

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

*Participação de células T reguladora no controle da resposta durante a  
paracoccidiodomicose humana*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientação: Prof. Dr. João Santana Silva

Aluna: Karen Angélica Cavassani de Souza

**Ribeirão Preto  
2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

**Ficha catalográfica**

**Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto-USP**

Cavassani de Souza, Karen Angélica

**Participação de células T reguladoras no controle da resposta imune durante a  
paracoccidiodomicose humana**

Ribeirão Preto, 2006

101p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Área de  
Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Silva, João Santana

1. *Paracoccidoides brasiliensis*. 2. Imunomodulação 3. Fenótipo 4. células T reguladoras 5. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

*Participação de células T reguladoras no controle da resposta durante a  
paracoccidiodomicose humana*

KAREN ANGÉLICA CAVASSANI DE SOUZA

**Ribeirão Preto  
2006**

Assim como em diversas infecções de caráter crônico, na paracoccidiodomicose (PCM) há uma dinâmica interação entre parasita e hospedeiro. Estudos pertinentes demonstram claramente a participação de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais (Tregs) no controle das respostas imunes a diversos patógenos, contribuindo para a persistência dos mesmos e o estabelecimento da infecção crônica. É sabido que as Tregs suprimem a proliferação de células T efetoras, utilizam a IL-2 produzida, produzem citocinas tais como TGF-β e IL-10 e expressam de maneira constitutiva CTLA-4. De forma interessante, tais fenômenos podem ser observados nos leucócitos de pacientes com PCM. Assim, nós investigamos o possível envolvimento dessa população celular no controle da resposta imune no sangue periférico e nas lesões cutâneas e de mucosa mediadas por *P. brasiliensis* durante a PCM. Não observamos diferenças na frequência de leucócitos no sangue periférico de pacientes com PCM e indivíduos controles, exceto na população de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> (7,2 e 1,8%, respectivamente). No entanto, uma maior percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> co-expressando CTLA-4, GITR, TGF-β de membrana ou Foxp3 com forte atividade supressora foi observada nos pacientes quando comparada às células de indivíduos controles (94.0 x 67.5%, da inibição da resposta proliferativa de células T alogeneicas). Adicionalmente, nossos resultados mostraram que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> co-expressando marcadores fenotípicos, CTLA-4, GITR, CD103, CD45RO, TGF-β de superfície, Foxp3 e receptores de quimiocinas, CCR4 e CCR5, acumulam-se nas lesões. De fato, a expressão de CCL17 e CCL22, ambos associados com a migração de Tregs para os sítios periféricos, foi detectada nas biópsias cutâneas dos pacientes. Além disso, 78% das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> derivadas das lesões foram TGF-β<sup>+</sup>. Na proporção 1:10, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas das lesões de cinco dos oito pacientes analisados foram capazes de suprimir a resposta proliferativa de células T alogeneicas mediada por PHA (a percentagem de inibição variou de 51 a 81%) e essas lesões apresentaram granulomas compactos e organizados. De forma contrária, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> incapazes de inibir a resposta proliferativa foram isoladas de pacientes cujas

lesões apresentaram um processo granulomatoso que condiz com a forma aguda e subaguda da PCM. Em conjunto, os dados apresentados neste estudo revelam a presença de Tregs em pacientes infectados por *P. brasiliensis*, contribuindo para uma melhor compreensão dos fatores que modulam a resposta imune sistêmica e local durante a PCM humana.

The long-term persistence of pathogens in a host is a hallmark of certain infectious diseases including, schistosomiasis, leishmaniasis, paracoccidioidomycosis (PCM). Natural regulatory T cells (Treg) control effector immune responses allowing the pathogen persistence. Since CTLA-4 is constitutively expressed in Treg cells and it acts as a negative regulator of T cell activation in patients with PCM, here we investigated the involvement of Treg in the control of systemic and local immune response in patients with PCM. We found that the leucocytes subsets were similar in patients and controls, except for CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> cells. However, higher frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4, GITR, membrane-bound TGF- $\beta$ , and Foxp3 were observed in PBMC of patients. In accordance, these cells exhibited stronger suppressive activity when compared with those from controls (94.0 vs. 67.5%, of inhibition of allogeneic T cell proliferation). In addition, the data showed that CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells expressing, CTLA-4<sup>+</sup>, GITR<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, membrane-bound TGF- $\beta$ , Foxp3<sup>+</sup>, and the chemokines receptors, CCR4 and CCR5, accumulate in the *P. brasiliensis*-induced lesions. Indeed, the secreted CCL17 and CCL22, both associated with the migration of Tregs cells to peripheral tissues, were also detected in the biopsies. Moreover, the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell derived from lesions, most of them TGF- $\beta$ <sup>+</sup>, also exhibited regulatory activity *in vitro* (51 to 81%, of inhibition of T cell proliferation), however, at 1:10 ratio, some of them were functionally deficient. This functional deficit of Tregs could be related to the formation of granulomatous process observed in these lesions. Altogether, these data provide the first evidence that Tregs cells play a role in controlling local and systemic immune response in patients infected by *P. brasiliensis* advancing our understanding of immune regulation in human chronic diseases, in particular concern, the PCM.

## *Sumário*

<b>RESUMO</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VI</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
1. Amostra populacional - identificação e seleção de pacientes e indivíduos controles sadios	<b>19</b>
2. Estabelecimento da cultura de <i>P. brasiliensis</i> e obtenção dos antígenos utilizados como estímulo	<b>20</b>
3. Anticorpos	<b>20</b>
4. Obtenção dos leucócitos humanos	<b>21</b>
5. Isolamento dos leucócitos presentes das lesões mediadas por <i>P. brasiliensis</i>	<b>21</b>
6. Separação das sub-populações de células T obtidas do PBMC e das lesões	<b>22</b>
7. Expansão “ <i>in vitro</i> ”	<b>23</b>
8. Co-culturas e ensaio de proliferação celular	<b>24</b>
9. Citometria de fluxo para análise fenotípica da expressão de moléculas de superfície	<b>25</b>
10. Marcação intracelular para detecção de citocinas e de Foxp3	<b>26</b>
11. Avaliação do padrão de citocinas no sobrenadante das co-culturas por citometria de fluxo	<b>27</b>
12. Reações de imunohistoquímica para detecção de quimiocinas e Foxp3	<b>28</b>
13. Imunofluorescência e análise por confocal	<b>30</b>
14. Análise estatística	<b>31</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
1. Caracterização fenotípica de PBMC de pacientes com PCM	<b>33</b>

2. Caracterização do fenótipo das células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> e CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes com PCM	33
3. Caracterização fenotípica das células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> presentes no sangue periférico de pacientes com PCM	35
4. Caracterização funcional das células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> isoladas do PBMC de pacientes com PCM	37
5. Análise microscópica das lesões de pele mediadas por <i>P. brasiliensis</i>	43
6. Caracterização fenotípica das células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> presentes nas lesões de pacientes com PCM	43
7. Expressão de Foxp3 nas lesões de pacientes com PCM	48
8. A expressão de quimiocinas nas lesões mediadas por <i>P. brasiliensis</i>	51
9. O perfil da produção de citocinas por células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> e T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> presentes nas lesões de pacientes com PCM	53
10. Caracterização funcional das células T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> isoladas das lesões de pacientes com PCM	56
11. Histomorfologia das lesões granulomatosas tegumentares dos pacientes	56
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO</b>	<b>102</b>

**APC:** células apresentadoras de antígenos

**BHI:** “Brain heart infusion”

**BSA:** “bovine albumin fraction V”

**CCL:** ligante de quimiocinas CC

**CCR:** receptor de quimiocinas CC

**CD:** “cluster of differentiation”

**CTLA-4:** “cytotoxic T lymphocyte antigen 4”

**DAPI:** 4'-6-Diamidino-2-phenylindole

**DNase:** deoxyribonuclease

**EDTA:** ácido “ethylenediaminetetraacetic”

**FITC:** isotiocianato de fluoresceína

**Foxp3:** fator de transcrição “forkhead box P3”

**GITR:** gene relacionado à família do receptor TNF induzido por glicocorticóide

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana

**IDO:** enzima “indoleamine 2,3-dioxygenase”

**IFN:** interferon

**Ig:** imunoglobulina

**IL:** interleucina

**LAP:** peptídeo associado à latência

**MHC:** complexo de histocompatibilidade principal

**MIF:** média da intensidade de fluorescência

**PBMC:** células mononucleares do sangue periférico

**PBS:** “phosphate buffered saline”

**PCM:** paracoccidiodomicose

**PE:** ficoeritrina

**PercP:** clorofila-peridininina

**PHA:** fitohemaglutinina

**RPMI-1640:** meio de cultura para células

**SBF:** soro bovino fetal

**sPbAg:** antígenos de membrana e secretados de *P. brasiliensis*

**TGF- $\beta$ :** fator de crescimento e transformação  $\beta$

**Th:** Linfócito T auxiliar

**Tregs:** células T reguladoras

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica de evolução crônica e granulomatosa cuja incidência e prevalência são expressivas em países da América Latina, onde as principais regiões endêmicas estão localizadas no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (LACAZ & RAMOS, 1956). A primeira evidência da PCM no Brasil foi descrita em 1908 por Adolpho Lutz e, atualmente é definida como um importante agravo de saúde no Brasil. Esta doença é a oitava causa de mortalidade dentre as doenças infecciosas e parasitárias e, dentre as micoses sistêmicas, apresenta-se com a mais elevada taxa de mortalidade (1,45/milhão de habitantes) sendo considerada endêmica em áreas não-metropolitanas, interioranas e rurais. Esta doença se sobressai entre o sexo masculino em relação ao feminino (562 homens/100 mulheres) com na faixa etária de 30 e 59 anos (COUTINHO, 2002).

O agente etiológico da paracoccidiodomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, é um fungo assexuado e dimórfico que depende, exclusivamente, de alterações da temperatura e/ou nutrientes para a expressão de sua morfologia. Suas estruturas são caracterizadas pela forma de leveduras nos tecidos do hospedeiro ou em culturas *in vitro*, a 33-37°C, ou pela forma micelial que vive no solo, água e em plantas, à temperatura ambiente, 22-28°C, sendo considerada a forma infectante (SAN BLAS & SAN BLAS, 1985; 1994; PARIS *et al.*, 1985). A conversão da forma micelial à leveduriforme reflete um efeito adaptativo para o aumento de resistência do microorganismo necessário para a sobrevivência do parasita no hospedeiro mamífero (DA SILVA *et al.*, 1994).

A infecção do hospedeiro humano ocorre comumente pela via respiratória, quando propágulos do fungo alcançam os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares (RESTREPO *et al.*, 1986; DOMER *et al.*, 1992; MONTENEGRO & FRANCO, 1994). Assim, o estabelecimento da doença, com lesões primárias mais freqüentes nos pulmões, marca a transformação do fungo da forma miceliana saprofítica à forma de levedura (patogênica) a qual não se restringe às superfícies do organismo, causando lesões em tecidos conjuntivos e em vísceras (SAN BLAS & SAN BLAS, 1985). De fato, as lesões de pele são resultantes da disseminação hematogênica de *P. brasiliensis* inicialmente

instalado no pulmão (BICALHO *et al.*, 2001). Ademais, o comprometimento dos órgãos pode ou não estar acompanhado pela repercussão clínica, desde que foram detectadas lesões mediadas pela PCM apenas por meio de necrópsias em diversos tecidos, tais como vasos, coração, sistema nervoso central, timo, baço, medula óssea e músculo estriado (DEL NEGRO, 1982).

