, 2010.

HUFFNAGLE, G. B.; YATES, J. L.; LIPSCOMB, M. F. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. **J. Exp. Med.**, v. 173, n. 4, p. 793-800, 1991.

HWU, P.; DU, M. X.; LAPOINTE, R.; DO, M.; TAYLOR, M. W.; YOUNG, H. A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3596-3599, 2000.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JOHANNS, T. M.; ERTELT, J. M.; ROWE, J. H.; WAY, S. S. Regulatory T cell suppressive potency dictates the balance between bacterial proliferation and clearance during persistent *Salmonella* infection. **PLoS Pathog.,** v. 6, p. e1001043, 2010.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; SCHULER, G.; KNOP, J.; ENK, A. H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 9, p. 1213-1222, 2000.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; KAKIRMAN, H.; STASSEN, M.; KNOP, J.; ENK, A.H. Infectious tolerance: human CD25+ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4+ T helper cells. **J. Exp. Med.** v. 196, p. 255–260, 2002.

KARHAWI, A. S. K.; COLOMBO, A. L.; SALOMÃO, R. Production of IFN-γ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 225-229, 1999.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; MOSCARDI-BACCHI, M.; FRANCO, M.; SINGER-VERMES, L. M.; CALICH, V. L. G.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L. M**.** In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. **Mycopathologia**, v. 92, p**.** 173-178, 1985.

KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A. C.; BURGER, E.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-γ production. **J. Interf. Cyt. Res.**, v. 20, p. 89-97, 1998.

KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. **Immunol. Lett.**, v. 78, p. 113-122, 2001.

KWIDZINSKI, E.; BUNSE, J.; AKTAS, O. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. **FASEB J.**, v. 19, p. 1347–1349, 2005.

LIU, H.; LIU, L.; LIU, K. Reduced cytotoxic function of effector CD8+ T cells is responsible for indoleamine 2, 3-dioxygenasedependent immune suppression. **J. Immunol.**, v. 183, p. 1022–1031, 2009.

LOGAN, G. J.; SMYTH, C. M.; EARL, J. W. HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immuno-inhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. **Immunology**, v. 105, p. 478–487, 2002.

MACKENZIE, C. R.; HADDING, U.; DAUBENER, W. Interferon-γ-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. **J. Infect. Dis.**, v. 178, p. 875, 1998.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350. 1997.

MATTEOLI, G.; MAZZINI, E.; ILIEV, I. D.; MILETI, E.; FALLARINO, F.; PUCCETTI, P.; CHIEPPA, M.; RESCIGNO, M. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. **Gut**, v. 59, p. 595-604, 2009.

MCEWEN, J.; BEDOYA, V.; PATIÑO, M.; SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 165-175, 1987.

MCWILLIAM, A. S.; NELSON, D.; THOMAS, J. A.; HOLT, P. G. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1331-1336, 1994.

MEDZHITOV, R.; SHEVACH, E. M.; TRINCHIERI, G.; MELLOR, A. L.; MUNN, D. H.; GORDON, S.; LIBBY, P.; HANSSON, G. K.; SHORTMAN, K.; DONG, C.; GABRILOVICH, D.; GABRYŠOVÁ, L.; HOWES, A.; O'GARRA, A. Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 693-702. 2011.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunol. Today**, v. 20, p. 469, 1999.

MELLOR, A. L.; KESKIN, D. B.; JOHNSON, T.; CHANDLER, P.; MUNN, D. H. Cells expressing indoleamine 2,3 dioxygenase inhibit T cell responses. **J. Immunol.**, v. 168, p. 3771, 2002.

MELLOR, A. L., MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 762–774, 2004.

MEZRICH, J.; FECHNER, J. H.; ZHANG, X.; JOHNSON, B. P.; BURLINGHAM, W. J.; BRADFIELD, C. A. An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T cells. **Immunology**, v. 185, p. 3190-3198, 2010.

