

NAYANE ALVES DE LIMA GALDINO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS NA
IMUNOMODULAÇÃO DA PARACOCCIDIOMICOSE PULMONAR
ESTABELECIDADA**

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

São Paulo

2017

NAYANE ALVES DE LIMA GALDINO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS NA
IMUNOMODULAÇÃO DA PARACOCCIDIOMICOSE PULMONAR
ESTABELECIDADA**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr^a. Vera Lúcia Garcia Calich

Versão original

São Paulo

2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Alves de Lima Galdino, Nayane
AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS NA
IMUNOMODULAÇÃO DA PARACOCCIDIOMICOSE PULMONAR
ESTABELECIDADA / Nayane Alves de Lima Galdino;
orientadora Vera Lúcia Garcia Calich; coorientador
Flávio Vieira Loures. -- São Paulo, 2017.
78 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Imunologia. 2. Micologia. 3. Doenças
Infecciosas. 4. Imunomodulação do sistema imune. I.
Garcia Calich, Vera Lúcia, orientador. II. Vieira
Loures, Flávio, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Nayane Alves de Lima Galdino

Título da Dissertação: Avaliação do papel das células T reguladoras na imunomodulação da paracoccidiodomicose pulmonar estabelecida

Orientador: Prof. Dr^a. Vera Lúcia Garcia Calich

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado (a)

Reprovado (a)

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:.....

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.044.2016

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 180/2011/CEUA, datado de 07/12/2011, renovado até 07/12/2019, e por solicitação da Profa. Dra. **Vera Lúcia Garcia Calich**, do Departamento de Imunologia, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Nayane Alves de Lima Galdino** ao Projeto de Pesquisa "*Paracoccidioidomycose pulmonar. Fatores do fungo e do hospedeiro que influenciam a resposta imune e a gravidade da doença*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 03 de maio de 2016.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-Coordenadora da CEUA-ICB/USP

**Aos meus pais, por toda a fé e investimento
que depositaram em mim ao longo desses
anos.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, aquele que me concedeu a força necessária para subir todos os degraus até agora;

Aos meus pais Neuma e Filho, que são minha base, meu ponto de apoio em qualquer momento da minha vida. Muito obrigada por todas as palavras de ânimo e pela grande dedicação a mim e a minha carreira;

À toda minha família, pelo incentivo e pelos exemplos, por me passarem tão claramente todos os seus princípios, os quais formaram meu caráter;

À Prof^ª. Dr^ª Vera Calich, minha orientadora, por me acolher em seu laboratório, sobretudo pelo apoio, confiança e tempo dedicados a este trabalho. Sou muito grata por ter convivido e aprendido tanto com uma pessoa de tamanha sabedoria;

Ao meu co-orientador, Dr. Flávio Loures pelo melhor dos presentes: sua dedicação. Obrigada por toda a ajuda durante este período de aprendizado, pelas dicas, sugestões e orientações na minha vida acadêmica, profissional e pessoal.

Ao meu namorado André Carvalho, por ter caminhado junto comigo, seja na vitória ou na queda. Você é um exemplo de esforço e dedicação que me faz ser melhor a cada dia. Palavra nenhuma é capaz de expressar tamanha gratidão por ter uma pessoa tão maravilhosa ao meu lado. Que continuemos caminhando juntos com amor e respeito, para que possamos conquistar ainda mais os nossos objetivos.

À Camila, Carolzinha e Taís, por terem me acompanhado dentro e fora da USP. Sou grata por todas as experiências que vivemos e ainda viveremos juntas, com alegrias e desesperos compartilhados. Sempre que estamos juntas, renovamos os ânimos e as forças para dar o passo adiante.

Aos meus colegas de laboratório Eliseu Frank, Cláudia Feriotti, Nycolas Preite e a técnica Tânia Costa pelo convívio agradável e toda a ajuda com experimentos. Obrigada também pela companhia durante os almoços e cafés da tarde, regados de boa conversa;

Aos amigos Anne, Larissa, Samuel, Cecili, Diego, Pachelle e Gabi, por todo o companheirismo, mesmo a tantos quilômetros de distância. A torcida de vocês pelo meu sucesso é sempre muito gratificante. Em especial ao meu amigo Zé Rogério,

que sempre tem um ombro amigo infalível e palavras de força seguidas de valiosos conselhos. Obrigada pela melhor amizade de todas! Aprendi muito com todos vocês e admiro a cada um de forma única;

Às minhas irmãs Patrícia, Luísa, Isabela, Roberta e Beatriz e meu irmão Eduardo, por acreditarem em mim mais do que eu mesma. Sou grata por todo apoio e amor. Vocês fazem parte de cada conquista;

À minha banca de qualificação: Prof. Dr. Alexandre Basso, Prof^a Dr^a Alessandra Pontillo e Prof. Dr. Carlos Taborda, por todas as dicas e sugestões na qualificação, em especial à Prof^a Alessandra, pela orientação durante o PAE e todos os bons momentos dentro e fora de seu laboratório. Uma bênção ter sido orientada por esta excelente profissional, sobretudo uma orientadora amorosa e amiga.

Ao Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo e todos os funcionários, por me proporcionarem uma experiência única durante o mestrado;

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento durante o mestrado de Nayane Alves de Lima Galdino, nº USP 9374741, projeto de pesquisa de nº 830656/1999-5 e processo 130194/2015-8.

"O conhecimento nos faz responsáveis"

(Che Guevara)

RESUMO

GALDINO, N. A. L. **Avaliação do papel das células T reguladoras na imunomodulação da paracoccidiodomicose pulmonar estabelecida.** 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

Recentemente tem sido demonstrada a grande importância dos linfócitos T reguladores (Treg, T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) na manutenção da tolerância a auto antígenos e no controle da resposta imune em diversas infecções que, quando excessiva, pode levar a intensa patologia tecidual. Em vários modelos de doenças infecciosas, a ação das células Treg tem sido associada com efeitos deletérios por sua atividade supressora sobre a imunidade efetora, embora em outros modelos estes efeitos têm sido considerados protetores por controlar a inflamação excessiva e patologia tecidual. Na paracoccidiodomicose (PCM), micose sistêmica mais frequente na América Latina causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), a atuação das células Treg tem sido recentemente estudada e o seu papel na infecção vem sendo gradativamente elucidado. Este estudo teve como propósito caracterizar o efeito modulador da depleção de células Treg em fase de doença já estabelecida. Para tanto, foram utilizados camundongos C57BL/6 transgênicos para a expressão do receptor de toxina diftérica (DTR) e GFP (“green fluorescent protein”) sob a influência do gene FoxP3, fator de transcrição característico das células Treg. A depleção foi realizada através do tratamento de camundongos C57BL/6^{DTR/eGFP} (DEREG) com toxina diftérica na doença já estabelecida (3 semanas após a infecção intratraqueal com um milhão de leveduras). A gravidade da doença foi avaliada 6 e 10 semanas após a infecção através da caracterização da carga fúngica nos tecidos, desenvolvimento de imunidade TCD8⁺ e TCD4⁺ (Th1/Th2/Th17) e histopatologia. No período de infecção analisado, os animais DEREG tratados com a toxina diftérica apresentaram menor número de células Treg associado com menor carga fúngica no pulmão, fígado e baço, além de menor lesão tecidual e redução dos granulomas do que os camundongos controle (infectados e tratados com salina). Além disso, foi possível observar um maior influxo de células TCD4⁺ e TCD8⁺ efetoras nos pulmões dos camundongos tratados com DT acompanhado de aumento significativo na produção de citocinas dos tipos Th1 e Th17 em relação aos animais controle. Desta forma, os dados obtidos demonstram pela primeira vez os efeitos benéficos da depleção das células T reguladoras na PCM já estabelecida, visto que todos os parâmetros analisados demonstraram uma melhora da doença, como caracterizado pela menor carga fúngica e maior ativação da imunidade TCD4⁺ e TCD8⁺. Mais importante, estes achados abrem a perspectiva de tratamento imunoterápico em PCM, que só é diagnosticada quando já está estabelecida, através do controle do número e/ou função das células T reguladoras.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose. T reguladoras. DEREG. Imunomodulação

ABSTRACT

GALDINO, N. A. L. **Immunomodulatory function of regulatory T cells during pulmonary paracoccidioidomycosis.** 2017. 78 f. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

The importance of regulatory T cells (Treg) in maintaining tolerance to self antigens and controlling the immune response in various infections has been recently demonstrated. In many infectious diseases, Treg cells suppressive activity of the effector immune response has been associated with deleterious effects, however in other models this activity has been considered protective in order to control excessive inflammation and tissue pathology. In paracoccidioidomycosis (PCM), the most frequent systemic mycosis in Latin America caused by *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), the role of Treg cells role in the infection has been recently studied. We used C57BL/6 transgenic mice for expression of the diphtheria toxin receptor (DTR) and GFP ("green fluorescent protein") under the influence of FoxP3 gene transcription factor, which is characteristic of Treg cells. Depletion was performed by treatment of C57BL/6^{DTR/eGFP} (DEREG) mice with diphtheria toxin after 3 weeks of infection with a million yeast by intratracheal surgery. Disease severity was assessed 6 weeks after the infection by characterizing the tissue fungal burden, CD8⁺ immune development, CD4⁺ (Th1/Th2/Th17) and histopathology. Over the infection period, DEREG mice treated with diphtheria toxin showed smaller number of Treg cells, which was associated with a lower fungal burden in the lung, liver and spleen, less tissue damage and reduced granulomas when compared to control mice (infected and treated saline). Additionally, we observed a greater influx of CD4⁺ and CD8⁺ effector cells in the lungs of DEREG mice followed by significant increase in cytokine production in Th1 and Th17 cell types when compared to control animals. Thus, this data indicates beneficial effects of depletion of regulatory T cells in PCM already established, for the first time. All results showed an improvement of the disease characterized by decreased in fungal burden and increased activation of CD4⁺ immunity and CD8⁺. More importantly, these findings highlight a immunotherapeutic treatment perspective for established PCM through immunomodulation of Treg cells, controlling the number and function of these population.

Keywords: Paracoccidiomycosis. Treg cells. DEREG. Immunomodulation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Morfologia de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Figura 2 - Distribuição geográfica da endemicidade da PCM no Brasil.

Figura 3 - Caracterização de protocolo de depleção de células Treg usando camundongos Dereg.

Figura 4 - Restabelecimento das células Treg após a depleção com toxina diftérica em camundongos Dereg.

Figura 5 - Análise da cinética de restabelecimento das células Treg de camundongos Dereg.

Figura 6 - Análise histopatológica após depleção crônica de células Treg em camundongos Dereg.

Figura 7 - Análise da frequência de células T reguladoras e de seus marcadores de superfície após tratamento com toxina diftérica.

Figura 8 - Análise dos marcadores de superfície após três semanas de tratamento com toxina diftérica.

Figura 9 - A depleção das células Treg diminui a carga fúngica nos órgãos-alvo.

Figura 10 - Histopatologia dos órgãos-alvo dos camundongos infectados com *P. brasiliensis* tratados com DT ou PBS (controle).

Figura 11 - Quantificação da área da lesão dos camundongos tratados com DT e PBS, 6 e 10 semanas após a infecção.

Figura 12 - Avaliação da frequência de macrófagos e células dendríticas pós-depleção de células Treg com DT.

Figura 13 - A depleção de células Treg no curso da infecção de camundongos Dereg resgata a imunidade mediada por macrófagos e células dendríticas.

Figura 14 - Quantificação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados em pulmões de camundongos tratados DT ou PBS.

Figura 15 - Quantificação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺naive e efetores/memória em pulmões de camundongos tratados DT ou PBS.

Figura 16 - Expressão relativa de mRNA nos pulmões de camundongos Dereg após o tratamento com DT.

Figura 17 - Balanço da resposta celular Th1/Th2/Th17 no pulmão induzida pela depleção das células Treg após 6 e 10 semanas de infecção.

Figura 18 - Balanço da resposta celular Th1/Th2/Th17 no fígado induzida pela depleção das células Treg após 6 e 10 semanas de infecção.

Figura 19. Balanço da resposta celular Th1/Th2/Th17 no baço induzida pela depleção das células Treg após 6 e 10 semanas de infecção.

Figura 20. Perfil celular Th1/Th2/Th17 induzido pela depleção das células Treg.

Figura 21. A depleção das células Treg aumenta o tempo de sobrevivência de animais DREG.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac – anticorpo

i.p. – intraperitoneal

i.t. – intratraqueal

IL – interleucina

INF – interferon

LPS – lipopolissacarídeo

MyD88 – do inglês *myeloid differentiation primary response gene 88*

NFκB – fator nuclear κB

PBS – *phosphate-buffered saline*

SFB – soro fetal bovino

STAT – sinal ativador e transdutor de transcrição

TLR – receptores do tipo toll

TNF-α – fator de necrose tumoral α

PCM – Paracoccidiodomicose

TGF-β – Fator de transformação do crescimento β

Gp – Glicoproteína

Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*

kDa – KiloDaltons

SNC – Sistema nervosa central

PCR – Reação da polimerase em cadeia

RT-PCR – Reação da polimerase em cadeia em tempo real

HE – Hematoxilina e eosina

PAS – Ácido periódico de Schiff

HTT – Hipersensibilidade do tipo tardia

Treg – Células T reguladoras

NO – óxido nítrico

pDCs – Células dendríticas plasmocitóides

Dcs – Células dendríticas convencionais

IDO – Indoleamina-2,3- dioxigenase

Th – Linfócitos T auxiliares, ou do inglês, *T helper*

GITR – Receptor da Família do TNF Induzido por Glicocorticoide

CTLA-4 – Antígeno 4 do linfócito T citotóxico

APCs – Células apresentadoras de antígeno

nTreg – Célula T reguladora natural

iTreg – Célula T reguladora induzida

OX40 – Membro 4 da superfamília do fator de necrose tumoral

ICOS – do inglês *Inducible T-cell COStimulator*

Tr1 – T reguladora do tipo 1

Th3 – T helper 3

Foxp3 – do inglês Forkhead box P3

DTR – Receptor de toxina diftérica

DT – Toxina diftérica

GFP – do inglês *Green fluorescentprotein*

TLR – Receptores do tipo *Toll*

DEREG – C57BL/6 Foxp3^{DTR/eGFP}

SPF – do inglês *specificpathogenfree*

PBS – Tampão fosfato-salino

pH – Concentração hidrogeniônica

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

USP – Universidade de São Paulo

mg – Miligramas

kg – Quilogramas

µg – Microgramas

µL – Microlitros

mL – Mililitros

PFA –Paraformaldeído

BHI – do inglês *Brainheartinfusion*

RPMI – meio *Roswell Park Memorial Institute*

SFB – Soro fetal bovino

RNA – Ácido ribonucleico

DNA – Ácido desoxirribonucleico

WT – do inglês *Wild type*

Fig. – Figura

Tbx21 –do inglês *T-box transcription factor*

Gata 3 – Fator de transcrição do gene *Gata3*

Rorc – do inglês *RAR-related orphan receptor C*

RSV – Vírus sincicial respiratório

AhR – receptores Aril hidrocarboneto

TCDD – 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p- dioxina

FICZ – 6-formilindol [3,2-b] carbazol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Paracoccidiodomicose (PCM)	18
1.1.1 <i>Epidemiologia</i>	20
1.1.2 <i>Aspectos clínicos e diagnóstico</i>	21
1.1.3 <i>Resposta imune na paracoccidiodomicose</i>	23
1.2 Células T Reguladoras	25
1.2.1 <i>Células T reguladoras em doenças infecciosas</i>	27
1.3 Modelo de depleção de células T Reguladoras em camundongos <i>DEREG</i>	29
2 OBJETIVOS GERAIS	31
2.1. Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4 RESULTADOS	36
5 DISCUSSÃO	58
5.1 Principais perspectivas	65
6 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	67

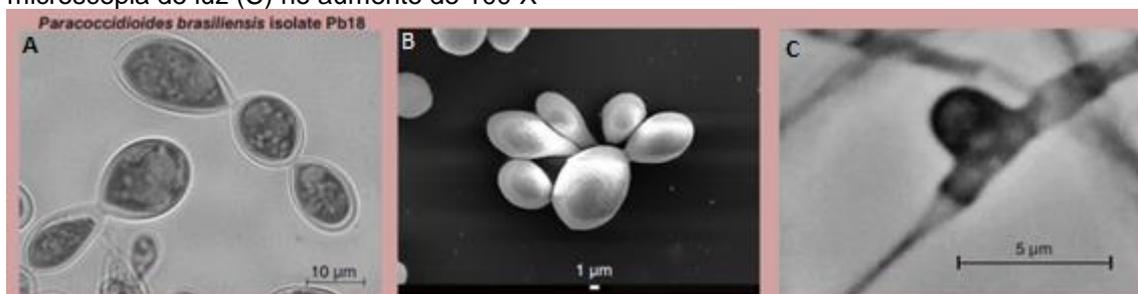
1 INTRODUÇÃO

1.1 Paracoccidioidomicose (PCM)

Paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente na América Latina, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, sendo *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii* os agentes etiológicos atualmente conhecidos desta doença (TEIXEIRA et al., 2009). O *P. brasiliensis*, o agente com maior diretriz de estudos, caracteriza-se como um fungo dimórfico termodependente, de modo que seu crescimento a 25 °C se desenvolve na forma de micélio (forma M) que apresenta hifas finas e septadas, com clamidoconídios terminais ou intercalados (Figura 1-C), enquanto que a 37 °C, nos tecidos infectados e nas secreções do hospedeiro, são encontradas as formas de leveduras arredondadas (forma L), mostrando-se isoladas ou em pequenos agrupamentos de células (Figura 1- A e B) (LACAZ, 1994).

A PCM afeta principalmente os pulmões, sistema reticulo endotelial e áreas mucocutâneas, podendo também se propagar para outros órgãos como linfonodos, fígado e baço (BRUMMER et al., 1993; FRANCO, 1987). Apresenta-se como uma doença predominantemente crônica e granulomatosa, sendo esta a lesão resultante da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT) contra antígenos do fungo, o que impede a disseminação deste pelo organismo promovendo seu controle (ROMANI, 1997).

Figura 1 - Morfologia de *Paracoccidioides brasiliensis*. Leveduras do isolado Pb18 mostradas por microscopia de luz (A) e microscopia eletrônica (B). Ilustração de um conídio de Pb 18 visto por microscopia de luz (C) no aumento de 100 X



(Fonte: Bocca et al., 2013)

Indivíduos que inalam propágulos infectantes, como fragmentos de micélio ou esporos dos fungos, geralmente desenvolvem a infecção, cuja manifestação clínica

depende da virulência da cepa infectante de *P. brasiliensis*, do grau e do tipo de resposta imunológica desencadeada (RESTREPO et al., 2001). Dentre componentes que podem ser considerados fatores de virulência do fungo, o principal componente antigênico do *P. brasiliensis* é uma glicoproteína de superfície da parede fúngica com 43 kDa (gp43), a qual é considerada o antígeno imunodominante associado ao fator de virulência e/ou escape pelo qual o fungo evade os mecanismos de defesa do hospedeiro e se instala nos tecidos. Esta glicoproteína é liberada pelo fungo em sua fase exponencial de crescimento, e acredita-se que sua atuação como um mecanismo de escape do fungo ocorrapor interferir com a resposta humoral do hospedeiro, promovendo a ligação da superfície celular do parasita à laminina, facilitando sua disseminação e invasão nos tecidos (LOPES et al., 1994; VICENTINI et al., 1994). Entretanto, outro trabalho de nosso grupo mostrou resultados opostos, isto é a ligação de laminina ao *P. brasiliensis* leva a infecções menos graves (ANDRÉ et al., 2004). Além da gp43, componentes como a α -(1,3)-glucana encontrada na parede celular fúngica, proteinases, lipases e moléculas de adesão também são considerados importantes fatores de virulência (BAGAGLI et al., 2008). O *P. brasiliensis* também possui melanina em sua parede celular, visto que a melanização é um processo que auxilia no mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro, a melanina também é considerada um componente importante associado à virulência do fungo (TABORDA et al., 2008).