Considera-se que as manifestações clínicas da PCM provêm da progressão de lesões primárias, pela reativação de focos quiescentes após um período de latência (reativação endógena) pela re-infecção exógena após prévia exposição ao agente infeccioso (MONTENEGRO & FRANCO, 1994). Uma vez estabelecida e, dependendo dos fatores relacionados ao hospedeiro (ROBLEDO *et al.*, 1982) e ao fungo (SAN BLAS & SAN BLAS, 1977), a PCM-infecção pode regredir com a destruição do parasita ou regredir com a persistência de fungos viáveis e a formação de focos quiescentes ou latentes. Ainda, pode ocorrer a progressão da PCM, que permitirá a proliferação e disseminação do fungo, desenvolvendo-se lesões ativas associadas a sinais e sintomas que são reunidos em dois padrões principais, que definem as formas agudas (incluindo a subaguda) e crônica (FRANCO *et al.*, 1987; MONTENEGRO & FRANCO, 1994).

Na forma aguda, a doença é comumente caracterizada pela rápida progressão, gravidade e tendência à disseminação linfática e hematogênica com grande quantidade de fungos originando lesões secundárias e viscerais, principalmente no baço, fígado e medula óssea. Nessa forma clínica da doença, as lesões cutâneas são relativamente comuns, encontrando-se ainda lesões na mucosa oral, ósseas e outras menos freqüentes. O acometimento pulmonar é raro, apenas em 5-11% dos pacientes (FRANCO *et al.*, 1987; MENDES, 1994; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Na forma crônica, o comprometimento pulmonar, da mucosa orofaríngea e das vias respiratórias caracteriza as manifestações clínicas da doença. Os pacientes com imunidade menos deficitária apresentam doença geralmente menos grave, com lesões localizadas ou que envolvem mais de um órgão ou sistema e são caracterizadas pela tendência à formação de granulomas epitelióides

bem definidos, onde fungos estão contidos (FRANCO *et al.*, 1993; MENDES, 1997; 1994). Essa forma clínica parece ser uma consequência da reativação de focos primários quiescentes após um período de latência de *P. brasiliensis* (PERAÇOLI *et al.*, 1982; MENDES, 1994).

Assim como em diversas doenças infecciosas e parasitárias, na PCM ocorre uma dinâmica interação entre parasita e hospedeiro. Nessa influência mútua, fungo-hospedeiro, há o envolvimento das propriedades do agente infeccioso que favorecem sua implantação e ocasionam o comprometimento do hospedeiro e, por outro lado, os mecanismos de defesa do hospedeiro que se opõe a esses processos. A virulência do agente infeccioso, envolvendo suas características físicas e químicas, a quantidade e o número de contatos fungo-hospedeiro influenciam e exercem um papel relevante nos eventos iniciais deste processo (PERAÇOLI & SOARES, 1992; SAN BLAS, 1993).

Nessa interação, que leva à geração de complexos fenômenos inflamatórios e imunológicos, diferentes populações celulares estão envolvidas e são ativadas no sentido de desempenharem papel efetor direto contra o parasita ou de participarem dos mecanismos imunoregulatórios desencadeadores após o hospedeiro ser infectado (PERAÇOLI & SOARES, 1992). Dados obtidos de estudos clínicos de pacientes com PCM assim como os estudos com animais de experimentação demonstram que mecanismos da imunidade inata e da imunidade adquirida são importantes para o controle desta infecção fúngica (MUSSATI *et al.*, 1994; PERAÇOLI, 2000)

Células fagocíticas, a exemplo do que ocorre na maioria das doenças infecciosas, estão envolvidas na resposta imune inata a *P. brasiliensis*. O fungo, seus componentes metabólicos e somáticos, assim como os constituintes de parede celular são capazes de ativar o sistema complemento e induzir a quimiotaxia de neutrófilos, participando da imunidade inata durante a PCM (CALICH *et al.*, 1979; CROTT *et al.*, 1993; PINA *et al.*, 2006). De fato, tais células estão presentes nos sítios inflamatórios durante estágios iniciais da doença bem como nos granulomas desenvolvidos em humanos e animais de experimentação (FRANCO & MONTENEGRO, 1994; GONZALEZ *et al.*,

2003). Tanto leucócitos polimorfonucleares humanos quanto murinos, além de induzirem a constante migração de fagócitos através da liberação de fatores quimioatraentes no microambiente inflamatório, são ativados por citocinas como TNF- $\alpha$ , induzida por constituintes polissacárides da parede celular fúngica (FIGUEIREDO *et al.*, 1993), IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-1 $\beta$  e exercem uma atividade fungicida e fungistática sobre as leveduras de *P. brasiliensis*, podendo desempenhar papel crítico na resistência do hospedeiro na fase inicial da infecção (KURITA *et al.*, 1999; 2000; 2005).

Nesse contexto, vários estudos vêm demonstrando com ênfase à participação do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no desenvolvimento de uma resposta imune protetora à infecção experimental por *P. brasiliensis* (CANO *et al.*, 1998; SOUTO *et al.*, 2000, CALVI *et al.*, 2003; 2003). Calvi *et al.* (2003) primeiramente demonstraram que monócitos do sangue periférico assim como células do lavado broncoalveolar (predominantemente macrófagos) de pacientes com PCM liberam altos níveis de TNF- $\alpha$ , importante em potencializar as ações fungicidas ou fungistáticas contra *P. brasiliensis*. Ainda, esses parâmetros de ativação dos macrófagos estão elevados quando as células foram ativadas com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , confirmando a importância do sinergismo de tais citocinas na doença humana.

Entretanto, a persistente interação de antígenos fúngicos com o sistema imune do hospedeiro pode induzir distúrbios imunoregulatorios relacionados à supressão da atividade fungicida de células fagocitárias (PERAÇOLI, 2000). Assim, componentes fúngicos, tais como  $\alpha$ -glucana presente na parede celular de *P. brasiliensis*, favorecem a permanência do fungo perante aos mecanismos de defesa do hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento da doença (KUROKAWA *et al.*, 1998). A inibição na produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a indução de citocinas com atividade supressora por células presentes no microambiente, são relevantes na regulação da fase inicial da infecção e um fator preponderante no estabelecimento e contenção do fungo. Cabe salientar, que não somente na infecção por *P. brasiliensis*, mas também em diversas infecções fúngicas,

parasitárias, virais e em processos patológicos que levam ao desequilíbrio homeostático do sistema imune, os mecanismos regulatórios são primordiais no sentido de evitar uma resposta exacerbada e dano tecidual.

Embora no hospedeiro humano haja uma complexidade de mecanismos moduladores e de fatores externos que interferem com o estabelecimento e desenvolvimento da PCM, estudos, já bem definidos em modelos experimentais, têm mostrado uma correlação entre o padrão da resposta imune celular, Th1, com uma menor gravidade da doença (ROBLEDO *et al.*, 1982; CANO *et al.*, 1998; KASHINO *et al.*, 2000; SOUTO *et al.*, 2000; PINA *et al.*, 2004). Deste modo, uma resposta imune mediada por células exerce um papel relevante para o bom prognóstico da PCM, levando muitas vezes à eliminação do agente infeccioso (ROBLEDO *et al.*, 1982). Em contrapartida, alterações imunológicas em indivíduos infectados, como a depressão generalizada da resposta imune celular acompanhada pela hiper-reatividade da resposta imune humoral caracterizam justamente a forma mais grave da doença que pode resultar na multiplicação do fungo (MOTA *et al.*, 1985; MUSSATTI *et al.*, 1994, BENARD *et al.*, 1996). Portanto, há uma correlação entre a gravidade da forma clínica e o nível de imunossupressão na PCM (MOTA *et al.*, 1985).

De fato, pacientes com uma forma disseminada, quando comparado àqueles com a forma moderada da doença, apresentam altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TGF- $\beta$  assim como a produção de anticorpos, IgE e IgG4, acompanhado de baixos níveis de IFN- $\gamma$  (BENARD *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; BAIDA *et al.*, 1999; MAMONI *et al.*, 2002; 2005). De forma contrária, uma resposta típica do padrão Th1, com predomínio da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 é observada em indivíduos saudáveis que vivem em áreas endêmicas e não desenvolvem a doença, apesar de apresentarem reatividade aos antígenos de *P. brasiliensis*, quando submetidos ao teste da reação de hipersensibilidade do tipo tardia (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Essa heterogeneidade de apresentação da PCM não se limita à forma sistêmica, mas nas lesões induzidas pela presença de *P. brasiliensis*. Pagliari e Sotto (2003) mostraram que a presença de células produtoras de IFN- $\gamma$  é predominante nas lesões de pele que apresentam granulomas definidos, contudo nas lesões com granulomas frouxos assim como aquelas com granulomas de ambos tipos (frouxos e definidos), a presença de células produtoras de IL-4 e IL-10 é predominante.

Embora exista uma expressiva correlação entre a gravidade da PCM e o nível de resposta imune celular do hospedeiro, pacientes com essa doença freqüentemente apresentam uma depressão da resposta proliferativa de seus linfócitos frente a mitógenos assim como a vários antígenos incluindo antígenos provindos de *P. brasiliensis* (BENARD *et al.*, 1996; 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2002; CAMPANELLI *et al.*, 2003). Ainda que não completamente esclarecidos, têm-se avaliado alguns parâmetros imunológicos que podem indicar os mecanismos envolvidos em distúrbios imunonreguladores durante a progressão desta micose, tais como: a produção de óxido nítrico (BOCCA *et al.*, 1998; SOUTO *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2002), baixa produção de IL-2 (REZKALLAH-IWASO *et al.*, 1992) e IL-12p70 (ROMANO *et al.*, 2002), distúrbios na produção de citocinas por células T (BENARD *et al.*, 2001), a presença de imunocomplexos circulantes (ARANGO *et al.*, 1982), aumento da sinalização inibitória via CTLA-4, assim como o aumento da apoptose em células recém-isoladas ou cultivadas com antígenos de *P. brasiliensis* (CACERE *et al.*, 2002; CAMPANELLI *et al.*, 2003).

Além desses fatores acima descritos, altos níveis séricos e expressão de TGF- $\beta$  em amostras de pacientes com PCM (MAMONI *et al.*, 2002, 2005) também estariam relacionados com esse quadro de imunossupressão. TGF- $\beta$  também está presente no sobrenadante de culturas de PBMC e de monócitos de pacientes infectados quando comparado às células de indivíduos saudáveis (CAMPANELLI, 2003; PERAÇOLI, 2000). Assim como TGF- $\beta$ , IL-10 encontra-se no tecido cutâneo de lesões induzidas por *P. brasiliensis* e em PBMC de pacientes infectados (BENARD *et al.*,

2001; CAMPANELLI, 2003; PAGLIARI & SOTTO, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2002, MAMONI *et al.*, 2005), ainda, essa citocina está envolvida com a baixa produção de IFN- $\gamma$  e IL-12p70 observada durante a PCM humana (ROMANO *et al.*, 2002; 2005). A presença destas citocinas é descrita por modular a função das células apresentadoras de antígenos e/ou inibir a produção de citocinas, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , por células Th1 através do contato entre célula efetora e célula reguladora (Treg) (SHEVACH, 2002; BELKAID *et al.*, 2002).

A sinalização inibitória via CTLA-4 está envolvida com a modulação da resposta imune dos pacientes infectados com *P. brasiliensis*. Campanelli *et al.* (2003) elegantemente mostraram que a ausência de resposta de células T não está associada ao desequilíbrio na produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10) ou ausência na expressão de CD28, no entanto, uma alta frequência dessas células, recém isoladas ou cultivadas com antígenos fúngicos, expressam CTLA-4, fosfatidil serina (Anexin V), moléculas ligantes de indutores de morte celular por apoptose, FAS (FAS-L) e secretam TGF- $\beta$ . A adição de anticorpos neutralizantes anti-FasL e anti-CTLA-4 resulta em um aumento na produção de IFN- $\gamma$  por células T cultivadas com antígenos do fungo. Além disso, o bloqueio de ambas moléculas simultaneamente, mas não de TGF- $\beta$ , leva a um significativo aumento da proliferação celular.

