

JULIANA DE AMORIM

Geração de células T de memória e linfócitos T
reguladores em camundongos BALB/c vacinados com
vetor plasmidial contendo o inserto P10 de
Paracoccidioides brasiliensis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências (Microbiologia)

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda

São Paulo

2010

RESUMO

AMORIM, J. **Geração de células T de memória e linfócitos T reguladores em camundongos BALB/c vacinados com vetor plasmidial contendo o inserto P10 de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico patogênico agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica de caráter granulomatoso endêmica no Brasil e em outros países da América Latina, ocupando o décimo lugar dentre as doenças infecto-parasitárias que mais causam morte no Brasil. A busca por alternativas para reduzir o tempo de tratamento da PCM, levou ao desenvolvimento de uma vacina de DNA contendo a sequência do peptídeo P10 de *P. brasiliensis*. Este peptídeo foi capaz de conferir proteção em modelo experimental de PCM. Levando-se em consideração que este peptídeo induz uma proliferação de células T, torna-se necessário avaliar se a inflamação mais exacerbada provocada nestes animais também leva a um aumento na geração de células T reguladoras e se esta vacina é capaz de gerar células T de memória. Neste trabalho, avaliamos a geração dessas populações de células T em animais imunizados com o vetor contendo o inserto P10 de *P. brasiliensis* antes e após o desafio com o fungo. Para este propósito, esplenócitos de camundongos imunizados e desafiados foram submetidos a um ensaio de proliferação celular com estímulo do peptídeo P10 e, em seguida, imunofenotipados por citometria de fluxo usando os seguintes marcadores CD4 e CD44 para células T de memória, CD4 e Foxp3 para células T reguladoras e ROR γ t, marcador para células Th17. Linfócitos pulmonares desses camundongos também foram avaliados por citometria de fluxo. Nossos resultados indicam um aumento do percentual de células T reguladoras e de memória no baço e nos pulmões de camundongos imunizados antes e depois de 30, 60 e 120 dias do desafio em comparação com os grupos controle e não imunizado. A análise histopatológica demonstrou tecido pulmonar menos inflamado em camundongos imunizados comparando com o grupo não tratado, sugerindo um papel das células T reguladoras na prevenção da imunopatologia. Outro experimento revelou que o modelo experimental da PCM *in vivo* é capaz de induzir a expressão de ROR γ t. Este estudo indica que nossa vacina de DNA contra a PCM gera células com um fenótipo de reguladoras e de memória, caracterizando seu potencial para o tratamento desta micose.

Palavras-chave: Células T reguladoras; Células T de memória; Paracoccidioidomicose; Vacina de DNA; P10

ABSTRACT

AMORIM, J. **Generation of memory and regulatory T cells in BALB/c mice immunized with plasmid DNA encoding the P10 peptide of *Paracoccidioides brasiliensis***. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungal pathogen that is the etiological agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a granulomatous systemic mycosis endemic in Brazil and other Latin America countries. Systemic mycosis occupy the tenth place among the chronic infectious and parasitic diseases that causes death in Brazil. The search for new alternatives to reduce the duration of PCM treatment led to the development of a DNA vaccine encoding the peptide P10 of *P. brasiliensis*, which was capable of protecting mice in an infection model of PCM. This peptide induces T cell proliferation and it is of great interest to investigate if there is also an increase in the regulatory T cells subpopulation and if this DNA vaccine can generate memory T cells. Presently, we analyzed the generation of these cells in mice immunized with the vector encoding the peptide P10 of *P. brasiliensis*, before and after the challenge with the fungus. For this purpose, splenocytes of immunized and challenged mice were submitted to a proliferation assay with stimulus of P10 peptide and then immunophenotyped by flow cytometry using the following markers CD4 and CD44 for memory T cells, CD4 and Foxp3 for regulatory T cells and ROR γ t, which is the marker for Th17 cells. We also analyzed pulmonary lymphocytes of these mice by flow cytometry. Our results indicate an increase in the percentage of regulatory and memory T cells on spleens and lungs of immunized mice before and after 30, 60 and 120 days of challenge compared with the control and untreated groups. Histopathological analysis demonstrated a less inflamed pulmonary tissue on immunized mice comparing with the untreated group, suggesting a role of regulatory T cells on preventing immunopathology. Another experiment revealed that the PCM *in vivo* infection model is capable of inducing ROR γ t expression. This study indicates that our DNA vaccine against PCM generates cells with a regulatory and memory phenotype, which shows its potential in the treatment of this mycosis.

Keywords: Regulatory T cells; Memory T cells; Paracoccidioidomycosis; DNA vaccine; P10

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose, micose sistêmica de caráter granulomatoso, considerada endêmica no Brasil e outros países da América Latina, principalmente Argentina, Venezuela e Colômbia (RESTREPO; GREER; VASCONCELLOS, 1973; BORGES-WALMSLEY et al., 2002). É um fungo termodimórfico, sendo que a 37 °C encontra-se sob a forma de levedura, a qual é parasitária, e a temperatura ambiente está sob a forma micelial (RESTREPO; MONCADA; QUINTERO, 1969; RESTREPO, 1978). Esta última forma é considerada infectante para o homem, uma vez que é responsável pela liberação dos conídios. Estes conídios são aspirados sendo, portanto, a via de infecção o trato respiratório (McEWEN et al., 1987; FRANCO et al., 1989).

A paracoccidioidomicose teve sua etiologia fúngica descoberta por Adolfo Lutz em 1908 (LUTZ, 1908). A sua primeira denominação foi dada por Splendore em 1912, porém somente em 1930, após estudos comparando o granuloma, denominado então de coccidioico, de ocorrência nos Estados Unidos, semelhantes aos do Brasil, que foi criado o gênero *Paracoccidioides*. Embora as lesões objeto das comparações fossem muito parecidas, verificou-se que os agentes etiológicos, no caso *Coccidioides immitis* e *Paracoccidioides brasiliensis*, eram diferentes após cultivo e que, portanto, fazia-se necessária a criação de um novo gênero. A espécie *brasiliensis* foi mantida, conforme já havia sido criada por Splendore (ALMEIDA, 1930). Atualmente, este fungo classifica-se no Filo *Ascomycota*, Classe *Pleomycetes*, Ordem *Onigenales*, Família *Onygenaceae*, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis* (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

P. brasiliensis já foi isolado a partir de diversos materiais, desde solo até vísceras de morcegos frugívoros (*Artibeus lituratus*) e fezes de pinguins (SHOME e BATISTA, 1963; NEGRONI, 1966; GROSE e TAMSITT, 1965; GEZUELE, 1989). Contudo, tais dados não foram passíveis de reprodução, o que impossibilitou relacioná-los com a ecologia do fungo.

Durante um estudo para identificação de hospedeiros silvestres de *Leishmania*, Naiff et al. (1986) isolaram *P. brasiliensis* a partir de vísceras de tatus silvestres da espécie *Dasyus novemcinctus* na região do Pará. A partir daí, novos isolamentos de *P. brasiliensis* de vísceras destes animais foram obtidos em regiões endêmicas da paracoccidioidomicose no Brasil e em

outros países da América do Sul, confirmando o fato de que os tatus podem ser reservatórios naturais do fungo e são capazes de desenvolver a doença por ele causada (BAGAGLI et al., 1998; CORREDOR et al., 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000). Além disso, o estudo dos hábitos e da área geográfica habitada por estes animais mostrou uma correlação positiva com regiões de endemia da paracoccidiodomicose (BAGAGLI et al., 2003). O fungo também já foi isolado de outras espécies de animais silvestres tais como porquinho da índia (*Cavia aperea*) e porco-espinho (*Sphiggurus spinosus*), além de animais domésticos como o cão (RICCI et al., 2004; BAGAGLI et al., 2008).

Embora possivelmente seu habitat natural seja o solo, o fungo é patogênico e apresenta alguns componentes que podem ser considerados fatores de virulência como α -(1,3)-glucana, presente na parede celular fúngica, moléculas de adesão, proteinases e lipases (revisto por BAGAGLI et al., 2008). A melanina também é considerada um importante fator de virulência do fungo, uma vez que a melanização o auxilia na evasão do sistema imune do hospedeiro (TABORDA et al., 2008). Outro possível fator de virulência que merece destaque é a gp43, antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*. A gp43 foi caracterizada em 1986 por Puccia et al., durante a análise dos componentes extracelulares liberados pela fase leveduriforme do fungo. É uma glicoproteína de massa molecular de 43.000 daltons, a qual, dentre outras glicoproteínas identificadas, foi caracterizada como antígeno específico de *P. brasiliensis*, uma vez que é reconhecida por basicamente todos os soros de pacientes com paracoccidiodomicose, sendo inclusive utilizada atualmente para o diagnóstico da mesma.

Inquéritos baseados em reações intradérmicas utilizando antígenos do fungo preparados de várias formas diferentes e denominados genericamente de paracoccidiodina, realizados tanto no Brasil como em outros países da América do Sul, revelaram índices de positividade em populações tidas como sadias, o que se justificaria pelo fato de que o fungo, embora capaz de infectar o indivíduo, pudesse gerar quadros leves ou assintomáticos, assim como outras micoses como a coccidiodomicose ou histoplasnose. Contudo, o uso da paracoccidiodina, embora empregada nestes inquéritos, não apresenta alta especificidade, ocorrendo reações cruzadas com outros compostos como a histoplasmina. Ainda assim, tais inquéritos constituem uma boa maneira de realizar estudos epidemiológicos sobre paracoccidiodomicose (LACAZ et al., 1959; FAVA-NETTO e RAPHAEL, 1961; RESTREPO et al., 1968).

Desde sua descoberta, a paracoccidiodomicose é alvo de intensas pesquisas, porém, devido a vários fatores como o período de latência bastante extenso, a não ocorrência de epidemias e poucos dados referentes aos casos ocorridos, uma vez que não representa uma doença de notificação compulsória, tornam o estudo desta micose bastante difícil (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; BAGAGLI et al., 2008). Todavia, sabe-se que a paracoccidiodomicose, a qual ocupa o décimo lugar dentre as doenças infecciosas crônicas que mais matam no Brasil e é a micose sistêmica com maior taxa de mortalidade, afeta principalmente pessoas que exercem atividades ligadas ao solo, basicamente atividades agrícolas, e normalmente afeta homens com idade entre 30 e 60 anos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; PRADO et al., 2009). Já as mulheres são menos acometidas pela micose, provavelmente em decorrência da presença do hormônio feminino 17- β -estradiol (E_2). Estudos realizados com este hormônio indicaram seu papel na inibição da transformação da forma de micélio para a forma de levedura, influenciando na patogenicidade do fungo (MUCHMORE; MCKOWN; MOHR, 1974; LOOSE et al., 1983). Outro fator, ainda relacionado à questão hormonal, que contribui para a menor incidência da paracoccidiodomicose no sexo feminino, é a capacidade observada, através de experimentos *in vitro* realizados por Hong e Zhu (2004), do 17- β -estradiol em induzir a liberação de óxido nítrico (NO) por macrófagos, os quais são capazes de agir na destruição das leveduras por eles internalizadas.

Por apresentar esta capacidade, os macrófagos pulmonares desempenham papel fundamental no controle da paracoccidiodomicose, uma vez que a porta de entrada do fungo é o trato respiratório, conforme já mencionado. Verificou-se que os macrófagos pulmonares são capazes de fagocitar células leveduriformes do fungo prontamente, contudo, são permissivos a multiplicação do *P. brasiliensis* se não forem ativados. A ativação dos macrófagos pulmonares, através de IFN- γ , aumenta sua capacidade fungicida, contribuindo para o controle da doença (BRUMMER et al., 1988, 1989). Células *Natural Killers* (NK) também já foram caracterizadas como sendo capazes de limitar o crescimento do fungo, em experimentos *in vitro*, além de também já terem sido descritas em pacientes não tratados (JIMENEZ e MURPHY, 1984; PERAÇOLI et al., 1991).

Contudo, embora a via de infecção seja o trato respiratório, a doença pode disseminar-se para outras partes do organismo como linfonodos, adrenais, fígado, baço, pâncreas, intestino e inclusive o cérebro (MACKINNON, 1970). Apresenta-se sob duas formas clínicas,

sendo a crônica e a aguda ou subaguda (RESTREPO et al., 1973; BORGES-WALMSLEY et al., 2002). Na forma crônica, a qual representa cerca de 90% dos casos, o indivíduo pode resolver a infecção sem o desenvolvimento de sintomatologia, sendo que em alguns casos haverá a permanência de focos quiescentes. Tais focos poderão futuramente acarretar a reativação da doença, caracterizando-se esta pelo envolvimento oral ou do trato respiratório em pacientes imunocompetentes (FRANCO et al., 1989; BENARD, 2008). Esta forma é de curso lento, manifestando-se principalmente no pulmão. Já a forma clínica aguda ou subaguda apresenta um curso mais rápido, cerca de semanas a meses, caracterizando-se por disseminação linfo-hematogênica, envolvendo o sistema fagocítico-mononuclear (FRANCO et al., 1989; BENARD, 2008). Esta forma apresenta-se predominantemente através de linfadenomegalia e lesões de pele (BORGES-WALMSLEY et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A incidência da forma aguda/subaguda da paracoccidiodomicose parece estar relacionada com a temperatura e umidade absoluta do ar (BARROZO et al., 2009).