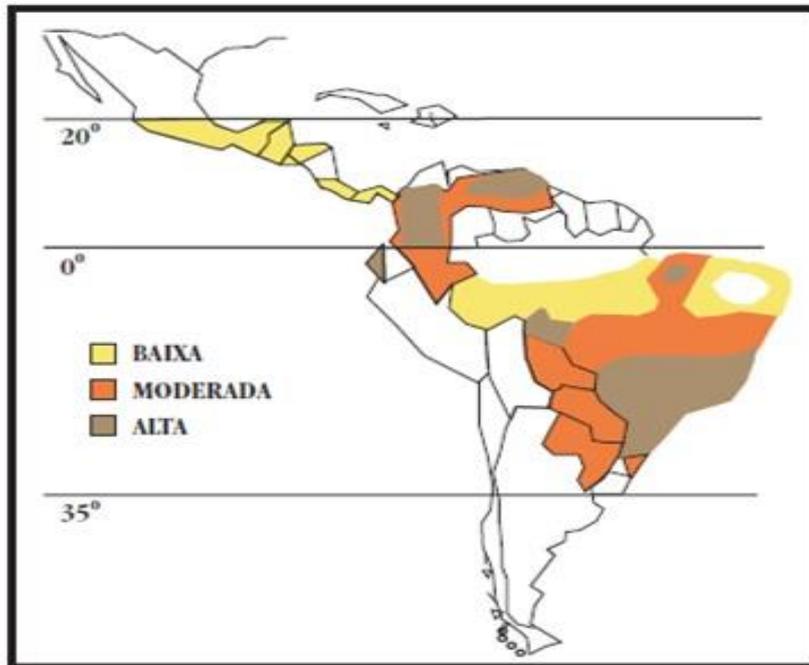
A PCM pode ser classificada em PCM-infecção e PCM-doença, com formas clínicas aguda e subaguda (ou tipo juvenil) e crônica (tipo adulto). A PCM-infecção ocorre em indivíduos de ambos os sexos, aparentemente saudáveis, que residem ou residiram em zona endêmica e que têm reação intradérmica positiva para antígeno de *P. brasiliensis*, porém não há desenvolvimento da doença (FRANCO, 1986). A forma aguda ocorre em aproximadamente 5% dos casos e aparece em algumas semanas ou meses após a infecção com o fungo. Esta forma da doença geralmente afeta crianças e jovens adultos, homens e mulheres em frequências aparentemente parecidas. A forma crônica atinge preferencialmente adultos do sexo masculino, havendo infecção pulmonar com disseminação para outros órgãos e tecidos (RESTREPO, 2001). A PCM-doença é menos frequente nas mulheres do que nos homens, pois devido a presença de hormônios femininos, como o estrógeno, que

impede a transformação do fungo da forma de micélio para a forma leveduriforme infectante (LOOSE et al., 1983).

1.1.1 Epidemiologia

Ao estudar a incidência e propagação da PCM, foi verificado que esta é uma endemia encontrada principalmente na América Central e América do Sul, sendo sua maior prevalência na Argentina, Brasil, Colômbia e Venezuela. Nos últimos anos, casos de PCM têm aparecido nos USA, Europa e Ásia, mas acredita-se que sejam casos importados das Américas (BOCCA et al., 2013).

Figura 2 - Distribuição geográfica da endemicidade da PCM no Brasil.



(Fonte: Shikanai-Yassuda et al., 2006)

No Brasil, a PCM é considerada a oitava causa de mortalidade entre as doenças infecciosas e parasitárias. No período de 1980 a 1995 foram registrados 3.181 casos de óbitos por PCM, resultando em uma taxa média anual de 1,45/milhões de habitantes, havendo registro de óbitos pela moléstia em um quarto dos municípios brasileiros (COUTINHO et al., 2002).

Em estudo mais recente, Coutinho et al. (2015) analisou os registros hospitalares referentes a casos cujo diagnóstico estava relacionado à infecção por *P. brasiliensis*. Um total de 6732 internações por paracoccidioidomicose foram registrados no Brasil entre janeiro de 1998 e dezembro de 2006, com uma média anual de 748 admissões. A taxa de admissão para PCM foi de 4,3 internamentos por

milhão de habitantes, e os casos foram contabilizados em todos os estados do Brasil (COUTINHO et al., 2015).

Uma vez que a notificação dos casos não se dá de forma compulsória, os cálculos de prevalência, incidência e morbidade desta micose baseiam-se em relatos de inquéritos epidemiológicos e de séries de casos. Com base na experiência de serviços de referência no atendimento de pacientes com PCM, acredita-se que sua incidência em zonas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos por 100 mil habitantes/ano (MARTINEZ et al., 2015).

Dentre as regiões brasileiras que são acometidas com casos da doença, os principais estados atingidos são: São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais na região Sudeste; Goiás e Mato Grosso do Sul na região Centro Oeste, e no Sul os principais estados atingidos são Paraná e o Norte do Rio Grande do Sul. Ademais, estados ao longo da fronteira oriental da Região Amazônica, incluindo o Pará, Maranhão e Tocantins, também apresentam um número significativo de casos. Na região Nordeste não foi relatado a incidência de muitos casos devido, além da falta de notificação nesta região como na maioria das regiões do país, ao acesso dificultado aos serviços hospitalares por parte da população rural (Figura 2) (COUTINHO et al., 2015).

O principal fator de risco para aquisição da PCM são as profissões ou atividades relacionadas ao manejo do solo como presença fungo, como por exemplo, atividades agrícolas, preparo de solo, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, entre outros. Em geral, observa-se que a grande maioria dos pacientes exerceu atividade agrícola nas duas primeiras décadas de vida, tendo nessa época provavelmente adquirida a infecção, embora as manifestações surjam em geral muitos anos depois da exposição (SHIKANAI-YASSUDA et al., 2006).

1.1.2 Aspectos clínicos e diagnóstico

A PCM crônica no adulto é a forma de apresentação mais frequente e ocorre predominantemente no sexo masculino, como já descrito anteriormente. Caracteriza-se por uma evolução de vários meses onde predominam a adinamia, emagrecimento, lesões tegumentares e às vezes linfadenopatia. A presença de febre é irregular e em geral pouco intensa, visto que seu surgimento pode ser

decorrente de coinfeções bacterianas como *Mycobacterium tuberculosis* ou outros microrganismos. O pulmão é o órgão mais frequentemente acometido, atingindo entre 80 e 90% dos casos, sua manifestação clínica é muito insidiosa, compreendendo tosse seca, posteriormente produtiva, e dispneia aos esforços (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

As lesões da mucosa oral, faringe e laringe são muito comuns e resultam de disseminação hematogênica do fungo a partir de um foco primário pulmonar e geralmente correlacionam-se com maior gravidade do processo infeccioso. Apresentam aspecto polimórfico e frequentemente são distribuídas na face e em torno de orifícios naturais do corpo, como boca, nariz e ânus (MARTINS et al., 2003). Na boca, nota-se a presença de ulcerações de aspecto moriforme, geralmente acompanhada de sangramento, abaulamento dentário e dor. Lesões de palato mole e faringe causam odinofagia, estado no qual o paciente apresenta emagrecimento e, em geral, apresenta uma piora no quadro clínico. Outros locais frequentemente envolvidos na infecção sistêmica incluem os linfonodos, glândulas suprarrenais, fígado e baço e, ainda em menores proporções, o intestino e o SNC também podem ser atingidos (BRUMMER et al., 1993; FRANCO, 1987). As sequelas mais limitantes desta micose incluem quadros de insuficiência pulmonar crônica, insuficiência adrenal crônica e linfangiectasia com má-absorção intestinal (RESTREPO et al., 2008).

O diagnóstico da PCM pode ser realizado através de diferentes métodos, como exame micológico direto, cultura de *P. brasiliensis*, exames sorológicos, histopatologia e técnicas moleculares por reação em cadeia da polimerase (em inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR) (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA, 2008). Testes sorológicos apresentam resultados mais rápidos quando comparados a exames de cultura e histopatológicos, e são amplamente utilizados na confirmação da doença (BLOTTA et al., 1999). A glicoproteína de 43 kDa (gp43), secretada durante a infecção, é um antígeno detectado em todas as formas clínicas da PCM e reconhecido em diversos testes sorológicos (PUCCIA et al., 1991). No entanto, a cultura e a histopatologia são igualmente recomendados para o diagnóstico conclusivo da doença. Na análise através da biópsia, evidencia-se um granuloma supurativo com aproximadamente 30 µm de diâmetro, geralmente contendo leveduras esporuladas. Para tornar o fungo evidente são empregadas as colorações

de nitrato de prata metenamina (Gomori-Groccott) e PAS (ácido periódico de Schiff) (PALMEIRO et al., 2005).

A inflamação granulomatosa durante a PCM pode assumir padrões que se correlacionam com a resposta imunológica do hospedeiro (MARQUES et al., 2007), podendo representar uma resposta imune específica do tecido parasitado na tentativa de destruir ou formar uma barreira para impedir a multiplicação e disseminação do fungo. O diagnóstico rápido é essencial para a introdução de uma estratégia terapêutica eficaz. O tratamento geralmente é prolongado, com terapias que se estendem de 1 a 2 anos, e as drogas frequentemente usadas no tratamento incluem a anfotericina B, sulfamidas e derivados azólicos. Portanto, com um retardo no diagnóstico e na ausência de terapia com drogas, a doença pode levar a sequelas graves e inclusive ao óbito (HAHN et al., 2003; SANTO, 2008; VALLE et al., 1998).

1.1.3 Resposta imune na paracoccidiodomicose

Dados experimentais e clínicos indicam que tanto a imunidade inata quanto a adaptativa têm um papel fundamental na defesa dos hospedeiros contra a infecção por *P. brasiliensis*, bem como a imunidade humoral, visto que níveis altos de anticorpos e ativação policlonal de linfócitos B estão associados com as formas mais graves da doença (CASTAÑEDA et al., 1988).

Com o intuito de estudar os aspectos clínicos da PCM do ponto de vista imunológico, foi proposto por Calich et al. (1985) um modelo murino isogênico de PCM, onde camundongos A/Sn apresentavam uma resposta imune que confere resistência frente à infecção por *P. brasiliensis* e susceptibilidade em camundongos B10.A. Neste caso, a linhagem B10.A mimetiza a doença humana grave e progressiva, onde apresenta uma ineficiente ativação dos macrófagos e desenvolve positividade discreta ou total anergia nas reações de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT). De modo oposto, a linhagem A/Sn mostra um padrão regressivo ou brando da doença, eficiente ativação dos macrófagos e reações de HTT positivas e persistentes (CALICH et al., 1994; CALICH et al., 1998).

Acredita-se que as células fagocíticas por meio de sua ativação e atividade fungicida representem as principais células de defesa contra o *P. brasiliensis*. Através do processo de fagocitose, os macrófagos ativados pelo IFN- γ exercem um efeito fungicida sobre conídios de *P. brasiliensis* associado à síntese de óxido nítrico

(NO) (GONZALEZ et al., 2000) ao contrário, leveduras fagocitadas por macrófagos não ativados são capazes de se multiplicar dentro dessas células (BRUMMER et al., 1989). O NO pode exercer efeitos positivos ou negativos na imunorregulação do hospedeiro na PCM, podendo causar imunossupressão inibindo a linfoproliferação e a produção de TNF- α ou controlar a multiplicação do fungo (GONZALEZ et al., 2000).

As células dendríticas, as quais são consideradas as principais células apresentadoras de antígenos do sistema imune, são especializadas na captura, processamento, transporte do antígeno para os órgãos linfoides e apresentação do antígeno processado aos linfócitos T naíve (ALMEIDA et al., 2001). As células dendríticas de camundongos B10.A e A/J em resposta ao desafio *in vitro* com antígeno dominante de *P. brasiliensis*, gp-43, são pouco eficientes na indução de resposta celular mediada por linfócitos e, quando estas células são transferidas *in vivo*, podem levar a doença exacerbada (ALMEIDA et al., 2001).

As células dendríticas plasmocitóides (pDCs), as quais são cruciais em infecções virais, foram recentemente descritas quanto à sua ação tolerogênica frente a infecção por *P. brasiliensis*, induzindo a síntese elevada de TNF- α e IFN- β *in vitro* de maneira dependente da indolamina 2,3 dioxigenase (IDO) uma enzima que degrada o triptofano. A depleção de pDCs com o uso de um anticorpo monoclonal específico resultou numa infecção menos severa, bem como patologia tecidual reduzida e tempo de sobrevivência aumentado. Foi também observado um aumento do influxo de macrófagos e neutrófilos nos pulmões e uma elevada presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ e IL-17, concomitante com a diminuição da frequência de células Treg e níveis reduzidos de citocinas imunorreguladoras tais como IL-10, TGF- β , IL-27 e IL-35 (ARAUJO et al., 2017).

De acordo com estudos realizados por nosso grupo, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ participam dos processos da imunoproteção na infecção pelo *P. brasiliensis*. Linfócitos T CD4 e T CD8 do tipo 1, secretores de IFN- γ e IL-2 em concomitância com linfócitos CD4 do tipo Th2, secretores de IL-4, IL-5 e IL-10, caracterizam a resposta protetora dos camundongos A/J. Por outro lado, camundongos B10.A não desenvolvem resposta Th2 típica, pois não há a síntese de IL-4. Entretanto, os níveis baixos ou ausentes de IFN- γ se associam a altos níveis de IL-5 e IL-10 (CHIARELLA et al., 2007).

Cano et al. (2000) observou que as células T CD8⁺ são protetoras na PCM experimental murina (B10.A e A/Sn) e a intensidade da ativação dessas células depende do padrão genético do hospedeiro (CANO et al., 2000). Chiarella et al. (2007), também em nosso laboratório, demonstraram que a depleção de células T CD4⁺ não afetou drasticamente a doença de camundongos susceptíveis, sugerindo que o controle da doença nestes animais não é mediado principalmente por esta população celular, mas sim por linfócitos T CD8⁺.

Pacientes que apresentam a forma disseminada da doença quando comparados com aqueles que apresentam a forma branda exibem um perfil de resposta Th2, com leucócitos produtores de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-10), TGF-β, e síntese de baixos níveis de IFN-γ. Em contrapartida, indivíduos infectados com sintomas brandos ou assintomáticos apresentam resposta predominante do tipo Th1, com produção predominante de IFN-γ e TNF-α associados a níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 (OLEIVEIRA et al., 2002).

Recentemente, também tem sido investigada a participação de células Treg no controle da PCM, uma vez que o aumento no número destas células tem sido associado com a gravidade da doença. Visto que os mecanismos imunorreguladores dessas células frente a infecção por *P. brasiliensis* ainda permanecem pouco elucidados, torna-se necessário uma compreensão mais clara do seu papel na doença.

1.2 Células T Reguladoras

As células T reguladoras (Tregs) representam uma subpopulação de linfócitos CD4⁺ caracterizados, em geral, pela expressão da molécula CD25^{high} e pelo fator de transcrição Foxp3, sendo consideradas essenciais para a manutenção da tolerância periférica, prevenção da autoimunidade e limitação da resposta inflamatória crônica (CAMPBELL et al., 2007; SOJKA et al., 2008). Como as outras células T CD4⁺, estas células também têm sua maturação no timo. Entretanto, as células Treg produzidas no timo já deixam este órgão comprometidas funcionalmente, e parecem realizar a seleção de seus receptores para o reconhecimento de auto-antígenos com alta afinidade, possivelmente por serem selecionadas por células epiteliais tímicas apresentadoras de antígenos. Ainda no timo, estas células adquirem um fenótipo ativado e expressam um grupo de marcadores de superfície celular encontrado em

células T convencionais ativadas [p.ex. CD25, GITR (Receptor da Família do TNF Induzido por Glicocorticoide), CTLA-4 (Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico) (SAKAGUCHI et al., 2004).

As células Treg desempenham um importante papel na manutenção da tolerância periférica e previnem o desenvolvimento de uma variedade de doenças autoimunes, além de atuarem através de vários mecanismos no controle da resposta imune aos aloantígenos, aos auto-antígenos e aos patógenos (YI et al., 2006).

Vários são os mecanismos propostos para a atividade supressora das células Treg. Além do contato físico, mediadores solúveis podem ocasionar a supressão. As moléculas CTLA-4 ao interagir com moléculas B7 de APCs inibem a ativação de células T; além disso, as células Treg expressam TGF- β em sua membrana e são capazes de sintetizar citocinas inibitórias como a IL-10, TGF- β e IL-35. O consumo de IL-2 exógena, e a transferência de cAMP para células T através de junções do tipo GAP também resultam em sinais supressores para as células T (BODOR et al., 2007; DEAGLIO et al., 2007).

Esta subpopulação de células pode ser dividida em duas categorias: Tregs naturais e Tregs induzidas.

As Tregs naturais (nTreg) são naturalmente produzidas no timo, onde adquirem seu fenótipo ativado e expressam marcadores que são comumente encontrados em células T ativadas, tais como CD25⁺, CTLA-4, OX40 e GITR (YAMAGUCHI et al., 2007). Estas células, que representam cerca de 1 a 3% das células TCD4⁺, atuam através de vários mecanismos no controle da resposta imune aos aloantígenos, auto-antígenos e patógenos, desempenhando um papel importante no controle de autoimunidade e da imunidade contra diversas patologias, sejam elas infecciosas ou não (BELKAID et al., 2005). Já as células Treg induzidas (iTreg), que são expandidas em resposta a antígenos próprios ou estranhos apresentados na periferia, são linfócitos que inicialmente possuem o fenótipo T CD4⁺ CD25⁻ naíve e, através de condições estimulatórias específicas, se diferenciam (TCD4⁺CD25^{high}) e adquirem sua função supressora dependentes ou independentes do fator de transcrição Foxp3 (YI et al., 2006). Vários fatores podem induzir a expressão do Foxp3 (FEUERER et al., 2009), estando dentre os mecanismos de conversão CD25⁻CD4⁺ em CD25⁺CD4⁺ na periferia principalmente

via TGF- β , sendo também demonstrado que a vitamina D, a prostaglandina E2 e a enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO) também induzem a expressão de Foxp3 e sua função supressora (GROTH; LANDAY, 2008). No entanto, o mecanismo molecular responsável pela regulação da expressão e função da Foxp3 permanece pouco esclarecido (BELKAID et al., 2005).

A função das células iTreg são semelhantes às funções das nTreg, porém uma subpopulação que não expressa o fator de transcrição Foxp3 tem sua função principalmente mediada pela produção de citocinas supressoras, as quais são utilizadas como base para a sua atual classificação em dois tipos de iTregs. As células T reguladoras CD4⁺ do tipo 1 (Tr1) expressam altos níveis de IL-10 e moderados níveis de TGF- β , enquanto as células T helper 3 regulatórias (Th3) expressam altos níveis de TGF- β e moderados de IL-10 (FARIA et al., 2006; WEINER et al., 2001). Ambas, nTreg e iTreg, têm a capacidade de prevenir a migração de células da imunidade celular para os órgãos-alvo, bem como impedir a ativação destas impedindo o contato com as células apresentadoras de antígenos.

Além disso, além da expressão em células reguladoras T CD4⁺, trabalhos recentes têm demonstrado que Foxp3 também se expressa em linfócitos T CD8⁺ que também exercem potentes atividades supressoras da imunidade (LU et al., 2008).

1.2.1 Células T reguladoras em doenças infecciosas

O papel das células T reguladoras em infecções virais, bacterianas e parasitárias tem sido amplamente estudado, bem como contra infecções fúngicas como as causadas por *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* e *P. brasiliensis* (CAVASSANI et al., 2006; FELONATO et al., 2009; KROETZ et al., 2010; NETEA et al., 2004; SUTMULLER et al., 2006).

Em geral, a presença de número grande ou a atividade excessiva de células Treg estão geralmente associadas com efeito deletério por inibir a função efetora de células T (SUVAS et al., 2004). Uma das hipóteses que associa a presença de células Treg com patologias infecciosas de natureza crônica baseia-se no argumento que a frequência destas células pode facilitar a manutenção do patógeno, mesmo que em pequeno número. Esta permanência de pequeno número de microrganismos parece também facilitar a manutenção de memória imunológica em níveis suficientes para proteger contra infecções subsequentes. Um exemplo

descrito é o modelo de infecção por *Leishmania major* em camundongos C57BL/6. Durante a infecção por este protozoário as células T CD4⁺CD25⁺ acumulam na derme, onde suprimem a capacidade das células T CD4⁺CD25⁻ de eliminar o parasita do local. Como consequência, as células Treg promovem a persistência do patógeno e a potencial transmissão para outros hospedeiros. A remoção das células Treg induz a “cura estéril”, um estado não compatível com a preservação da imunidade por longo tempo (BELKAID et al., 2002).

Em modelo de infecção por fungo, descreveu-se que as células Treg são componentes necessários para a manutenção da infecção causada por *C. albicans*; a redução de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) induz um melhor controle da infecção por reduzir a carga fúngica, mas aumenta a inflamação gastrointestinal. Por outro lado, a transferência de células Treg mantém a infecção e restaura a resistência à reinfecção (MONTAGNOLI et al., 2002).

Na PCM, em um estudo pioneiro realizado com indivíduos saudáveis e com pacientes com PCM crônica, foi demonstrado que o número total de células T CD4⁺CD25⁺ é similar no sangue e nas lesões de ambos os grupos. Contudo, as células T CD4⁺CD25⁺ que expressam o fator de transcrição Foxp3 aparecem em número elevado tanto no sangue como nas lesões dos pacientes infectados, e apresentam forte atividade supressora (CAVASSANI et al., 2006). Em trabalho subsequente, pode-se notar mais uma vez que a presença de Treg com maior frequência nas lesões e sangue periférico de pacientes não tratados do que naqueles tratados, e que a atividade supressora das células Treg era parcialmente mediada por contato célula-célula e secreção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β (MAMONI et al., 2006).