Em conjunto, os dados acima sugerem claramente a participação de outros mecanismos supressores envolvidos no desenvolvimento e estabelecimento da PCM humana. Embora haja controvérsias com relação aos fatores envolvidos na função efetora de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais (Tregs), a função e homeostasia dessas células está relacionada com a expressão constitutiva de CTLA-4 e de fatores solúveis como TGF- $\beta$  e IL-10. Ainda, tais células têm sido descritas estarem envolvidas no estabelecimento de infecções crônicas (MILLS, 2004; BELKAID & ROUSE, 2005), reforçando a suposição de que células Tregs estão presentes nas lesões

de indivíduos infectados por *P. brasiliensis* e contribuem, sobremaneira, para a persistência dos mesmos.

A hipótese de que uma sub-população de células T induzida naturalmente e capaz de suprimir os efeitos de uma resposta auto-imune foi primeiramente proposta por Gershon em 1975. A concepção da existência dessas células foi através de estudos que identificaram uma sub-população de células T CD4<sup>+</sup> periféricas que desempenham um papel essencial na regulação das respostas imunes. Anos mais tarde, em 1995, Sakaguchi *et al.* mostraram que tais células co-expressam de maneira constitutiva e a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25), e só recentemente uma população com propriedades fenotípicas e funcionais semelhantes foi observada no sangue periférico de humanos (JONULEIT *et al.*, 2001; DIECKMANN *et al.*, 2001; NG *et al.*, 2001; LEVINGS *et al.*, 2001). A eliminação ou inativação destas células resulta no desenvolvimento de doenças auto-imunes, tais como gastrites, diabetes mellitus dependente de insulina, colites e artrites, e acentua a resposta imune contra aloantígenos, alérgenos e tumores (SAKAGUSHI *et al.*, 1995; ITOH *et al.*, 1999; SHEVACH, 2000; 2002; SAKAGUCHI *et al.*, 2001).

As células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais constituem uma população homogênea derivada do timo (SURI-PAYER *et al.*, 1998), inicialmente descritas serem inertes a estimulação via TCR, mas necessitam da ativação via este receptor para se tornarem ativas e exercerem sua função (THORNTON & SHEVACH, 1998; SHEVACH, 2002). Uma vez ativadas, pressupõe-se que sua função reguladora seja dependente do contato célula-célula e/ou fatores solúveis como TGF- $\beta$  e IL-10 e exerçam essa propriedade de maneira antígeno inespecífica (THORNTON & SHEVACH, 2000; NG *et al.*, 2001; SHEVACH, 2002; DIECKMANN *et al.*, 2002; LEVINGS *et al.*, 2002), embora cresçam evidências de regulação antígeno específica mediada por Tregs naturais (TANCHOT *et al.*, 2004; NISHIMURA *et al.*, 2004; BELKAID & ROUSE, 2005; SUFFIA *et al.*, 2006).

As citocinas que compartilham o receptor  $\gamma$ , tais como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, são necessárias ao desenvolvimento tímico das Tregs, sendo a IL-2 essencial para sobrevivência/manutenção delas nos sítios periféricos (MALOY & POWRIE, 2005). Assim, a presença de IL-2 secretada por células T convencionais é necessária para a função e sobrevivência das Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, que por sua vez são capazes de suprimir a ativação de células T efectoras/respondedoras (THORNTON & SHEVACH, 1998, SAKAGUSHI, 2005; MALOY & POWRIE, 2005; FEHÉRVARI *et al.*, 2006). Além da presença de IL-2, é suposto que a interação B7/CD28 é necessária para a homeostasia das Tregs, uma vez que o bloqueio de CD28 foi correlacionado à drástica redução da população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e a exacerbação da doença em NOD (TANG *et al.*, 2003).

Sabe-se que outros subtipos de células com função reguladora podem ser induzidos na periferia após o desenvolvimento de uma resposta imune. Essas células são diferenciadas a partir de células T convencionais, porém suas características fenotípicas diferenciam-se das Tregs naturais. As células T reguladoras tipo 1 (Tr1) são células provenientes de células T “naives” convencionais e, dependem, exclusivamente de IL-10, para sua diferenciação e função. Além das Tr1, as denominadas Th3, estão envolvidas nas respostas relacionadas à tolerância oral e exercem seu papel supressor através da secreção de TGF- $\beta$  (revisto por MILLS, 2004). Adicionalmente a estas populações já bem definidas, as Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais podem exercer sua função de modo indireto, induzindo a diferenciação de células T reguladoras antígeno-específica produtoras de IL-10 (MEKALA *et al.*, 2005). Visto que a presença das citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 é comum entre as sub-populações de Tregs, naturais e induzidas presentes nos sítios periféricos, a caracterização de marcadores fenotípicos é a ferramenta mais apropriada para distinguir tais populações.

Várias moléculas de superfície tais como CD103, CD62L, CD45RO (CD45RB<sup>low</sup> em camundongos), dentre outras como TGF- $\beta$  ancorado à membrana (revisto por NAKAMURA *et al.*,

2001; FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004; OSTROUKHOVA *et al.*, 2004), podem caracterizar as células Tregs naturais. A molécula CTLA-4 é expressa de maneira constitutiva nessa população de Tregs (TAKAHASHI *et al.*, 2000), diferentemente das células T convencionais onde é expressa de maneira estritamente regulada (LINSLEY *et al.*, 1992). Embora os mecanismos pelos quais as Tregs exercem sua função ainda resultam em controvérsias, parece pertinente não descartar a importância dos sinais que resultam da ligação desta molécula ao seu ligante, CD80 ou CD86 nas células apresentadoras de antígenos (APC) ou em células T convencionais, para a indução de sua atividade reguladora.

De fato, a população de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> apresenta forte atividade reguladora *in vitro* e o bloqueio de CTLA-4 reduz sua atividade em camundongos (MANZOTTI *et al.*, 2002; READ *et al.*, 2000; TAKAHASHI *et al.*, 2000; BIREBENT *et al.* 2004; TANG *et al.*, 2004). Contudo, alguns trabalhos mostraram que a ausência de CTLA-4, utilizando-se anticorpos bloqueadores, não impede a atividade das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> em humanos (JONULEIT *et al.*, 2001; LEVINGS *et al.*, 2001; DIECKMANN *et al.*, 2001; NG *et al.*, 2001; STEPHENS *et al.*, 2001) o mesmo sendo observado em camundongos deficientes desta molécula (TAKAHASHI *et al.*, 2000). Quanto à interação CTLA-4, CD80 e CD86 na superfície de células dendríticas, há ativação da enzima indoleamina 2.3-dioxigenase (IDO) que induz a secreção de metabólitos que resultam na supressão da resposta proliferativa e inibição da produção de citocinas por células T efectoras (MUNN *et al.*, 2004; BRUSKO *et al.*, 2005).

Dentre as moléculas presentes na superfície das Tregs, o receptor induzido por glicocorticóide (GITR), pertencente à família do TNFR, quando acoplado ao seu ligante, regula a produção de citocinas e a proliferação celular (RONCHETTI *et al.*, 2002). GITR é constitutivo em células T CD4<sup>+</sup> convencionais (T CD25<sup>-</sup>) em repouso e altamente expresso somente nas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Contudo, um aumento significativo na expressão de GITR pode ocorrer após ativação

das células T CD25<sup>-</sup> (SHIMIZU *et al.*, 2002; McHUGH *et al.*, 2002). Seu ligante, GITR-L, é expresso na superfície de APC e alguns subtipos de linfócitos B e, embora ainda em discussão, sugeriu-se ser também expresso em células T ativadas (TONE *et al.*, 2003). Quanto ao papel de GITR na função das Tregs, pesquisadores propuseram, em modelo murino, que o bloqueio da mesma impede a atividade reguladora *in vitro* e *in vivo* (SHIMIZU *et al.*, 2002). De forma contrária, foi demonstrado que a expressão de GITR poderia influenciar a hiporresponsividade de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e não somente sobre as Tregs (PICCIRILLO & THORNTON, 2004). Assim, os estudos relacionados às interações de GITR e seu ligante na supressão mediada pelas Tregs permanecem por serem esclarecidos.

É indubitável a importância de se identificar marcadores específicos presentes em células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais que facilitem a identificação e manipulação das mesmas. A expressão do gene *Foxp3*, o qual codifica um fator de transcrição pertencente à família FOX (do inglês “forkhead box”), é necessária no ambiente tímico durante o desenvolvimento e diferenciação da população de Tregs naturais (revisto por COFFER & BURGERING, 2004), contudo, o mecanismo molecular responsável pela regulação de sua expressão e função permanece por se esclarecido. A princípio, HORI *et al.* (2003) e FONTENOT *et al.* (2003) observaram que *Foxp3* não era expresso em células TCD4<sup>+</sup> diferenciadas, Th1 e Th2, caracterizando-o como um marcador altamente específico às Tregs naturais. Entretanto, atualmente é sabido que a expressão desse gene não se restringe somente a essa população celular (O’GARRA & VIEIRA, 2004), uma vez que células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, na presença de TGF-β, expressam *Foxp3* tornando-as funcionalmente similares às Tregs (CHEN *et al.*, 2003; HUBER *et al.*, 2004) impedindo o desenvolvimento de respostas auto-ímmunes e suprimindo a proliferação de células T (revisto por FONTENOT *et al.*, 2005). Cabe salientar que a expressão de *Foxp3* em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> é cerca de 100x menor que a expressão em Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais (revisto por COFFER & BURGERING, 2003).

Além da importância de se entender as características fenotípicas das Tregs, a migração das mesmas aos locais onde exercem seu efeito supressor sobre a resposta imune é outro relevante aspecto a ser compreendido. As Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foram identificadas nos tecidos linfóides, incluindo timo, baço e linfonodos assim como no sangue periférico. Recentes publicações sugerem que tais células, de fato, migram através dos tecidos linfóides e entram nos sítios inflamados, particularmente sob condições patológicas (revisito por HUEHN & HAMANN, 2005).

Tais células expressam os receptores de quimiocinas CCR4, CCR8 e CCR5 (IELLEM *et al.*, 2001; NG-CASHIN *et al.*, 2003; WYSOCKI, *et al.*, 2005). Lee *et al.* (2005) demonstraram que a tolerância ao alo-enxerto é dependente do recrutamento de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> mediado pelo receptor CCR4 e seu ligante CCL22. De forma similar, a migração das Tregs em direção ao sítio tumoral foi dependente da quimiocina CCL22 produzida por macrófagos locais (CURIEL *et al.*, 2004). Assim, a detecção de fatores quimiotáticos envolvidos no acúmulo de células Tregs nas lesões de pacientes infectados com *P. brasiliensis* é de suma importância.

Após a migração das Tregs aos sítios periféricos e, dependendo do microambiente ali presente, tais células exercem suas funções. Quanto ao papel de citocinas em mediar a função das células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, alguns estudos falharam em detectar a produção de IL-10 e TGF-β por células Tregs naturais humanas, enquanto outros, claramente demonstram a secreção destas citocinas em resposta a uma variedade de estímulos (THORNTON & SHEVACH, 1998; SAKAGUCHI, 2000; TAKAHASHI, *et al.*, 2000; ANNACKER *et al.*, 2001; SHEVACH, 2002). Embora haja controvérsias quanto ao envolvimento de fatores solúveis como mediadores da função supressora das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, a presença desses promovem a sobrevivência e retenção das Tregs nos sítios periféricos (HUBER *et al.*, 2004; BELKAID & ROUSE, 2005).