Com o intuito de estudar as diferenças entre as formas clínicas da paracoccidiodomicose do ponto de vista imunológico, um modelo experimental foi proposto, baseado em linhagens murinas geneticamente resistentes ou suscetíveis. Neste modelo, proposto por Calich et al. (1985), camundongos da linhagem B10.A mostraram-se suscetíveis à infecção por *P. brasiliensis* e, portanto, correspondem, no modelo humano, à forma aguda, severa da doença. Já os camundongos A/Sn ou A/J foram considerados resistentes e representam a forma crônica. Através da utilização deste modelo verificou-se que a resistência à paracoccidiodomicose está relacionada a uma resposta imune celular predominante. Lacaz et al. já haviam classificado a paracoccidiodomicose em dois pólos, tendo como base a resposta imunológica dos pacientes. O pólo hiperérgico, correlacionado com a forma crônica e o pólo anérgico. O pólo hiperérgico caracteriza-se por infecção localizada, na qual o paciente apresenta uma resposta imune celular efetiva e baixos níveis de anticorpos circulantes, além de granulomas compactos contendo poucas células fúngicas viáveis. Por outro lado, no pólo anérgico há envolvimento de vários órgãos, sendo que a resposta imune celular está prejudicada. Os níveis de anticorpos específicos são altos e os granulomas encontram-se frouxos e com presença de muitas células fúngicas viáveis (LACAZ et al., 1982). Conforme a severidade da micose, temos depressão da resposta imune celular e produção de altos níveis de IgE (ARANGO e YARZÁBAL, 1982).

Esta depressão da imunidade celular, associada às formas mais graves da paracoccidiodomicose, não se resume a alterações nas diferentes subpopulações de linfócitos T, mas também em alterações na produção de citocinas por estas células, como a liberação de IFN- γ abaixo dos níveis normais (BAVA et al., 1991). Em análise do perfil de células encontradas em material obtido a partir da lavagem broncoalveolar de pacientes acometidos pela micose, percebeu-se que havia um maior percentual de células T *helper* neste material do que no sangue periférico, o que significa a ocorrência de uma resposta imunológica no local da infecção. Estes percentuais foram menores quando comparados com indivíduos saudáveis (TAPIA et al., 1991).

Experimentos mais recentes identificaram que os macrófagos pulmonares de camundongos resistentes, em um primeiro momento, secretam baixas quantidades de IL-12 e altos níveis de TGF- β , levando a um controle prejudicado do fungo. Contudo, de forma progressiva, ocorre a ativação de células T CD4⁺, as quais ativam os macrófagos que então serão capazes de controlar a inflamação e levar a uma regressão da doença, com a presença de lesões organizadas, os granulomas. Por outro lado, os macrófagos alveolares e células dendríticas de linhagens suscetíveis são capazes de secretar IL-12, IFN- γ e óxido nítrico, o que leva a uma eficácia inicial no combate ao fungo. Porém, ao que parece, a secreção exagerada de óxido nítrico leva a um estado de anergia de células T CD4⁺, prejudicando uma resposta eficiente. Desta forma, estabeleceu-se uma dicotomia da resposta imune na paracoccidiodomicose (CALICH; VAZ; BURGER, 1998; ARRUDA et al., 2002; CALICH et al., 2008). Tal dicotomia caracteriza-se através da análise do perfil das citocinas secretadas pelos camundongos suscetíveis e resistentes à paracoccidiodomicose, na qual os animais suscetíveis secretam níveis muito baixos das citocinas associadas ao padrão Th1 da resposta imune, como IFN- γ e IL-12, contrariamente ao que ocorre com os camundongos resistentes, os quais secretam níveis elevados e constantes destas citocinas (KASHINO et al., 2000).

Diante da importância da paracoccidiodomicose, a busca de antígenos específicos do fungo tornou-se algo essencial. Uma vez que a gp43 é capaz de elicitar uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio, Taborda et al. em 1998 buscaram identificar epitopos que tivessem potencial para serem utilizados na terapia da paracoccidiodomicose. Desta forma, foi identificado um epitopo de células T, o peptídeo de 15 aminoácidos denominado P10. Este peptídeo é capaz de conferir proteção a camundongos BALB/c frente a um desafio com *P. brasiliensis* de forma mais eficaz do que a gp43, uma vez que elicita uma resposta imune

celular do tipo Th1, considerada protetora na infecção por *P. brasiliensis* (TABORDA et al., 1998). Este peptídeo, quando associado às drogas comumente utilizadas no tratamento da paracoccidiodomicose, apresenta um efeito aditivo em modelo experimental utilizando camundongos BALB/c, o que demonstra a capacidade do P10 em auxiliar na diminuição do tempo de tratamento da paracoccidiodomicose (MARQUES et al., 2006).

Face aos resultados promissores obtidos utilizando-se o peptídeo P10 como adjuvante à quimioterapia na paracoccidiodomicose experimental, o seu potencial como composto vacinal foi explorado. Rittner (2008) inseriu, em um vetor plasmidial, a sequência de DNA para expressão do peptídeo P10. Esta construção mostrou-se bastante eficaz tanto em modelo experimental terapêutico quanto profilático, principalmente quando utilizada em conjunto com vetores expressando IL-12 murina, levando a uma diminuição significativa da carga fúngica nos pulmões dos animais imunizados. Este tipo de vacina, conhecida como vacina de DNA, é composta de um plasmídeo contendo a sequência da proteína de interesse, uma origem de replicação bacteriana, um marcador para seleção, um promotor eucariótico e uma sequência de poliadenilação. A origem de replicação de *Escherichia coli* é a mais indicada para que se obtenha um elevado número de cópias do plasmídios, facilitando o processo de extração deste DNA plasmidial e sua posterior purificação para uso terapêutico. Para os marcadores de seleção, os quais servem para selecionar o plasmídeo de interesse em uma cultura bacteriana, são utilizados geralmente genes de resistência a antibióticos bacterianos, como a kanamicina. O promotor eucariótico deve ser um promotor forte para que se consiga uma expressão em células de mamíferos e os mais recomendados são os promotores derivados de vírus como o do citomegalovírus (CMV) ou do vírus símio 40 (SV40), pois foram os que apresentaram maior expressão do transgene (GARMORY; BROWN; TITBALL, 2003; LIU, 2003). As vacinas de DNA podem ser injetadas via intramuscular, intradérmica ou via mucosa. O plasmídeo então penetra no núcleo dos miócitos ou queratinócitos e temos a rota de processamento antigênico endógena, o que leva à ativação de linfócitos T CD8⁺. Contudo, o plasmídeo também pode entrar no núcleo de células apresentadoras de antígenos e estas podem ou serem transfectadas diretamente pelo plasmídeo ou fagocitar outras células que foram transfectadas e estão em apoptose, sendo que este último mecanismo é denominado apresentação cruzada. Neste caso temos a rota exógena resultando em ativação de linfócitos T CD4⁺ (DONELLY et al., 2005; CUTLER et al., 2007). Em ambas as rotas o gene é transcrito e a proteína ou peptídeo antigênico de interesse é produzida na célula. O antígeno é

modificado de forma a apresentar uma conformação tal que seja semelhante à conformação de proteínas endógenas. Tais antígenos são apresentados via MHC de classe I ou II e assim, as células apresentadoras de antígenos migram para os órgãos linfóides secundários. Nestes locais, os antígenos são apresentados às células T *naive* e, juntamente com a ação de moléculas co-estimulatórias, tem início a resposta imune (KUTZLER e WEINER, 2008). No modelo de vacinação profilática, as células T são ativadas pelas células apresentadoras de antígenos. Já no modelo terapêutico, as células de memória podem sofrer um *boost*, principalmente no caso de infecções crônicas, como ocorre com a paracoccidiodomicose (DONELLY et al., 2005; CUTLER et al., 2007).

A primeira vacina de DNA foi desenvolvida por acaso a partir de um experimento no qual se percebeu que DNA não conjugado a histonas (*naked DNA*) era capaz de penetrar em células musculares esqueléticas de camundongos e estas, por sua vez, eram capazes de expressar proteínas por ele codificadas (WOLFF et al., 1990). Com base neste fenômeno, Ulmer et al. (1993) injetaram DNA contendo a sequência para uma proteína específica do vírus da influenza em células musculares esqueléticas de camundongos. Com isso, verificaram que tais células sintetizavam a proteína de interesse o que desencadeava uma resposta imunológica específica, capaz de proteger os animais a um desafio com o vírus da influenza. Diante dos resultados promissores obtidos, foram desenvolvidas vacinas de DNA para várias doenças, desde aquelas provocadas por vírus, bactérias e outros parasitas até as desencadeadas por fungos (RANGARAJAN, 2002). Jiang et al. (1999) desenvolveram uma vacina de DNA contendo a sequência de um antígeno purificado a partir da parede celular de *Coccidioides immitis* a qual se mostrou eficaz na proteção de camundongos BALB/c frente a um desafio com o fungo. Resultados bastante satisfatórios também foram obtidos por Wong et al. (2002) utilizando um vetor contendo a sequência de um antígeno de parede celular secretado por *Penicillium marneffe* em modelo murino através da rota intramuscular. Com relação à paracoccidiodomicose, Pinto et al. (2000) desenvolveram uma vacina de DNA contendo o gene da gp43, a qual é capaz de elicitar tanto uma resposta imune humoral quanto celular. Esta construção mostrou-se eficaz, reduzindo significativamente o número de unidades formadoras de colônia no pulmão dos animais imunizados e desafiados intratraquealmente com o fungo. Ribeiro et al. (2009) utilizaram um vetor contendo a sequência da proteína de choque térmico 65 (hsp65, do inglês *Heat Shock Protein*) de *Mycobacterium leprae*, a qual já havia demonstrado papel como imunomoduladora em

diversas infecções além da tuberculose, em modelo experimental murino de paracoccidiodomicose, obtendo resultados bastante interessantes.

A utilização da terapia gênica no combate às infecções fúngicas apresenta vantagens, pois é capaz de ativar tanto linfócitos T CD8⁺, os quais apresentam importante papel no controle destas infecções, quanto linfócitos T CD4⁺ (CUTLER et al., 2007). Além disso, as vacinas de DNA são de rápida produção, apresentam estabilidade térmica, há facilidade de sua produção em larga escala, são estáveis com o passar do tempo, são de fácil armazenamento e transporte, mostram ausência de efeitos adversos nos testes clínicos até hoje aplicados e induzem linfócitos T e B específicos (KUTZLER e WEINER, 2008).

Contudo, uma vacina eficaz deve ser capaz de promover a geração da chamada memória imunológica (ELY et al., 2006). Segundo Dutton et al. (1998), a memória imunológica pode ser descrita como uma reposta diferenciada, mais rápida e mais forte, de um animal que entra em contato com um antígeno pela segunda vez. Embasados em observações acuradas, os antigos gregos já haviam percebido que a praga não era capaz de afetar o mesmo indivíduo por mais de uma vez¹ (SILVERSTEIN, 2009). Tal habilidade intrínseca ao organismo foi caracterizada como duradoura, conforme observações realizadas pelo médico dinamarquês Peter L. Panum em 1846. Panum verificou que, mesmo após 65 anos do primeiro contato com o sarampo, indivíduos das Ilhas Faraós sobreviveram a uma epidemia desta mesma doença. Desta forma, a idéia de que a própria doença era capaz de prevenir a morte do indivíduo levou os chineses a praticarem a então denominada variolação em meados do século 16. A variolação consistia em infectar indivíduos com isolados pouco virulentos da varíola utilizando para isto pus ou até mesmo roupas íntimas de pessoas que haviam pego a doença e sobrevivido. Tal método foi estudado e aprimorado por Edward Jenner em 1796, o qual utilizou, para a indução da imunidade contra a varíola, o vírus da varíola bovina (PLOTKIN e PLOTKIN, 1999). Porém, somente em 1875 é que estudos acerca da vacinação e indução de imunidade são retomados de forma bastante intensa e temos o desenvolvimento de vacinas contra antraz, cólera e raiva a partir de observações e experimentos realizados pelo francês Louis Pasteur, utilizando microrganismos atenuados. Na mesma época, Emil Von Behring inicia os testes sobre imunoterapia passiva, empregando

¹“Yet it was those who recovered from the disease that the sick and the dying found most compassion. These knew what it was from experience, and had no fear for themselves; for the same man was never attacked twice – never at least fatally” – Tucídides sobre a praga que assolou Atenas em 430 a.C.

para este fim as toxinas tetânica e diftérica detoxificadas. A partir daí, há um grande avanço no campo da vacinologia, com a produção de muitas vacinas utilizadas até os dias de hoje como as vacinas contra coqueluche e tuberculose, embora em constante processo de aprimoramento. Já a partir de 1930, temos o surgimento de uma nova era neste campo em parte graças às iniciativas militares, uma vez que esta nova era se deu no período da Segunda Guerra Mundial. Neste momento temos o desenvolvimento da vacina contra a influenza, a partir de ovos embrionados infectados com o vírus. De 1950 até os dias de hoje, vivemos a era moderna da vacinologia, com o uso de vacinas de subunidades e recombinantes (HILLEMANN, 2000).