A literatura recente, inclusive aquela por nós publicada, tem demonstrado que as células Treg exercem, em geral, um papel deletério na PCM, pois estão associadas a imunidade deficiente de células T e dificuldade na erradicação do patógeno. Ao estudar a imunorregulação na PCM, pudemos verificar que células Treg exercem tal efeito deletério tanto para camundongos resistentes quanto para camundongos susceptíveis ao fungo. A depleção destas células por anticorpo monoclonal anti-CD25 levou a infecção menos grave e regressiva além de patologia tecidual diminuída em ambas as linhagens. Além disso, a depleção de células Treg foi capaz de reverter a anergia inicial de células T de camundongos A/J resistentes e

potenciou as repostas Th1/Th2 e Th17 tardias e protetoras contra o fungo. Em camundongos B10.A, a diminuição de células Treg levou a mecanismos de imunidade natural muito eficientes, resgatou a produção tardia de citocinas Th1/Th2/Th17 e, mais importante, aboliu a mortalidade precoce e aumentada desta linhagem de camundongos (FELONATO et al., 2012). Outros trabalhos também realizados em nosso laboratório demonstraram que os receptores do tipo Toll, a molécula adaptadora MyD88 e a molécula coestimulatória CD28 controlam a expansão das células Treg na PCM pulmonar (FELONATO et al., 2010; LOURES et al., 2009; LOURES et al., 2010; LOURES et al., 2011). Entretanto, foi demonstrado recentemente por Bazan et al. (2015) que, em determinadas situações, as células Treg podem também exercer um papel protetor na PCM, uma vez que sua deficiência acarreta uma inflamação tecidual exacerbada mediada principalmente por linfócitos Th17 e excessiva inflamação mediada por leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (BAZAN et al., 2015).

Visto que tanto na PCM humana como em modelos murinos os mecanismos imunorreguladores das células Treg ainda são ainda pouco elucidados, faz-se necessário o aumento do conhecimento relacionado ao papel desta célula frente à infecção, bem como seu comportamento e atividade em diferentes estágios da PCM.

1.2.2 Modelo de depleção de células T Reguladoras em camundongos DREG

Devido à importância do papel das células T reguladoras na homeostase do sistema imune, novas ferramentas que propiciam a modulação destas células têm sido desenvolvidas para o melhor entendimento de suas funções. O protocolo de depleção de células T reguladoras em camundongos DREG foi descrita por Lahl e Sparwasser (2011) com o objetivo de permitir a depleção específica de células Treg que expressam o gene Foxp3 (LAHL et al., 2007; LAHL; SPARWASSER, 2011). Camundongos DREG foram produzidos a partir da inserção de cDNA do gene que codifica o receptor de toxina diftérica (DTR) fundido ao marcador GFP (green fluorescent protein) na região IRES 3' não traduzida do gene Foxp3, dando origem a um camundongo Foxp3^{DTR/eGFP} (RUDENSKY, 2006).

O tratamento com toxina diftérica em camundongos DREG tem sido utilizado para o estudo de uma ampla variedade de doenças associadas a desordens do sistema imunológico, como autoimunidade (MAYER et al., 2014), câncer

(MARAROLLO et al., 2013), alergia (BARU et al., 2012) e várias infecções (LOEBBERMANN et al., 2012; VEIGA-PARGA, 2012).

2 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito da modulação das células Treg em PCM pulmonar já estabelecida. Esta abordagem teve como objetivo elucidar se a manipulação de células Treg em uma patologia já estabelecida poderia ter um efeito terapêutico e modificar o curso e a gravidade da doença.

2.1 Objetivos específicos

Camundongos C57BL/6 (de susceptibilidade intermediária ao *P. brasiliensis*) transgênicos para $\text{Foxp3}^{\text{DTR/eGFP}}$ (DEREG) foram utilizados para:

- a- Determinar o efeito da depleção de células Treg em PCM pulmonar já estabelecida (3 semanas pós infecção) quanto à gravidade da doença, analisada pela carga fúngica nos órgãos, histopatologia e mortalidade dos animais.
- b- Caracterizar o efeito da depleção tardia de células Treg no perfil de resposta imune através da caracterização da resposta inflamatória e ativação de imunidade Th1/Th2/Th17

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais. Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 transgênicos para Foxp3^{DTR/eGFP} (DEREG) SPF (“*specific pathogen free*”) criados no biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia da USP. Estes animais foram adquiridos da *Jackson Laboratories* com o apoio financeiro e logístico da Fapesp. Foram utilizados camundongos machos ao atingirem a idade de 6-8 semanas. Todos os procedimentos com camundongos receberam aprovação da Comissão de Ética para Experimentação animal do ICB da USP (180/2011)

3.2 Fungo. A cepa utilizada foi a virulenta Pb18 do fungo *P. brasiliensis* mantido por repiques semanais em meio semi-sólido de Fava Neto (Fava Neto, 1955) a 36 °C. O fungo foi coletado e lavado com solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,2). A contagem do número de células foi realizada utilizando-se câmara hemocitométrica e a viabilidade das leveduras foi determinada utilizando o corante vital Verde-Janus. Todos os procedimentos foram realizados com suspensão fúngica de viabilidade entre 90 e 95%.

3.3 Infecção intratraqueal (i.t.). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) de 120 µl de uma solução contendo xilazina (15 mg/kg – Vetbrand) e ketamina (110 mg/kg – Vetbrand). Em seguida, os camundongos foram infectados por injeção (i.t) de 1×10^6 leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50 µl de solução PBS. Foi realizada uma pequena incisão longitudinal na pele do pescoço e a traqueia foi exposta. O fungo foi posteriormente inoculado com o auxílio de uma seringa e a incisão suturada. O procedimento cirúrgico teve início quando o animal se apresentou insensível à dor e os procedimentos cirúrgicos foram realizados com suspensão fúngica de viabilidade superiores a 95%.

3.4 Modelo de depleção DEREG. A depleção das células T reguladoras dos camundongos Foxp3^{DTR/eGFP} foi realizada de acordo com protocolo previamente estabelecido (LAHL; SPARWASSER, 2011), com algumas modificações. Na terceira semana após a infecção com o fungo *P. brasiliensis*, foi injetada pela via intraperitoneal em cada animal 0,5 µg da toxina diftérica em 200 µL de PSB por dois dias consecutivos, uma vez por semana. O procedimento foi repetido a cada

semana até o fim do experimento. A toxina diftérica foi adquirida através da empresa Sigma e foi reconstituída de acordo com o protocolo do fabricante.

3.5 Modelo de autoimunidade. Camundongos não infectados foram tratados pela via intraperitoneal com 0,5 µg da toxina diftérica em 200 µL de PBS ou apenas PBS por dois dias consecutivos, uma vez por semana, por 10 semanas. Após 10 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia. Após a perfusão com paraformaldeído 2% (PFA) pela via aórtica, os órgãos-alvo (Pulmão, fígado, baço, cérebro, coração e rins) foram retirados e analisados por procedimento histopatológico. Os órgãos foram preservados em fixador Carnoy a temperatura ambiente até o momento do processamento. Posteriormente, após a etapa de inclusão em parafina, os órgãos foram cortados na espessura de 5 µm e submetidos a coloração por hematoxilina-eosina (HE) para identificação celular e tecidual.

3.6 Avaliação da gravidade da doença. Após a inoculação i.t. a gravidade da doença foi avaliada nos animais após 6 e 10 semanas da infecção. A análise foi realizada através da recuperação de fungos viáveis do pulmão, fígado e baço, em meio BHI suplementado com soro de cavalo e filtrado de cultura do isolado 192 do *P. brasiliensis* (SINGER-VERMES et al., 1992).

3.7 Preparo das suspensões celulares dos órgãos-alvos. Suspensões celulares do pulmão foram preparadas de acordo com Huffnagle et al. (1991). Os pulmões foram retirados e posteriormente submetidos à digestão por 30 min. em tampão de digestão contendo colagenase 2 mg/mL (Sigma). Em seguida, os órgãos foram macerados em homogenizador com meio de cultura RPMI 1640 para recuperação da suspensão celular. Os eritrócitos foram lisados com tampão de lise e posteriormente as células foram contadas e a viabilidade da suspensão obtida pela contagem celular em azul de Trypan.

3.8 Citometria de fluxo para caracterização de subpopulações celulares. A partir das suspensões celulares obtidas da maceração dos pulmões dos animais infectados (6 e 10 semanas pós infecção) foi realizado um ajuste na concentração celular, e as células devidamente adicionadas às placas de fundo em U na quantidade de 1×10^6 células/poço. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS-azida (0,1%) contendo soro fetal bovino (SFB, 5%). As placas foram submetidas a centrifugação até a rotação de 453 G por 10 min em centrífuga

refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi dispensado e o anticorpo marcado (25 µL no título adequado) adicionado após o bloqueio de receptores para Fc de IgG com anticorpo monoclonal anti-CD16/32, com o volume final acertado para 50 µL/poço. Após incubação por 30 min. a 4 °C, as placas foram lavadas 2 x com PBS-azida-SBF, o sobrenadante dispensado e as células foram ressuspensas em um volume final de 300 µL em Paraformaldeído 2% e transferidas para tubos de leitura para citometria. Todas as amostras foram cuidadosamente mantidas em banho de gelo e protegidas da luz. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto (Becton-Dickison). Foram usados anticorpos marcados com isotiocinado de fluoresceína, alexa flúor, ficoeritrina ou outro fluorocromo (BD Biociences) na combinação adequada para a população celular a ser analisada (marcadores celulares de linfócitos: CD45, CD3, CD4, CD8, CD44, CD62L, CD69, CD25, ICOS, CTLA-4, GITR e Foxp3, e marcadores celulares de macrófagos e células dendríticas: CD45, CD11b, CD11c, CD40, CD80, CD86 e F4/80).

3.9 Dosagem das citocinas (ELISA). A presença e concentração das citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-23, IL-17, IL-10, TGF- β , TNF- α e IL-35) foram determinadas em homogenatos de pulmão, baço e fígado obtidos 6 e 10 semanas após a infecção por *P. brasiliensis*. A metodologia utilizada foi preconizada pelo fornecedor (eBioscience). 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.

3.10 PCR em Tempo Real (qPCR). A partir dos macerados obtidos dos pulmões infectados, usando o reagente Trizol (Invitrogen), o RNA foi extraído utilizando UltraClean tissue & cells kit (moBIO) e o cDNA foi sintetizado com 1 µg de RNA usando o kit high-capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A expressão dos genes *Foxp3*, *il-17*, *il-4*, *ifn- γ* , *tgf- β* , *tbet*, *gata3* e *rorc* foi analisada nos macerados de pulmão de 6 e 10 semanas após a infecção. A quantificação do mRNA foi caracterizada através da técnica de reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) (Applied Biosystems, Foster City, CA). A leitura das amostras foi realizada no aparelho Stratagene Mx3500p (Agilent Technologies). As sequências dos genes alvo e o gene endógeno GaPDH transcrito em todos os tipos de células, foram obtidos da Applied Biosystems. Os resultados

estão apresentados como expressão relativa entre o mRNA do gene alvo e mRNA de GaPDH.

3.11 Avaliação do tempo de sobrevivência. Os camundongos infectados com 1×10^6 células de *P. brasiliensis* pela via i.t., tratados com PBS ou DT, foram acompanhados quanto ao tempo de sobrevivência. As mortes foram registradas diariamente até o último óbito.

3.12 Análise histopatológica. Foi examinado um dos pulmões, parte do fígado e do baço utilizados na determinação do número de UFC nos tempos de 6 e 10 semanas pós-infecção. Os órgãos foram preservados em fixador Carnoy a temperatura ambiente até o momento do processamento. Posteriormente, após a etapa de inclusão em parafina, os órgãos foram cortados na espessura de $5 \mu\text{m}$ e submetidos a coloração por hematoxilina-eosina (HE) para identificação celular, e impregnação pela prata metamina (Grocot) para visualização dos fungos no tecido.

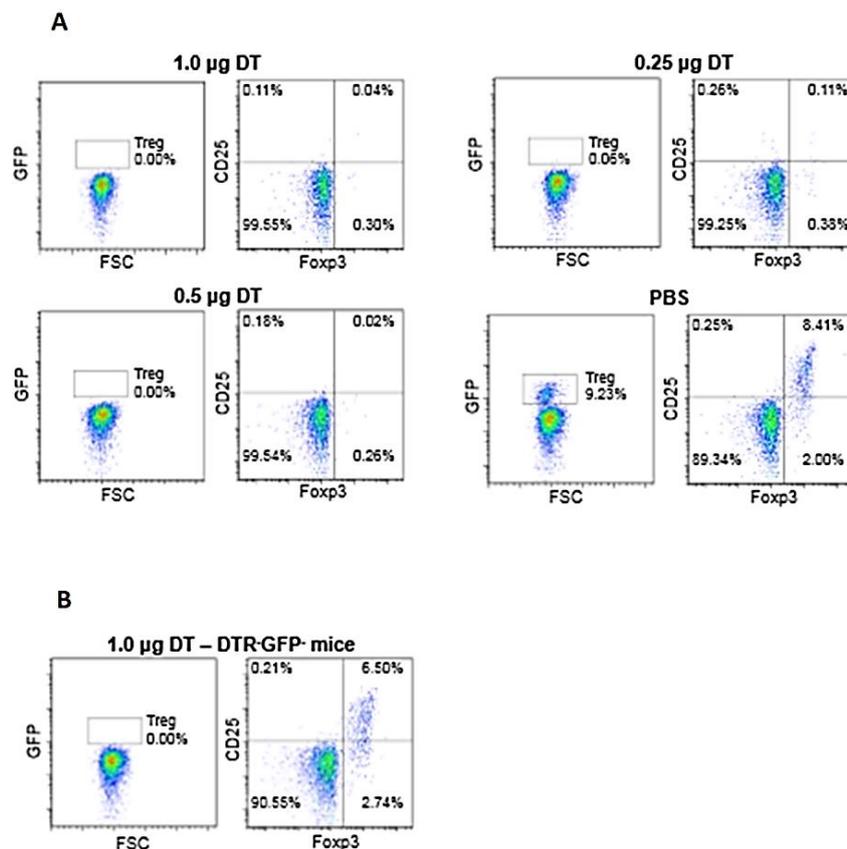
3.13 Análise estatística. Os dados foram analisados pelo teste t de Student ou análise de variância, dependendo do número de grupos. A mortalidade foi avaliada pelo teste Log-Rank. O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da depleção das células T reguladoras em camundongos DEREg

Utilizando camundongos C57BL/6 transgênicos para a expressão do receptor para toxina diftérica (DTR) e GFP (“greenfluorescentprotein”) ligado ao gene FoxP3 (DEREG), caracterizamos a melhor dose de toxina diftérica (DT) para depletar as células Treg. Os camundongos foram tratados com 1,0, 0,5 e 0,25 µg/mL da toxina. Neste experimento usamos como controle adicional camundongos C57BL/6 selvagens (WT) que foram tratados com 1,0 µg/mL de DT.

Figura 3 - Caracterização de protocolo de depleção de células Treg usando camundongos DEREg. (A) Depleção das células Treg nos camundongos DEREg (DTR/eGFP) com o uso de três diferentes doses (1,0, 0,5, e 0,25µg/mL de toxina diftérica (DT). Camundongos DEREg foram também tratados com PBS. **(B)** Tratamento com toxina diftérica na concentração de 1,0µg/mL em camundongos C57BL/6 WT, negativos para a expressão de GFP e DTR. As respostas obtidas foram analisadas por citometria de fluxo e apresentadas sob a forma de frequência de células



CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺(Treg).

A depleção foi realizada de acordo com protocolo estabelecido anteriormente por Lahl e Sparwasser (2011), com algumas modificações. Os pulmões foram obtidos e analisadas as frequências de células Treg nos diversos protocolos utilizados.

Conforme mostrado na figura 3, foi possível verificar que os camundongos DREG tratados com todas as concentrações de toxina diftérica mostraram uma diminuição importante na frequência de células Treg em relação ao grupo que recebeu PBS. Na concentração de 1,0 µg/mL a porcentagem de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) foi de 0,04%, na de 0,5 µg/ml foi de 0,02%, e com 0,25 µg/ml a porcentagem foi de 0,11%, enquanto que nos camundongos DREG tratados com PBS a porcentagem de células Treg foi de 8,41% (Fig. 3A). O tratamento com a toxina diftérica a 1,0 µg/mL nos camundongos C57BL/6 WT, negativos para a expressão de DTR e GFP tampouco reduziu a frequência de células Treg, que foram detectadas em 6,5% (Fig. 3B).

4.2 Avaliação do restabelecimento das células T reguladoras pulmonares após depleção com DT

Para determinar a taxa de recuperação de células Treg após a depleção, os camundongos DREG foram tratados com a toxina diftérica (0,5 µg/mL) nos tempos 0 e 24 horas pela via intraperitoneal, e o afluxo de células Foxp3⁺ aos pulmões foi monitorado durante 8 dias pós-depleção (Fig 4).

A administração de toxina diftérica não afetou o número de células Treg nos camundongos DTR negativos, como mostrado na figura 3B, mas ocasionou a eliminação quase completa de células Treg do pulmão dos camundongos DREG 2 dias após a injeção inicial da toxina (Fig. 4). No dia 4, ocorreu a recuperação de 47% das células Treg do pulmão.

Figura 4 - Restabelecimento das células Treg após a depleção com toxina diftérica em camundongos DEREK. Análise por citometria de fluxo da frequência de células T CD4⁺Foxp3⁺ provenientes de pulmões de camundongos C57BL/6 Foxp3^{DTR/eGFP} (DEREG) não infectados e que receberam injeções de toxina da difteria (0,5 µg /ml) em 2 dias consecutivos. Experimento realizado em 3 repetições (n=5/dia/experimento).

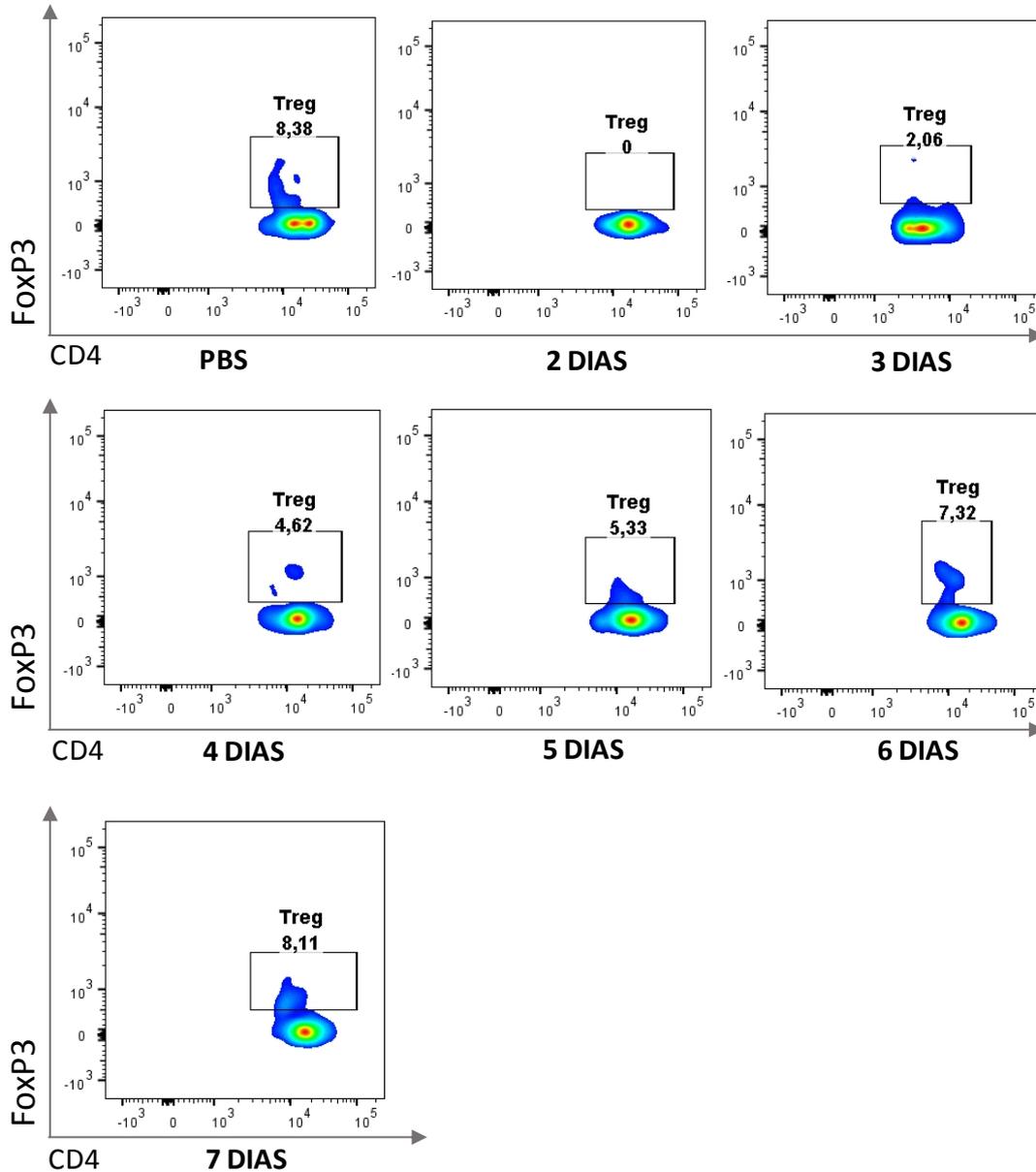
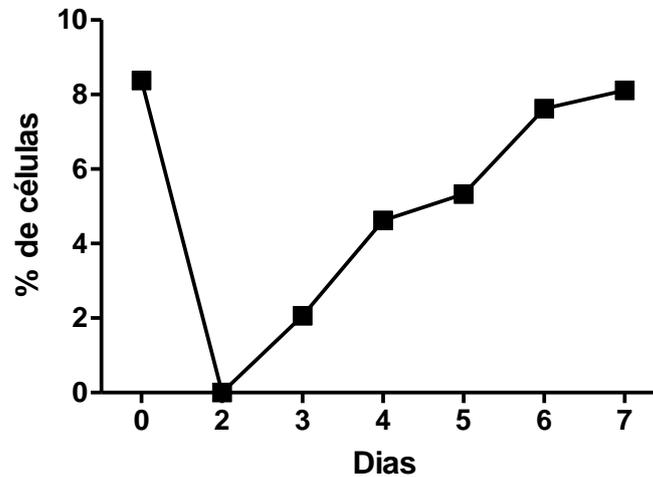


Figura 5 - Análise da cinética de restabelecimento das células Treg de camundongos DEREg. Frequência de células Treg antes do tratamento com toxina diftérica (DT) até 7 dias após a segunda injeção. A DT foi injetada por 2 dias consecutivos pela via i.p. e o restabelecimento de células Treg nos pulmões dos camundongos DEREg tratados foi analisada por citometria de fluxo diariamente por 7 dias consecutivos (n=4/dia). Valores representados como média.