É claro o papel de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no controle e manutenção da homeostasia do sistema imune. Entretanto, contrário ao que se propunha inicialmente, a ação das Treg não se limita

apenas a antígenos próprios, podendo se estender a agentes infecciosos, contribuindo para persistência dos mesmos e o estabelecimento da infecção crônica. Assim, a ação das Tregs poderia limitar as lesões induzidas pela infecção, mas prolongar a sobrevivência do patógeno no hospedeiro (revisto por MILLS *et al.*, 2004, BELKAID & ROUSE, 2005). De fato, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais estão envolvidas em diversas infecções crônicas: na leishmaniose humana (CAMPANELLI *et al.*, 2006) e experimental (BELKAID *et al.*, 2002; JI *et al.*, 2005), na infecção por *Schistosoma mansoni* (MCKEE & PEARCE, 2004; HESSE *et al.*, 2004; BAUMAGART *et al.*, 2006), por *Plasmodium falciparum* (WALTHER *et al.*, 2005), em diversas infecções bacterianas e virais, como por exemplo, *Helicobacter pylori* (RAGHAVAN *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (GUYOT-REVOL *et al.*, 2006), HIV (ANDERSSON *et al.*, 2005), Hepatite C (BOYER *et al.*, 2004), respectivamente. Nas infecções fúngicas experimentais por *Candida sp.*, a presença de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> é descrita como responsável por suprimir uma exacerbada reação inflamatória no pulmão, contribuindo para persistência do parasita (MONTAGNOLI *et al.*, 2002). De forma interessante, dados do nosso laboratório mostraram que na infecção experimental por *P. brasiliensis* a presença das Tregs nos pulmões contribuem para a disseminação fúngica, uma vez que na ausência do receptor de quimiocina CCR5, os animais controlam eficientemente o crescimento fúngico e apresentam pequena quantidade de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> com características fenotípicas similares às Tregs (MOREIRA *et al.*, MS em preparação).

Desde que a amplitude da resposta imune é determinada pelo equilíbrio entre a estimulação de células efetoras e mecanismos reguladores, um melhor entendimento no que se concerne à presença, localização e função das Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no controle da ativação de células T durante as respostas imunes a diversos patógenos é de extrema relevância. De forma notável, o desequilíbrio no número e/ou função de tais células contribui para uma resposta inflamatória exacerbada seguida de

dano tecidual ou, na supressão dos mecanismos efetores da resposta imune resultando na reativação do foco latente ou crônico.

Estas evidências abrem novas perspectivas ao estudo do papel de células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> na PCM humana, assim como em outras doenças infecciosas de caráter crônico. A compreensão dos fatores que contribuem para a modulação da resposta imune durante a infecção humana por *P. brasiliensis* foi o que almejamos no presente estudo.

*Investigar a possível participação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladoras (Tregs) no controle da resposta imune observada durante a paracoccidiodomicose humana*

Detalhadamente nossos objetivos foram:

→Determinar os leucócitos presentes no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose.

→Caracterizar o fenótipo das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose quanto à expressão de marcadores de Tregs naturais.

→Isolar e caracterizar, quanto à sua função, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> obtidas de PBMC de pacientes infectados por *P. brasiliensis*.

→Caracterizar o infiltrado celular presente nas lesões, de pele e mucosa, causadas por *P. brasiliensis*.

→Pesquisar as possíveis quimiocinas envolvidas no acúmulo de células Treg nas lesões causadas por *P. brasiliensis*.

→Isolar e estudar a função das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes nas lesões de pacientes com paracoccidiodomicose.

### 1. Amostra populacional – identificação e seleção de pacientes e indivíduos controles sadios

Foram utilizadas amostras de sangue de pacientes com paracoccidiodomicose (PCM), os quais apresentavam diferentes quadros clínicos da doença. Dentre os 44 pacientes inseridos neste estudo, 25 deles foram submetidos à coleta de uma biópsia de pele ou mucosa no ambulatório e enfermaria de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Ribeirão Preto – USP pelo Prof. Dr. Roberto Martinêz, após análise criteriosa dos dados clínicos contidos no prontuário médico. A faixa etária dos pacientes variou dos 21 aos 71 anos, 41 deles eram do sexo masculino e 3 do sexo feminino. Com exceção de 2 pacientes, todos foram positivos na pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* na reação de imunoelctroforese confirmando-se a infecção fúngica, também confirmada por exame histopatológico ou por isolamento de *P. brasiliensis* em cultura. As biópsias das lesões foram analisadas no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas, àquelas em que não se detectou estruturas de *P. brasiliensis* não foram incluídas ao grupo de estudo. Ainda, pacientes em tratamento com antifúngicos ou que apresentaram co-infecções foram excluídos deste estudo.

Como indivíduos controles, normais, foram utilizadas amostras de sangue de 18 doadores de sangue do Hemocentro do HC de Ribeirão Preto. Amostras soro positivas para AIDS, hepatite B, hepatite C, Doença de Chagas, Sífilis e HTLV I e II foram excluídas do estudo. Dentre os indivíduos controle, 13 eram do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com idade variando dos 22 aos 35 anos. Como biópsias controle, foi utilizado tecido cutâneo de indivíduos submetidos à cirurgia plástica no HC da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Os pacientes foram esclarecidos com relação à coleta de sangue e biópsia e, após o consentimento dos mesmos a coleta de ambos foi realizada. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (processo HCRP #487/2001).

## 2. Estabelecimento da cultura de *P. brasiliensis* e obtenção dos antígenos utilizados como estímulo

A amostra 18 do fungo foi obtida no laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP-USP). As leveduras cultivadas em ágar Fava-Netto foram transferidas para novos frascos e mantidas em cultura por um período de 10 dias. Em seguida, as células fúngicas foram colhidas, lavadas em tampão fosfato estéril (PBS pH 7,2). Após centrifugação, as leveduras foram distribuídas em tubos “ependorf” de 1,5ml contendo 1ml de PBS e submetidas à agitação do “vortex” à temperatura ambiente por 30 segundos. A solução foi centrifugada a  $150 \times g$  por 10 min, o sobrenadante coletado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A dosagem protéica foi realizada utilizando-se kit comercial (ácido bicinônico, Pierce, Rockford, IL, USA). Durante a expansão das células T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  e T  $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$  isoladas do sangue de pacientes, utilizamos a concentração de  $10\mu\text{g/ml}$  desses antígenos de membrana e secretados (sPbAg).

## 3. Anticorpos

Neste estudo, foram utilizados anticorpos de camundongos conjugados à proteína clorofila-peridina (PercP) (FL3), ficoeritrina (PE) (FL2), isotiocianato de fluoresceína FITC (FL1) e purificados anti: CD3 (UCHT1, IgG<sub>1,k</sub>), CD28 (CD28.2, IgG<sub>1,k</sub>), CD4 (RPAT4, IgG<sub>1,k</sub>), CD8 (RPA-T8, IgG<sub>1,k</sub>), CD14 (M5E2, IgG<sub>2a,k</sub>), CD19 (HIB 19, IgG<sub>1,k</sub>), CD25 (M-A251, IgG<sub>1,k</sub>), CD11c (B-ly6, IgG<sub>1,k</sub>), CD1a (HI149, IgG<sub>1,k</sub>), CD152 (BNI3, IgG<sub>2a,k</sub>), CD45RO (UCHL1, IgG<sub>2a,k</sub>), CCR4 (1G1, IgG<sub>1,k</sub>), IL-10 (JES3–19F1, IgG<sub>2a</sub>), IFN- $\gamma$  (4S.B3, IgG<sub>1,k</sub>) e os adequados isotipos controle de camundongo e de rato (todos provenientes de BD PharMingen, San Diego, CA). Os anticorpos monoclonais anti-GITR/TNFRSF18 (110416, IgG<sub>1</sub>) and anti-CCR5 (CTC5, IgG<sub>1</sub>) conjugados a PE e os anticorpos biotinizados anti-TGF- $\beta$ 1 LAP (27240, IgG) e anti-TGF- $\beta$ 3 (4492, IgG<sub>1</sub>) foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN). O anticorpo anti-CD103 conjugado a PE (B-Ly7) e o

anticorpo policlonal anti-Foxp3 humano foram obtidos da eBioscience (San Diego, CA) e Abcam Inc (Cambridge, MA), respectivamente. Os anticorpos contra os ligantes de quimiocinas humanas (CCL17, CCL22) e Foxp-3 foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) e, Abcam Inc, respectivamente.

#### *4. Obtenção dos leucócitos humanos*

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas de indivíduos saudáveis ou de pacientes com paracoccidiodomicose. Após a coleta, o sangue foi diluído em igual volume de PBS, à temperatura ambiente. Essa mistura foi aplicada em gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 1.077g/ml, e centrifugada a 400 x g por 30 min, à temperatura ambiente. A interface obtida, contendo PBMC, foi coletada, centrifugada por 10 minutos a 150 x g e lavadas duas vezes. Após esse procedimento, o sedimento foi ressuspensão em 2 a 3 ml de meio RPMI-1640 (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e os leucócitos contados através da câmara de Neubauer. A concentração das células foi ajustada, seguida pela marcação com os anticorpos específicos para análise fenotípica por citometria de fluxo e/ou preparadas para purificação das sub-populações de células T.

#### *5. Isolamento dos leucócitos presentes das lesões mediadas por P. brasiliensis*

Após a coleta das biópsias provenientes das lesões de pele ou mucosa, o fragmento foi incubado durante 1h a 37°C em RPMI-1640, adicionado de antibióticos (100U/ml de penicilina, 100µg/ml de streptomina e 500µg/ml de gentamicina) e 50µg/ml of liberase CI enzyme blend (Boehringer Ingelheim Chemicals, Inc. Petersburg, VA). Após esse período, os fragmentos foram processados por 4 minutos, em uma solução de RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino

fetal contendo 0.05% DNase I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), utilizando Medimachine (BD Biosciences, San Jose, CA) de acordo com as instruções do fabricante. As células colhidas foram passadas através de um filtro especial, Filcon (BD Biosciences), com poro de 20- $\mu$ m, lavadas e a viabilidade celular determinada por exclusão do azul de tripan a 2%. As células foram contadas através da câmara de Neubauer, a concentração de células ajustada e, devido ao pouco rendimento as células foram distribuídas em placas de cultura para expansão (item 7), para análise fenotípica (item 9) ou para detecção de citocinas intracelulares (item 10). Cabe salientar que em alguns ensaios foi possível realizar a análise dos marcadores fenotípicos juntamente aos ensaios de co-cultura.

#### *6. Separação das sub-populações de células T obtidas do PBMC e das lesões*

Após a obtenção das células mononucleares recém isoladas do sangue periférico ou após expansão das células obtidas das lesões (item 7), as mesmas foram lavadas em PBS gelado acrescido de 0,5% de BSA e 3mM de EDTA e as sub-populações de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> separadas utilizando um kit comercial proveniente da Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Resumidamente, as células foram primeiramente marcadas com um “cocktail” de anticorpos monoclonais biotinizados contra tais moléculas humanas: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma/\delta$  e Glycoforina A (expresso em hemácias humanas) e, subseqüentemente a suspensão celular foi incubada com “micro-beads” cobertas com biotina. Após 15 minutos de incubação, as células foram lavadas, 300 x g por 10 minutos a 4-8°C e, a população CD4<sup>+</sup> foi separada magneticamente por MACS®-“sorting” através da seleção negativa em colunas adequadas ao número de células.

Em uma segunda etapa, as células T CD4<sup>+</sup> previamente selecionadas foram diretamente marcadas com “micro-beads” cobertas com anticorpos anti-CD25 e então obtida as sub-populações

de interesse. As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foram selecionadas positivamente através da separação com colunas MACS® adequadas ao número de células.