MIKI, T.; SUN, H.; LEE,Y.; TANDIN, A.; KOVSCEK, A. M.; SUBBOTIN,V.; FUNG, J. J.; VALDIVIA, L. A. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. **Transplant. Proc.**, v. 33, p. 129, 2001.

MILLS, K. H.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Semin. Immunol.**, v. 16, p. 107-117, 2004.

MONTAGNOLI, C.; FALLARINO, F.; GAZIANO, R.; BOZZA, R.; BELLOCCHIO, S.; ZELANTE, T.; KURUP, W. P.; PITZURRA, L.; PUCCETTI, P.; ROMANI, L. Immunity and Tolerance to Aspergillus Involve Functionally Distinct Regulatory T Cells and Tryptophan Catabolism. **J. Immunol.**, v. 176, p. 1712-1723, 2006.

MOTA, N. G.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T.; AUDI, R. C.; MENDES, R. P.; MARCONDES, J.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; FRANCO, M. F. Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 765-772, 1985.

MULLEY, W. R.; NIKOLIC-PATERSON, D. J. Indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation. **Nephrology**, v. 13, p. 204–221, 2008.

MUNN, D. H.; PRESSEY, J.; BEALL, A. C.; HUDES, R.; ALDERSON, M. R. Selective activation-induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages: a potential mechanism of antigen-specific peripheral lymphocyte deletion. **J. Immunol.**, v. 156, p. 523, 1996.

MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; PASHINE, A.; MELLOR, A. L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **J. Exp. Med.,** v. 189, p.1363, 1999.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; LEE, J. R.; JHAVER, K. G.; JOHNSON, T. S.; KESKIN, D. B.; MARSHALL, B.; CHANDLER, P.; ANTONIA, S. J.; BURGESS, R. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science,** v. 297, p.1867, 2002.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; BABAN, B.; HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; RON, D. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. **Immunity**, v. 22, p. 633–642, 2005.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor induced tolerance. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1147–1154, 2007.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends Immunol.**, v**.** 34, n. 3, p. 137-143, 2013.

MURAKAMI, Y.; HOSHI, M.; HARA, A.; TAKEMURA, M.; ARIOKA, Y.; YAMAMOTO, Y.; MATSUNAMI, H.; FUNATO, T.; SEISHIMA, M.; SAITO, K. Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates Toxoplasma gondii replication in the lung during acute infection. **Cytokine**, v. 59, n. 2, p. 245-251, 2012.

NGUYEN, N. T.; KIMURA, A.; NAKAHAMA, T.; CHINEN, I.; MASUDA, K.; NOHARA, K.; FUJII-KURIYAMA, Y.; KISHIMOTO, T. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 107, n. 46, p.19961-6, 2010.

NASCIMENTO, F. R.; CALICH, V. L. G.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.

NEVES, A. R.; ENSINA, L. F. C.; ANSELMO, L. B.; LEITE, K. R. M.; BUZAID, A. C.; CÂMARA-LOPES, L. H.; BARBUTO, J. A. M. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids

express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, p. 61-66, 2004.

O'GARRA, A.; TRINCHIERI, G. Are dendritic cells afraid of commitment? **Nat. Immun.** v. 5, n.12, 2004.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat. Med.**, v. 10, p. 801-5, 2004.

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAIORDANOU, P. M. O.; BLOTTA, M. H. S. L. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adults forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microb. Infect.**, v. 4, p. 139-144, 2002.

ORABONA, C.; BELLADONNA, M. L.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; FALLARINO, F.; VOLPI, C.; GIZZI, S.; FIORETTI, M. C.; GROHMANN, U.; PUCCETTI, P. Cutting edge: silencing suppressor of cytokine signaling 3 expression in dendritic cells turns cd28-ig from immune adjuvant to suppressant. **J. Immunol.**, v. 174, p. 6582–6586, 2005.