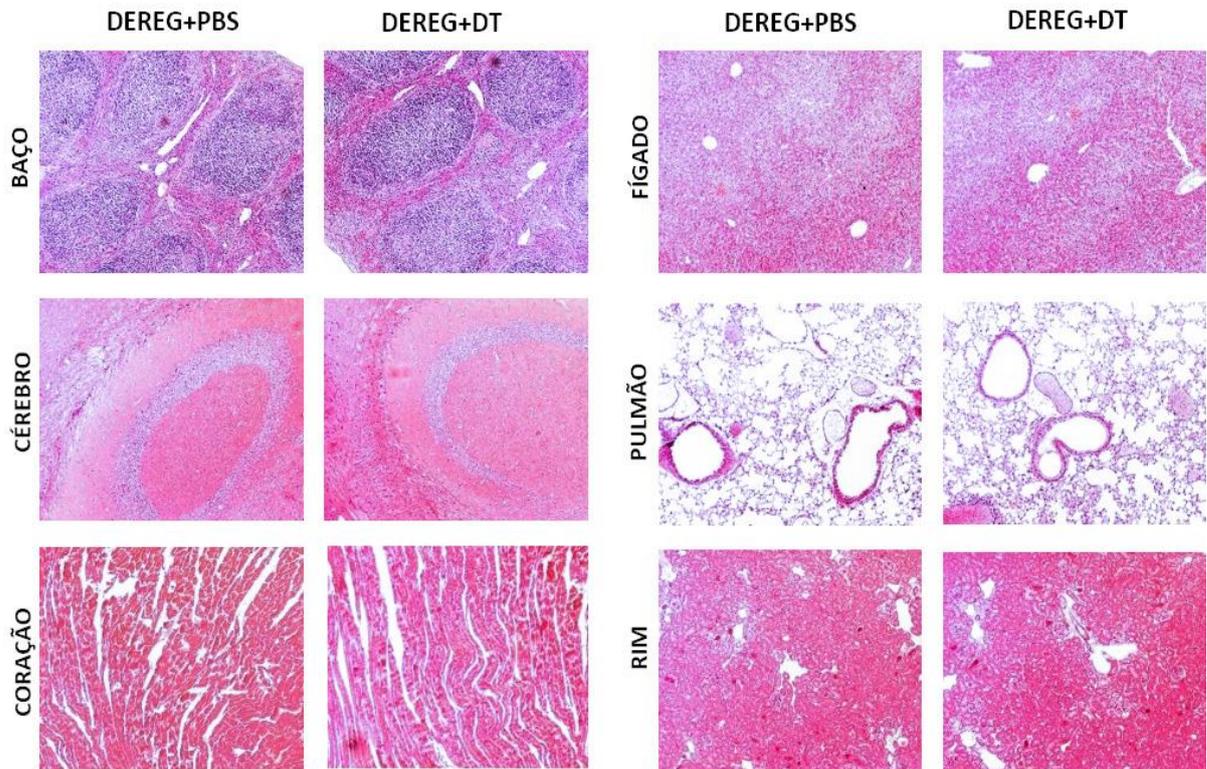


Além disso, foi possível observar que a frequência das células Foxp3^+ estava totalmente recuperada no dia 7 após a injeção da toxina (Fig.5). Este fato levou-nos a fazer o tratamento com DT por 2 dias/semana durante todo o curso de experimento.

4.3 Efeito da depleção crônica de células Treg na morfologia de órgãos alvo de autoimunidade em camundongos DEREg

Visto que a completa ausência de células Treg pode levar à autoimunidade letal (BEROD et al., 2014; RUDENSKY et al., 2007), verificamos se o tratamento com a toxina diftérica na frequência determinada causaria alguma patologia associada à autoimunidade. Animais DEREg não infectados foram tratados com PBS e DT por 2 dias consecutivos/semana durante 10 semanas. Os órgãos foram retirados e analisados por histopatologia.

Figura 6 - Análise histopatológica após depleção crônica de células Treg em camundongos DEREГ. Camundongos DEREГ não infectados foram submetidos à injeções de DT por 2 dias consecutivos semanalmente durante 10 semanas pela via i.p. Os órgãos foram retirados e analisados por histopatologia para verificar quanto a sinais de patologia associada doença autoimune. Os cortes de espessura de 5 μ m foram corados com HE e as lâminas foram analisadas no aumento 100 X no microscópio Nikon. (n=12/grupo).



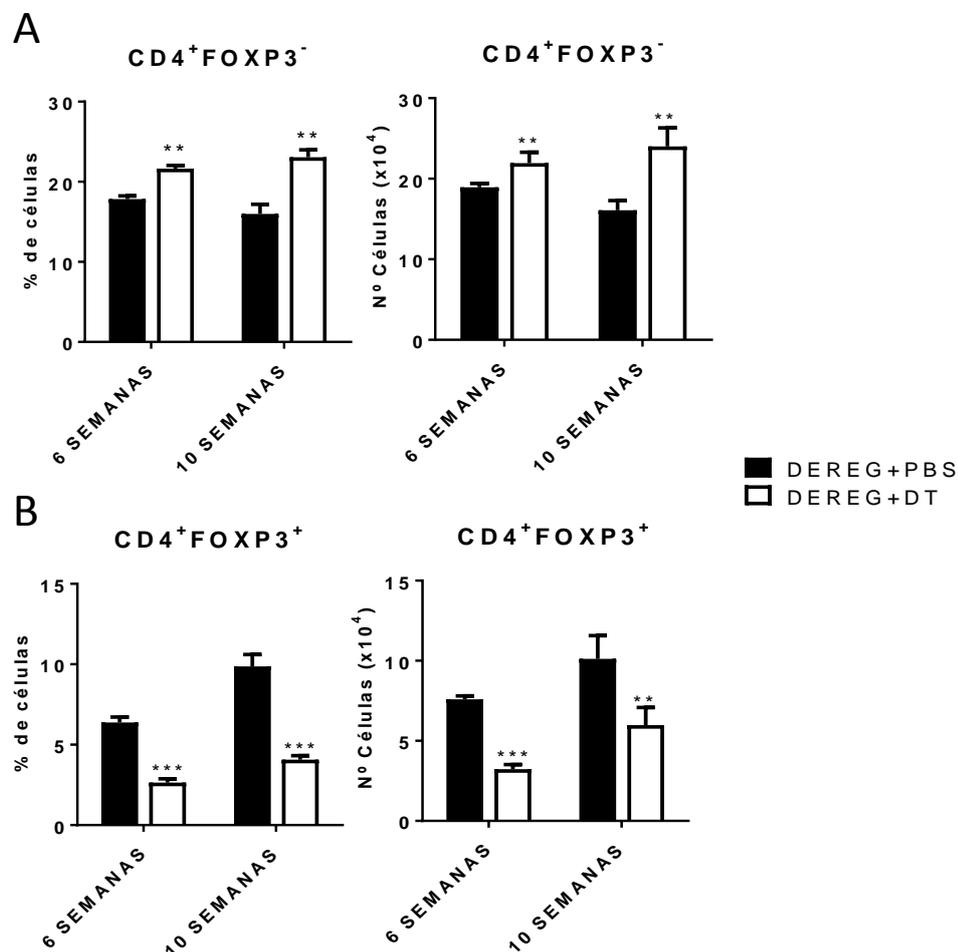
Ao fim da análise, foi possível observar que os animais DEREГ não infectados tratados tanto com PBS quanto com DT apresentaram morfologia normal e parênquima preservado em todos os órgãos analisados. Além disso, não foi observado nenhum evento relacionado à lesão tecidual decorrente de resposta imune excessiva ou inflamação decorrente de patologias associadas a autoimunidade após a depleção crônica de células Treg no protocolo desenvolvido.

4.4 Avaliação do efeito do tratamento com DT na PCM estabelecida em relação à presença de células T CD4⁺ e Treg nos pulmões.

Camundongos DEREK foram infectados com 1×10^6 leveduras do *P. brasiliensis* e na terceira semana pós-infecção foram tratados com DT ou com PBS. A frequência e o número total de linfócitos TCD4⁺Foxp3⁻ e TCD4⁺Foxp3⁺ foram analisados na sexta e na décima semana pós-infecção.

Pudemos verificar que o grupo tratado com PBS apresentou menor frequência e número de células TCD4⁺ em relação aos camundongos que foram tratados com DT (Fig. 7).

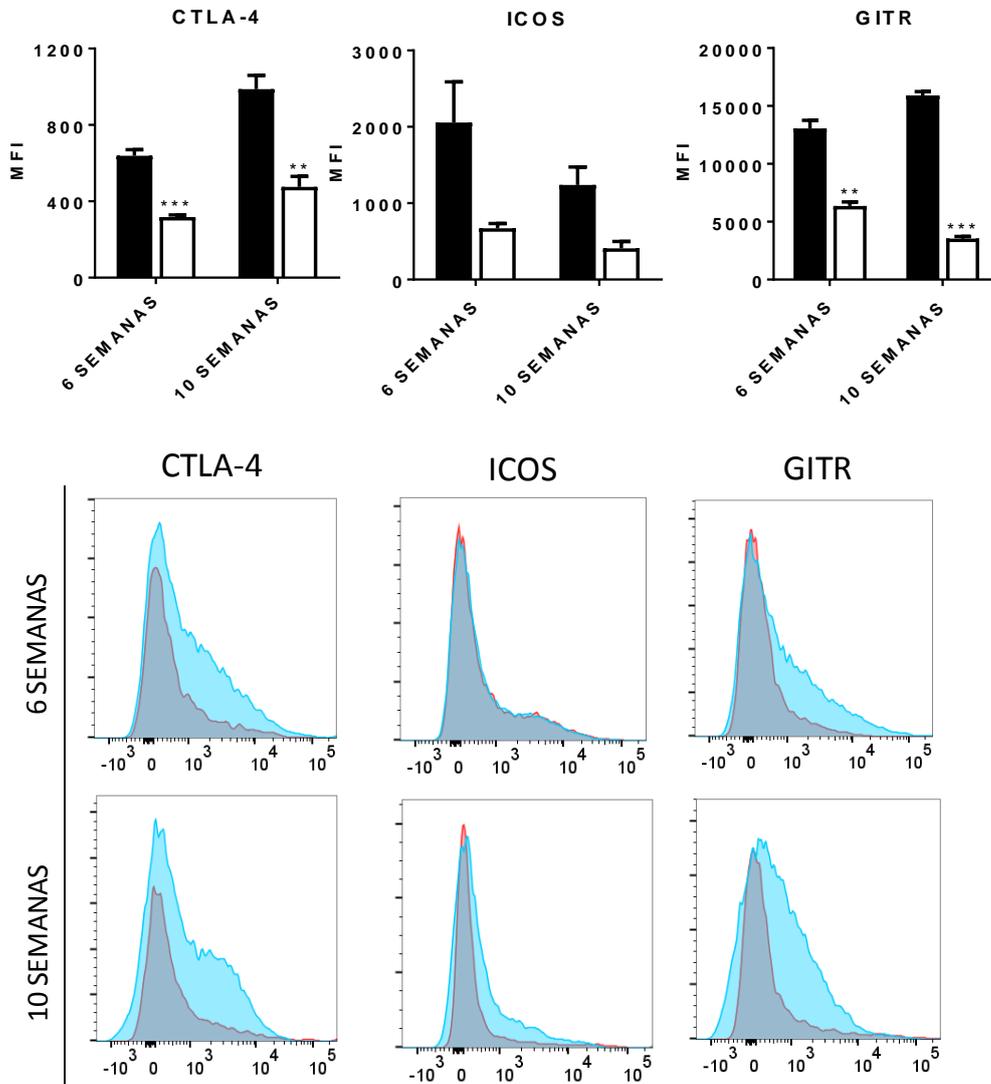
Figura 7 - Análise da frequência de células T reguladoras e de seus marcadores de superfície após tratamento com toxina diftérica. Camundongos DEREK foram infectados com um milhão de leveduras do *P. brasiliensis* e após três semanas um grupo recebeu PBS e outro grupo recebeu DT 0,05 µg/mL. O tratamento permaneceu nas três semanas seguintes. Na sexta semana os animais foram sacrificados e analisada a presença de linfócitos T CD4⁺ nos pulmões por citometria de fluxo. (A) Frequência e número total das células T CD4⁺FoxP3⁻ (A) e CD4⁺Foxp3⁺ (B) 6 e 10 semanas pós infecção. Os dados estão representados como média±erro padrão (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$) (n=12/grupo).



Por outro lado, como esperado, a frequência e o número total de células Treg foi menor nos camundongos tratados com DT, em ambos tempos de infecção. Assim, o grupo tratado com DT apresentava uma média de 3,64% de células Treg nos pulmões dos camundongos DEREK com 6 semanas de infecção e uma frequência de 4,71% nos camundongos com 10 semanas de infecção. Em contraste, os camundongos DEREK tratados com PBS apresentavam uma frequência 6,03% de células Treg nos pulmões com 6 semanas de infecção e 10,01% com 10 semanas de infecção (Fig. 6B).

A expressão de marcadores de ativação de células Treg também foi analisada por citometria de fluxo. É bem conhecido que as células Treg apresentam vários marcadores de ativação em sua superfície e que são também encontrados em células T ativadas, tais como CD25⁺, CTLA-4, ICOS e GITR (YAMAGUCHI *et al.*, 2007). A expressão de alguns marcadores de ativação foi quantificada em linfócitos Treg de camundongos tratados com DT e com PBS.

Figura 8 - Análise dos marcadores de superfície após três semanas de tratamento com toxina diftérica. Expressão (MFI) dos marcadores de ativação nas células $CD4^+Foxp3^+$ presentes nos pulmões dos camundongos DREG tratados com PBS ou DT quantificados por citometria de fluxo 6 e 10 semanas após a infecção. Os dados estão representados como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$) (n=12/grupo).

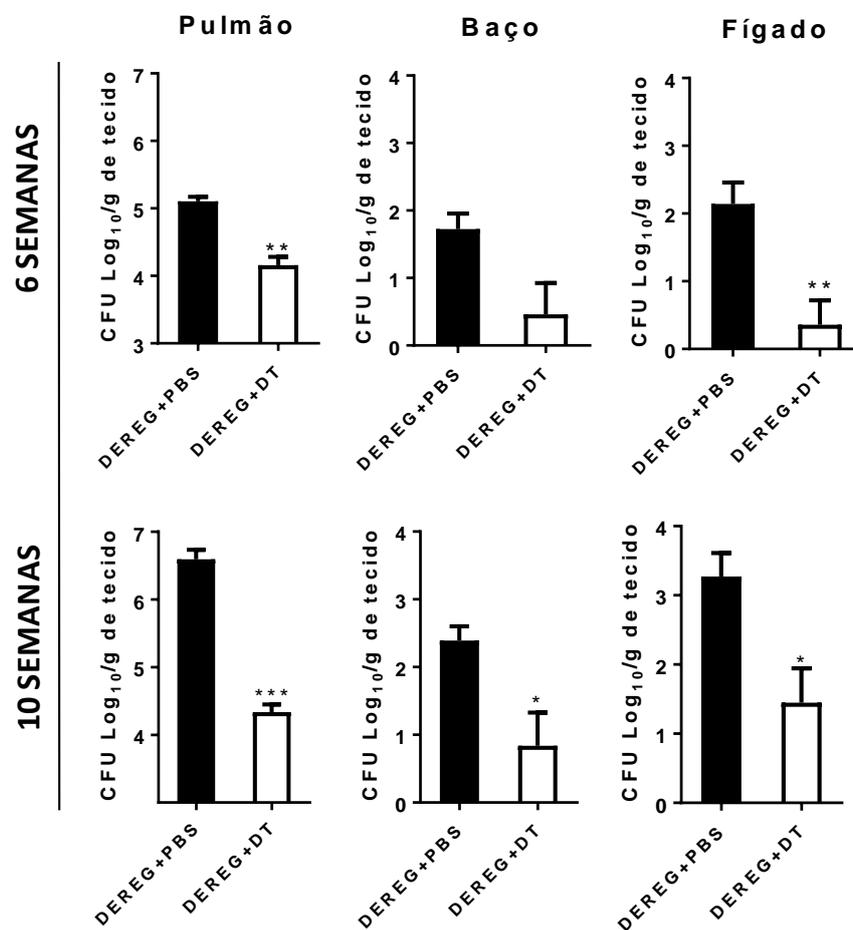


Pode-se observar que a expressão de CTLA4, GITR e ICOS nas células Treg apresentava-se diminuída nos camundongos tratados com DT em relação aos controles tratados com PBS em ambos os tempos de infecção (Fig.8). Assim, a depleção de células Treg no curso da doença foi efetiva pois proporcionou um aumento de células T $CD4^+$ em concomitância com diminuição de células Treg e suas respectivas moléculas de ativação. Além disso, as células Treg apresentavam uma menor expressão de moléculas de ativação tais como CTLA4, GITR e ICOS.

4.5 Efeitos do tratamento com DT na carga fúngica e na gravidade das lesões

Camundongos C57BL/6 $Foxp3^{DTR/eGFP}$ (DEREG) foram tratados com toxina diftérica (DT) (0,5 $\mu\text{g/mL}$) ou PBS (controle) por dois dias consecutivos, uma vez por semana, a partir da terceira semana pós infecção com *P. brasiliensis* até o fim do experimento.