### 7. Expansão “*in vitro*”

Imediatamente após o isolamento as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> obtidas de PBMC foram distribuídas em placas de cultura de fundo em U e de 96 poços (Corning Corporation Corning, NY) e expandidas através da ativação policlonal mediada pelos poços cobertos com 0,5µg/ml do anticorpo monoclonal anti-CD3, 1µg/ml do anticorpo monoclonal anti-CD28 e 1µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) na presença ou ausência do sPbAg (10µg/ml). Todas as culturas foram realizadas em meio RPMI contendo 10% de soro bovino fetal adicionado de antibióticos, anti-fúngico (100U/ml e 100µg/ml de penicilina e streptomicina, respectivamente, 500µg/ml de gentamicina e 5,6µg/ml de anfotericina B) e 10ng/ml de citocina recombinante IL-2 humana (rhIL-2), à qual foi adicionada aos dias 2, 5 e 7 após a adição dos estímulos descritos acima. Na segunda semana de cultura, tais células foram re-estimuladas de maneira similar à primeira semana e, aos 15 dias após expansão, as células provindas de pacientes com PCM e de indivíduos saudáveis foram novamente separadas com colunas MACS® e então utilizadas em ensaios de co-cultura para verificar atividade funcional das mesmas frente à estimulação de células T alogeneicas mediada por PHA (1µg/ml). Decorridas 48h, avaliou-se a produção de citocinas através do kit CBA (item 10) e a resposta proliferativa medida por incorporação de timidina após 96h de cultura.

Após a separação (item 5), as células obtidas das biópsias de pacientes foram distribuídas em cultura, placa de fundo em U com 96 poços e, devido ao pequeno número de células obtidas das lesões, tais células foram previamente expandidas com PHA, anti-CD3, anti-CD28 e rhIL-2 como descrito acima. Após 15 dias, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foram selecionadas utilizando-se “micro-beads” como descrito no item 6 e então utilizadas no ensaios de co-cultura

### 8. Co-culturas e ensaio de proliferação celular

Culturas de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de PBMC ou de lesões de pacientes na presença de PBMC alogeneicas foram realizadas no intuito de verificar a propriedade reguladora/supressora de tais células sobre a proliferação não específica de células T convencionais. As culturas foram efetuadas em placa de fundo em U de 96 poços, numa concentração de 1x10<sup>6</sup> por ml (1x10<sup>5</sup> células/poço) de PBMC alogeneico. Tais células foram estimuladas com PHA (1μg/ml) na presença ou não de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (item 6 e 7), numa concentração previamente padronizada de 1x10<sup>5</sup>/ml (1x10<sup>4</sup> células/poço), resultando em uma proporção 1:10. Após um período de 96h em incubadora umidificada a 37°C, contendo 5% CO<sub>2</sub>, as culturas foram pulsadas com metil-H-timidina, na concentração de 0,5 μCi/poço (Amersham Biosciences Piscataway, NJ). Depois de 12 a 16 horas, a quantidade de timidina incorporada pelas células foi determinada utilizando-se um coletor de células (Cambridge Technology Inc, CA) e um contador β de cintilação líquida (Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA). Dados foram expressos como média de contagem por minuto (cpm±SEM) de culturas realizadas em triplicata e o índice de estimulação (IE) foi calculado pelos valores resultantes da proliferação celular na presença de PHA ou PHA + células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> dividido pela média dos valores resultantes da proliferação basal das células alogeneicas (somente incubadas com meio de cultura). Adicionalmente, a percentagem de inibição foi calculada baseando-se na proliferação do PBMC alogeneico, mediada por PHA, cultivado na ausência das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

### 9. Citometria de fluxo para análise fenotípica da expressão de moléculas de superfície

A análise da expressão de marcadores de superfície no intuito de caracterizar a população de células T, B, monócitos/macrófagos, células dendríticas, bem como a caracterização fenotípica da sub-populações de células T, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, foi realizada em células mononucleares do sangue periférico (obtidas de indivíduos normais ou infectados por *P. brasiliensis* como descrito no item 4) e em células provenientes de biópsias de pele e mucosa (item 5). As células foram lavadas e ressuspensas em 100µl de PBS adicionado de BSA a 1% e incubadas com soro de coelho normal diluído 2:10 (para evitar as ligações inespecíficas, por 30 minutos a 4°C) e, em seguida com 1,5µg de anticorpo monoclonal anti-CD3, CD25, CD11c conjugados a FITC, anti-CD8, anti-CD14, anti-CTLA-4, anti-GITR, anti-CD103, anti-CD45RO, anti-CCR5, anti-CCR4 conjugados a PE, anti-CD4 conjugado a PerCP e anti-LAP (TGF-β1) conjugado a biotina por 30 minutos. Adicionalmente, anticorpos não relacionados, de mesmo isotipo, conjugados a FITC, PE ou PerCP (todos obtidos da BD Pharmingen, San Diego, CA) foram utilizados. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS acrescido de BSA 1%, sendo centrifugadas a 250 x g por 10 minutos. Nas amostras incubadas com anticorpo anti-LAP (TGF-β1) biotilado foi utilizado streptoavidina conjugada a PE (Gibco-BRL) por 30 minutos, 4°C, no abrigo da luz. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas 2 vezes com PBS acrescido de BSA 1%, sendo centrifugadas a 250 x g por 10 minutos.

Após estes procedimentos, as amostras foram adquiridas em FACSort™ (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ) utilizando-se os canais de fluorescência 1 (FL1) para as moléculas conjugadas a FITC, 2 (FL2) para aquelas conjugadas a PE e 3 (FL3) para a molécula CD4 conjugada a PerCP. As análises foram realizadas usando o programa CELLQuest™ (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ) os quais permitem analisar todas as células

adquiridas (100000 por amostra proveniente de PBMC e 20000 por amostra proveniente das lesões) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou “gates”) selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade ou fluorescência (FL).

#### *10. Marcação intracelular para detecção de citocinas e de Foxp3*

A percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ou T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> positivas para citocinas, IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , ou para Foxp3 foi determinada por citometria de fluxo através de marcação intracelular. Para a detecção de citocinas, os leucócitos isolados das lesões de pacientes infectados (como descrito no item 5) foram ressuspensos em 100 $\mu$ l de PBS e, primeiramente, marcados com anticorpos anti-moléculas de superfície, CD25 e CD4, conjugados a FITC e PerCP, respectivamente, de acordo com o protocolo descrito no item 9. Após a incubação com os anticorpos, as células foram lavadas sucessivamente e permeabilizadas por 20 minutos em uma solução de permeabilização/fixação (fix/perm solution; BD PharMingen) de acordo com as instruções do fabricante. As células permeabilizadas foram lavadas com uma solução “Perm/Wash” (BD PharMingen) e, então incubadas com anticorpos específicos: anti-hIL-10, anti-hIFN- $\gamma$  conjugados a PE e o anti-TGF- $\beta$ 3 conjugado a biotina na diluição 5:100 por 30 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas com a solução de “Perm/Wash” e, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Após as lavagens com PBS contendo 1% de BSA, as amostras incubadas com o anti-TGF- $\beta$  biotinilado foram então incubadas com o complexo streptoavidina conjugada a PE (diluído 1/2000 em PBS), incubadas a 4°C durante 30 minutos, lavadas e, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Anticorpos não relacionados, de mesmo isotipo, conjugados a FITC, PE e PerCP (todos obtidos da BD Pharmingen, San Diego, CA) foram utilizados como controle. As amostras foram adquiridas em FACSsort™ (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ)

utilizando-se os canais de fluorescência 1 (FL1) para CD25, 2 (FL2) para as citocinas e 3 (FL3) para CD4. As análises foram realizadas usando o programa CELLQuest™ (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ) os quais permitem analisar todas as células adquiridas (20000 por amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou “gates”) selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade ou fluorescência (FL).

Os gráficos representam o número absoluto de células/biópsia ( $\times 10^4$ ) e a média da intensidade de expressão das citocinas analisadas dentro das sub-populações T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Os valores referentes ao número absoluto de células/biópsia foram calculados de acordo com os valores das percentagens obtidas por citometria de fluxo e o número de células contado na câmara de Neubauer.

Para a detecção de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ou T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> positivas para o fator de transcrição Foxp3 foi realizada de forma semelhante à detecção das citocinas com algumas modificações. O anticorpo policlonal purificado de coelho anti-Foxp3 foi utilizado na concentração de 4 $\mu$ g/ml. Posteriormente aos 30 minutos de incubação a 4°C, as células foram submetidas a lavagens sucessivas previamente à incubação com o anticorpo biotilado (diluído 1/1000 em PBS) de cabra anti-IgG de coelho proveniente da Vector Laboratories. O controle negativo para Foxp3 foi realizado através da substituição do anticorpo de interesse por PBS ou IgG não relacionada. Após novas lavagens, com uma solução de PBS adicionado de BSA a 3%, as células foram incubadas com o complexo streptoavidina conjugado a PE (Gibco BRL) diluídos 1/2000 em PBS. Após serem lavadas, as células foram analisadas por citometria de fluxo como descrito anteriormente.

### *11. Avaliação do padrão de citocinas no sobrenadante das co-culturas por citometria de fluxo*

A produção de citocinas presentes no sobrenadante das co-culturas de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de pacientes e PBMC alogeneicas foi avaliada utilizando-se o kit CBA para citocinas

humanas Th1/Th2 (BD™ Cytometric Bead Array) de acordo com as instruções indicadas pelo fabricante. O princípio desta técnica baseia-se em uma mistura de esferas de poliestileno, de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para citocinas humanas detectadas no canal FL3. A utilização de uma mistura de esferas permite a avaliação simultânea de diversas citocinas de interesse no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra.

O aparelho foi ajustado utilizando o BD FACSComp Software e o BD Calibrate Beads. Esse ajuste permite definir os parâmetros de tamanho e granulosidade adequados para o posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho versus granulosidade. Após a seleção das esferas, procedeu-se o ajuste da intensidade de fluorescência 3 para permitir a segregação das esferas policromáticas, apresentando diferentes intensidades de fluorescência em histogramas unidimensionais. Para cada tubo foram adquiridos 1800 eventos dentro da região selecionada R1 (300 eventos por citocina testada). Após a aquisição das amostras, a concentração de cada citocina presente nas amostras foi determinada através de um programa exclusivo (BD Cytometric Bead Array Software).

### *12. Reações de imunohistoquímica para detecção de quimiocinas e Foxp3*

O método escolhido para análise imunohistoquímica da expressão de quimiocinas (CCL17, CCL22), e do fator de transcrição Foxp3 em tecido cutâneo de pacientes com PCM como de biópsias controle foi o da imunoperoxidase, por meio da avidina-biotina-peroxidase.

A análise foi realizada sobre os cortes obtidos de biópsias de lesão cutânea provenientes de pacientes com PCM, as quais foram congeladas em meio OCT (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA) e mantidos no nitrogênio líquido (-146.9°C). A reação de imunohistoquímica iniciou-se com o descongelamento das lâminas contendo cortes de 5µm (armazendas a -70°C), à temperatura

ambiente, por 30 minutos. Em seguida, os cortes foram pós-fixados com acetona 100% a -20°C, por 10 minutos, e lavados em PBS 0,01M (pH 7,2). Todas as lavagens foram realizadas por três vezes consecutivas. A peroxidase endógena dos tecidos foi bloqueada, por meio da incubação dos cortes com água oxigenada a 3% em PBS, por 10 minutos. Posteriormente às lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com avidina a 0,01% por 15 minutos; em seguida, retirou-se o excesso de avidina e adicionou-se biotina a 0,1% por 15 minutos no intuito de bloquear a biotina endógena. Decorridos os minutos de incubação, os cortes foram lavados com PBS, por duas vezes, e incubados com soro de leite a 3% em água destilada (leite desnatado Mólico) por 20 minutos, a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, desta vez sem as lavagens, os cortes foram incubados com os anticorpos primários, em câmara úmida, à temperatura ambiente por 1 a 2h.

Os anticorpos monoclonais de cabra anti: CCL17, CCL22 e o anticorpo policlonal de coelho anti-Foxp3, ambos diluídos em PBS-saponina 0,01% na concentração 1/300 para as quimiocinas e 1/200 para Foxp3. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas e então incubadas, à temperatura ambiente por 45 minutos, aos anticorpos biotinizados anti-cabra e anti-coelho (1/600 em PBS) provenientes da Vector Laboratories. Depois de novas lavagens, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos, à temperatura ambiente.