ORABONA, C.; BELLADONNA, M. L.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; FALLARINO, F.; VOLPI, C.; GIZZI, S.; FIORETTI, M. C.;GROHMANN, U.; PUCCETTI, P. Cutting edge: silencing suppressor of cytokine signaling 3 expression in dendritic cells turns cd28-ig from immune adjuvant to suppressant. **J. Immunol.**, v. 174, p. 6582–6586, 2006.

ORISS, T. B.; OSTROUKHOVA, M; SEGUIN-DEVAUX, C.; DIXON-MCCARTHY, B.; YANG, L.; AMEREDES, B.; CORCORAN, T.; RAY, A. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4+ T cells expressing membrane-bound TGF-β and FOXP. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 1, p. 28–38, 2005.

PALLOTTA, M. T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; VACCA, C.; BELLADONNA, M.; BIANCHI, R.; SERVILLO, G.; BRUNACCI, C.; CALVITTI, M.; BICCIATO, S.; MAZZA, E. M. C.; GRASSI, F.; FIORETTI, M. C.; FALLARINO, F.; PUCCETTI, P.; GROHMANN, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nat. Immun.**, v. 12, p. 870–878, 2011.

PARK, C. Y.; YANG, S. H.; CHUCK, R. S.; GEHLBACH, P. L.; PARK, C. G. The Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Retinal Pigment Epithelial Cell-mediated Immune Modulation. **Ocul. Immunol. Inflamm.**, v. 18, n.1, p. 24–31, 2010.

PERIASAMY, S.; SINGH, A.; SAHAY, B.; RAHMAN, T.; FEUSTEL, P. J.; PHAM, G. H.; GOSSELIN, E. J.; SELLATI, T. J. Development of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells favors exponential bacterial growth and survival during early respiratory tularemia. **J. Leukoc. Biol.**, v. 90, n. 3, p. 493-507, 2011.

PFEFFERKORN, E. R. Interferon γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 81, p. 908, 1984.

PINA, A.; SALDIVA, P. H.; RESTREPO, L. E.; CALICH, V. L. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J. Leukoc. Biol**., v. 79, n. 6, p. 202-213, 2006.

PINA, A.; BERNARDINO, S.; CALICH, V. L. G. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial Paracoccidioides brasiliensis infection. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, p. 1088-1099, 2008.

PINA, A., FELONATO, M.; LOURES, F. V.; BERNARDINO, S.; BARBUTO, J. A.; CALICH, V. L. G. Myeloid dendritic cells (DCs) of mice susceptible to paracoccidioidomycosis suppress T cell responses whereas myeloid and plasmacytoid DCs from resistant mice induce effector and regulatory T cells. **Infect. Immun.** v. 81, n. 4, p.1064-1077, 2013.

RAVISHANKAR, B.; LIU, H.; SHINDE, R.; CHANDLER, P.; BABAN, B.; TANAKA, M.; MUNN, D. H.; MELLOR, A.; KARLSSON, M. C. I.; MCGAHA, T. L. Tolerance to apoptotic cells is regulated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 109, n. 10, p. 3909-3914, 2012.

REIS E SOUSA, C. Activation of dendritic cells: translating innate to adaptative immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, p. 21-25, 2004.

RESTREPO, A.; ROBLEDO, M.; GUTIERREZ, F.; SANCLEMENTE, M.; CASTANEDA, E.; CALLE, G. Paracoccidioidomycosis, (South American blastomycosis). A study of 39 cases observed in Medellin, Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 19, p. 68-76, 1970.

RESTREPO, A. The ecology of P. brasiliensis: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23. p. 323-334, 1985.

ROMANI, N.; GRUNER, S.; BRANG, D.; KAMPGEN, E.; LENZ, A.; TROCKENBACHER, B.; KONWALINKA, G.; FRITSCH, P.O.; STEINMAN, R. M.; G. SCHULER. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 83-93. 1994.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; PUCETTI, P.; BISTONI, F. Neutrophils production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 Therapy in neutropenic mice. **J. Immunol.**, v. 158, p. 5349, 1997.