O sucesso das vacinas desenvolvidas ao longo da história da humanidade comprova a habilidade do organismo em criar e manter uma resposta imunológica eficiente contra os vários patógenos existentes. Contudo, grande parte destas vacinas foram criadas sem que houvesse conhecimento do papel das células T no contexto da memória imunológica, o qual tornou-se imprescindível a partir do surgimento da necessidade em se desenvolver vacinas eficazes contra doenças crônicas (ESSER et al., 2003). As células T de memória podem ser definidas como qualquer célula T que já tenha encontrado o antígeno e esteja em uma fase pós-efetora (McKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2008).

Normalmente, as células T de memória são encontradas por períodos longos após exposição ao antígeno e estão presentes principalmente no sangue e no baço (DUTTON et al., 1998). Classicamente, as células T passam por três estágios antes de se tornarem células de memória. O primeiro deles é a chamada Fase de Expansão, na qual as células T *naive* encontram o antígeno em órgãos linfóides, geram clones e diferenciam-se em células T efetoras. A fase seguinte é a Fase de Contração ou Morte, caracterizada pela morte de mais de 90% das células T efetoras após eliminação do patógeno (KAECH; WHERRY; AHMED, 2002). Em face da eliminação do antígeno e diminuição de mediadores inflamatórios, a transição das células T CD4 efetoras para células T CD4 de memória ocorre de forma rápida, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (McKINSTRY et al., 2008). A última fase, a Fase de Memória, compreende as células que sobreviveram e isto está relacionado com a extensão da morte celular, pois quanto maior o número de células efetoras que entram em apoptose, menor é o *pool* de células T de memória (KAECH; WHERRY; AHMED, 2002). Este *pool* é mantido através de divisões celulares intermitentes e, segundo Berard e Tough (2002), é capaz de permanecer por longos períodos na ausência de antígeno. As células T de memória diferem

das células T *naive* por serem ativadas por quantidades menores de antígeno (LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2001).

Atualmente são conhecidas duas subpopulações de células T de memória, as centrais de memória e as efectoras de memória. Em seres humanos, as centrais de memória ou T_{CM} caracterizam-se pela expressão de CD62L e CCR7, produzindo IL-12 após a reativação. As células T efectoras de memória (T_{EM}) produzem citocinas efectoras e expressam baixos níveis de CD62L e CCR7. Estas provavelmente atuam nos locais de possível contato com o antígeno, estando de prontidão para atuar rapidamente em caso de um segundo contato. Já as células T de memória centrais atuam nos órgãos linfóides secundários, auxiliando na geração de efectoras, uma vez que não são capazes de penetrar em tecidos não linfóides, ao contrário do que ocorre com as células T efectoras de memória (MACLEOD et al., 2009). A existência de células T_{EM} e T_{CM} também podem ser aplicadas ao modelo murino (SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004).

Ainda analisando as células T de memória, Bell e Westermann (2008) dividem as células T CD4⁺ em quatro subpopulações: as que estão em repouso, as primadas, as efectoras e as multifuncionais. As células T CD4⁺ em repouso são definidas por apresentarem longa vida e por estarem constantemente circulando. As primadas, denominadas também de efectoras de memória, são as que já entraram em contato com o antígeno e sob re-estimulo detêm a capacidade de se diferenciarem em efectoras, as quais são responsáveis pela secreção de citocinas. Finalmente, temos as células T CD4⁺ multifuncionais, as quais compreendem as células T CD4⁺ primadas que não tiveram um segundo contato antigênico. Tais células podem retornar ao estado de repouso e então recebem a denominação de células de memória centrais. Diferentemente do que ocorre com os linfócitos B, nos quais o encontro com o antígeno gera uma mudança permanente, nos linfócitos T tais mudanças não podem ser consideradas duradouras (BELL e WESTERMANN, 2008). Desta forma, as células T de memória são fenotípica e funcionalmente heterogêneas (BERARD e TOUGH, 2002), pois são geradas de forma progressiva (McKINSTRY et al., 2008).

O percentual de células T CD4 de memória geradas após uma imunização ou infecção é significativamente menor do que o percentual de células T CD8 devido ao fato destas últimas proliferarem muito mais após um estímulo antigênico. Porém, poucas células T CD4 são capazes de estimular várias células apresentadoras de antígeno, linfócitos B e T CD8. Estas células T CD4 de memória apresentam características importantes como a capacidade

de reconhecerem um antígeno para o qual são específicas e iniciar uma resposta mais rápida, além de secretarem citocinas (McKINSTRY et al., 2008).

A identificação fenotípica de células T de memória em camundongos se dá através da marcação das moléculas de adesão, como CD44. Ao contrário das células T *naive* que secretam poucas citocinas (células T CD4⁺ secretam apenas IL-2 e IL-3 e as células T CD8⁺ secretam IFN- γ), as células T de memória podem secretar uma variedade bem maior de citocinas.

Indivíduos com uma doença infecciosa crônica, como a paracoccidiodomicose, apresentam células de memória mesmo após tratamento, porém discute-se se a permanência do fungo nestas infecções crônicas não seria o fator responsável pela memória imunológica a longo prazo (SCOTT, 2005; BOZZI et al., 2007). A permanência do fungo estaria sendo assegurada pela ação de células T reguladoras. Tais células, então denominadas supressoras, já haviam sido descritas na paracoccidiodomicose em 1988, por Mota et al. Através da identificação, com o uso de anticorpos monoclonais, de subpopulações de células T em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose não tratada, estes autores verificaram que os pacientes que apresentavam as formas mais severas da doença também apresentavam maiores níveis de células T supressoras/citotóxicas. O mesmo foi constatado em um modelo murino, nos quais os camundongos, após receberem por via intravenosa, antígenos de *P. brasiliensis*, apresentavam células T supressoras no baço primeiramente e mais tarde nos linfonodos. Soma-se a isso o fato de que as células T supressoras identificadas eram antígeno-específicas, uma vez que tais células não eram capazes de suprimir as respostas de hipersensibilidade tardia em animais infectados com antígeno de *Cryptococcus neoformans* (JIMENEZ-FINKEL e MURPHY, 1988). Já se especulava naquela época que o fungo portaria mecanismos próprios capazes de induzir a resposta imunoreguladora e que a diminuição da carga antigênica levaria a uma diminuição dos fatores derivados do fungo indutores das células supressoras, o que restabeleceria a resposta imune celular do indivíduo (FRANCO et al., 1989).

O conceito de que existiam células pertencentes ao sistema imune capazes de controlar a ação de outras células deste mesmo sistema remontam a virada do século 19. Paul Ehrlich já havia proposto que “[...] o organismo possui certos artifícios pelos quais a reação imunológica, tão facilmente produzida por todos os tipos celulares, é prevenida em agir contra os próprios elementos do organismo [...] desta forma podemos justificar o “horror

autotoxicus” do organismo”². Na época em que Ehrlich propôs o conceito de *horror autotoxicus*, este foi interpretado erroneamente, e muitos imunologistas acreditaram que com este termo Ehrlich inferia que o organismo não produzia de forma alguma auto-anticorpos. Em realidade, Paul Ehrlich acreditava que os auto-anticorpos eram produzidos, mas impedidos de agir por algum mecanismo desconhecido (SILVERSTEIN, 2009). Ehrlich também sugeriu que linfócitos auto-reativos poderiam ser silenciados ou tolerados através da perda de seus receptores auto-específicos (STEINMAN e NUSSENZWEIG, 2002). No século seguinte, em 1969, temos as primeiras evidências de células T com capacidade supressora. Nishizuka e Sakakura (1969), após realizarem uma timectomia em camundongos fêmeas com três dias de idade, verificaram que estas apresentavam atrofia em seus ovários. Tal condição era revertida após esses animais receberem um transplante de timo aos setes dias de nascimento, demonstrando que células presentes no timo apresentavam a capacidade de suprimir a atrofia dos ovários, condição esta de causa auto-imune. Em 1970, Gershon e Kondo, através de experimentos com animais timectomizados, irradiados e reconstituídos com células de medula óssea, verificaram que células T eram dotadas da habilidade em suprimir a geração de anticorpos. Com isso, evidenciou-se o papel de células T na supressão de outros tipos celulares (linfócitos B). Contudo, estudos realizados por Gershon et al. em 1972 demonstraram que as células T eram capazes de suprimir a ação de outras células T e não somente de células B secretoras de anticorpos. Tais estudos foram corroborados por Cooke et al. (1978) através do modelo de anemia hemolítica auto-imune.

Penhale et al. (1973) foram capazes de induzir uma tireoidite auto-imune em ratos adultos da linhagem Wistar, através da timectomia e exposição a doses de radiação X subletais, inclusive com presença de auto-anticorpos anti-tireoglobulina. Através deste experimento, reforça-se a idéia de que linfócitos T derivados do timo eram capazes de controlar auto-imunidades órgão-específicas.

Em 1975, temos as primeiras evidências da existência de uma subpopulação de células T com capacidade supressora e uma subpopulação de células T auto-reativas, ainda no modelo de indução de auto-imunidade (PENHALE; FARMER; IRVINE, 1975). Nesse mesmo ano, Debré et al. descrevem que a imunossupressão estava sob controle genético

² “The organism possesses certain contrivances by means of which the immunity reaction, so easily produced by all kinds of cells, is prevented from acting against the organism’s own elements and so giving rise to autotoxicus... so that we might be justified in speaking of a ‘horror autotoxicus’ of the organism”

(DEBRÉ et al., 1975). No ano seguinte, experimentos comprovaram que a reconstituição de células T em ratos PVG/c timectomizados e irradiados subletalmente foi capaz de reverter danos auto-ímmunes à tireóide (PENHALE et al., 1976). Tais dados foram corroborados por Sugihara et al. (1990). Ainda em 1976, Murphy et al. identificaram uma subregião no complexo gênico murino H-2 denominada I-J marcada pelo *locus Ia-4*. Estudos deste *locus* demonstraram que determinantes de *Ia-4* estavam presentes em linfócitos T supressores. Porém análises em nível de RNA mensageiro e sequenciamento genômico não confirmaram tal achado, o que contribuiu para gerar, dentre outros fatores, um descrédito por parte dos imunologistas a respeito dos estudos com células T supressoras, uma vez que estas não possuíam características específicas que assegurassem sua identificação, embora hoje se saiba que muitas das funções e características das células T supressoras são semelhantes às células T reguladoras (GERMAIN, 2008).

A relação de uma subpopulação específica de células T com a indução de auto-ímmunidade foi determinada após experimentos de Sakaguchi et al. (1985) nos quais esplenócitos de camundongos normais foram tratados para depleção de subpopulações de células T e depois inoculados em outros camundongos. Estes autores verificaram a ocorrência de auto-ímmunidades órgão-específicas (ovários, estômago, glândula tireóide), comprovadas através da presença de auto-anticorpos circulantes. Assim, estabeleceu-se o envolvimento de uma subpopulação de células T específicas que atuam na supressão de células T efectoras contra antígenos próprios, as quais, segundo Lewkowich et al. (2005), podem ser definidas como células T capazes de limitar a proliferação e função de células T efectoras.

A geração de linfócitos T reguladores faz parte do mecanismo de tolerância dominante o qual se caracteriza por apresentar células do sistema imune específicas para suprimir a resposta efetora contra patógenos invasores. Desta forma, são responsáveis pela manutenção da homeostase imunológica (JOSEFOWICZ e RUDENSKY, 2009). A existência desta subpopulação de linfócitos T pode ocorrer como um mecanismo alternativo a deleção de células auto-reativas que ocorre no timo. Aparentemente, tal mecanismo parece não ser totalmente eficaz na indução da auto-tolerância e, portanto, as células T reguladoras atuam no controle de células que reagem contra o próprio organismo (SAKAGUCHI, 2004; TANG e BLUESTONE; 2008). Contudo, elas também podem ser geradas durante um processo infeccioso, uma vez que a ativação de células T reguladoras é um dos primeiros eventos a

serem desencadeados quando do início da resposta imune celular, graças à produção de IL-2 por parte de células T CD4⁺ ativadas (O'GORMAN et al., 2009).