Posterior às lavagens consecutivas com PBS, procedeu-se a revelação da reação utilizando-se o substrato revelador diaminobenzidina (Vector) em PBS, contendo 0,1% de água oxigenada 20 volumes. Decorridos 10 minutos, à temperatura ambiente, as reações foram interrompidas com água destilada e as lâminas contra coradas com Hematoxilina de Mayer por 2 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente, as lâminas foram imediatamente montadas em

meio de montagem apropriada. O controle negativo das reações foi realizado através da substituição dos anticorpos primários por PBS ou IgG não relacionada.

Paralelamente, alguns cortes obtidos de biópsias dos pacientes infectados por *P.brasiliensis* foram corados com Hematoxilina de Mayer para ilustrar o infiltrado inflamatório nessas lesões.

### *13. Imunofluorescência e análise por confocal*

As reações de imunofluorescência para a detecção de Foxp3 e TGF- $\beta$  em células CD25<sup>+</sup> foram realizadas em lesões de pele retirada por biópsia de pacientes com PCM. Os cortes provindos de material congelado foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina e fixados com acetona gelada por 1 minuto, já os cortes do material embebido em parafina foram previamente submetidos à recuperação antigênica utilizando-se tampão citrato. Em seguida, ambas lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente e os sítios inespecíficos bloqueados com PBS contendo BSA 1% por 90 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados os anticorpos primários anti-CD25 conjugados a FITC (diluídos 1:50 em PBS), ou anticorpos purificados anti-Foxp3 ou anti-TGF- $\beta$  (Santa Cruz) (diluídos 1:300 e 1:100, respectivamente, em PBS contendo 0,01% de saponina e adicionados 50 $\mu$ l sobre o corte). A reação foi incubada à temperatura ambiente durante 90 minutos e, em seguida, os cortes lavados dez vezes com PBS e então adicionado o anticorpo anti-cabra biotilado aos cortes que foram adicionados o anti-Foxp3 e anti-TGF- $\beta$ . Decorridos os minutos de incubação e lavagens, foi adicionado o conjugado Texas Red-Estreptoavidina (cor vermelha, Molecular Probes) diluído 1:1000 em PBS (50 $\mu$ l por corte), durante 30 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. Os cortes foram lavados por 10 vezes e adicionado uma solução DAPI, 100 $\mu$ M, que marca o DNA, 50 $\mu$ l por corte, por 5 minutos. O DAPI foi aspirado e os cortes lavados uma vez com PBS (somente nas lâminas para detecção do

TGF- $\beta$ ). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Leica) e as imagens processadas usando o “software” SlideBook (Intelligent Imaging Innovation, Inc. Denver, CO) que pertencem ao Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

### *15. Análise estatística*

As diferenças fenotípicas observadas nas análises por citometria de fluxo assim como as diferenças na média da resposta proliferativa obtida nos ensaios de incorporação com metil-H-timidina foram expressas como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste ANOVA seguido do teste de múltipla comparação Tukey's e o teste Mann-Whitney que compara 2 grupos individuais (INSTAT software, GraphPad, San Diego, CA, USA), como indicado na legendas das figuras. Todos os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### *1. Caracterização fenotípica de PBMC de pacientes com PCM*

Após a separação das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose e de indivíduos saudáveis, as mesmas foram analisadas quanto ao fenótipo relacionado à população de linfócitos T e B (“gate” R1) assim como a população de monócitos e células dendríticas (“gate” R2). As populações foram primeiramente selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) (Figura 1A) e, posteriormente, analisadas quanto à expressão de moléculas de superfície presentes nas populações em R1 e R2. Nossos resultados mostraram que a frequência de células CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, e CD14<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes com PCM foi similar quando comparada aos indivíduos saudáveis. Contudo, um significativo aumento na porcentagem de células CD11c<sup>+</sup>CD1a foi observado no sangue dos pacientes (p<0,05) (Figure 1B).

A proporção de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> recém isoladas do sangue periférico de pacientes foi de 35,0±2,6% do total, sendo que 3,5±0,4% co-expressaram o receptor de IL-2 (CD25) (Figura 1B). Nessa população, 1,1% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> co-expressaram altos níveis de CD25 (variando de 0,2 a 3,4%) e representa 23,9% das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Figura 1B e inserto). Valores similares foram encontrados na população de células T CD4<sup>+</sup> do sangue de indivíduos saudáveis, sendo que 1,2 a 6,9% co-expressaram CD25 e 0,1 a 2,8% eram CD25<sup>high</sup> (Figura 1B e inserto).

### *2. Caracterização do fenótipo das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> presentes no sangue periférico de pacientes com PCM*

Desde que a expressão de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> não se limita à população de células Tregs e não exclui a possibilidade de pertencerem à população de células T ativadas, avaliamos a expressão de moléculas características de células Tregs naturais.

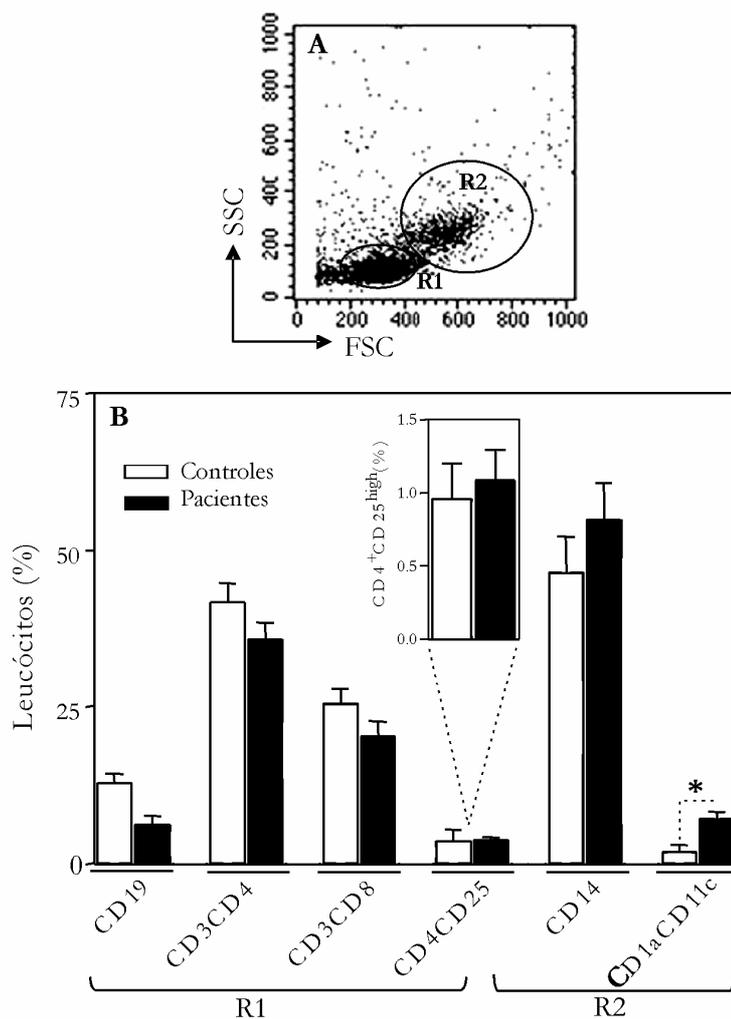


Figura 1. Caracterização fenotípica das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com PCM. PBMC recém isolado de pacientes (barras preenchidas,  $n=31$ ) e de indivíduos controles (barras abertas,  $n=12$ ) foram caracterizadas por citometria de fluxo. Em **A**, são mostradas as populações R1 e R2 que foram selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Em **B**, as barras representam a média  $\pm$  SEM da porcentagem de leucócitos CD19<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que determinam a população de linfócitos T e B, CD14<sup>+</sup> e CD1a<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> que determinam as populações de monócitos e células dendríticas, respectivamente. A inserção em **B** mostra a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> expressando altos níveis de CD25 (CD25<sup>high</sup>). \* $p<0.05$ , significativo em relação à porcentagem de leucócitos provenientes de indivíduos controles.

A percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando CD103, CD45RO e os receptores de quimiocinas, CCR4 e CCR5 foi similar entre os pacientes e indivíduos saudáveis. Entretanto, em PBMC de pacientes com PCM, a população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando CTLA-4 (19,3±5,0%), GITR (25,0±8,0), Foxp3 (7,8±1,4%) e LAP (57,8±11,2%) foi significativamente maior que nos controles [2,6±0,9% para CTLA-4 (p<0,001), 6,1±2,9% para GITR (p<0,05), 1,9±1,1% para Foxp3 (p<0,01) e 19,7±5,5% para LAP (p<0,05)] (Figura 2B). De acordo com a média de intensidade de fluorescência (MIF), verificamos que as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de pacientes expressaram altos níveis de CTLA-4 (82,5±14,2) e de LAP (60,1±12,6) quando comparados às células de indivíduos controles (30,1±3,9 e 19,4±2,8; respectivamente) (p<0,05).

Em adição à análise fenotípica da sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, avaliamos a sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Figura 2C). A percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> co-expressando CTLA-4 (1,2±0,5%), GITR (1,2±0,4%), CD103 (2,0±0,7%), CD45RO (43,6±0,4%), CCR4 (19,9±2,0%), CCR5 (1,6±0,4%), Foxp3 (1,4±0,9%) ou LAP (8,9±4,5%) foi significativamente menor (p<0,001) nessa sub-população quando comparada à sub-população de células T CD4<sup>+</sup> que co-expressa CD25. Cabe salientar que uma pequena quantidade das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> co-expressaram CD45RO e CCR4, marcadores que caracterizam células T de memória (OSWALD-RICHTER *et al.*, 2004). Ainda, a análise desses resultados revelou que não houve diferenças quanto ao fenótipo das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de pacientes e indivíduos controles (Figura 2C).

### 3. Caracterização fenotípica das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> presentes no sangue periférico de pacientes com PCM

As Tregs naturais, com forte atividade reguladora, são também caracterizadas pela alta expressão de CD25 (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001; 2005). Nesse contexto, analisamos a expressão