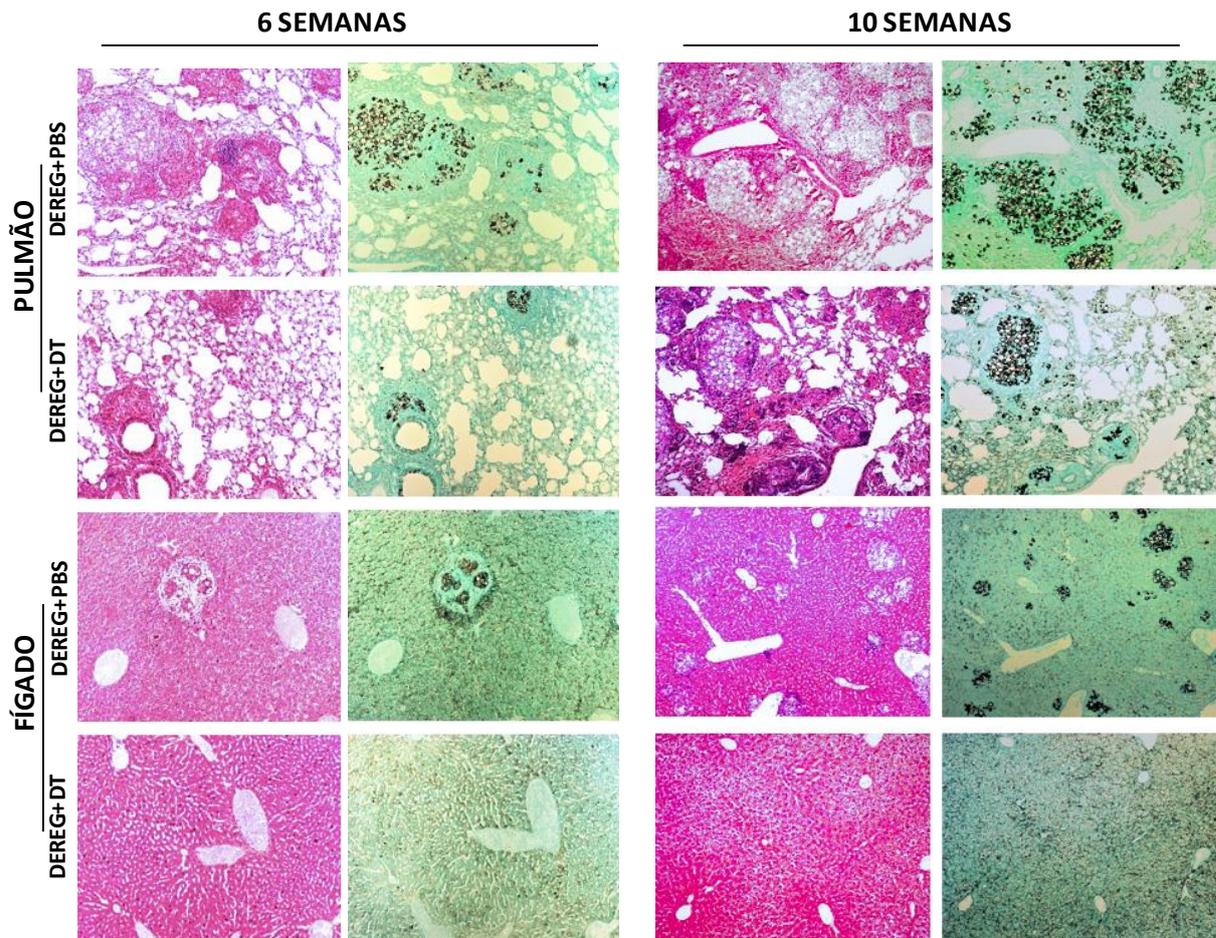
Figura 9 - A depleção das células Treg diminui a carga fúngica nos órgãos-alvo. Quantificação da carga fúngica em órgãos de camundongos DEREG infectados com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* e tratados com a DT ou PBS semanalmente a partir da terceira semana de infecção. Os órgãos foram coletados 6 e 10 semanas após a infecção e os dados estão representados como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$) (n=12/grupo).



Conforme mostrado na figura 9, animais que foram submetidos à depleção de células Treg pelo tratamento com DT apresentaram uma diminuição acentuada na carga fúngica dos pulmões, fígado e baço após 6 e 10 semanas de infecção em comparação com o grupo controle (PBS).

Foram realizadas análises histológicas após 6 e 10 semanas de infecção nos órgãos alvo (pulmão, fígado e baço).

Figura 10 - Histopatologia dos órgãos-alvo dos camundongos infectados com *P. brasiliensis* tratados com DT ou PBS (controle). Fotomicrografias dos órgãos-alvo 6 semanas após infecção com o *P. brasiliensis*. Os cortes de espessura de 5µm foram corados com HE e Grocott e as lâminas foram analisadas no aumento 100 X no microscópio Nikon.

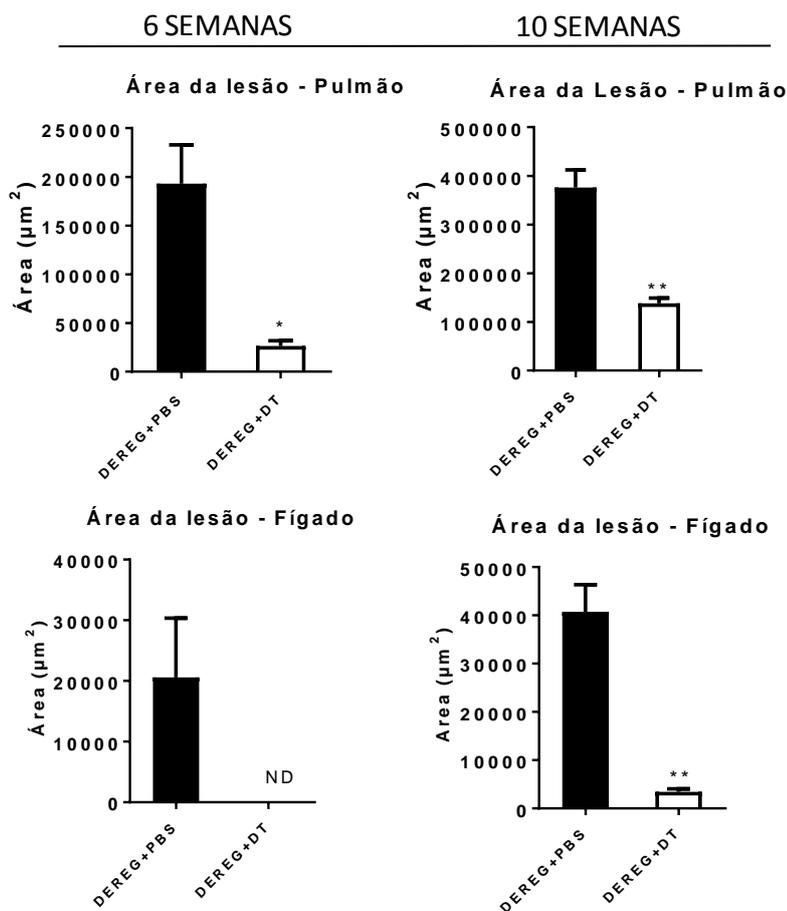


Como pode ser observado na figura 10, os animais tratados com PBS apresentavam infecção mais grave nos pulmões em ambos os tempos de infecção, com maior gravidade em um tempo de infecção crônico (10 semanas) com lesões granulomatosas ocupando maior área e contendo elevado número de leveduras, permanecendo, porém, parte do parênquima preservado. Ao contrário, animais tratados com DT apresentavam maior parte do parênquima pulmonar preservado, contendo menores lesões ou granulomas e uma menor quantidade de fungos nos pulmões em ambos os tempos de infecção (Fig. 10 superior). Fígados de animais tratados com DT apresentaram morfologia normal após 6 e 10 semanas de infecção, demonstrando baixa ou nenhuma presença de fungos, ao contrário dos animais que

receberam PBS, cujos órgãos apresentavam poucas e pequenas lesões, contendo algumas leveduras (Fig. 10 inferior). Não foi possível observar lesões no baço.

As áreas das lesões observadas nos cortes histológicos foram analisadas. Foi possível determinar que animais infectados apresentavam lesões cujas áreas puderam ser medidas nos pulmões e fígado, mas não no baço. Comparados aos camundongos que receberam PBS, os camundongos que receberam a toxina diftérica apresentavam lesões que ocuparam áreas menores em ambos os tempos de infecção no pulmão (Fig. 11 superior), além de ausência de lesões no baço e no fígado 6 semanas após a infecção, e pequenas lesões após 10 semanas de infecção quando comparado aos camundongos tratados com PBS (Fig. 11 inferior).

Figura 11 - Quantificação da área da lesão dos camundongos tratados com DT e PBS, 6 e 10 semanas após a infecção. As áreas foram quantificadas a partir de fotomicrografias de cortes histológicos utilizando o software NIS Elements AR 2.30 (Nikon). Os dados estão representados como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$). $n = 12$ /grupo

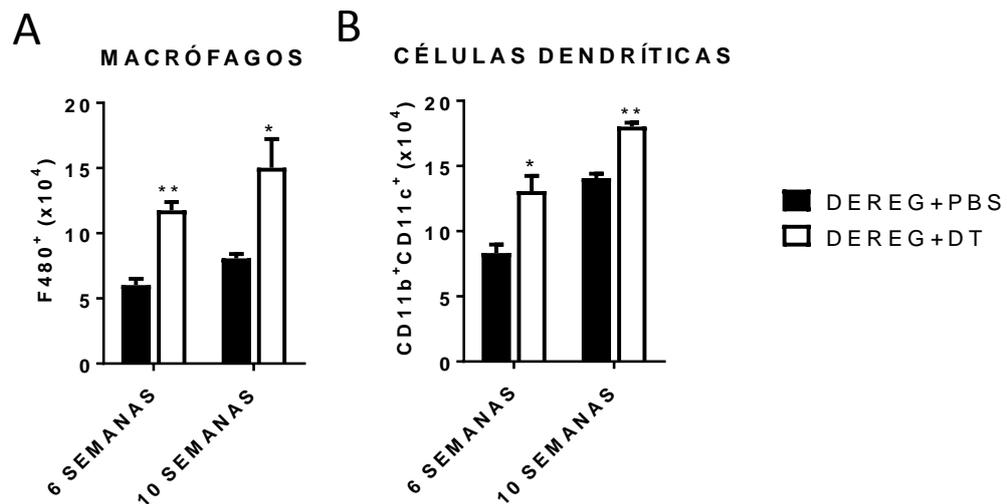


Em conclusão a depleção de células Treg na PCM estabelecida leva a um maior infiltrado de células TCD4⁺, uma menor carga fúngica e à diminuição das lesões teciduais.

4.6 Avaliação da imunidade celular após depleção das células Treg

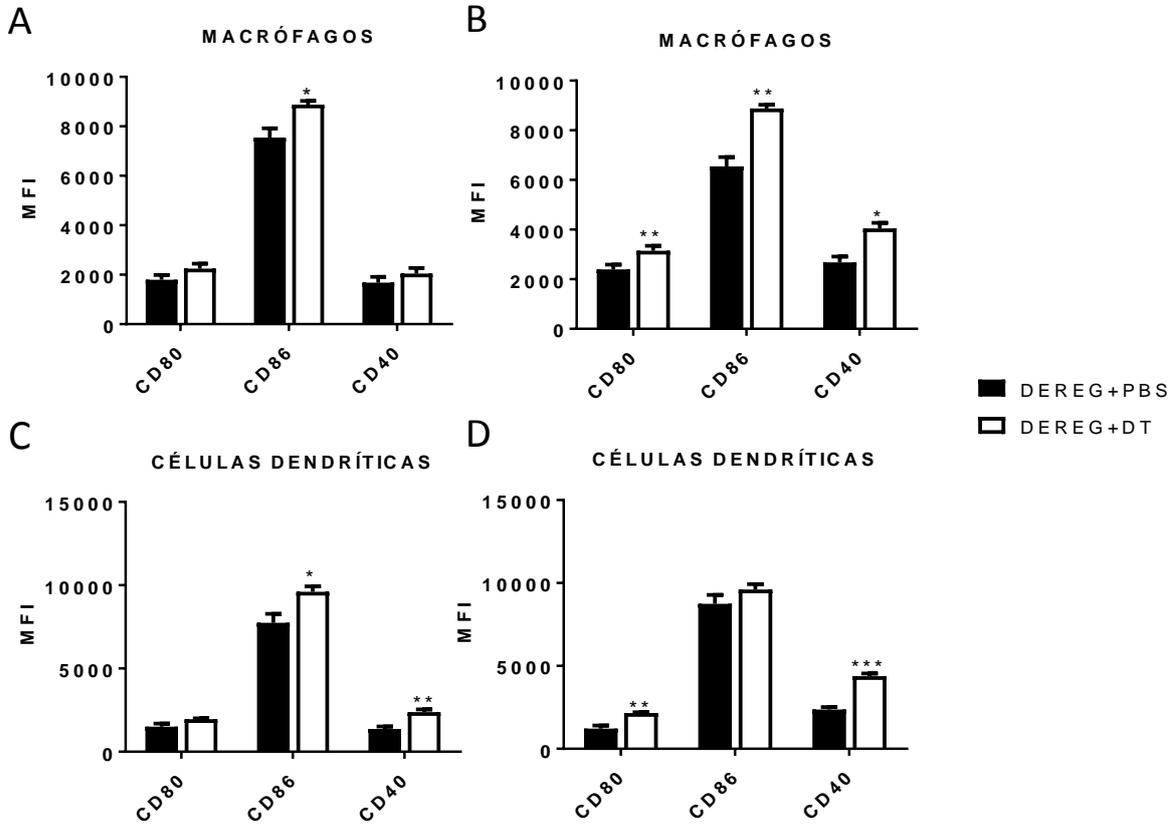
Para verificar se a depleção das células T reguladoras teria influência na imunidade celular, a frequência e a ativação de macrófagos e células dendríticas foram analisadas nos pulmões dos camundongos tratados com DT ou PBS através de citometria de fluxo 6 e 10 semanas após a infecção por *P. brasiliensis*.

Figura 12 - Avaliação da frequência de macrófagos e células dendríticas pós-depleção de células Treg com DT. Quantificação por citometria de fluxo do número absoluto de macrófagos (F4/80⁺) (A) e células dendríticas (CD11c⁺CD11b⁺) (B) nos pulmões de camundongos Dereg tratados com DT ou PBS 6 e 10 semanas após a infecção por *P. brasiliensis*. Os dados estão representados como média± erro padrão (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$) n=12/grupo.



Na figura 12 é possível observar que a depleção de células Treg na PCM em curso propiciou um resgate no afluxo de células de imunidade inata para os pulmões representado pelo aumento da frequência de macrófagos F4/80⁺ e células dendríticas convencionais CD11b⁺CD11c⁺.

Figura 13 - A depleção de células Treg no curso da infecção de camundongos DEREg resgata a imunidade mediada por macrófagos e células dendríticas. MFI dos marcadores de superfície de ativação de macrófagos (A, 6 semanas p.i. e B, 10 semanas p.i.) e células dendríticas (C, 6 semanas p.i. e D, 10 semanas p.i.) por citometria de fluxo. Os dados estão representados como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,05$) (n=12/grupo).

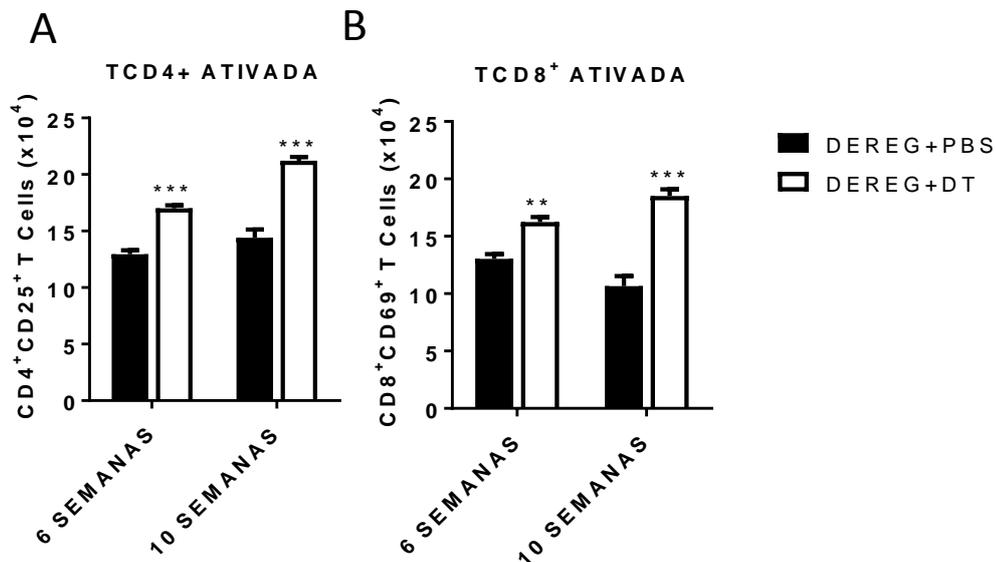


Verificamos também que nos camundongos DEREg tratados com DT ambas as populações celulares apresentavam um aumento na frequência nos marcadores de ativação (Fig. 13), que foi significativo para as moléculas de superfície CD86, na população macrófaga em ambos os tempos de infecção (Fig 13.A e B), além de um aumento significativo nas moléculas CD80⁺ e CD40⁺ após a décima semana de infecção (Fig. 13 B). Na população de células dendríticas convencionais também foi possível observar o aumento nos marcadores CD86 e CD40 quando comparada aos tratados com PBS após 6 semanas de infecção (Fig. 13 C) e um aumento nas moléculas CD80⁺ e CD40⁺ após 10 semanas de infecção (Fig. 13D).

4.7 Análise fenotípica de linfócitos infiltrantes do pulmão após o tratamento com DT

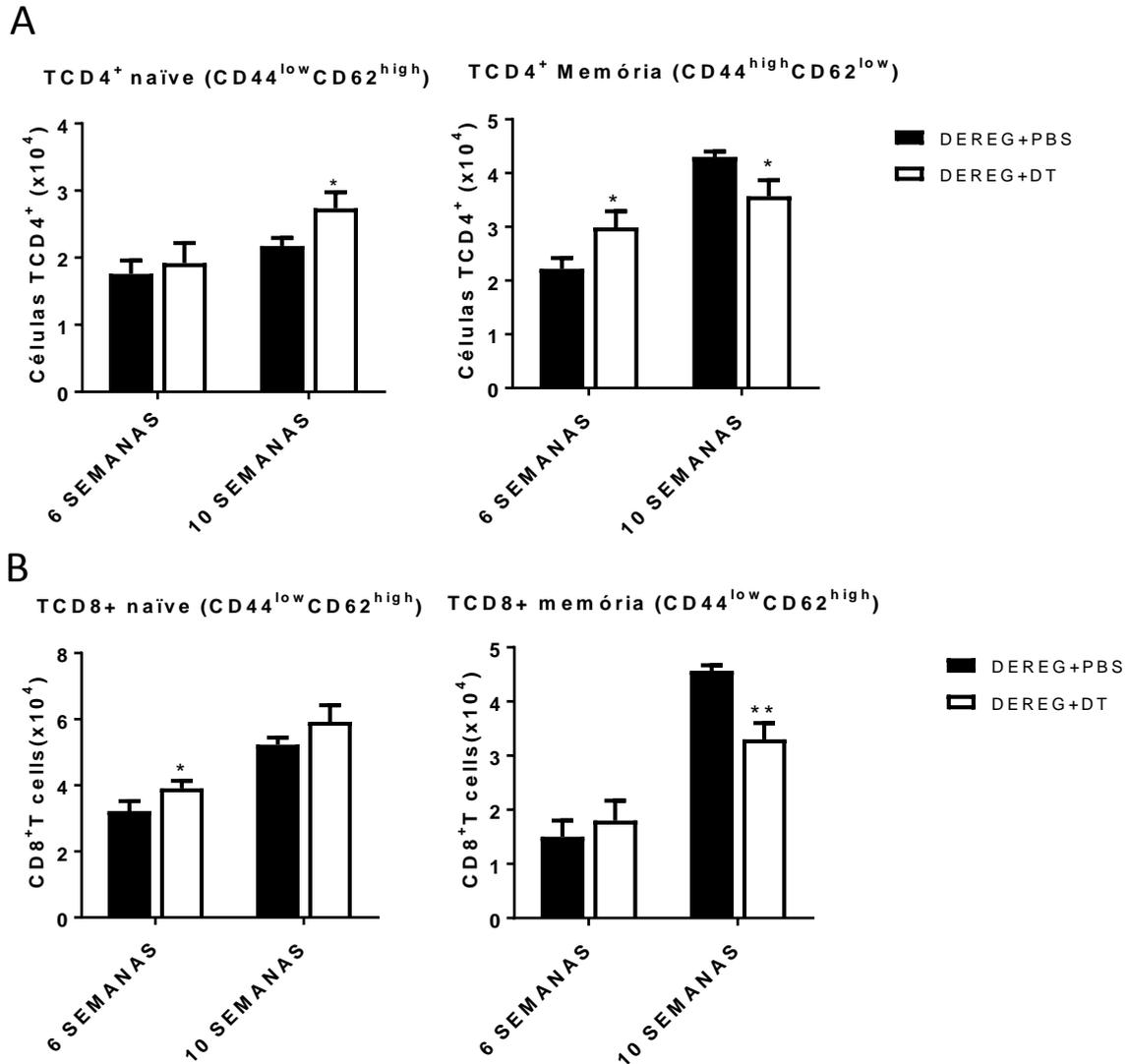
Avaliamos se a depleção de células Treg no curso da infecção pelo *P. brasiliensis* causaria, da mesma forma, uma alteração no influxo de linfócitos T para o pulmão. Células infiltrantes dos pulmões foram obtidas na sexta e décima semana após infecção por *P. brasiliensis*. A concentração celular foi ajustada a 1×10^6 cels/mL e marcadas com anticorpos específicos no título previamente determinado e na combinação adequada para a população celular estudada. Estas células foram analisadas por citometria de fluxo para avaliação da expressão de marcadores de ativação e memória. ($0,5 \mu\text{g/mL}$) quando comparados aos animais controle tratados com PBS (Fig. 14).