A expressão do receptor de IL-2 cadeia alfa ou CD25 foi relacionada às células T reguladoras primeiramente após experimentos nos quais verificou-se que a retirada de células T CD25⁺ causavam doenças auto-imunes em camundongos BALB/c e que esta podia ser revertida pela restauração de células T CD4⁺CD25⁺, além de estarem envolvidas no aumento da resposta a antígenos exógenos (SAKAGUCHI et al., 1995). A partir daí, o fenótipo associado às células T reguladoras era CD4⁺CD25⁺. Entretanto, estudos sobre uma mutação recessiva ligada ao cromossomo X, conhecida como *scurfy*, levaram a descoberta de um novo fator que seria considerado como único e específico na identificação das células T reguladoras (BRUNKOW et al., 2001; FONTENOT et al., 2003). Este fator é o produto do gene *Foxp3*, que codifica para uma proteína, Foxp3 ou scurfina, a qual é um membro da família *forkhead/winged* de fatores de transcrição, sendo bastante conservada em humanos. A inserção de dois pares de base no exon 8 do gene *Foxp3* é o que caracteriza a mutação já referida, levando a produção de uma proteína truncada, não ativa e sem o domínio de ligação ao DNA (BRUNKOW et al., 2001; COFFER e BURGERING, 2004; ZIEGLER, 2006).

A mutação *scurfy* é uma mutação que afeta os animais X^{SF}/Y, ou seja, machos. Tal mutação gera um quadro semelhante ao de uma auto-imunidade linfoproliferativa, sendo que os animais afetados apresentam descamações nas orelhas, pálpebras, pés e cauda, além de linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, levando os mesmos à morte em cerca de três semanas. Estes camundongos também apresentam um nível cerca de vinte vezes maior de linfócitos periféricos, pois há uma falha na regulação da ativação de linfócitos T. Após a identificação de Foxp3, ele tornou-se suficiente para a caracterização fenotípica de células T reguladoras em camundongos (ZIEGLER, 2006).

Embora Foxp3 tenha sido identificado tanto em humanos quanto em camundongos, ele não é igual em ambos. Em humanos, Foxp3 apresenta duas isoformas, uma ortóloga a encontrada em camundongos e outra codificada a partir de um RNA mensageiro que não apresenta o exon 2, denominada Foxp3Δ2 (ALLAN et al., 2005). Em humanos, existe uma síndrome comparável à *scurfy*, denominada IPEX (disfunção/poliendocrinopatia/enteropatia/imune ligada ao X), identificada em 1982. A IPEX caracteriza-se por diarreia sanguinolenta, dermatites, endocrinopatias como diabetes tipo 1 e tiroidite, além de níveis altos de auto-anticorpos, IgE e eosinófilos. As pessoas afetadas

morrem antes dos dois anos de idade. Contudo, ao contrário do que ocorre na *scurfy*, na síndrome que acomete os seres humanos, nem sempre a causa é decorrente de mutações no gene *Foxp3*. Especula-se que mutações em outros genes cujos produtos interajam com o produto de *Foxp3*, sejam as outras possíveis causas da IPEX (COFFER e BURGERING, 2004; ZIEGLER, 2006).

A denominação *forkhead* dada à família dos fatores de transcrição, da qual pertence *Foxp3*, deriva do gene responsável pela mutação de mesmo nome em moscas do gênero *Drosophila*. Nestes animais, o gene *forkhead* atua na formação terminal do embrião (COFFER e BURGERING, 2004; ZIEGLER, 2006). Com a descoberta de outro grupo de fatores de transcrição específicos do fígado e muito similares ao *forkhead*, os quais apresentavam domínios de ligação ao DNA, houve a criação de uma nova família de fatores de transcrição. Os membros desta nova família foram descritos desde organismos menos complexos, como as leveduras até organismos mais complexos como os seres humanos. Diante da promiscuidade destes novos fatores de transcrição, houve a necessidade de se rever suas denominações. Desta forma, os fatores de transcrição *forkhead* dos animais classificados como cordados recebem o nome de FOX (*forkhead box*) e são divididos conforme a sua função em pelo menos quinze classes (COFFER e BURGERING, 2004). O *Foxp3* enquadra-se na família de fatores de transcrição *forkhead/winged helix*. O nome *winged helix* está relacionado com a estrutura do domínio *forkhead* (FKH) de ligação ao DNA, a qual lembra uma estrutura de hélice em forma de duas asas, semelhantes às de uma borboleta, sendo bastante conservada. Embora não seja totalmente esclarecida a biologia de *Foxp3*, sugere-se que ele atue como um inibidor transcricional via fator nuclear de células T ativadas (NFAT, *Nuclear Factor of Activate T cells*) e fator nuclear- κ B (NF- κ B, *nuclear factor- κ B*) (SCHUBERT et al., 2001; BETTELLI; DASTRANGE; OUKKA, 2005). *Foxp3* é apenas uma das várias proteínas da família *forkhead/winged helix* que está relacionado com a regulação imune. Como exemplo podem ser citados os genes *Foxn1* e *Foxj1*. O primeiro está associado ao fenótipo *nude* de camundongos e o segundo à auto-imunidades celulares e hiperproliferação de linfócitos T (COFFER e BURGERING, 2004; ZIEGLER, 2006).

Uma curiosidade relacionada à *Foxp3* é o fato de que o hormônio feminino estrógeno é capaz de induzir sua expressão, exercendo papel importante durante a gravidez, uma vez que a geração de células T reguladoras durante a gestação é bastante requerida (COFFER e BURGERING, 2004).

Estudos acerca do Foxp3 demonstraram, após análise de seu RNA mensageiro em timócitos de camundongos BALB/c CD4⁺CD25⁺, que tais células apresentavam níveis de RNA mensageiro de Foxp3 cem vezes mais abundante do que em células de fenótipo CD4⁺CD25⁻, mesmo que as células CD4⁺CD25⁺ estivessem sob um estado de ativação, indicando que Foxp3 não está relacionado com o estado de ativação das células (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003). Deve-se ressaltar que Foxp3 é um excelente marcador para células T reguladoras em camundongos, porém ele pode ser transientemente expresso em células T ativadas humanas, o que prejudica a imunofenotipagem destas células em seres humanos. Outro inconveniente no estudo das células T reguladoras em humanos é o fato de que nas infecções crônicas tais células são mantidas nos tecidos afetados e torna-se mais difícil encontrá-las no sangue periférico, o qual é o único material acessível para o estudo em humanos (BELKAID e TARBELL, 2009). Outros marcadores não tão específicos como o receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide (GITR, do inglês *Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor*) e o antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4, do inglês *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) são utilizados na caracterização de células T reguladoras. A inespecificidade destes marcadores provém do fato dos mesmos serem expressos inclusive em células T ativadas (SAKAGUCHI, 2004; O'GARRA et al., 2004). O mesmo ocorre com a expressão de CD25, a qual se constitui em um índice indireto da ativação celular e desta forma, também não é um marcador satisfatório para as células T reguladoras (MILLS e McGUIRK, 2004).

As células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ compreendem de 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas em camundongos e inclusive em chimpanzés saudáveis (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; MANIGOLD et al., 2006). Dentre esta subpopulação celular, a expressão de Foxp3 é predominante, não somente no timo, mas também na periferia (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003).

Existem pelo menos duas subpopulações de células T reguladoras, sendo as naturais e as adaptativas ou induzidas. As células T reguladoras naturais ou nTregs originam-se no timo, são específicas para antígenos próprios, embora possam atuar na resposta a microrganismos da microbiota e em contextos de infecções crônicas como na leishmaniose (SUFFIA et al., 2006), sendo que neste último caso contribuem para a regulação da resposta imune contra o patógeno e, portanto, asseguram sua permanência. Provavelmente, isto ocorre porque em infecções agudas, a manutenção de uma resposta imune ocasiona a lesão tecidual no local,

com liberação de antígenos do hospedeiro (SUFFIA et al., 2006). As nTres expressam constitutivamente CTLA-4, GITR, CD25^{hi}, já estão presentes no organismo do hospedeiro e requerem IL-2 e TGF- β apenas para manutenção de sua estabilidade e não para sua geração. Além disso, estão sujeitas a ação de IL-6, podendo se diferenciar em células Th17. Já as adaptativas ou induzidas, também denominadas iTregs, originam-se na periferia, reconhecem antígenos teciduais ou estranhos, dependem de citocinas para exercerem supressão, como IL-10 ou TGF- β e a expressão de CD25 é bastante variável. Também requerem IL-2 e TGF- β para sua geração e estabilidade, sendo que na ausência de TGF- β estas células podem perder a expressão de Foxp3 (SELVARAJ e GEIGER, 2007), mas não sofrem a atuação de IL-6. Além disso, as células T reguladoras adaptativas são geradas a partir de linfócitos T maduros na periferia, normalmente em infecções ou transplantes, sendo que nestes casos comprovou-se a atuação de TGF- β na indução do fator de transcrição Foxp3 (CHEN et al., 2003). Atualmente, não temos um marcador que seja confiável para distinguir células T reguladoras endógenas de convertidas (BELKAID e TARBELL, 2009).

Ambas as subpopulações de células T reguladoras atuam via contato célula a célula (BLUESTONE e ABBAS, 2003; BELKAID e ROUSE, 2005; HORWITZ et al., 2008; BELKAID e TARBELL, 2009). A IL-2, embora não seja produzida por células T reguladoras, é essencial para estas, sejam elas nTregs ou iTregs, atuando no estímulo de células T Foxp3⁺ e inclusive na expressão deste fator de transcrição e no aumento da atividade supressora destas células. Contudo, a IL-2 não é um fator imprescindível para a atividade supressora das células T reguladoras (FONTENOT et al., 2005; HORWITZ et al., 2008; O’GORMAN et al., 2009), embora a eliminação desta citocina através de anticorpos monoclonais (mAbs) resulte na queda desta subpopulação de células T e conseqüente desenvolvimento de auto-imunidades (SAKAGUCHI, 2004).

As iTregs podem ser subdivididas em células T reguladoras 1 (Tr1), as quais secretam IL-10, células Th3, secretoras de TGF- β e células T reguladoras induzidas Foxp3⁺ (BELKAID e ROUSE, 2005; BELKAID e TARBELL, 2009). As células Tr1 atuam na supressão de uma resposta imune via secreção da citocina imunossupressora IL-10 (GROUX et al., 1997). As células Tr1 expressam níveis indetectáveis do fator de transcrição Foxp3, diferentemente do que ocorre com as células T reguladoras naturais, para as quais Foxp3 constitui o principal marcador, talvez porque estas células estejam em contato com seus antígenos cognatos (HOWITZ et al., 2008).

As células Th3 foram primeiramente descobertas após estudos de indução de tolerância oral, nos quais verificou-se que tal regime levava a indução de células T CD4⁺ de caráter regulador e secretoras de TGF-β. Esta citocina mostrou-se capaz de converter células T CD4⁺ Foxp3⁻ naive em células iTregs CD4⁺ Foxp3⁺ (CHEN et al., 2003).

As células T reguladoras necessitam do estímulo via TCR para exercerem sua atividade supressora e um fato importante é o de que as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ requerem uma quantidade muito mais baixa do antígeno para o qual elas são específicas para desencadear a supressão do que células T CD4⁺CD25⁻, muito provavelmente devido a moléculas acessórias como CTLA-4. Uma vez que estas células reguladoras tenham reconhecido seu antígeno, elas irão suprimir tanto a resposta contra aquele antígeno específico quanto contra quaisquer outras células específicas para antígenos diferentes, sendo considerada uma supressão não específica (SAKAGUCHI, 2004). Após ativação, as células T reguladoras saem dos órgãos linfóides e migram para os tecidos alvos da infecção, nos quais tais células são reativadas pelas células dendríticas locais (TANG e BLUESTONE, 2008).