ROMANI, L.; BOZZA, S.; FALLARINO, F.; PITZURRA, L.; ZELANTE, T.; MONTAGNOLI, C.; BELLOCCHIO, S.; MOSCI, P.; VACCA, C.; PUCCETTI, P. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/Candida albicans interface. **J. Immunol.**, v. 174, p. 2910-2918, 2005.

ROTTENBERG, M. E.; GIGLIOTTI-ROTHFUCHS, A.; WIGZELL, H. The role of IFN-γ in the outcome of chlamydial infection. **Curr. Opin. Immunol**. v. 14, p. 444, 2002.

SAKURAI, K.; ZOU, J. P.; TSCHETTER, J. R.; WARD, J. M.; SHEARER, G. M. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Neuroimmunol**., v. 129, p. 186–96, 2002.

SANNI, L. A.; THOMAS, S. R.; TATTAM, B. N.; MOORE, D. E.; CHAUDHRI, G.; STOCKER, R.; HUNT, N. H. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along

the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria. **Am. J. Pathol.**, v. 152, p. 611, 1998.

SCHROECKSNADEL, K.; ZANGERLE, R.; BELLMANN-WEILER, R.; GARIMORTH, K.; WEISS, G.; FUCHS, D. Indoleamine-2,3-dioxygenase and other interferon-gamma-mediated pathways in patients with human immunodeficiency virus infection. **Curr. Drug. Metab.**, v. 8, p. 225–236, 2007.

SEDLMAYR, P.; BLASCHITZ, A.; WINTERSTEIGER, R. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in human female reproductive organs and the placenta. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 8, p. 385, 2002.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat.Rev. Immunol.**, v. 2, p.151, 2002.

SILVA, N. M.; RODRIGUES, C. V.; SANTORO, M. M.; REIS, L. F.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; GAZZINELLI, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with Toxoplasma gondii: induction by endogenous interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 859, 2002.

SINGER-VERMES, L. M.; CALDEIRA, C. B.; BURGER, E.; CALICH, V. L. G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 94, p. 75-79, 1993.

SOUTO, J. F.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-γ and tumor necrosis factor-α determines resistance to Paracoccidioides brasiliensis infection. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p. 1811–1820, 2000.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v. 137, p. 1142-1162, 1973.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol.**, v. 21, p. 685–711, 2003.

SUZUKI, S.; HONMA, K.; MATSUYAMA, T.; SUZUKI, K.; TORIYAMA, K.; KUMATORI, A. Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8 dendritic cell development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.101, n. 24, 8981–8986, 2004.

TAYLOR, M. W.; FENG, G. Relationship between interferon-γ, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. **FASEB J**., v. 5, p. 2516, 1991.

THOMAS, S. R.; STOCKER, R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. **Redox Rep.**, v. 4, p. 199–220, 1999.

UYTTENHOVE, C.; PILOTTE, L.; THEATE, I. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Nat. Med.**, v. 9, p. 1269, 2003.

WU, L.; LIU, Y. J. Development of Dendritic-Cell Lineages. **Immunity**, v. 26, p. 741-750, 2007.

XIA, W. J.; PINTO, C. E.; KRADIN, R. L. The antigen-presenting activities of Ia+ dendritic cells shift dynamically from lung to lymph node after an airway challenge with soluble antigen. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 1275-1283, 1995.

YUAN, W.; COLLADO-HIDALGO, A.; YUFIT, T.; TAYLOR, M.; VARGA, J. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. **J. Cell Physiol.**, v. 177, p. 174-186, 1998.

WANG, Y.; YANG, B. H.; LI, H.; CAO, S.; REN, X. B.; YU, J. P. IDO(+) DCs and signalling pathways. **Curr. Cancer Drug. Targets**, v. 3, p. 278-288, 2013.

ZELANTE, T.; FALLARINO, F.; BISTONI, F.; PUCCETTI, P.; ROMANI, L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. **Microbes Infect.**, v. 11, p. 133-141, 2009.