Figura 14 - Quantificação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados em pulmões de camundongos tratados DT ou PBS. Avaliação da ativação de células TCD4⁺ (esquerda) e TCD8⁺ (direita) por citometria de fluxo na sexta e décima semana pós infecção. Os dados estão representados como média \pm erro padrão (** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$) (n=12/grupo).



Em ambos os tempos pós infecção, foi verificado um maior afluxo de linfócitos T ativados CD4⁺ CD25⁺ e CD8⁺ CD69⁺ nos pulmões de animais DEREG tratados com toxina diftérica.

Figura 15 - Quantificação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺naïve e efetores/memória em pulmões de camundongos tratados DT ou PBS Número absoluto de células TCD4⁺ (A) e TCD8⁺ (B) naïve e memória por citometria de fluxo 6 e 10 semanas pós infecção. Os dados estão representados como média±erro padrão (* $p<0,05$, ** $p<0,005$ e *** $p<0,001$) n=12/grupo.

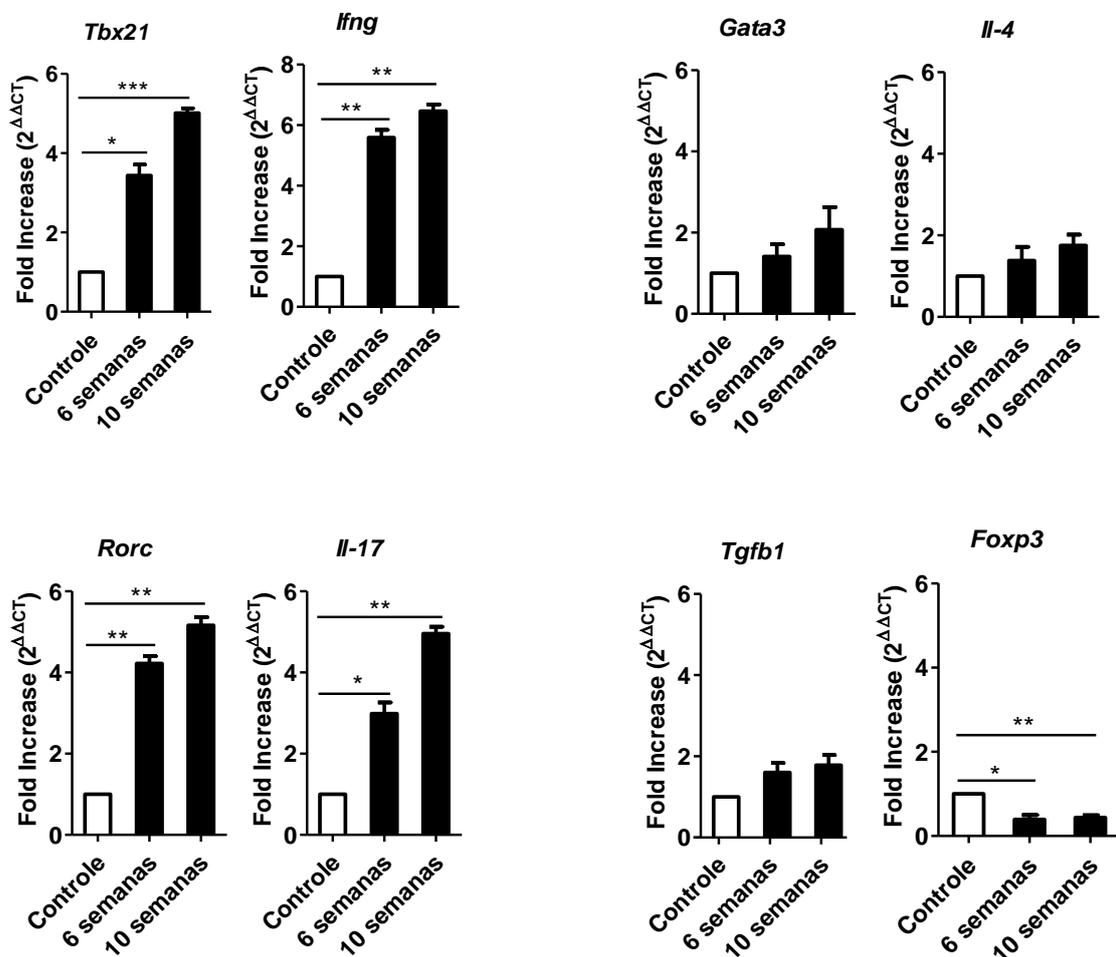


Ao observarmos o efeito quanto às células T naïve e de memória, na sexta semana pós-infecção verificou-se um maior afluxo de linfócitos T CD4⁺ de memória (CD44^{high}CD62L^{low}) e CD8⁺ naïve (CD44^{low}CD62L^{high}) nos pulmões de camundongos tratados com DT quando comparados aos animais controle tratados com PBS (Fig. 15). Com 10 semanas após a infecção, foi observado um maior número de linfócitos T CD4⁺ naïve (CD44^{low}CD62L^{high}) e memória (CD44^{high}CD62L^{low}), além de um maior número absoluto de T CD8⁺ memória (CD44^{high}CD62L^{low}).

4.8 Análise da alteração do perfil de expressão gênica de fatores de transcrição e genes para citocinas após a depleção das células Treg

Para melhor caracterizar os padrões de resposta imune após o tratamento com DT na PCM já estabelecida, foi investigado se a depleção das células Treg no curso da doença alteraria de forma equivalente ao observado com outros ensaios o perfil de expressão de determinados genes nos pulmões, principalmente aqueles relacionados com os perfis de respostas Th1/Th2/Th17 e Treg.

Figura 16 - Expressão relativa de mRNA nos pulmões de camundongos DREG após o tratamento com DT Expressão relativa de mRNA *Tbx21*, *Gata3*, *Rorc*, *Irf-γ*, *Il-4*, *Il-17*, *Tgfb1* e *Foxp3* nos pulmões de camundongos DREG, tratados com PBS (controle) ou DT, após 6 e 10 semanas de infecção. Os dados estão representados como média ± erro padrão (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,001$) (n=12/grupo).



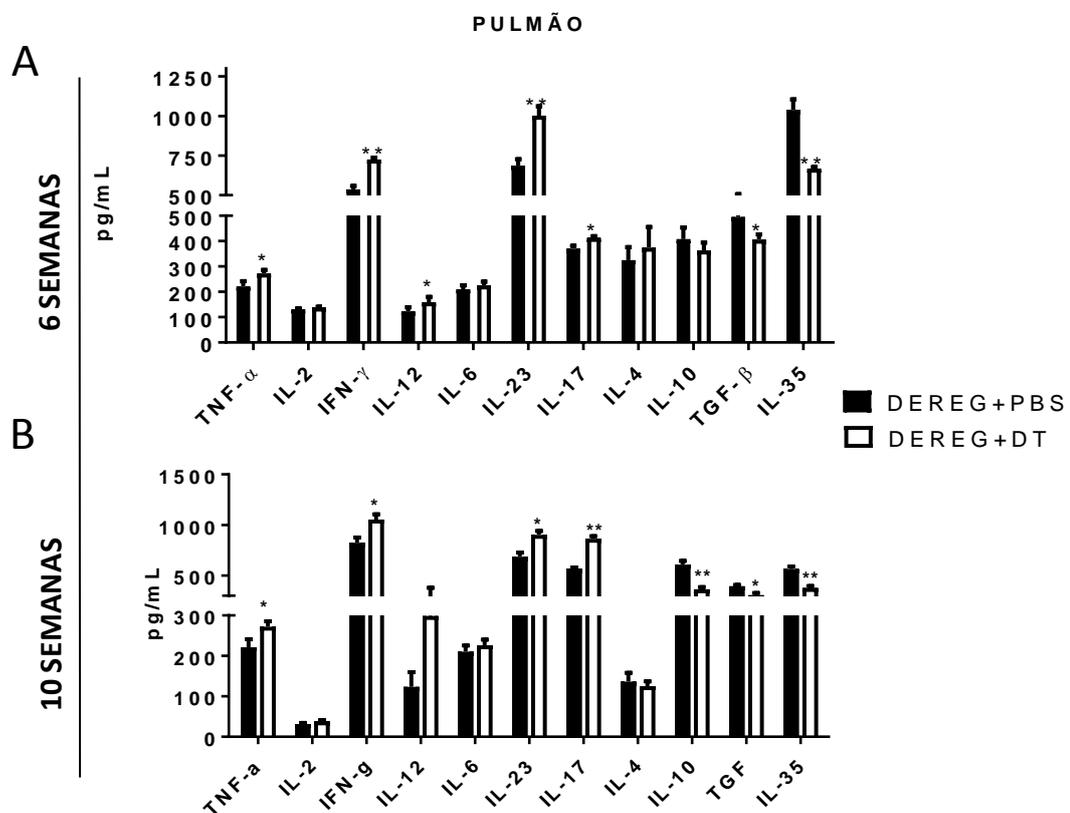
A expressão de mRNA em animais tratados ou não foi analisada após 6 e 10 semanas de infecção por RT-PCR. Foram analisadas as expressões de mRNA para fatores de transcrição *Foxp3*, *Tbx21*, *Gata3*, *Rorc*, *Ifn- γ* , *Il-4*, *Il-17* e *Tgfb1*.

Conforme pode ser observado na figura 16, os níveis de expressão de *Foxp3* diminuíram em ambos os tempos pós infecção, mas, inesperadamente, houve uma tendência a um aumento de *Tgfb1* (TGF- β). Por outro lado, a expressão de mRNA para *Gata3* e *IL-4* praticamente não se alterou após 6 semanas de infecção, tampouco na fase crônica, de 10 semanas pós infecção. O mRNA para os genes *Rorc*, *Tbx21* aumentaram significativamente, acompanhando o aumento da expressão gênica de *Il-17* e *Ifn- γ* em ambos os tempos de infecção, sendo possível observar que após 10 semanas de infecção houve um aumento notável na expressão gênica de *Il17*. Assim, a redução de *Foxp3*, o fator de transcrição de células Treg, nos camundongos DEREK tratados com DT foi paralela ao aumento da expressão de fatores de transcrição e genes de citocinas relacionados a respostas dos tipos Th1 e Th17.

4.9 Alteração dos níveis de citocinas Th1/Th2/Th17 após tratamento com DT

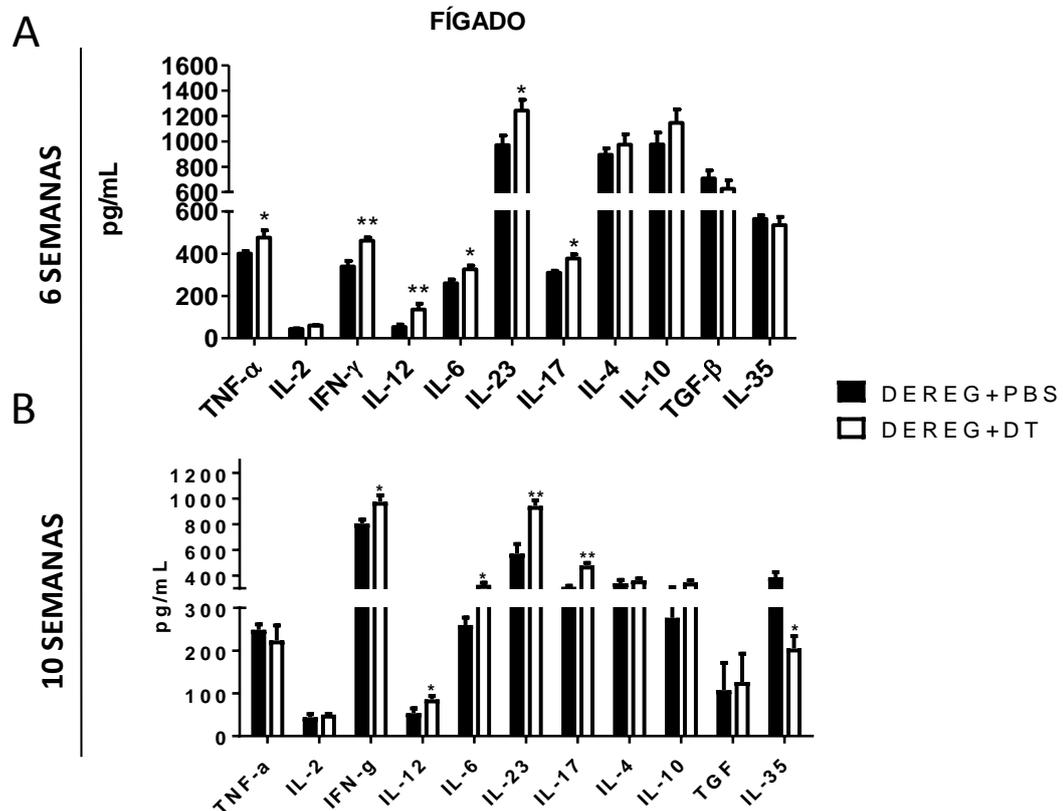
A presença de citocinas características dos tipos Th1, Th2 e Th17 foi analisada em homogenatos de pulmão, fígado e baço de animais tratados com DT ou PBS no período de 6 e 10 semanas de infecção.

Figura 17 - Balanço da resposta celular Th1/Th2/Th17 no pulmão induzida pela depleção das células Treg após 6 e 10 semanas de infecção. Quantificação de citocinas por ELISA em homogenatos de pulmão após 6 semanas (A) e 10 semanas (B) de infecção com *P. brasiliensis* nos grupos tratados com toxina diftérica (DT) e PBS. Os dados estão representados como média±erro padrão (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,005$) (n=12/grupo).



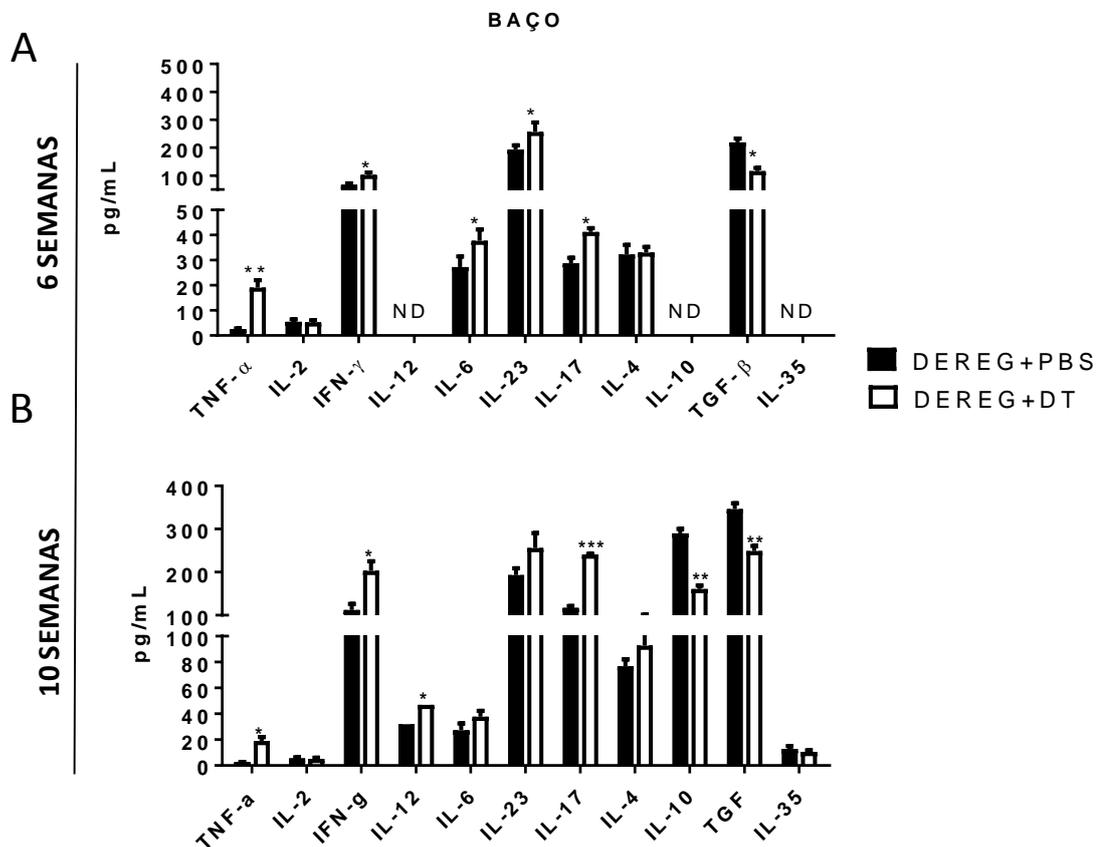
Conforme demonstrado na figura 17, após 6 semanas de infecção foi observado um aumento significativo nos níveis de IL-23, IL-17 e IFN- γ nos pulmões, e ainda uma diminuição na quantidade de TGF- β e IL-35 no pulmão de animais tratados com toxina diftérica a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 6 semanas pós infecção e TGF- β , IL-10 e IL-35 após 10 semanas de infecção. Observou-se também um aumento nos níveis de TNF- α e IL-12 nos homogenatos de pulmão e fígado (Fig. 17; Fig. 18), exceto no baço, o qual não apresentou níveis detectáveis para esta citocina entre os animais DEREG tratados com a DT e os tratados com PBS (Fig.19).

Figura 18 - Balanço da resposta celular Th1/Th2/Th17 no fígado induzida pela depleção das células Treg após 6 e 10 semanas de infecção. Quantificação de citocinas por ELISA em homogenatos de fígado após 6 semanas (A) e 10 semanas (B) de infecção com *P. brasiliensis* nos grupos tratados com toxina diftérica (DT) e PBS. Os dados estão representados como média±erro padrão (* $p<0,05$ e ** $p<0,005$) (n=12/grupo).



Nos homogenatos de fígado em ambos os tempos de infecção, camundongos tratados com DT apresentaram níveis significativamente aumentados de IL-12, IFN- γ , IL-17 e IL-23, porém não apresentou diferença significativa nas citocinas relacionadas ao perfil Treg IL-10, IL-35 e TGF- β (Fig. 18).

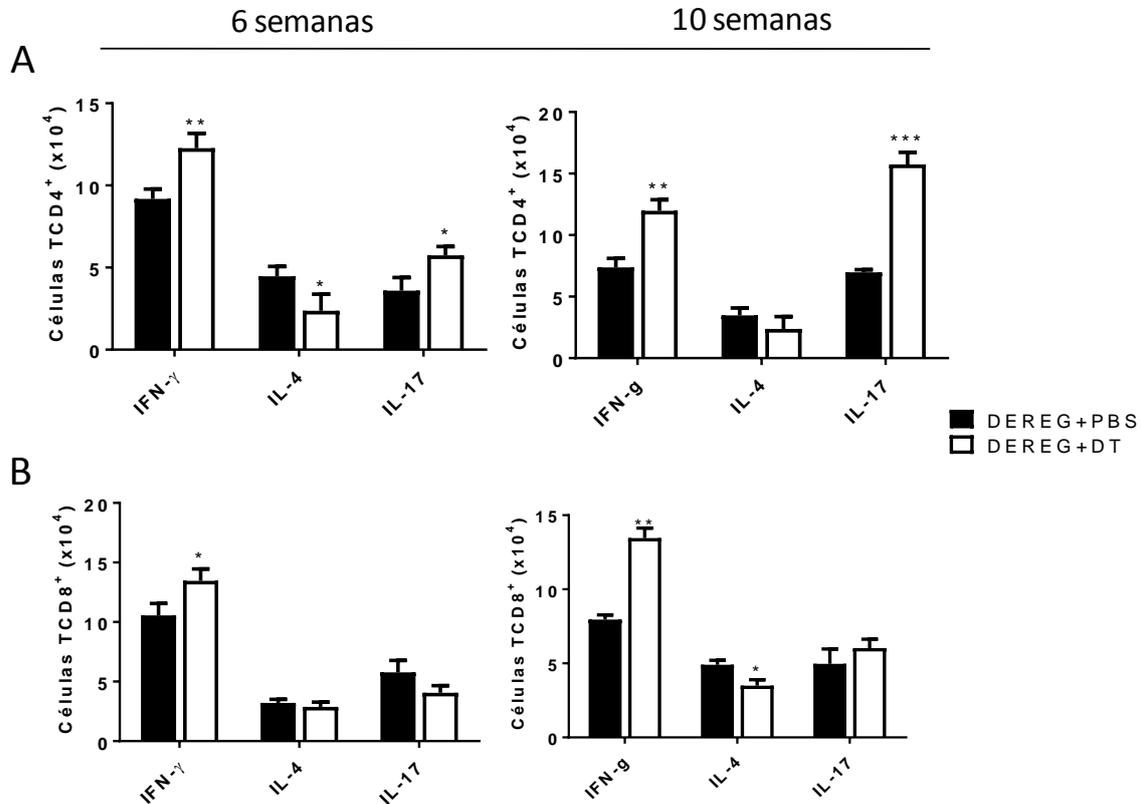
Figura 19 - Balanço da resposta celular Th1/Th2/Th17 no baço induzida pela depleção das células Treg após 6 e 10 semanas de infecção. Quantificação de citocinas por ELISA em homogenatos de baço após 6 semanas (A) e 10 semanas (B) de infecção com *P. brasiliensis* nos grupos tratados com toxina diftérica (DT) e PBS. Os dados estão representados como média±erro padrão (* $p<0,05$ e ** $p<0,005$) (n=12/grupo).