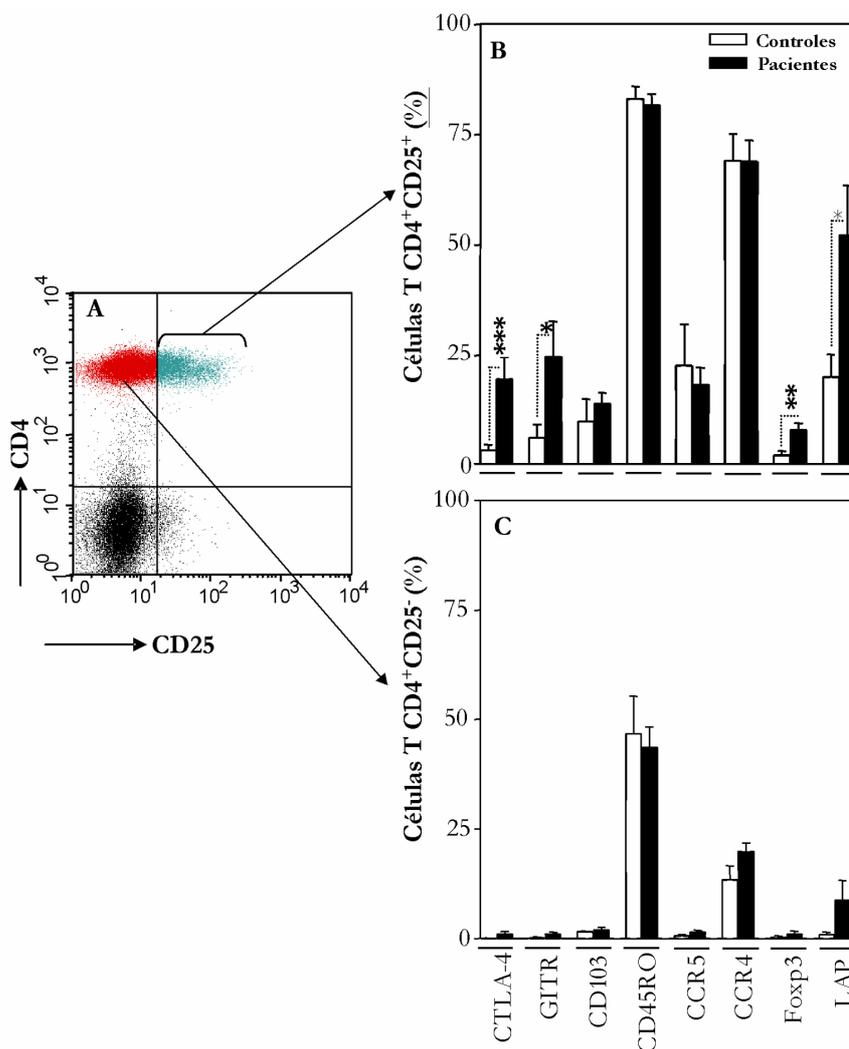


Figura 2. Caracterização fenotípica das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> do sangue periférico de pacientes com PCM. PBMC recém isolado de pacientes (barras preenchidas, n=34) e de indivíduos controles (barras abertas, n=18) foram caracterizadas por citometria de fluxo. A população de células de interesse foi selecionada primeiramente de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) e, em seguida, selecionada as sub-populações CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. Ambas sub-populações de um paciente está representada na forma de “dot plot” como mostrado em A. As barras representam a média ± SEM da percentagem das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (B), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (C) que co-expressaram CTLA-4, GITR, CD103, CD45RO, CCR5, CCR4, Foxp3 ou LAP. \*\*\*: p<0.001, \*\*: p<0.01 e \*: p<0.05 quando comparado com a expressão dos antígenos em leucócitos de indivíduos controles.

de CTLA-4, GITR, CD103, CD45RO, CCR5, CCR4, Foxp3 e TGF- $\beta$  de membrana na sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. A percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> expressando CTLA-4 (49,7 $\pm$ 9,9%) e Foxp3 (63,9 $\pm$ 10,4%) no sangue de pacientes foi maior ( $p < 0,05$ ) quando comparada às células de indivíduos controles (14,9 $\pm$ 9,3 e 14,2 $\pm$ 6,7%, respectivamente) (Figura 3B). Curiosamente, quando comparamos as sub-populações de células T, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, observamos um aumento significativo na frequência de células CD25<sup>high</sup> dos pacientes co-expressando CTLA-4 e Foxp3 ( $p < 0,001$  para ambas moléculas).

Quanto à intensidade de expressão de tais marcadores de Tregs, ela foi similar em pacientes e controles, exceto para a expressão de Foxp3 que foi significativamente maior nas células de pacientes (77,2 $\pm$ 18,3) quando comparada à expressão de 14,21 $\pm$ 6,7 nas células de indivíduos controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 3C).

#### *4. Caracterização funcional das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas do PBMC de pacientes com PCM*

Detectou-se uma maior percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando CTLA-4, GITR, Foxp3 e TGF- $\beta$  de membrana no sangue periférico de pacientes com PCM quando comparada às células dos controles (Figura 2B). De acordo com várias evidências na literatura, há uma correlação entre a expressão dessas moléculas e a capacidade reguladora/supressora de células Tregs naturais (FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004; BOEHMER, 2005). Desta forma, nossa próxima etapa foi avaliar a atividade funcional da suposta população de Tregs identificada no sangue de pacientes com PCM frente à estimulação policlonal com células T alogeneicas.

Para tal, as sub-populações de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de pacientes e indivíduos saudáveis foram cultivadas na razão de 1 para 10 células alogeneicas (1:10) na presença de PHA. Os resultados mostraram que as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de pacientes com PCM apresentaram

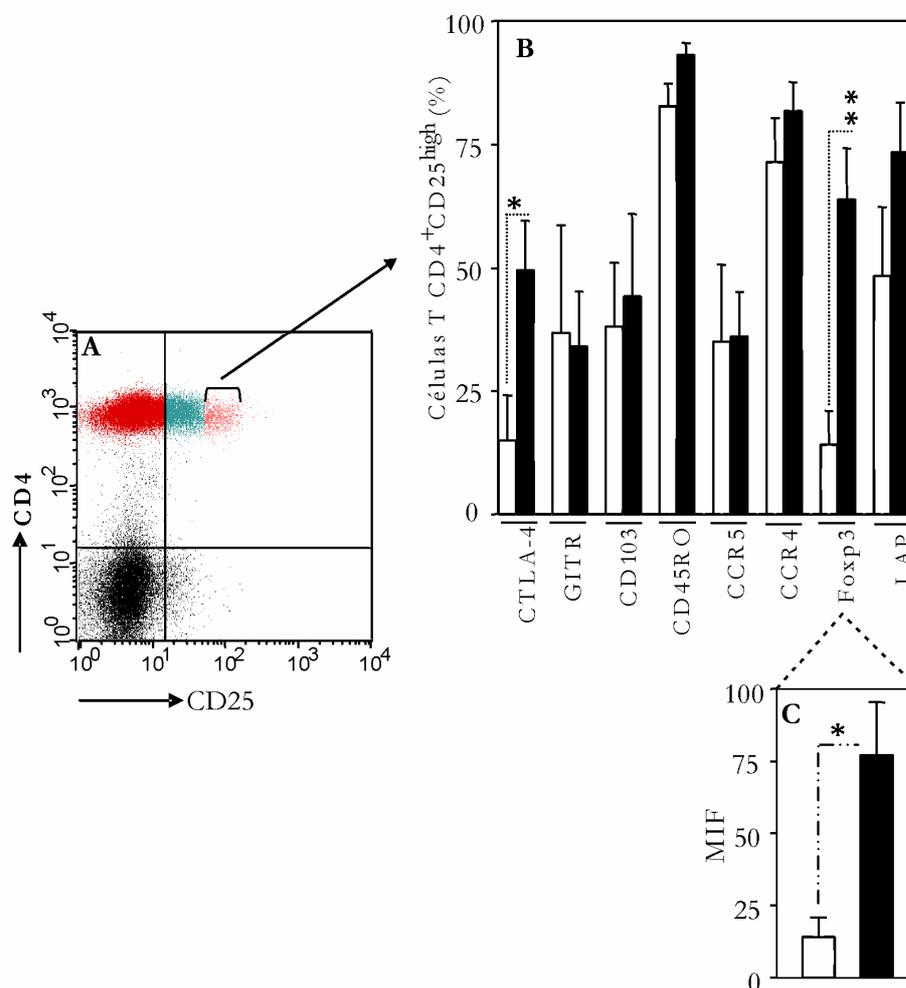


Figura 3. Caracterização fenotípica das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> do sangue periférico de pacientes com PCM. PBMC recém isolado de pacientes (barras preenchidas, n=34) e de indivíduos controles (barras abertas, n=18) foram caracterizadas por citometria de fluxo. A população de células de interesse foi selecionada primeiramente de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) e, em seguida, selecionada a população de células T CD4<sup>+</sup> expressando altos níveis de CD25<sup>+</sup>. A população analisada de um paciente está representada na forma de “dot plot” como mostrado em **A**. **(B)** As barras representam a média ± SEM da porcentagem das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> que co-expressaram CTLA-4, GITR, CD103, CD45RO, CCR5, CCR4, Foxp3 ou LAP. **(C)** As barras representam a média ± SEM da intensidade de fluorescência de Foxp3 na população T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. \*\*p<0.01 e \*p<0.05 quando comparado com a expressão dos antígenos em leucócitos de indivíduos controles.

atividade supressora e foram capazes de inibir  $94,0 \pm 0,6\%$  da proliferação de células alogeneicas ( $p < 0,001$ ). Diferentemente, embora as células T  $CD4^+CD25^+$  isoladas de indivíduos controles também inibiram a resposta proliferativa ( $67,5 \pm 2,0\%$ ,  $p < 0,01$ ), esta inibição foi 28% menor que àquela observada com as células T  $CD4^+CD25^+$  de pacientes (Figura 4). A presença dos antígenos de *P. brasiliensis* (sPbAg) durante a expansão de tais células não interferiu na sua capacidade de inibir a resposta proliferativa (Figura 4). Como esperado, as células T  $CD4^+CD25^+$ , de pacientes e indivíduos controles, não teve efeito sobre a proliferação das células T alogeneicas estimuladas com PHA (Figura 4).

Uma vez observada a capacidade supressora das células T  $CD4^+CD25^+$  isoladas do sangue periférico de pacientes com PCM, pesquisamos o potencial dessas células em inibir a produção de citocinas do perfil Th1, como IFN- $\gamma$  (JONULEIT *et al.*, 2001) e TNF- $\alpha$ . Para tal, os sobrenadantes das co-culturas com as células T  $CD4^+CD25^+$  de pacientes e leucócitos alogeneicos foram coletados e a concentração de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-2 determinada por citometria de fluxo. A ativação das células alogeneicas com PHA, como esperado, resultou em produção significativa ( $p < 0,05$ ) de IFN- $\gamma$  ( $4968,3 \pm 1718,4$  pg/ml) (Figura 5A), TNF- $\alpha$  ( $224,1 \pm 91,1$  pg/ml) (Figura 5B) e IL-10 ( $112,13 \pm 97,7$  pg/ml) (Figura 5C) quando comparado com a concentração de citocinas no sobrenadante das células alogeneicas cultivadas somente com meio ( $491,9 \pm 399,3$ ;  $42,6 \pm 33,3$  e  $6,8 \pm 3,7$  pg/ml, respectivamente).

A presença das células T  $CD4^+CD25^+$  isoladas de pacientes com PCM inibiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de IFN- $\gamma$  ( $247,6 \pm 185,7$  pg/ml) (Figura 5A) e TNF- $\alpha$  ( $19,4 \pm 25,7$  pg/ml) (Figura 5B), mas não de IL-10 ( $57,4 \pm 22,4$  pg/ml) (Figura 5C). Observamos que a presença dos antígenos de *P. brasiliensis*, sPbAg, durante a expansão das células T  $CD4^+CD25^+$  não alterou o efeito dessas células na produção de IFN- $\gamma$  ( $213,9 \pm 194,1$  pg/ml), TNF- $\alpha$  ( $20,8 \pm 14,7$