Os vários mecanismos de imunossupressão utilizados pelas células T reguladoras podem ocorrer simultaneamente (SAKAGUCHI, 2004). Um deles se dá através da indução de células apresentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas, a secretarem a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) mediado por CTLA-4. A IDO é um composto regulador capaz de induzir a produção de metabólitos pro-apoptóticos a partir do catabolismo do triptofano, culminando com a supressão das células T efectoras (FALLARINO et al., 2003). As células T reguladoras também são capazes de modular negativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias expressas pelas células dendríticas como CD80 e CD86 *in vitro* (CEDERBOM; HALL; IVARS, 2000). Porém, maiores estudos são necessários para validar estes mecanismos. A indução de tolerância em células dendríticas imaturas por parte das células T reguladoras pode resultar na conversão de células T CD4⁺CD25⁻ em células iTregs Foxp3⁺ ou na promoção da expansão de nTregs (HORWITZ et al., 2008). Outro mecanismo de supressão, denominado supressão por ruptura metabólica, ocorre através da captura de IL-2, uma vez que estas células expressam CD25, o qual é um receptor de IL-2 de alta afinidade. A ausência de IL-2 impede a proliferação de células T efectoras e inclusive é capaz de gerar uma síndrome em camundongos semelhante à *scurfy* (FONTENOT et al., 2005; TANG e BLUESTONE, 2008; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Além destes dois mecanismos de imunossupressão, outros podem ser citados, sendo eles a supressão por

citocinas inibidoras e a supressão por citólise. A supressão por intermédio de citocinas ocorre através da ação das citocinas inibidoras IL-10, TGF- β e IL-35. Não é claro se somente as iTregs atuam utilizando este mecanismo ou se a mesma estratégia é utilizada pelas nTregs. A supressão por citólise ainda é um mecanismo que requer maiores estudos, mas aparentemente, ocorre pela atividade citotóxica das células T reguladoras, mesmo em camundongos (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). A supressão das células T reguladoras também pode ser mediada pela adenosina e pelo AMP cíclico, porém tais mecanismos carecem de maiores estudos (DEAGLIO et al., 2007; BOPP et al., 2007). Deve ser ressaltado o fato de que todos os mecanismos citados ainda necessitam ser esclarecidos e que muitos deles podem ser redundantes (BELKAID, 2008).

Uma das questões talvez mais intrigantes a respeito das células T reguladoras é como elas seriam capazes de suprimir células auto-reativas e respostas efetoras exacerbadas contra antígenos externos sem que houvesse um comprometimento desta resposta efetora. O fato é que células T reguladoras de camundongos expressam seletivamente o receptor semelhante ao Toll (TLR, do inglês *Toll Like Receptors*) 4. Tal receptor é capaz de se ligar ao lipopolissacarídeo das bactérias gram-negativas (LPS) e se houver uma grande quantidade deste composto em decorrência de uma resposta efetora bem sucedida por parte dos anticorpos e sistema complemento, as células T reguladoras poderão reconhecer este LPS via TLR-4 e, portanto, atuarão na inibição da resposta efetora (CARAMALHO et al., 2003). Esta não é uma explicação completa para a questão acima descrita, mas indica um dos mecanismos que pode justificar a ação seletiva das células T reguladoras, além de demonstrar que as células T reguladoras podem responder diretamente a produtos microbianos.

Atualmente propõe-se uma relação entre as células T reguladoras e as células Th17. Isto porque TGF- β , conforme já mencionado, é capaz de converter células T CD4⁺Foxp3⁻ em células T CD4⁺Foxp3⁺ (ZHU e PAUL, 2008). Contudo, na presença de IL-6, TGF- β leva a indução de células T secretoras de IL-17 e, concomitantemente, inibe a diferenciação de células T reguladoras. Inclusive, a adição de IL-6 em células nTregs Foxp3⁺ cultivadas *in vitro* é capaz de converter tais células a células secretoras de IL-17 (BETTELLI; KORN; KUCHROO, 2007; AWASTHI; MURUGAIYAN; KUCHROO, 2008). Tal fato ocorre porque TGF- β junto com IL-6 induzem a expressão do fator ROR γ t, responsável pela indução da transcrição de IL-17A (ZHOU et al., 2008). Na ausência de IL-6, a IL-21 exerce o mesmo papel (JETTEN, 2009). Vale ressaltar que a IL-6 representa papel importante na conversão de

células Th17 em camundongos, porém em humanos a citocina responsável pela conversão das células T reguladoras em células Th17 parece ser a IL-1 (KOENEN et al., 2008). Um trabalho recente demonstrou que a IL-1 pode também estar relacionada com a conversão de células T reguladoras em células Th17 em camundongos (CHUNG et al., 2009). Baixas concentrações de TGF- β induzem expressão de ROR γ t e, contrariamente, altas concentrações de TGF- β induzem expressão de Foxp3. Desta forma, a diferenciação para Treg ou para Th17 depende da quantidade de TGF- β e também de citocinas pró-inflamatórias, o que influi diretamente na expressão de ROR γ t e Foxp3, fatores responsáveis pela diferenciação destas linhagens celulares (ZHU e PAUL, 2008). Ichiyama et al. (2008) discutem que as células T CD4⁺ expressam tanto ROR γ t quanto Foxp3 nas fases iniciais de sua diferenciação. Somando-se a isso, há relatos de que há células T CD4⁺ *naive* capazes de expressar tanto Foxp3 quanto ROR γ t, o que corrobora a idéia de que pode haver um estado de transição antes da definição por uma das duas linhagens (AFZALI et al., 2009). As células T CD4⁺ em contato com TGF- β expressam Foxp3, o qual interage de forma direta com ROR γ t, suprimindo a diferenciação para Th17, uma vez que age na supressão da ativação do promotor de *IL-17A* mediado por ROR γ t. Esta situação pode ser revertida, em camundongos, através da adição de IL-6 ou IL-21, sendo que neste caso tem-se a diminuição dos níveis de Foxp3 (ICHIYAMA et al., 2008; ZHOU et al., 2008). Esta interação direta entre um fator e outro é responsável pela supressão recíproca na qual Foxp3 antagoniza a função de ROR γ t (JETTEN, 2009).

ROR γ t é um membro da subfamília de receptores órfãos de ácido retinóico (ROR – *Orphan Receptors Retinoic-Related*). É expresso em algumas células do sistema imune e tem importante papel na organogênese de órgãos linfóides uma vez que sua ausência interfere na formação de linfonodos e Placas de Peyer. Somando-se a isso, a ausência deste fator interfere na expressão de citocinas características da linhagem Th17 (JETTEN, 2009). Outro receptor órfão de ácido retinóico implicado na diferenciação das células Th17 é ROR α . A deficiência em ROR γ t e em ROR α implica na eliminação desta subpopulação celular (ZHU e PAUL, 2008).

As células Th17 podem ser induzidas a partir de células T reguladoras. Experimentos utilizando células provenientes de camundongos revelaram que células T reguladoras secretoras de TGF- β são capazes de induzir a diferenciação de células Th17 na presença de IL-6 (XU et al., 2007). Contudo, parece haver diferenças nestes mecanismos entre as nTregs e as iTregs, sendo que estas últimas mostraram-se mais resistentes a ação de IL-6 (ZHENG;

WANG; HORWITZ, 2008). A função desta citocina na indução da diferenciação de células Th17 pode ser inibida através do metabólito de vitamina A ácido retinóico, o qual também é capaz de promover a diferenciação de células T reguladoras, apresentando importante papel no balanço entre estas duas linhagens celulares antagonistas (MUCIDA et al., 2007).

A relação entre infecções fúngicas e a linhagem Th17 já foi verificada em pacientes portadores da síndrome de hiper IgE, os quais apresentam desenvolvimento da linhagem Th17 deficiente. Estes pacientes sofrem infecções estafilocócicas e fúngicas de forma recorrente. As citocinas secretadas por células Th17 são capazes de recrutar e ativar neutrófilos os quais atuam na resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos (ZHU e PAUL, 2008). Na paracoccidiodomicose, Loures et al. (2009) observaram que macrófagos de camundongos deficientes para Toll-like receptor-2 (TLR-2) apresentavam problemas no que concerne à interação com leveduras de *P. brasiliensis*. Além disso, estes animais apresentaram uma resposta imunológica polarizada para Th17 e ausência de expansão de células T reguladoras.

Em face da importância das células T reguladoras no controle da inflamação exacerbada e de seu possível envolvimento na manutenção da memória imunológica em doenças crônicas e de sua relação com a geração de células Th17, este estudo propõe a pesquisa destas células e também das células T de memória em camundongos BALB/c imunizados com o vetor contendo o inserto P10 de *Paracoccidioides brasiliensis* e desafiados intratraquealmente com o fungo.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Os linfócitos esplênicos dos animais imunizados com o vetor contendo o inserto P10 de *P. brasiliensis* foram capazes de proliferarem *in vitro*, após estímulo com o peptídeo P10
- ✓ A vacina de DNA contendo a sequência do peptídeo P10 é capaz de diminuir significativamente a carga fúngica no pulmão dos camundongos imunizados
- ✓ A imunização com o vetor contendo o inserto P10 de *P. brasiliensis* é capaz de gerar células T com fenótipo de memória no baço e no pulmão dos animais imunizados, tanto antes quanto após o desafio.
- ✓ A imunização com o vetor contendo o inserto P10 de *P. brasiliensis* é capaz de gerar células T com fenótipo de reguladoras no baço e no pulmão dos animais imunizados, tanto antes quanto após o desafio.
- ✓ A imunização com o vetor contendo o inserto P10 de *P. brasiliensis* é capaz de gerar células T expressando ROR γ ⁺, marcador associado às células Th17, no baço e no pulmão dos animais imunizados e desafiados.
- ✓ As citocinas secretadas no sobrenadante de cultura dos esplenócitos provenientes dos animais imunizados com o vetor contendo o inserto P10 de *P. brasiliensis*, tanto antes quanto após o desafio caracterizam a polarização da resposta imunológica para o padrão Th1

REFERÊNCIAS*

AFZALI, B.; MITCHELL, P.; LECHLER, R. I.; JOHN, S.; LOMBARDI, G. Translational mini-review series on Th17 cells: Induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 159, p. 120-130, 2009.

ALLAN, S. E.; PASSERINI, L.; BACCHETTA, R.; CRELLIN, N.; DAÍ, M.; ORBAN, P. C.; ZIEGLER, S. F.; RONCAROLO, M. G.; LEVINGS, M. K. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 11, p. 3276-3284, 2005.

ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. São Paulo**, v. 5, p. 125–141, 1930.

ARANGO, M.; YARZÁBAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidiodomycosis. **Mycopathologia**, v. 79, p. 115-124, 1982.

ARRUDA, C.; FRANCO, M. F.; KASHINO, S. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; FAZIOLI, R. A.; VAZ, C. A. C.; RUSSO, M.; CALICH, V. L. G. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. **Clin. Immunol.**, v. 103, n. 2, p. 185-195, 2002.

ASADULLAH, K.; SABAT, R.; FRIEDRICH, M.; VOLK, H. D.; STERRY, W. Interleukin-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. **Curr. Drug Targets**, v. 3, n. 2, p. 185-192, 2004.

ASEFFA, A.; GUMY, A.; LAUNOIS, P.; MacDONALD, H. R.; LOUIS, J. A.; TACCHINI-COTTIER, F. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. **J. Immunol.**, v. 169, p. 3232-3241, 2002.

AWASTHI, A.; MURUGAIYAN, G.; KUCHROO, V. K. Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. **J. Clin. Immunol.**, v. 28, p. 660-670, 2008.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; DE, S.; BOSCO, M. G.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis*

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

- infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v. 41, n. 3, p. 217-223, 2003.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO, Z. P.; GOMES, G.M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic área of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n. 4, p. 505-512, 1998.
- BAGAGLI, E.; THEODORO, R. C.; BOSCO, S. M. G.; McEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, p. 197-207, 2008.
- BARROZO, L. V.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; BENARD, G.; SILVA, M. E. S.; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **Int. J. Epidemiol.**, 2009.
- BAUMGARTH, N.; ROEDERER, M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. **J. Immunol. Methods**, v. 243, p. 77-97, 2000.
- BAVA, A. J.; MISTCHENKO, A. S.; PALACIOS, M. F.; ESTEVEZ, M. E.; TIRABOSCHI, N. I.; SEN, L.; NEGRONI, R.; DIEZ, R. A. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. **Microbiol. Immunol.**, v. 35, n. 3, p. 167-174, 1991.
- BELKAID, Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 901-937, 2008.
- BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 10, p. 1497-1506, 2001.
- BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502-507, 2002.
- BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 353-360, 2005.
- BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 551-589, 2009.