Já no baço, os camundongos tratados com DT após 6 e 10 semanas de infecção apresentavam, em acórdância com os demais órgãos, um aumento nas citocinas IFN- γ e IL-17, apresentando em paralelo, como o esperado, uma diminuição nas citocinas IL-10 e TGF- β , como foi possível visualizar principalmente no tempo mais crônico de infecção (Fig. 19B)

Coerente com o perfil de resposta encontrada nas análises por ELISA dos homogenatos dos pulmões dos animais Dereg tratados com DT e PBS, na análise de citocinas intracelulares por citometria de fluxo foi possível evidenciar um aumento significativo nos números de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺ e T CD4⁺ IL-17⁺ associados a uma redução dos linfócitos T CD4⁺ IL-4⁺ nos pulmões dos camundongos Dereg que tiveram suas Treg depletadas no curso da infecção por *P. brasiliensis* em 6 e 10 semanas pós infecção (Fig. 20).

Figura 20 - Perfil celular Th1/Th2/Th17 induzido pela depleção das células Treg. Expressão intracelular de citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-17 nas populações CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) quantificadas por citometria de fluxo após 6 e 10 semanas de infecção com *P. brasiliensis* nos grupos tratados com toxina diftérica (DT) e PBS. Os dados estão representados como média \pm erro padrão (* $p < 0,05$) (n=12/grupo).

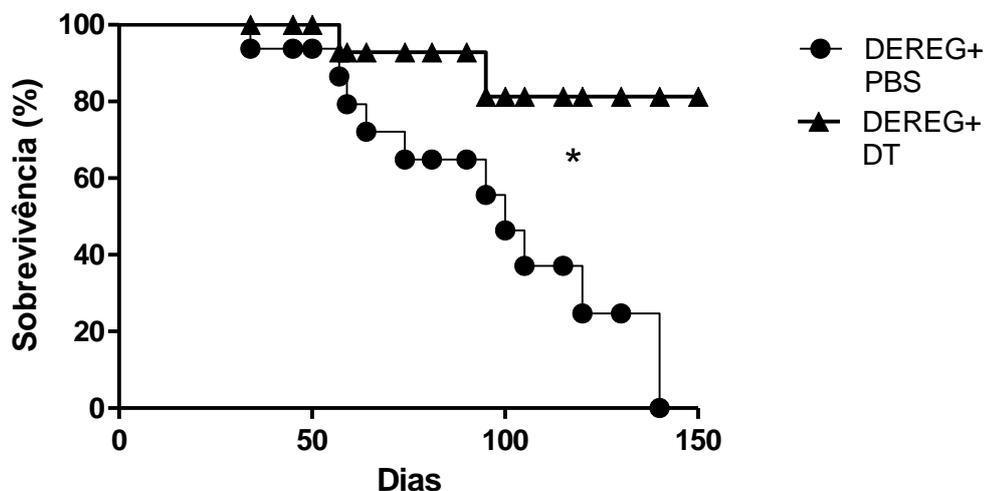


Além disso, foi também observado um aumento do número de células TCD8⁺IFN- γ ⁺ nos pulmões destes camundongos (Fig. 20B). Esta evidência, em conjunto com os resultados obtidos através de RT-PCR e ELISA reforçam a suposição de que a depleção de células Treg pode ser usada para um direcionamento de resposta imune na PCM para um padrão pró-inflamatório, sugerindo que este procedimento no curso da doença favorece uma resposta predominante dos perfis Th1 e Th17, além de promover a ampliação da expansão de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ produtores de IFN- γ .

4.10 Efeito da depleção das células Treg na sobrevida dos camundongos DEREg

Para que fossem avaliados os efeitos da depleção de células Treg na sobrevida de camundongos DEREg, os animais infectados e tratados com DT e com PBS foram acompanhados diariamente por até 150 dias (Fig 18).

Figura 21 - A depleção das células Treg aumenta o tempo de sobrevida de animais DEREg. Curva de sobrevivência de animais DEREg tratados com DT ou PBS 6 semanas após a infecção com *P. brasiliensis*. A sobrevida foi acompanhada por 150 dias. O * representa a diferença significativa entre os grupos (* $p < 0,05$) (n=15/grupo).



Animais tratados com PBS que não tiveram as células Treg depletadas durante a infecção apresentaram as maiores taxas de mortalidade, sobrevivendo por um período médio de 84 dias. Camundongos pertencentes ao grupo que receberam tratamento com DT apresentaram melhora estatisticamente significativa no tempo de sobrevida em comparação aos que receberam PBS, sobrevivendo em média por 105,5 dias e apresentando apenas 20% de mortalidade (Fig. 21).

Ao final do período de observação, 80% dos animais DEREg que foram submetidos ao tratamento com DT ainda se encontravam vivos, de maneira que o tempo médio total de sobrevida desses animais permaneceu indeterminado. Ainda assim, foi possível concluir que a depleção das células Treg na PCM estabelecida diminuiu a taxa de mortalidade, ou seja, aumentou o tempo de sobrevida dos camundongos infectados com *P. brasiliensis*.

5 DISCUSSÃO

Através de uma abordagem experimental utilizando a manipulação de células Treg *in vivo*, foi possível demonstrar que a redução destas células no curso da PCM pulmonar pode trazer efeitos benéficos para o curso da doença estabelecida. Neste trabalho, foram utilizados camundongos C57BL/6 $\text{Foxp3}^{\text{DTR/eGFP}}$ (DEREG) que abriram a possibilidade de manipular o número e função de células Treg em doença estabelecida, sem alterar a função ou número de outros linfócitos já ativados pela infecção com o fungo. Os trabalhos anteriores de Felonato et al. (2012), e Bazan et al. (2015), já haviam demonstrado que as células Treg acumulavam-se no sítio de infecção e que a sua redução poderia trazer efeitos benéficos a vários aspectos da doença. Entretanto, havíamos também demonstrado através de transferência adotiva de células que a presença de células Treg diminuía o excesso de inflamação e lesão tecidual produzida por linfócitos T ativados. Em resumo, a depleção de células Treg no curso da doença poderia trazer efeitos benéficos, mas havia também a possibilidade de induzirmos respostas imunes agressivas e patologia tecidual que poderiam agravar a doença já estabelecida.

Inicialmente verificamos que 99,98% das células Treg podiam ser depletadas com o uso de toxina diftérica (DT) inoculada pela via i.p. na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Como visto por Lahl et al. (2011), o uso da DT por dois dias consecutivos elimina as células Treg completamente, porém por volta de 7 dias após a última injeção de DT há a recuperação da frequência das células Treg. Nosso estudo da cinética de reconstituição das células Treg também demonstrou a recuperação de células Treg pulmonares dentro de 7 dias após o tratamento com DT em camundongos não infectados. Dada esta capacidade de recuperação das células Treg mostrada neste estudo e anteriormente por Lahl et al. (2002) e Rudensky et al. (2007), delineamos um protocolo de modo a manter os animais depletados de células Treg durante as três semanas que se seguiram ao tratamento inicial. Assim, o protocolo adotado para a depleção foi delineado de tal forma que as células Treg se mantivessem em baixo número durante as semanas que se seguiam ao tratamento inicial. Estudos anteriores demonstraram que camundongos DEREG tratados com DT diariamente por 20 dias consecutivos desenvolviam uma patologia relacionada com autoimunidade, apresentando grave linfadenopatia e esplenomegalia e iam a óbito rapidamente (BEROD et al., 2014; RUDENSKY et al., 2007). Por outro lado, foi

demonstrado por Mayer et al. (2014) que um número pequeno de células Treg residuais após o tratamento por DT era suficiente para evitar uma autoimunidade letal. Em função destas informações, o protocolo de depleção utilizado neste trabalho teve como propósito obter uma redução eficiente das células Treg sem, contudo, causar patologia por autoimunidade ou excesso de patologia tecidual por resposta imune excessiva.

O tratamento com DT ocasionou uma diminuição já esperada nas células Treg, associada a um aumento no número de células TCD4⁺Foxp3⁻. Este fato parece estar ligado às funções intrínsecas das células Treg que controlam a expansão de linfócitos T, entre outras células (MELO; CARVALHO, 2009).

Além de reduzir o número de células Treg, o tratamento com DT levou à diminuição de moléculas de superfície (GITR, ICOS e CTLA-4) associadas com a função supressora ou desativadora mediada por linfócitos Treg. Efeito semelhante foi observado em outros modelos de infecção, como na tuberculose e na infecção pelo RSV (FULTON et al., 2010; SCOTT-BROWNE et al., 2007).

Tanto na sexta quanto na décima semana pós-infecção após o tratamento com DT, foi observada uma redução da carga fúngica nos órgãos-alvo: pulmão, fígado e baço, sugerindo que a presença das células Treg no sítio de infecção estaria diretamente relacionado com a dificuldade de erradicação do patógeno pela imunidade do hospedeiro. Resultado equivalente foi relatado por Moreira et al. (2008), onde a transferência de células Treg de camundongos selvagens para animais com deficiência desta subpopulação celular aumentava significativamente o número de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* nos pulmões quando comparado ao grupo que não recebeu transferência de células Treg. Além disso, camundongos do tipo selvagem que receberam anticorpos monoclonais anti-CD25, diminuindo assim a população de células Treg, tiveram uma diminuição significativa no número de partículas fúngicas viáveis (MOREIRA et al., 2008). Dessa maneira, consistente com o presente trabalho e nossos achados anteriores (BAZAN et al., 2015; FELONATO et al., 2012), os estudos acima descritos demonstram que as células Treg favorecem o crescimento fúngico nas lesões.

O tratamento com a DT nos camundongos DREG também surtiu um efeito marcante na gravidade das lesões desenvolvidas na PCM, uma vez que,

concomitante com a redução da carga fúngica nas lesões, houve também uma diminuição no número e tamanho das lesões nos pulmões, fígado e baço dos animais tratados com DT. Da mesma forma, não observamos inflamação excessiva em paralelo ao aumento da imunidade T-dependente. Deve-se também considerar que com a significativa redução da carga fúngica, possivelmente a redução da inflamação pode ser também fungo-mediada.

Os efeitos da ação das células Treg no curso de diferentes doenças dependem do patógeno envolvido. Os dados encontrados na literatura demonstram que a depleção de células Treg por administração de DT ou anticorpo monoclonal anti-CD25 no curso de algumas enfermidades leva a um aumento da mortalidade de animais infectados, progressão da doença e prevalência do patógeno. Por exemplo, a depleção de células Treg por anti-CD25 levou a um aumento da mortalidade de animais infectados com *Toxoplasma gondii*, maior susceptibilidade à doença e maior carga parasitária (COUPER et al., 2009; TENORIO et al., 2010). Na infecção por *Cryptococcus neoformans*, o tratamento com toxina diftérica em animais DREG levou a aumento da lesão pulmonar e resposta do tipo Th2 exacerbada (SCHULZE et al., 2014).

Os resultados do presente trabalho, com relação a esses parâmetros, são semelhantes aos demonstrados recentemente por nosso grupo, nos quais animais C57BL/6 Foxp3 GFP tratados com o anticorpo monoclonal anti-CD25 antes da infecção por *P. brasiliensis* para a depleção das células Treg também apresentaram menor carga fúngica, além de lesões menos graves nos órgãos-alvo (BAZAN et al., 2015). Da mesma forma, em estudo anterior, Felonato et al. (2012), utilizou animais resistentes e suscetíveis ao *P. brasiliensis*, A/J e B10.A respectivamente. Quando tratados com anti-CD25 em período antes da infecção, os animais igualmente apresentaram uma menor gravidade da doença, caracterizada por menor carga fúngica e lesões menores e com menor número de leveduras. O acúmulo de células Treg no pulmão durante a PCM levanta a possibilidade de que esta população celular desempenhe um papel de supressão de resposta imune nesse sítio. Além de migrarem para o local de infecção, as células Treg apresentaram alteração do fenótipo da superfície celular, evidenciando uma ativação dessas células no curso da doença (Bazan et al., 2015). Os sinais que induzem a ativação das células Treg na infecção pelo *P. brasiliensis* ainda não estão bem estabelecidos.

Além do efeito positivo que a diminuição do número de células Treg proporcionou na gravidade da PCM, foi verificado também um número mais elevado de macrófagos, células dendríticas, bem como linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ ativados nos pulmões de camundongos que foram submetidos à depleção das células Treg por DT, indicando que a diminuição das células Treg no sítio da infecção ocasiona um resgate da imunidade protetora T-dependente. O aumento do influxo de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória/efetoras e naïve é consistente com o observado em um modelo de infecção por *M. tuberculosis*, onde foi demonstrado que a depleção de células Treg levou, além de uma diminuição da carga bacteriana, um aumento na porcentagem de células T naïve e memória/ativadas nos pulmões dos camundongos (SCOTT-BROWNE et al., 2007).

O aumento nas citocinas IL-12 nos pulmões, além de contribuírem para a diferenciação das células T para um perfil Th1 produtor de IFN- γ que deve ter levado à ativação de macrófagos e células dendríticas dos camundongos tratados, melhorando a sua função efetora e de co-estimulação (LANKFORD; FRUNCH, 2003). A IL-23, por outro lado, tem função de manutenção de linfócitos Th17 que são primariamente induzidos pelas citocinas IL-6 e TGF- β (citar revisão de Th17).

O aumento da imunidade celular e a melhora em sua ativação e atividade frente a infecções patogênicas após a depleção de células Treg também foi encontrado frente a diferentes infecções como as causadas pelo *Plasmodium yoelii*, *Leishmania spp.* e *Mycobacterium tuberculosis* (ABEL et al., 2012; BELKAID et al., 2002; KURSAR et al., 2007). Neste caso, nossos dados revelam que a depleção das células Treg no curso da infecção por *P. brasiliensis* interfere positivamente na melhora da resposta imune celular, uma vez que permite um resgate na imunidade mediada por macrófagos e linfócitos, e melhora nas suas funções efetoras possibilitando um melhor controle no crescimento do patógeno e atenuação na gravidade da doença.

Os dados da quantificação de citocinas demonstraram que animais DREG tratados com DT produzem menos IL-10 nos pulmões quando comparados com animais controle após 6 semanas de infecção. Como animais IL-10^{-/-} infectados com *P. brasiliensis* apresentam um controle significativamente mais eficiente da doença quando comparados a animais selvagens (COSTA et al., 2013), a menor quantidade de IL-10 associada à diminuição de células Treg pós depleção foi provavelmente

importante para a resistência aumentada à infecção observada nos animais tratados com DT. Simultaneamente, foi observado um aumento nos níveis de citocinas características de respostas do tipo Th1 e Th17, tanto na fase mais inicial como na fase tardia, indicando, assim, resposta imune direcionada a estes perfis de linfócitos. O perfil da produção de citocinas pós infecção nos animais DEREK tratados com DT é consistente com o aumento da expressão dos mRNAs dos fatores de transcrição Tbet e RORC e de seus respectivos percussores de citocinas IFN- γ e IL-17. Os níveis de IL-4 e GATA-3 relacionados com a resposta Th2 foram observados em menor expressão na fase inicial, apresentando uma pequena recuperação nos níveis de expressão na fase tardia, após 10 semanas de infecção.

A IL-35, recentemente descrita como citocina com capacidade supressora produzida por células nTreg e capazes de induzir células Tr35 que não expressam Foxp3, apareceu em níveis mais baixos nos pulmões de camundongos que tiveram suas células Treg depletadas. Visto que as nTregs são fontes naturais de IL-35 e que sua produção aumente 5-10 vezes ao estabelecer contato com células T (COLLISON et al., 2010), a diminuição desta citocina frente a depleção das células Treg está de acordo com o esperado, uma vez que há uma migração expressiva de nTreg durante a infecção por *P. brasiliensis*, como demonstrado por Bazan et al. (2015). Esta redução nos níveis de IL-35 ocorre em paralelo à diminuição da expressão de Foxp3 nos pulmões dos camundongos DEREK tratados com DT.

Dentre as citocinas analisadas neste trabalho, foi detectado um aumento expressivo (principalmente durante a fase mais inicial) de IFN- γ , citocina característica da resposta Th1. O aumento nos níveis desta citocina também foi demonstrado em um modelo de infecção por *M. tuberculosis*, onde a depleção das células Treg também causou uma diminuição significativa na carga de bactérias quando comparado aos camundongos controle (JARON et al., 2008). Na PCM, Cano et al (1998) demonstrou que tanto a linhagem susceptível B.10A quanto a linhagem resistente A/J que tinham seus níveis de IFN- γ endógenos neutralizados apresentavam uma exacerbação da infecção pulmonar, disseminação antecipada para o baço e fígado e deficiência na resposta imune protetora contra o fungo. Assim como as células T CD4⁺, as células T CD8⁺ produtoras de citocinas desempenham papel importante na proteção contra diversos patógenos. A produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ parece ser essencial para o controle de infecções causadas por

patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis*, *Leishmania spp.* e *Cryptococcus neoformans*, principalmente por meio da ativação das células infectadas (COLMENARES et al., 2003; HERATH et al., 2003; MA et al., 2002; TSAGOZIS et al., 2003). Além disso, é sabido que camundongos resistentes à infecção por *P. brasiliensis* desenvolvem resposta T CD4⁺ do tipo Th1, e apresentam também células T CD8⁺ que sintetizam grandes quantidades de IFN- γ , as quais são potencialmente protetoras na PCM pulmonar (CHIARELA et al., 2007; KASHINO et al., 2000), o que coincidentemente também foi demonstrado no presente trabalho após a depleção das células Treg.

As ações das citocinas IL-12 e IL-23 são semelhantes neste cenário, uma vez que ambas são capazes de atuar sobre as células Th1 de memória para aumentar sua proliferação, bem como a produção de IFN- γ (OPPMANN et al., 2000). Juntamente a este fato, a diminuição das células Treg também parece induzir uma diferenciação das células TCD4⁺ para o perfil de resposta Th17, principalmente na fase tardia, onde a produção de IL-17 é mais expressiva. A citocina anti-inflamatória TGF- β é responsável por dirigir a diferenciação de células naíve CD4⁺ para Treg através da indução de Foxp3 (ROWE et al., 2011). Contudo, a IL-23, citocina da família da IL-12, evita a indução de Foxp3 por TGF- β , e ao invés disso sustenta a diferenciação de células T naíve para a linhagem Th17 através da indução do fator de transcrição *Rorc* (IWAKURA; ISHGAME, 2006). É importante salientar que o achado do presente trabalho relacionado ao aumento da resposta mediada pelo perfil Th17 não esteve associado com uma inflamação exacerbada em nenhum dos órgãos-alvo, visto que as análises histopatológicas dos órgãos de camundongos DREG tratados com DT após 6 e 10 semanas de infecção apresentaram tecidos conservados e praticamente não lesionados. Em 2014, foi demonstrado que em candidíase disseminada a expansão de células Th17 em paralelo à diminuição de células Treg causavam uma resposta inflamatória exacerbada associada à patogenicidade. No entanto, em outras formas da doença, como candidíase gastrointestinal, a expansão de linfócitos Th17 leva à diminuição da colonização por *C. albicans* (WIBLEY; GAFFEN, 2014). Embora os efeitos atribuídos ao eixo IL-23/Th17 possam ser positivos ou negativos, no cenário de infecções fúngicas sistêmicas a ausência ou diferenciação defeituosa de células Th17 tem sido associada à efeitos negativos como pneumonia recorrente por fungos filamentosos e

a ocorrência de candidíase mucocutânea (BÄR et al., 2014; CONTI; GAFFEN, 2015;). Desta forma, de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho coerentes com os trabalhos citados, podemos considerar que a resposta tardia mediada por linfócitos Th17 tem um efeito imunoprotetor frente à infecção por *P. brasiliensis*.

Um outro benefício relacionado à depleção das células Treg foi visto em relação à mortalidade causada pela PCM. Os camundongos DEREK tratados com DT no curso da infecção apresentaram uma menor taxa de mortalidade quando comparados aos camundongos controle tratados com PBS, o que está diretamente relacionado com a melhora da imunidade celular, o que causou uma erradicação mais eficiente do patógeno e diminuiu a gravidade das lesões nos órgãos alvo estudados. Este mesmo evento foi encontrado nas infecções por *Plasmodium yoelii*, *Leishmania spp.* e *M. tuberculosis* (ABEL et al., 2012; BELKAID et al., 2002; KURSAR et al., 2007) citados anteriormente.

5.1 Principais perspectivas

Como a PCM é diagnosticada tardiamente, a caracterização do efeito da eliminação ou diminuição de células Treg em doença já estabelecida abre a possibilidade do uso deste procedimento como medida terapêutica.

