NAYANE ALVES DE LIMA GALDINO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS NA
IMUNOMODULAÇÃO DA PARACOCCIDIODOMICOSE 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

RESUMO

GALDINO, N. A. L. **Avaliação do papel das células T reguladoras na imunomodulação da paracoccidioidomicose 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 paracoccidioidomicose (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. 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: Paracoccidioidomicose. 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

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 retículo 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 ocorra por 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 com 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 perióxico 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 paracoccidioidomicose

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⁻ naïve 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 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 DERE

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 DERE 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 DERE 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 DERE 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 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 DEREG 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 Rev**, 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 ISHIGAME, 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. *Cytokine*, v. 32, p. 20-29, 2005.

MARQUES, S.A.; CORTEZ, D.B.; LASTÓRIA, J.C.; CAMARGO, R.M.P.; MARQUES, M.E.A. Paracoccidioidomycosis: 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. Paracoccidioidomycosis 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 Foxp3 regulatory 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.

MELZRICHT, 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.

MEZRICH, 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. Paracoccidioidomycose-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 Tcell 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.