- BELL, E. B.; WESTERMANN, J. CD4 memory T cells on trial: immunological memory without a memory T cell. **Trends Immunol.**, v. 29, n. 9, p. 405-411, 2008.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 209-221, 2008.
- BERARD, M.; TOUGH, D. F. Qualitative differences between naïve and memory T cells. **Immunology**, v. 106, p. 127-138, 2002.
- BETELLI, E.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 6, p. 652-657, 2007.
- BETTELLI, E.; DASTRANGE, M.; OUKKA, M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression. **PNAS**, v. 102, n. 14, p. 5138-5143, 2005.
- BLUESTONE, J. A.; ABBAS, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nat. Rev.**, v. 3, p. 253-257, 2003.
- BOASSO, A.; VACCARI, M.; NILSSON, J.; SHEARER, G. M.; ANDERSSON, J.; CECCHINATO, V.; CHOUGNET, C.; FRANCHINI, G. Do regulatory T-cells play a role in AIDS pathogenesis? **AIDS Rev.**, v. 8, p. 141-147, 2006.
- BOPP, T.; BECKER, C.; KLEIN, M.; KLEIN-HEßLING, S.; PALMETSHOFER, A.; SERFLING, E.; HEIB, V.; BECKER, M.; KUBACH, J.; SCHMITT, S.; STOLL, S.; SCHILD, H.; STAEGE, M. S.; STASSEN, M.; JONULEIT, H.; SCHMITT, E. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 6, p. 1303-1310, 2007.
- BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHENG, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 80 – 87, 2002.
- BOZZI, A.; REIS, B. S.; GOULART, M. I.; PEREIRA, M. C. N.; PEDROSO, E. P.; GOES, A. M. Analysis of memory T cells in the human paracoccidioidomycosis before and during chemotherapy treatment. **Immunol. Letters**, v. 114, p. 23-30, 2007.
- BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. *In vivo* and *in vitro* activation of pulmonary macrophages by IFN- γ , for enhanced killing of *Paracoccidioides brasiliensis* or *Blatomyces dermatitidis*. **J. Immunol.**, v. 140, n. 8, p. 2786-2789, 1988.

- BRUMMER, E.; HANSON, L. H.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 57, n. 8, p. 2289-2294, 1989.
- BRUNKOW, M. E.; JEFFERY, E. W.; HJERRILD, K. A.; PAEPER, B.; CLARK, L. B.; YASAYKO, S. A.; WILKINSON, J. E.; GALAS, D.; ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**, v. 27, p. 68-73, 2001.
- BYSTRY, R. S.; ALUVIHARE, V.; WELCH, K. A.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 12, p. 1126-1132, 2001.
- CABRERA, R.; TU, Z.; XU, Y. FIRPI, R. J.; ROSEN, H. R.; LIU, C.; NELSON, D. R. An immunomodulatory role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 40, p. 1062-1071, 2004.
- CALICH, V. L. G. ; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623, 1998.
- CALICH, V. L. G.; COSTA, T. A.; FELONATO, M.; ARRUDA, C.; BERNARDINO, S.; LOURES, F. V.; RIBEIRO, L. R. R.; VALENTE-FERREIRA, R. C.; PINA, A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, p. 223-236, 2008.
- CALICH, V. L. G.; SINGE-VERMES, M.; SIQUEIRA, A. M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Path.**, v. 66, p. 585 – 594, 1985.
- CALICH, V. L. G.; VAZ, C.A.C; BURGER, E. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Res. Immunol.**, v. 149, n. 4-5, p. 407-417, 1998.
- CARAMALHO, I.; LOPES-CARVALHO, T.; OSTLER, D.; ZELENAY, S.; HAURY, M.; DEMENGEOT, J. Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 4, p. 403-411, 2003.
- CARRIGAN, S. O.; YANG, Y. J.; ISSEKUTZ, T.; FORWARD, N.; HOSKIN, D.; JOHNSTON, B.; LIN, T. J. Depletion of natural CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells with anti-CD25 antibody does not change the course of *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung infection in mice. **Immunobiology**, v. 214, p. 211-222, 2009.

- CASSONE, A. Fungal vaccines: real progress from real challenges. **Lancet Infect. Dis.**, v. 8, p. 114-124, 2008.
- CASTAÑEDA, E.; BRUMMER, E.; PERLMAN, A. M.; McEWEN, J. G.; STEVENS, D. A. A culture medium for *Paracoccidioides brasiliensis* with high plating efficiency, and the effect of siderophores. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 26, n. 6, p. 351-358, 1988.
- CAULEY, L. S.; COOKENHAM, T.; MILLER, T. B.; ADAMS, P. S.; VIGNALI, K. M.; VIGNALI, D. A. A.; WOODLAND, D. L. Cutting Edge: Virus-specific CD4⁺ memory T cells in nonlymphoid tissues express a highly activated phenotype. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6655-6658, 2002.
- 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.
- CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 6, p. 1538-1543, 2000.
- CHATTERGOON, M. A.; SAULINO, V.; SHAMES, J. P.; STEIN, J.; MONTANER, L. J.; WEINER, D. B. Co-immunization with plasmid IL-12 generated a strong T-cell memory response in mice. **Vaccine**, v. 22, p. 1744-1750, 2004.
- CHEN, W. J.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.; LI, L.; MARINOS, N.; McGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor *Foxp3*. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 12, p. 1875-1886, 2003.
- CHUNG, Y.; CHANG, S. H.; MARTINEZ, G. J.; YANG, X. O.; NURIEVA, R.; KANG, H. S.; MA, L.; WATOWICH, S. S.; JETTEN, A. M.; TIAN, Q.; DONG, C. Critical regulation of early Th17 cells differentiation by interleukin-1 signaling. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 576-587, 2009.
- COFFER, P. J.; BURGERING, B. M. T. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. **Nat. Rev.**, v. 4, p. 889-899, 2004.
- COOKE, A.; HUTCHINGS, P. R.; PLAYFAIR, J. H. L. Suppressor T cells in experimental autoimmune haemolytic anaemia. **Nature**, v. 273, p. 154-155, 1978.
- CORREDOR, G. G.; CASTAÑO, J. H.; PERALTA, L. A.; DÍEZ, S.; ARANGO, M.; McEWEN, J. G.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-

banded armadillo *Dasyus novemcinctus*, in an endemic área for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Ver. Iberoam. Micol.**, v. 16, p. 216-220, 1999.

CUTLER, J. E.; DEEPE JR., G. S.; KLEIN, B. S. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold. **Nat. Rev.**, v. 5, 2007.

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

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 CD37 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **J. Exp. Med.**, v. 204, n. 6, p. 1257-1265, 2007.

DEBRÉ, P.; KAPP, J. A.; DORF, M. E.; BENACERRAF, B. Genetic control of specific immune suppression. II. H-2-linked dominant genetic control of immune suppression by the random copolymer L-glutamic acid⁵⁰-L-tyrosine⁵⁰ (GT). **J. Exp. Med.**, v. 142, p. 1447-1454, 1975.

DEMENGOT, J.; ZELANAY, S.; MORAES-FONTES, M. F.; CARAMALHO, I.; COUTINHO, A. Regulatory T cells in microbial infection. **Springer Sem. Immun.**, v. 28, p. 41-50, 2006.

DONNELLY, J. J.; ULMER, J. B.; SHIVER, J. W.; LIU, M. A. DNA Vaccines. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 617-648, 1997.

DONNELLY, J. J.; WAHREN, B.; LIU, M. A. DNA vaccines: progress and challenges. **J. Immunol.**, v. 175, p. 633-639, 2005.

DUTTON, R. W.; BRADLEY, L. M.; SWAIN, S.L. T cell memory. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 201-223, 1998.

ELY, K. H. ; COOKENHAM, T. ; ROBERTS, A. D. ; WOODLAND, D. L. Memory T cell populations in the lung airways are maintained by continual recruitment. **J. Immunol.**, v. 176, p. 537-543, 2006.

ESSER, M. T. ; MARCHESE, R. D. ; KIERSTEAD, L. S. ; TUSSEY, L. G. ; WANG, F. ; CHIRMULE, N. ; WASHABAUGH, M. W. Memory T cells and vaccines. **Vaccine**, v. 21, p. 419-430, 2003.

- FALLARINO, F. ; GROHMANN, U. ; HWANG, K. W. ; ORABONA, C. ; VACCA, C. ; BIANCHI, R. ; BELLADONNA, M. L. ; FIORETTI, M. C. ; ALEGRE, M. L. ; PUCCETTI, P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 12, p. 1206-1212, 2003.
- FAVA-NETTO, C.; RAPHAEL, A. A reação intradérmico com polissacáride do *Paracoccidioides brasiliensis*, na Blastomicose sul-americana. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.3, n. 4, p. 161-165, 1961.
- FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.
- FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. A function for interleukin-2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 11, p. 1142-1151, 2005.
- FORNAZIM, M. C.; BALTHAZAR, A.; QUAGLIATO JR., R.; MAMONI, R. L.; GARCIA, C.; BLOTTA, M. H. S. L. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. **Eur. Resp. J.**, v. 22, p. 895-899, 2003.
- FRANCO, M.; MENDES, R. P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.; MONTENEGRO, M. R. Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, v. 4, n. 1, p. 185-220, 1989.
- FURUICHI, Y.; TOKUYAMA, H.; UEHA, S.; KURACHI, M.; MORIYASU, F.; KAKIMI, K. Depletion of CD25⁺CD4⁺ T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8⁺T cell response primed by DNA immunization. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 24, p. 3772-3777, 2005.
- GARCIA, S.; DiSANTO, J.; STOCKINGER, B. Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation. **Immunity**, v. 11, p. 163-171, 1999.
- GARMORY, H. S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R. W. DNA vaccines: improving expression of antigens. **Gen. Vac. Ther.**, 2003.
- GEBHARDT, T.; WAKIM, L. M.; EIDSMO, L.; READING, P. C.; HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. **Nat. Immunol.**, v. 10, n. 5, p. 524-530, 2009.
- GERBERICK, G. F.; CRUSE, L. W.; MILLER, C. M.; SIKORSKI, E. E.; RIDDER, G. M. Selective modulation of T cell memory markers CD62L and CD44 on murine draining lymph node cells following allergen and irritant treatment. **Toxicol. Applied Pharmacol.**, v. 146, p. 1-10, 1997.

GERMAIN, R. N. Special regulatory T-cell review: A rose by any other name: from suppressor T cells to Tregs, approbation to unbridled enthusiasm. **Immunology**, v. 123, p. 20-27, 2008.

GERSHON, R. K.; COHEN, P.; HENCIN, R.; LIEBHABER, S. A. Suppressor T cells. **J. Immunol.**, v. 108, n. 3, p. 586-590, 1972.

GERSHON, R. K.; KONDO, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. **Immunology**, v. 18, p. 723-737, 1970.

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp de heces de pinguino de la Antártida. In: Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis, 4., 1989, Caracas. **Anais...** Caracas, p.B-2.

GRAY, D. A role for antigen in the maintenance of immunological memory. **Nat. Rev.**, v. 2, p. 60-65, 2002.

GRAY, D.; MATZINGER, P. T cell memory is short-lived in the absence of antigen. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 969-974, 1991.

GROSE, E.; TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Med. Mycol.**, v. 4, n. 2, p. 124-125, 1965.

GROUX, H.; O`GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; de VRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, v. 389, p. 737-742, 1997.

GUEBRE-XABIER, M.; SCHWENK, R.; KRZYCH, U. Memory phenotype CD8⁺ T cells persist in livers of mice protected against malaria by immunization with attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 3978-3986, 1999.

GUILLIAMS, M.; OLDENHOVE, G.; NOEL, W.; HÉRIN, M.; BRYNS, L.; LOI, P.; FLAMAND, V. MOSER, M.; BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. African trypanosomiasis: naturally occurring regulatory T cells favor trypanotolerance by limiting pathology associated with sustained type 1 inflammation. **J. Immunol.**, v. 179, p. 2748-2757, 2007.

GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; SEDER, R. A. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. **Nat. Med.**, v. 4, n. 12, p. 1409-1415, 1998.

- GURUNATHAN, S.; WU, C.; FREIDAG, B. L.; SEDER, R. A. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 442-447, 2000.
- HAN, G. M.; ZHAO, B.; JEYASEELAN, S.; FENG, J. M. Age-associated parallel increase of Foxp3⁺CD4⁺ regulatory and CD44⁺CD4⁺ memory T cells in SJL/J mice. **Cell. Immunol.**, 2009.
- HANDAN, J. S.; RESENDE, M. A. Lipid composition and effect of amphotericin B on yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 102, p. 97-105, 1998.
- HENINGER, E.; HOGAN, L. H.; KARMAN, J.; MACVILAY, S.; HILL, B.; WOODS, J. P.; SANDOR, M. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. **J. Immunol.**, v. 177, p. 3303-3313, 2006.
- HESSE, M.; PICCIRILLO, C. A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A. W.; SHEVACH, E. M.; WYNN, T. A. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 3157-3166, 2004.
- HILLEMAN, M. R. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. **Vaccine**, v. 18, p. 1436-1447, 2000.
- HISAEDA, H.; MAEKAWA, Y.; IWAKAWA, D.; OKADA, H.; HIMENO, K.; KISHIHARA, K.; TSUKUMO, S.; YASUTOMO, K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat. Med.**, v. 10, n. 1, p. 29-30, 2004.
- HOGAN, R. J.; USHERWOOD, E. J.; ZHONG, W.; ROBERTS, A. D.; DUTTON, R. W.; HARMSSEN, A. G.; WOODLAND, D. L. Activated antigen-specific CD8⁺ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. **J. Immunol.**, v. 166, p. 1813-1822, 2001.
- HONG, M.; ZHU, Q. Macrophages are activated by 17beta-estradiol: possible permission role in endometriosis. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 55, n. 5, p. 385-391, 2004.
- HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor *Foxp3*. **Science**, v. 299, p. 1057-1061, 2003.
- HORWITZ, D. A.; ZHENG, S. G.; GRAY, J. D. Natural and TGF-β-induced Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are not mirror images of each other. **Trends Immunol.**, v. 29, n. 9, p. 429-435, 2008.