O bloqueio de CTLA-4 com uso de anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 tem sido bastante utilizado como ferramenta terapêutica em diversas enfermidades como câncer (BATHIA et al., 2009) e doenças infecciosas (HAFALLA et al., 2012), visto que o fármaco quimioterápico ipilimumabe, anticorpo monoclonal anti CTLA-4 totalmente humanizado, vem trazendo benefícios frente a casos como melanoma grave (BATHIA et al., 2009) e artrite reumatoide (LEE et al., 2016).

Em nosso modelo experimental, os animais resistentes ao *P. brasiliensis* são produtores de altos níveis de TGF- β e IDO, além de expandirem grande número de células Treg (ARAUJO et al., 2014; FELONATO et al.). Estes estudos sugeriram que o grande número de células Treg nos animais resistentes poderia ser decorrente de uma ação efetiva de IDO via ativação do fator de transcrição AhR (Receptor Aril hidrocarboneto). De fato, vários estudos têm demonstrado que a ativação de AhR induz a expressão de IDO em vários tecidos murinos, levando a um aumento do número de células Treg (MEZRICH et al., 2010). Neste contexto, outra alternativa de modulação da função de células Treg no curso da infecção pelo *P. brasiliensis* seria a o tratamento através da utilização de antagonistas (ou agonistas) exógenos do Receptor Aril hidrocarboneto, um fator de transcrição citoplasmático que reconhece aminoácidos aromáticos e regula a geração de células Treg e Th17 em camundongos. A ativação de AhR por agonistas como o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), um poluente organoclorado altamente tóxico, induz células Treg por um mecanismo dependente de TGF- β , enquanto que a ativação de AhR pelo agonista 6-formilindol [3,2-b] carbazol (FICZ), um ligante endógeno, inibe a diferenciação de células Treg, induzindo a diferenciação de células Th17. Assim, o AhR regula a diferenciação de células Treg e Th17 de acordo com a especificidade do ligante (QUINTANA et al., 2008). Desta forma, o uso de agonistas do AhR permitiria a imunomodulação da PCM já estabelecida e poderia se tornar terapia auxiliar para os limitados procedimentos quimioterapêuticos para esta micose existentes na atualidade.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra pela primeira vez, usando modelo que permite a adequada manipulação de células Treg *in vivo* na PCM em curso, que a diminuição desta população celular pode restaurar a imunidade e reverter a gravidade da doença. A inibição destas células no curso da doença induz a diminuição da carga fúngica, ativa a imunidade Th1/Th17 e reduz significativamente a mortalidade dos animais tratados. Este resultado está, portanto, de acordo com um paradigma associado à função das células Treg na PCM, uma vez que trabalhos anteriores, onde as células Treg foram depletadas no início ou antes da infecção por *P. brasiliensis*, relacionavam a presença dessas células a quadros mais graves da doença.

REFERÊNCIAS*¹

ABEL, S.; UEFFING, K.; TATURA, R.; HUTZLER, M.; HOSE, M.; MATUSCHEWSKI, K.; KEHRMANN, J.; WESTENDORF, A. M.; BUER, J. AND HANSEN, W. *Plasmodium yoelii* infection of BALB/c mice results in expansion rather than induction of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. **Immunology**, v. 148, p. 197–205, 2016.

ALMEIDA, S. R.; LOPES, J. D. The low efficiency of dendritic cells and macrophages from mice susceptible to *Paracoccidioides brasiliensis* in inducing a Th1 response. **J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 529-37, 2001.

ARAÚJO, E.F.; et al. Indoleamine 2,3-Dioxygenase controls fungal loads and immunity in paracoccidioidomycosis but is more important to susceptible than resistant hosts. Vinetz JM, ed. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8 (11), p. e47102, 2014.

BAGAGLI, E.; THEODORO, R.C.; BOSCO, S.M.G.; MCEWEN, J. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, p. 197-207, 2008.

BARU, A.M.; et al. Absence of Foxp3 regulatory T cells during allergen provocation does not exacerbate murine allergic airway inflammation. **PLoS One**, v. 7 (10), p. 233-47 2012.

BARU, A.M. *et al.* Selective depletion of Foxp3(+) Treg during sensitization phase aggravates experimental allergic airway inflammation. **Eur. J. Immunol**, v. 40, p. 2259–2266, 2010.

BAZAN, S.B.; et al. Loss- and Gain-of-Function Approaches Indicate a Dual Role Exerted by Regulatory T Cells in Pulmonary Paracoccidioidomycosis. Vinetz JM, ed. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9(10), p 41-89, 2015.

¹ *De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

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

BEROD, L.; STUVE, P.; VARELA, F.; BEHREND, J.; SWALLOW, M.; *et al.* Rapid Rebound of the Treg Compartment in DEREK Mice Limits the Impact of Treg Depletion on Mycobacterial Burden, but Prevents Autoimmunity. **PLoS ONE**, v. 9(7), p. e102804, 2014.

BHATIA, S.; TYKODI, S.S.; THOMPSON, J.A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology**, v. 23, p. 488–96, 2009.

BLOTTA, MAMONI, R.L.; *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil; a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, p. 390-4, 1999.

BOCCA, A.L.; AMARAL, A.C.; TEIXEIRA, M.M.; SATO, P.K.; SHIKANAI-YASUADA, M.A.; FELIPE, M.S.S. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, v. 8(9), p.1177–1191, 2013.

BODOR, J.; FEHERVARI, Z.; DIAMOND, B.; SAKAGUCHI, S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. **Eur J Immunol.**, v. 37, p. 884-95, 2007.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Ver**, v. 6, p. 89-117, 1993.

BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 2289-2294, 1989.

CALICH, V. L. G.; SINGER-VERMES, L. 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.; SINGER-VERMES, L. M.; RUSSO, M.; VAZ, C. A. C. AND BURGER. E. CALICH, V. L. G. IN M. FRANCO, C.S. LACAZ, A. RESTREPO-

MORENO, AND G. DEL NEGRO(EDS), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, **Boca Raton**, v. 1, p. 151-173, 1994.

CALICH, V.L.G., VAZ, C.A.C. AND BURGER E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v.149, p. 407-416, 1998.

CAMPBELL, D.J.; ZIEGLER, S.F. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**, v. 7(4), p. 305-10, 2007.

CANO, L. E.; SINGER-VERMES, L. M.; COSTA, T. A.; MENGEL, J. O.; 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 mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect. Immunol.** , v. 68(1), p. 352-359, 2000.

CASTAÑEDA, E., STEVENS, D.; BRUMMER, E. - A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency and the effect of siderophores. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, p. 351-358, 1988.

CAVASSANI, K. A.; CAMPANELLI, A. P.; MOREIRA, A. P.; VANCIM, J. O.; VITALI, L. H.; MAMEDE, R. C.; MARTINEZ, R.; SILVA, J. S. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **J. Immunol.**, v. 177, p. 5811-5818, 2006.

CHIARELLA, A. P.; ARRUDA, C.; PINA, A.; COSTA, T. A.; VALENTE-FERREIRA, R. C. & CALICH, V.L.G. The relative importance of CD4+ and CD8+ T cells in immunity to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Microbes & Infect.**, v. 9, p. 1778-1788, 2007.

COLLISON, L.W.; CHATURVEDI, V.; HENDERSON, A.L.; GIACOMIN, P.R.; GUY, C.; BANKOTI, J.; FINKELSTEIN, D.; FORBES, K.; WORKMAN, C.J.; BROWN, S.A.; REHG, J.E.; JONES, M.L.; NI, H.T.; ARTIS, D.; TURK, M.J.; VIGNALI, D.A. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. **Nat Immunol.** Dec, v. 11(12), p. 1093-101, 2010.

COSTA, T.A.; BAZAN, S.B.; FERIOTTI, C.; ARAÚJO, E.F.; BASSI, Ê.; LOURES, F.V.; CALICH V.L. In pulmonary paracoccidioidomycosis IL-10 deficiency leads to

increased immunity and regressive infection without enhancing tissue pathology. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7(10), p. e2512, 2013.

COUPER K.N., LANTHIER P.A., PERONA-WRIGHT G., KUMMER L.W., CHEN W., SMILEY S.T, MOHRS M., JOHNSON L.L. Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. **J Immunol.**, v. 182 (7), p. 3985-3994, 2009.

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18(5), p. 1441-54, 2002.

COUTINHO, Z. F., WANKE, B., TRAVASSOS, C., OLIVEIRA, R. M., XAVIER, D. R. AND COIMBRA, C. E. A. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998–2006). **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, p. 673–680, 2015.

DEAGLIO, S.; DWYER, K. M.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; USHEVA, A., ERAT, A.; CHEN, J. F.; ENJYOJI, K.; LINDEN, J.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K.; STROM, T. B.; ROBSON, S. C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **J Exp Med.**, v. 204, p. 1257-65, 2007.

ELKINS, K. L., COOPER, A., COLOMBINI, S. M., COWLEY, S. C., KIEFFER, T. L. In vivo clearance of an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* LVS, is dependent on the p40 subunit of interleukin-12 (IL-12) but not on IL-12 p70 **Infect. Immun.**, v. 70, p. 1936-1948, 2002.

FARIA, A.M.; WEINER, H.L. “Oral tolerance and TGF- β - producing cells,” **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 3, p. 179–190, 2006.

FAVA NETO. Estudos quantitativos sobre a fixação do complement na blastomicose sulamericana, com antígeno polissacarídeo. *Arq. Cir. Clin. Exp. São Paulo*, v. 18, p. 197-254, 1955.

FELONATO, M.; PINA, A.; ARAUJO, E.F.D; LOURES, F.V.; BAZAN, S.B., et al. Anti-CD25 Treatment depletes Treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v. 7(11), p. e51071, 2012.

FELONATO, M.; PINA, A.; BERNARDINO, S.; LOURES, F.V.; DE ARAUJO, E. F.; CALICH, V. L. CD28 exerts protective and detrimental effects in a pulmonary model of paracoccidioidomycosis. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 4922-35, 2010.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification on its clinical forms. **Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p.129-133; 1987.

FEUERER, M.; HILL, J. A.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. **Nature Immunology**, v. 10, p. 689-695, 2009.

FULTON, R.B., MEYERHOLZ, D.K., VARGA, S.M. Foxp3+ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. **J Immunol.**, v. 185(4), p. 2382-2392, 2010.

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

GROTH, B. F, LANDAY, A. L. Regulatory T cells in HIV infection: pathogenic or protective participants in the immune response? **AIDS**, v. 22, p. 671–683, 2008.

HAFALLA, J.C.; CLASER, C.; COUPER, K.N.; GRAU, G.E.; RENIA, L.; DE SOUZA, J.B.; RILEY E.M. The CTLA-4 and PD-1/PD-L1 inhibitory pathways independently regulate host resistance to Plasmodium-induced acute immune pathology. **PLoS Pathog**, v. 8, p. e1002504, 2012.

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, p. 793-800, 1991.

IWAKURA, Y. AND ISHGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116(5), p. 1218-1222, 2006.

KASHINO, S. S., FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C. A.; BURGER, E.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. **J. of Interferon Cytokine Res.**, v. 20, p.89-97, 2000.

KIM, J.M., RASMUSSEN, J.P.& RUDENSKY, A.Y.; Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. **Nature Immunology**, v.8, p. 191-197, 2007.

KROETZ, D.N. & DEEPE, G.S. JR. CCR5 dictates the equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory Foxp3+ T cells in fungal infection. **J Immunol**, v. 184, p. 5224-5231, 2010.

KURSAR, M.; KOCH, M.; MITTRÜCKER H.W.; NOUAILLES G.; BONHAGEN K.; KAMRADT T.; KAUFMANN S.H. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol.**, v. 178 (5), p. 2661-2665, 2007.

LACAZ, C. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence; Taxonomy. In: Franco, M., Lacaz, C., Restrepo, A., Del Negro, G. (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, **Boca Ratón**, p. 1-11, 1994.

LAHL, K., AND T. SPARWASSER. In vivo depletion of Foxp3+ Tregs using the DREG mouse model. In *Regulatory T Cells: Methods and Protocols*. Kassiotis, George, Liston, and Adrian, **eds. Springer**. p. 157-172, 2011.

LAHL, K., C. LODDENKEMPER, C. DROUIN, J. FREYER, J. ARNASON, G.EBERL, et al. Selective depletion of Foxp3 regulatory T cells induces a scurfy-like disease. **J. Exp. Med.**, v. 204(1), p. 57–63, 2007.

LANKFORD, C.S.R.; FRUNCH, M.D. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p. 49-56, 2003.

LEE, B.; WONG, A.; KEE, D.; NEESON, P.; SHANDU, S. et al. The use of ipilimumab in patients with rheumatoid arthritis and metastatic melanoma. **Ann Oncol**, v. 27, p. 1174-1177, 2016.

LOEBBERMANN, J.; THORNTON, H.; DURANT, L.; et al. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. **Mucosal Immunol.**, v. 5(2), p. 161–72, 2012.

LOOSE, D. S.; STOVER, E. P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; & FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol protein and inhibits a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 80, p. 7659-7663, 1983.

Lopes, J.D.; Moura-Campos, M.C.R.; Vicentini, A.P.; Gesztesi, J.L.; de-Souza, W., Camargo Z.P. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Braz J Med Biol Res.**, v. 27, p. 2309-2313, 1994.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; ARAÚJO, E. F.; LEITE, K. R.; CALICH, V. L. TLR4 signaling leads to a more severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. **Infec. Immun.**, v, 78, p. 1078-1088, 2010.

LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M; CALICH, V. L. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J. Immunol.**, v.183, p. 1279-1290, 2009.

LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hypho-blastomycoses americanas. **Bras. Med.**, v. 22, p. 141-144, 1908.

MAMONI, R. L.; NOUER, S. A.; OLIVEIRA, S. J.; MUSATTI, C. C.; ROSSI, C. L.; Z. P.; BLOTTA, M. H. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 153-159, 2002.

MAMONI, R.L.; BLOTTA, M.H. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytocine*, v. 32, p. 20-29, 2005.

MARQUES, S.A.; CORTEZ, D.B.; LASTÓRIA, J.C.; CAMARGO, R.M.P.; MARQUES, M.E.A. Paracoccidioidomicose: frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **An Bras Dermatol.**, v. 82(5), p. 411-7, 2007.

MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57(19), p.11-20, 2015.

MARTINS, G.B.; SALUM, F.G.; FIGUEIREDO, M.A.Z. et al. Paracoccidioidomicose bucal: relato de três casos. **RBPO.**, v. 2, p.22-8, 2003.

MATTAROLLO, S.R.; STEEGH, K.; LI, M.; DURET H, FOONG NGIOW S, SMYTH MJ. Transient Foxp3⁺ regulatory T-cell depletion enhances therapeutic anticancer vaccination targeting the immune-stimulatory properties of NKT cells. **Immunol Cell Biol.**, v. 91(1), p.105–14, 2013.

MAYER, C. T., et al. Few Foxp3regulatory T cells are sufficient to protect adult mice from lethal autoimmunity. **Eur. J. Immunol.**, v. 44(10), p. 2014.

MELO, K.M; CARVALHO, B.T.C. T regulatory cell: mechanism of action and function in human diseases. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 32(5), p.184-188, 2009.

MELZRIC, J.; FESHNER, J.H.; ZHANG, X.; JONHSON, 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.

MEZRIC, J.D.; 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. **Journal of immunology**, v. 185(6), p. 3190-3198, 2010.

MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; MOSCI, P.; SHAROE, A. S.; ROMANI, K. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are

essential components of the memory to *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6298-6308, 2002.

MOREIRA, A. P.; CAVASSANI, K. A.; MASSAFERRA TRISTÃO, E. S.; CAMPANELLI, A. P.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. **J. Immunol.**, v. 180, p. 3049-56, 2008.

NETEA, M. G.; SUTMULLER, R.; HERMANN, C.; VAN DER GRAAF, C. A.; VAN DER MEER, J. W.; VAN KRIEKEN, J. H.; HARTUNG, T.; ADEMA, G.; KULLBERG, B. J. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 3712-3718, 2004.

OLIVEIRA, S. J.; MAMONI, R. L.; MUSATTI, C. C.; PAPAORDANOU, 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. **Microbes and Infection**, v.4, p. 139-144, 2002.

OPPMANN, B., LESLEY, R., BLOM, B., TIMANS, J. C., XU, Y., HUNTE, B., VEGA, F., YU, N., WANG, J., SINGH, K., ZONIN, F., VAISBERG, E., CHURAKOVA, T., LIU, M., GORMAN, D., WAGNER, J., ZURAWSKI, S., LIU, Y., ABRAMS, J. S., MOORE, K. W., RENNICK, D., DE WAAL-MALEFYT, R., HANNUM, C., BAZAN, J. F., KASTELEIN, R. A. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, p. 715-725, 2000

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L.S. Paracoccidioidomicose- revisão da literatura. **Scientia Medica.**, v. 15, p. 274-278, 2005.

Puccia, R. e Travassos, L.R. 43 kDa glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p. 1610-1615, 1991.

QUINTANA, F.J.; BASSO, A.S.; IGLESIAS, A.H.; KORN, T.; FAREZ, M.F.; *et al* Control of T(reg) and Th17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, p. 65–71, 2008.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med Mycol.**, v. 39, p. 233-41, 2001.

RESTREPO, A. ; BENARD, G. ; CASTRO, C. C. ; AGUDELO, C. A. ; TOBON, A. M. . Pulmonary paracoccidioidomycosis.. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 29, p. 182-197, 2008.

ROMANI, L. The Tcell response against fungal infections. **Curr Opin Immunology**, v. 9, p. 484-490, 1997.

ROWE, J.H.; ERTELT, J.M.; WAY, S.S. Foxp3+ regulatory T cells, immune stimulation and host defense against infection. **Immunol.**, v.136, p. 1–10, 2011.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 531-562, 2004.

SAN-BLAS, G. E NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In R.L. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications**, , p. 205-266, 2001.

SANTO, A.H. Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of São Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death. **Rev Panam Salud Publica**, v. 23, p. 313-24, 2008.

SCHULZE, B., PIEHLER, D., ESCHKE, M., VON BUTTLAR, H., KÖHLER, G., SPARWASSER, T. AND ALBER, G. CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress fatal T helper 2 cell immunity during pulmonary fungal infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 44, p. 3596–3604, 2014.

SCOTT-BROWNE, J.P.; SHAFIANI, S.; TUCKER-HEARD, G.; ISHIDA-TSUBOTA, K.; FONTENOT, J.D.; RUDENSKY, A.Y.; BEVAN, M.J.; URDAHL, K.B. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **J Exp Med.**, v. 204 (9), p. 2159-2169, 2007

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F. DE Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L. E MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39(3), p. 297-310, 2006.

SOJKA, D.K.; HUANG, Y.H.; FOWELL, D.J. Mechanisms of regulatory T cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124(1), p.13-22, 2008.

SUTMULLER, R. P.; DEN BROK, M. H.; KRAMER, M.; BENNINK, E. J.; TOONEN, L. W.; KULLBERG, B. J.; JOOSTEN, L. A.; AKIRA, S.; NETEA, M. G.; ADEMA, G. J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **J. Clin. Invest.**, v. 116, p. 485-494, 2006.

SUVAS, S.; AZKUR, A.K.; KIM, B.S.; KUMARAGURU, U.; ROUSE, B.T. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. **J Immunol.**, v.172, p. 4123-4132, 2004.

TABORDA, C.P.; DA SILVA, M.B.; NOSANCHUK, J.D.; TRAVASSOS, L.R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Mycopathologia**, v. 165, p. 301-339, 2008.

VALLE, A.C.F.; WANKE, B.; PEIXOTO, T.C. et al. Tratamento da paracoccidioidomicose: estudo retrospectiva de 500 casos. **An Bras Dermatol**, v. 67, p. 251-4, 1998.

VEIGA-PARGA T, SURYAWANSHI A, MULIK S, et al. On the role of regulatory T cells during viral-induced inflammatory lesions. **J Immunol.**, v. 189(12), p. 5924–33, 2012.

VICENTINI, A.P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, M.F.; SOUZA, V.; MORAES, J.Z.; TRAVASSOS, L.R.; et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infect Immun.**, v. 62, p. 1465-1469; 1994.

WEINER, H.L. "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF- β -secreting regulatory cells". **Microbes and Infection**, v. 3, p. 947–954, 2001.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S.L. Brothers in Arms: Th17 and Treg Responses in *Candida albicans* Immunity. Heitman J, ed. **PLoS Pathogens**, v. 10(12), p. e1004456, 2014.

YAMAGUCHI, T.; HIROTA, K.; NAGAHAMA, K.; OHKAWA, K.; TAKAHASHI, T.; et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. **Immunity**, v. 24, p. 145–159, 2007.

YI, H.; ZHEN, Y.; JIANG, L.; ZHENG, J.; ZHAO, Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 3, p. 189-195, 2006.