- HUANG, W.; NA, L.; FIDEL, P. L.; SCHWARZENBERGER, P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. **J. Infect. Dis.**, v. 190, p. 624-631, 2004.
- HUNG, C. Y.; XUE, J.; COLE, G. T. Virulence mechanisms of *Coccidioides*. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1111, p. 225-235, 2007.
- ICHIYAMA, K.; YOSHIDA, H.; WAKABAYASHI, Y.; CHINEN, T.; SAEKI, K.; NAKAYA, M.; TAKAESU, G.; HORI, S.; YOSHIMURA, A.; KOBAYASHI, T. Foxp3 inhibits ROR γ t-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with ROR γ t. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 25, p. 17003-17008, 2008.
- ITO, K.; ITO, K.; SHINOHARA, N.; KATO, S. DNA immunization via intramuscular and intradermal routes using a gene gun provides different magnitudes and durations on immune response. **Mol. Immunol.**, v. 39, p. 847-854, 2003.
- JARON, B.; MARANGHI, E.; LECLERC, C.; MAJLESSI, L. Effect of attenuation of Treg during BCG immunization on anti-mycobacterial Th1 responses and protection against *Mycobacterium tuberculosis*. **Plos One**, v. 3, n. 7, 2008.
- JELLEY-GIBBS, D. M.; DIBBLE, J. P.; FILIPSON, S.; HAYNES, L.; KEMP, R. A.; SWAIN, S. L. Repeated stimulation of CD4 effector T cells can limit their protective function. **J. Exp. Med.**, v. 201, n. 7, p. 1101-1112, 2005.
- JETTEN, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. **Nucl. Recept. Signal.**, v. 7, 2009.
- JIANG, C.; MAGEE, D. M.; QUITUGUA, T. N.; COX, R. A. Genetic vaccination against *Coccidioides immitis*: comparison of vaccine efficacy of recombinant antigen 2 and antigen 2 cDNA. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 2, p. 630-635, 1999.
- JIMENEZ, B. E.; MURPHY, J. W. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. **Infect. Immun.**, v. 46, n. 2, p. 552-558, 1984.
- JIMENEZ-FINKEL, B. E.; MURPHY, J. W. Induction of antigen-specific T suppressor cells by soluble *Paracoccidioides brasiliensis* antigen. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 4, p. 734-743, 1988.
- JOSEFOWICZ, S. Z.; RUDENSKY, A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. **Immunity**, v. 30, p. 616-625, 2009.

- KAECH, S. M.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Effector and memory T-cells differentiation: implications for vaccine development. **Nat. Ver.**, v. 2, p. 251-262, 2002.
- KASHINO, S. S.; FAZIOLI, R. A.; CAFALLI-FAVATI, C.; MELONI-BRUNERI, L. H.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E.; SINGER, L. M.; CALICH, V. L. G. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN- γ production. **J. Interferon Cytokine res.**, v. 20, p. 89-97, 2000.
- KAYA, T. I.; ESKANDARI, G.; GUVENC, U.; GUNES, G.; TURSEN, U.; BURAK CIMEN, M. Y. IKIZOGLU, G. CD4⁺ CD25⁺ Treg cells in patients with toenail onychomycosis. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 301, n. 10, p. 725-729, 2009.
- KIM, B.; FENG, N.; NARVÁEZ, C. F.; HE, X. S.; EO, S. K.; LIM, C. W.; GREENBERG, H. B. The influence of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells on the immune response to rotavirus infection. **Vaccine**, v. 26, p. 5601-5611, 2008.
- KOENEN, H. J. P. M.; SMEETS, R. L.; VINK, P. M.; van RIJSSEN, E.; BOOTS, A. M. H.; JOOSTEN, I. Human CD25^{high} Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2340-2352, 2008.
- KOHM, A. P.; McMAHON, J. S.; PODOJIL, J. R.; BEGOLKA, W. S.; DEGUTES, M.; KASPROWICZ, D. J.; ZIEGLER, S. F.; MILLER, S. D. Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 3301-3305, 2006.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 cells. **Annu. Ver. Immunol.**, v. 27, p. 485-517, 2009.
- KULLBERG, M. C.; JANKOVIC, D.; GORELICK, P. L.; CASPAR, P.; LETTERIO, J. J.; CHEEVER, A. W.; SHER, A. Bacteria-triggered CD4⁺ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 4, p. 505-515, 2002.
- KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nat. Rev.**, v. 9, p. 776-788, 2008.
- LACAZ, C. S.; PASSOS FILHO, M. C. R.; FAVA NETTO, C.; MACARRON, B. Contribuição para o estudo da “Blastomicose-infecção”. Inquérito com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clinic-radiológico dos paracoccidioidino-positivos. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.1, n.4, p. 245-259, 1959.
- LACAZ, C. S.; ZAMITH, V. A.; DEL NEGRO, G.; SIQUEIRA, A. M. Aspectos Clínicos Gerais. **In:** FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomicose**, São Paulo, 1982.

- LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 6, p. 487-492, 2001.
- LEWKOWICH, I. P.; HERMAN, N. S.; SCHLEIFER, K. W.; DANCE, M. P.; CHEN, B. L.; DIENGER, K. M.; SPROLES, A. A.; SHAH, J. S.; KOHL, J.; BELKAID, Y.; WILLS-KARP, M. CD4⁺ CD25⁺ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. **J. Exp. Med.**, v. 202, n. 11, p. 1549-1561, 2005.
- LIU, M. A. DNA vaccines: a review. **J. Internal Med.**, v. 253, p. 402-410, 2003.
- LOOSE, D. S.; STOVER, E. P.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor-like cytosol binding protein and initiates a biological response in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 80, p. 7659-7663, 1983.
- LOURES, F. V.; PINA, A.; FELONATO, M.; CALICH, V. L. G. 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.
- LUNDGREN, A.; SURI-PAYER, E.; ENARSSON, K.; SVENNERHOLM, A. M.; LUNDIN, B. S. *Helicobacter pylori*-specific CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. **Infec. Immun.**, v. 71, n. 4, p. 1755-1762, 2003.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hypo-blastomycoses americanas. **Braz. Med.**, v. 22, n. 15, p.141-144, 1908.
- MACKINNON, J. E. On the importance of South American Blastomycosis. **Mycopathol. Mycol.**, v. 41, p. 187-193, 1970.
- MANIGOLD, T.; SHIN, E. C.; MIZUKOSHI, E.; MIHALIK, K.; MURTHY, K. K.; RICE, C. M.; PICCIRILLO, C. A.; REHERMANN, B. Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells control virus-specific memory T cells in chimpanzees that recovered from hepatitis C. **Blood**, v. 107, n.11, p. 4424-4432, 2006.
- MARQUES, A. F.; SILVA, M. B.; JULIANO, M. A. P.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Peptide immunization as an adjuvant to chemotherapy in mice challenged intratracheally with virulent yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 8, p. 2814-2819, 2006.

- McEWEN, J. G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med Vet. Mycol.**, v.25, p.165-175, 1987.
- McKINLEY, L.; LOGAR, A. J.; McALLISTER, F.; ZHENG, M.; STEELE, C.; KOLLS, J.K. Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of *Pneumocystis pneumonia*. **J. Immunol.**, v. 177, p. 6215-6226, 2006.
- McKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M.; SWAIN, S. L. The effector to memory transition of CD4 T cells. **Immunol. Res.**, v. 40, p. 114-127, 2008.
- McLEOD, M. K.; CLAMBAY, E. T.; KAPPLER, J. W.; MARRACK, P. CD4 memory T cells: what are they and what can they do? **Sem. Immunol.**, v. 21, p. 53-61, 2009.
- MENDEZ, S.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A.; SACKS, D.; BELKAID, Y. Role for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **J. Exper. Med.**, v. 200, n. 2, p. 201-210, 2004.
- MILLS, K. H. G.; McGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells – their induction and role in infection. **Sem. Immunol.**, v. 16, p. 107-117, 2004.
- MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; MOSCI, P.; SHARPE, A. H.; ROMANI, L. B7/CD28-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6298-6308, 2002.
- MONTAGNOLI, C.; FALLARINO, F.; GAZIANO, R.; BOZZA, S.; BELLOCCHIO, S.; ZELANTE, T.; KURUP, W. P.; PITZURRA, L.; PUC CETTI, P.; ROMANI, L. Immunity and tolerance to *Aspergillus* involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. **J. Immunol.**, v. 176, p. 1712-1723, 2006.
- MOORE, K. W.; MALEFYT, R. W.; COFFMAN, R. L.; O’GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MOREIRA, A. P.; CAVASSANI, K. A.; TRISTÃO, F. S. M.; 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. 3049-3056, 2008.
- MORTIMER, E. A. (Ed.). **Vaccines**. 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 1-12, 1999.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOTA, N. G. S.; PERAÇOLI, M. T. S.; MENDES, R. P.; GATTASS, C. R.; MARQUES, S. A.; SOARES, A. M. V. C.; IZATTO, I.C.; REZKALLAH-IWASSO, M. T. Mononuclear cell subsets in patients with different clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 26, n. 2, p. 105-111, 1988.
- MUCHMORE, H. G.; MCKOWN, B. A.; MOHR, J. A. Effects of the steroid hormones on the proliferation of *Paracoccidioidomycosis brasiliensis*. **Biol. Oficina Sanit. Panam.**, v. 77, p. 55-70, 1974.
- MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, v. 317, p. 256-260, 2007.
- MURPHY, D. B.; HERZENBERG, L. A.; OKUMURA, K.; McDEVITT, H. O. A new I subregion (I-J) marked by a locus (IA-4) controlling surface determinants on suppressor T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 144, p. 699-712, 1976.
- NAIFF, R.; FERREIRA, L.; BARRAET, T.; NAIFF, M.; ARIAS, J. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcitus*) in the State of Para. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 28, n. 1, p. 19-27, 1986.
- NEGRONI, P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argentina. **Prensa Med. Argent.**, v. 53, p. 2381-2, 1966.
- NIE, C. Q.; BERNARD, N. J.; SCHOFIELD, L.; HANSEN, D. S. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T-cells function and inhibit the development of *Plasmodium berghei*-specific Th1 responses involved in cerebral malaria pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2275-2282, 2007.
- NISHIZUKA, Y.; SAKAKURA, T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. **Science**, v. 166, p. 753-755, 1969.
- O`GARRA, A.; VIEIRA, P. L.; VIEIRA, P.; GOLDFELDS, A. E. IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. **J. Clin. Invest.**, v. 114, n. 10, p. 1372-1378, 2004.
- O`GORMAN, W. E.; DOOMS, H.; THORNE, S. H.; KUSWANTO, W. F.; SIMONDS, E. F.; KRUTZIK, P. O.; NOLAN, G. P.; ABBAS, A. K. The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 183, p. 332-339, 2009.

- OKWOR, I.; UZONNA, J. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. **Immunol. Res.**, v. 41, p. 123-136, 2008.
- PANDIYAN, P.; ZHENG, L.; ISHIHARA, S.; REED, J.; LENARDO, M. J. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 1353-1362, 2007.
- PANUN, P. L. Observations made during the epidemic of measles on the Faroe Islands in the year 1846.
- PASQUALI, P.; THORNTON, A. M.; VENDETTI, S.; PISTOIA, C.; PETRUCCI, P.; TARANTINO, M.; PESCIAROLI, M.; RUGGERI, F.; BATTISTONI, A.; SHEVACH, E. M. CD4⁺CD25⁺ T regulatory T cells limit effector T cells and favor the pregression of brucellosis in BALB/c mice. **Microbes Infect.**, v. 12, p. 3-10, 2010.
- PENHALE, W. J.; FARMER, A.; IRVINE, W. J. Thyroiditis in T cell-depleted rats: influence of strain, radiation dose, adjuvants and antilymphocyte serum. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 21, p. 362-375, 1975.
- PENHALE, W. J.; FARMER, A.; MCKENNA, R. P.; IRVINE, W. J. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated wistar rats. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 15, p. 225-236, 1973.
- PENHALE, W. J.; IRNIVE, W. J.; INGLIS, J. R.; FARMER, A. Thyroiditis in T cell-depleted rats: suppression of the autoallergic response by reconstitution with normal lymphoid cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 25, p. 6-16, 1976.
- PERAÇOLI, M. T. S.; SOARES, A. M. V. C.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; PEREIRA, P. C. M.; REZKALLAH-IWASSO, M. T. Studies of natural killer cells in patients with paracoccidiodomycosis. **Med. Mycol.**, v. 29, n. 6, p. 373-380, 1991.
- PINTO, A. R.; PUCCIA, R.; DINIZ, S. N.; FRANCO, M. F.; TRAVASSOS, L. R. DNA-based vaccination against murine paracoccidiodomycosis using the gp43 gene from *Paracoccidoides brasiliensis*. **Vaccine**, v. 18, p. 3050-3058, 2000.
- PLOTKIN, S. L.; PLOTKIN, S. A. A short history of vaccination. In: PLOTKIN, S. A.; PRADO, M.; da SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 513-521, 2009.
- PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidoides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v. 53, n. 1, p. 199-206, 1986.
- RANGARAJAN, P. N. DNA vaccines. **Resonance**, 2002.
- RESTREPO, A. Paracoccidiodomycosis. **Acta Med. Colomb.**, v. 3, p. 33-66, 1978.

- RESTREPO, A.; ARANGO, M. D. In vitro susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to sulfonamides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 18, p. 190-194, 1980.
- RESTREPO, A.; GREER, D. L.; VASCONCELLOS, M. Paracoccidioidomycosis: a review. **Rev. Med. Vet. Mycol.**, v. 8, p. 97-123, 1973.
- RESTREPO, A.; ROBLEDO, M.; OSPINA, S.; RESTREPO, M.; CORREA, A. Distribution of paracoccidioidin sensitivity in Colombia. **Am. Trop. Med. Hyg.**, v. 17, n.1, p. 24-37, 1968.
- RESTREPO, A.; MONCADA, L. H.; QUINTERO, M. Effect of hydrogen ion concentration and temperature on the growth of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil extracts. **Sabouraudia**, v. 7, p. 207-215, 1969.
- RIBEIRO, A. M.; BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; FACCIOLI, L. H.; GALETTI, F. C. S.; ZÁRATE-BLADÉS, C. R.; FIGUEIREDO, F.; SILVA, C. L.; FELIPE, M. S. S. DNA_{hsp65} vaccination induces protection in mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Vaccine**, v. 27, p. 606-613, 2009.
- RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 42, n. 4, p. 379-383, 2004.
- RITTNER, G. M. G. **Terapia gênica contra paracoccidioidomicose experimental utilizando camundongos BALB/c e B10.A e vetores de expressão de P10, HSP60 e IL-12.** 2008. 165 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ROBERTSON, S. J.; HASENKRUG, K. J. The role of vírus-induced regulatory T cells in immunopathology. **Springer Sem. Immunol.**, v. 28, p. 51-62, 2006.
- ROMANI, L. Cells mediated immunity to fungi: a reassessment. **Med. Mycol.**, p. 1-15, 2008.
- RUDNER, X. L.; HAPPEL, K. I.; YOUNG, E. A.; SHELLITO, J. E. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. **Infec. Immun.**, v. 75, n. 6, p. 3055-3061, 2007.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 531-562, 2004.
- SAKAGUCHI, S.; FUKUMA, K.; KURIBAYASHI, K.; MASUDA, T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. **J. Exp. Med.**, v. 161, p. 72-87, 1985.
- SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). **J. Immunol.**, v. 155, p. 1151-1164, 1995.
- SAKAGUCHI, S.; WING, K.; MIYARA, M. Regulatory T cells – a brief history and perspective. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 116-123, 2007.

- SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cells subsets: function, generation, and maintenance. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 745-763, 2004.
- SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.
- SCHOLZEN, A.; MITTAG, D.; ROGERSON, S. J.; COOKE, B. M.; PLEBANSKI, M. *Plasmodium falciparum*-mediates induction of human CD25^{hi}Foxp3^{hi}CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGF- β . **Plos Pathog.**, v. 5, n. 8, 2009.
- SCHUBERT, L. A.; JEFFREY, E.; ZHANG, Y.; RAMSDELL, F.; ZIEGLER, S. F. Scurfin (Foxp3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 40, p. 37672-37679, 2001.
- SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 1707-1713, 2005.
- 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, n. 9, p. 2159-2169, 2007.
- SELVARAJ, R. K.; GEIGER, T. L. A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF- β ¹. **J. Immunol.**, v. 178, p. 7667-7677, 2007.
- SHEDLOCK, D. J.; WEINER, D. B. DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, p. 793-806, 2000.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. e grupo de consultores em paracoccidioidomicose. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 3, p. 297 – 310, 2006.
- SHOME, S.K.; BATISTA, A.C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil in Recife, Brazil. **Ver. Fac. Med. Univ. Federal Ceará**, v. 3, p. 90-94, 1963.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H. B.; MAFFEI, C. M. L.; CHADY, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an área where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, n. 3, p. 193-199, 2000.
- SILVERSTEIN, A. M. A history of immunology. 2^a ed. New York: Academic Press, 2009.

- SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M. C.; KASHINO, S. S.; BURGER, E.; CALICH, V. L.G. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, n. 3, p. 261-264, 1992.
- SOUTO, J. T.; ALIBERTI, J. C.; CAMPANELLI, A. P.; LIVONESI, M. C.; MAFFEI, C. M. L.; FERREIRA, B. R.; TRAVASSOS, L. R.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . **Am. J. Pathol.**, v. 163, n. 2, p. 583-590, 2003.
- SOUTO, J. T.; FIGUEIREDO, F.; FURLANETTO, A.; PFEFFER, K.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon- γ and tumour necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p. 1811-1820, 2000.
- STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **PNAS**, v. 99, n. 1, p. 351-358, 2002.
- STOBER, C. B.; LANGE, U. G.; ROBERTS, M. T. M.; ALCAMI, A.; BLACKWELL, J. M. Heterologous priming-boosting with DNA and modified vaccinia virus Ankara expressing trypanothione peroxidase promotes long-term memory against *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 852-860, 2007.
- STOBER, C. B.; LANGE, U. G.; ROBERTS, M. T. M.; ALCAMI, A.; BLACKWELL, J. M. IL-10 from regulatory T cells determines vaccine efficacy in murine *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 175, p. 2517-2524, 2005.
- SUFFIA, I. J.; RECKLING, S. K.; PICCIRILLO, C. A.; GOLDSZMID, R. S.; BELKAID, Y. Infected site-restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 3, p. 777-788, 2006.
- SUGIHARA, S.; MARUO, S.; TSUJIMURA, T.; TARUTANI, O.; KOHNO, Y.; HAMAOKA, T.; FUJIWARA, H. Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cells subsets. III. Analysis of regulatory cells suppressing the induction of thyroiditis. **Intern. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 343-351, 1990.
- 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.
- SWAIN, S. L.; HU, H.; HUSTON, G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. **Science**, v. 286, n. 5443, p. 1381-1383, 1999.
- TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-cell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response protective against fungal infection in BALB/c mice. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 2, p. 786-793, 1998.

- TABORDA, C. P.; SILVA, M. B.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi: a minireview. **Myopathologia**, v. 165, p. 331-339, 2008.
- TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a Jack of all trades, master of regulation. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 239-244, 2008.
- TAPIA, F. J.; GOIHMAN-YAHR, M.; CÁCERES-DITTMAR, G.; ALTIERI, E.; GROSS, A.; ISTURIZ, G.; ROSQUETE, R.; VILORIA, N.; AVILA-MILLAN, E.; CARRASQUERO, M. Leukocyte immunophenotypes in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood of paracoccidioidomycosis, sarcoidosis and silicosis. **Histol. Histopathol.**, v. 6, n. 3, p. 395-402, 1991.
- TAYLOR, M. D.; LeGOFF, L.; HARRIS, A.; MALONE, E.; ALLEN, J. E.; MAIZELS, R. M. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. **J. Immunol.**, v. 174, p. 4924-4933, 2005.
- TOKA, F. N.; SUVAS, S.; ROUSE, B. T. CD4⁺CD25⁺ T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8⁺ T-cell responses against herpes simplex virus type 1. **J. Virol.**, v. 78, n. 23, p. 13082-13089, 2004.
- ULMER, J. B.; DONNELLY, J. J.; PARKER, S. E.; RHODES, G. H.; FELGNER, P. L.; DWARKI, V. J.; GROMKOWSKI, S. H.; DECK, R. R.; DeWITT, C. M.; FIEDMAN, A. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science**, v. 259, n. 5102, p. 1745-1749, 1993.
- ESSEN, D.; DULLFORCE, P.; BROCKER, T.; GRAY, D. Cellular interactions involved in Th cell memory. **J. Immunol.**, v. 165, p. 3640-3646, 2000.
- VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 523-532, 2008.
- WALTHER, M.; JEFFRIES, D.; FINNEY, O. C.; NIJE, M.; EBONYI, A.; DEININGER, S.; LAWRENCE, E.; NGWA-AMAMBUA, A.; JAYASOORIYA, S.; CHEESEMAN, I. H.; GOMEZ-ESCOBAR, N.; OKEBE, J.; CONWAY, D. J.; RILEY, E. M. Distinct roles for Foxp3⁺ and Foxp3⁻ CD4⁺ T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. **Plos Pathog.**, v. 5, n. 4, 2009.
- WEAVER, C. T.; HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; GAVRIELI, M.; MURPHY, K. M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, v. 24, p. 677-688, 2006.
- WHERRY, E. J.; BARBER, D. L.; KAECH, S. M.; BLATTMAN, J. N.; AHMED, R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. **PNAS**, v. 101, n. 45, p. 16004-16009, 2004.
- WOHLFERT, E.; BELKAID, Y. Role of endogenous and induced regulatory T cells during infections. **J. Clin. Immunol.**, v. 28, p. 707-715, 2008.

- WOLF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGNER, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science**, v. 247, p. 1465-1458, 1990.
- WONG, L. P.; WOO, P. C. Y.; WU, A. Y. Y.; YUEN, K. Y. DNA immunization using a secreted cell wall antigen Mp1p is protective against *Penicillium marneffei* infection. **Vaccine**, v. 20, p. 2878-2886, 2002.
- WOODLAND, D. L.; SCOTT, I. T cell memory in the lung airways. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v. 2, p. 126-131, 2005.
- XU, L.; KITANI, A.; FUSS, I.; STROBER, W. Cutting Edge: Regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β . **J. Immunol.**, v. 178, p. 6725-6729, 2007.
- YANG, G.; LIU, A.; XIE, Q.; GUO, T. B.; WAN, B.; ZHOU, B.; ZHANG, J. Z. Association of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B. **Intern. Immunol.**, 2006.
- YURCHENKO, E.; TRITT, M.; HAY, V.; SHEVACH, E. M.; BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulaoty T cells to sites of *Leishmanis major* infection favors pathogen persistence. **J. Exp. Med.**, v., 2006.
- ZAPH, C.; UZONNA, J.; BEVERLEY, S. M.; SCOTT, P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nat. Med.**, v. 10, n. 10, p. 1104-1110, 2004.
- ZHANG, J.; DONG, Z.; ZHOU, R.; LUO, D.; WEI, H.; TIAN, Z. Isolation of lymphocytes and their innate immune characterizations from liver, intestine, lung and uterus. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 271-280, 2005.
- ZHENG, S. G.; WANG, J.; HORWITZ, D. A. Cutting Edge : Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by IL-2 and TGF- β are resistant to Th17 conversionby IL-6. **J. Immunol.**, v. 180, p. 7112-7116, 2008.
- ZHOU, L.; LOPES, J. E.; CHONG, M. M. W.; IVANOV, I. I.; MIN, R.; VICTORA, G. D.; SHEN, Y.; DU, J.; RUBTSOV, Y. P.; RUDENSKY, A. Y.; ZIEGLER, S. F.; LITTMAN, D. R. TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. **Nature**, v. 453, n. 7192, p. 236-240, 2008.
- ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells : fates, functions and faults. **Blood**, v. 112, p. 1557-1569, 2008.
- ZIEGLER, S. F. Foxp3: of mice and men. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 209-226, 2006.

ZINKERNAGEL, R. M. ; HENGARTNER, H. Protective 'immunity' by pre-existing neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called 'immunological memory'. **Immunol. Rev.**, v. 211, p. 310-319, 2006.