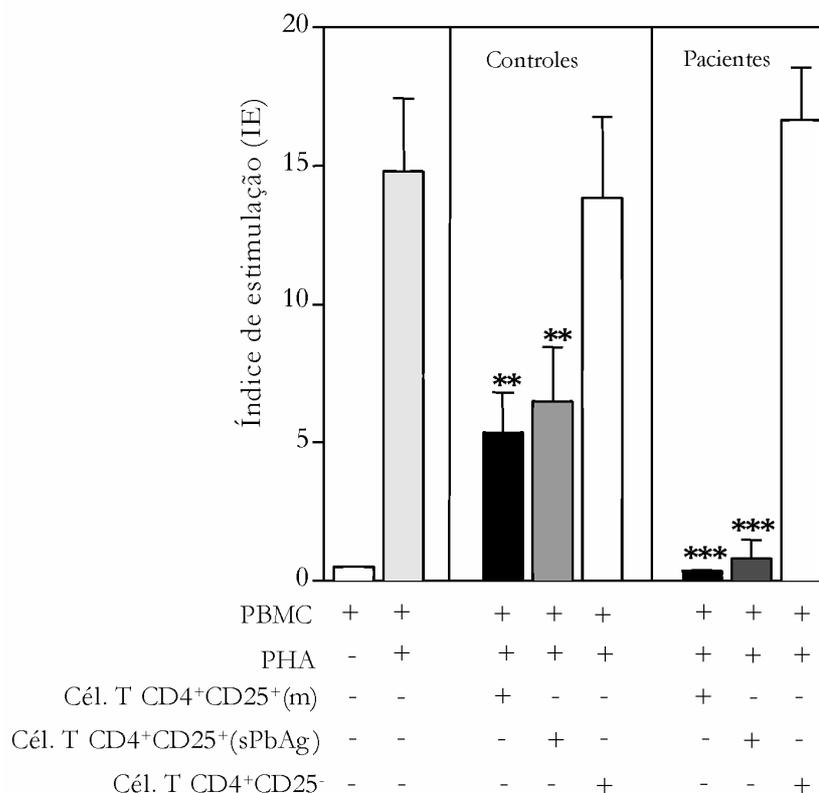
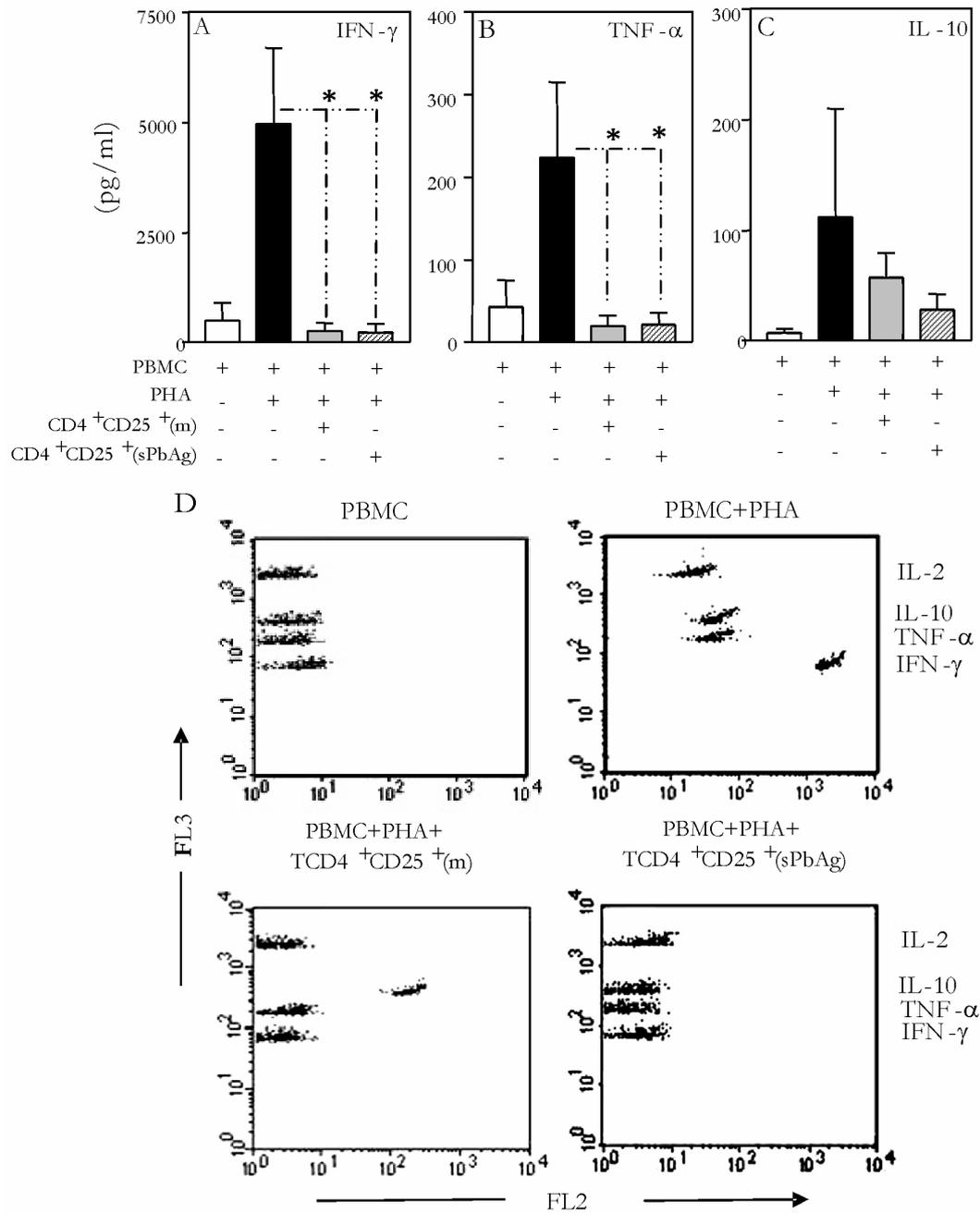


Figura 4. Caracterização funcional das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas do sangue periférico de pacientes infectados com *P. brasiliensis* e de indivíduos saudáveis. (A) As sub-populações de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> do sangue periférico de pacientes ( $n=6$ ) e de indivíduos saudáveis ( $n=4$ ) foram isoladas utilizando-se um kit contendo “micro-beads” (MACS®) como descrito em material e métodos. Após separação, ambas sub-populações foram estimuladas em placas cobertas com anti-CD3 (0,5µg/ml) e fatores solúveis, PHA (1µg/ml), anti-CD28 (1µg/ml) e rhIL-2 (10ng/ml) na presença ou ausência de sPbAg (10µg/ml). Após duas semanas de expansão celular, as sub-populações de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $1 \times 10^4$ /poço), novamente isoladas através de “micro-beads”, foram cocultivadas com PBMC alogeneicos ( $1 \times 10^5$ /poço) e estimulados com PHA. Decorridas 96h de incubação as células foram pulsadas com metil-H-timidina e a quantidade de timidina incorporada determinada. As barras representam a média  $\pm$  SEM do índice de estimulação. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  quando comparados aos valores obtidos da proliferação das células T alogeneicas mediada por PHA .



*Figura 5: As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas do sangue periférico de pacientes com PCM inibem a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .* As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes ( $n=4$ ) foram isoladas utilizando-se um kit contendo “micro-beads” como descrito em material e métodos. Após a separação, as células foram estimuladas em placas cobertas com anti-CD3 (0,5 $\mu$ g/ml) e os fatores solúveis PHA (1 $\mu$ g/ml), anti-CD28 (1 $\mu$ g/ml) e rhIL-2 (10ng/ml) na presença ou ausência de sPbAg. Após duas semanas, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (1x10<sup>4</sup>/poço) foram co-cultivadas com PBMC provenientes de indivíduos alogeneicos (1x10<sup>5</sup>/poço) estimulados com PHA. Após 48h de incubação, o sobrenadante foi coletado e a produção de IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  avaliada por citometria de fluxo. Os gráficos de barras representam as médias  $\pm$  SEM dos níveis de IFN- $\gamma$  (**A**), TNF- $\alpha$  (**B**) e IL-10 (**C**) no sobrenadante das diferentes culturas como indicado. (**D**) O resultado de um experimento representativo mostrando os níveis das citocinas presentes nessas co-culturas está representado na forma de “dot plot”. \* $p<0.05$  quando comparado à produção de citocinas nas culturas de PBMC alogeneico estimulado com PHA.

pg/ml) e IL-10 ( $27,4 \pm 15,2$  pg/ml) nas co-culturas. Baixos níveis de IL-2 ( $<7$ pg/ml) foram detectados nessas culturas. A figura 5D, em forma de “dot plot”, é representativa dos resultados apresentados nas figuras 5A, B e C.

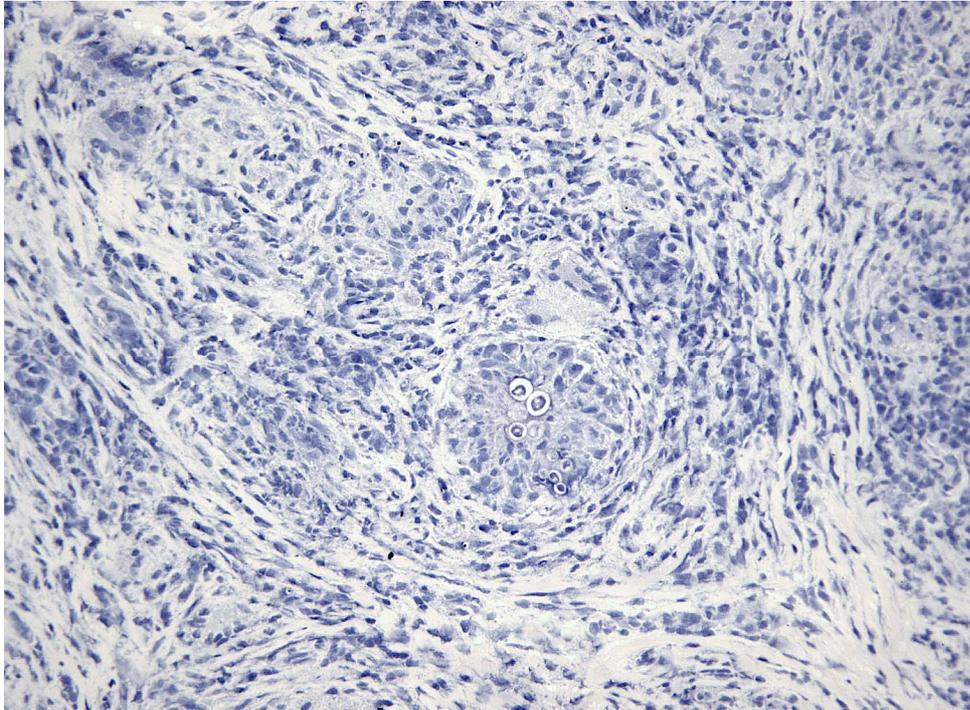
Estes dados revelaram a presença de células T  $CD4^+CD25^+$  no sangue periférico de pacientes infectados por *P. brasiliensis*, com características fenotípicas e funcionais similares às Tregs. Ainda, essas células exibiram altos níveis de CTLA-4, GITR, TGF- $\beta$  de membrana, Foxp3 e forte atividade reguladora quando comparadas às células T  $CD4^+CD25^+$  de indivíduos controle.

#### 5. *Análise microscópica das lesões de pele causadas por P. brasiliensis*

Após o estabelecimento da infecção no pulmão, a PCM humana pode disseminar para outros órgãos e tecidos formando lesões secundárias nas mucosas (oral e nasal), pele, linfonodos e glândulas adrenais (MONTENEGRO & FRANCO, 1994). Caracterizamos microscopicamente as lesões de pele induzidas pela presença de leveduras de *P. brasiliensis*. De forma representativa, podemos observar que a inflamação granulomatosa pode ser bem definida e circunscrita, geralmente ao redor das leveduras fúngicas. Nessa reação inflamatória granulomatosa há presença de agregados de macrófagos epitelióides e células gigantes multinucleadas com linfócitos e polimorfonucleares ao redor desses agregados (Figura 6).

#### 6. *Caracterização fenotípica das células T $CD4^+CD25^+$ presentes nas lesões de pacientes com PCM*

Segundo proposto por Belkaid & Rouse (2005), durante uma infecção crônica ambas populações de células, Tregs e efetoras, migram para os sítios infectados e, dependendo do



*Figura 6: Fotomicrografia de lesão cutânea mostrando um granuloma induzido por P. brasiliensis. A figura mostra uma lesão com processo inflamatório granulomatoso compacto e organizado que condiz com a forma crônica da PCM. É possível notar as leveduras no centro do granuloma. Coloração Hematoxilina: aumento de 200x.*

microambiente (citocinas, quimiocinas), tais células exercem suas funções. Certas condições propiciam o recrutamento/sobrevivência assim como as funções das Tregs levando ao controle das células T efectoras e APC presentes no local.

Inicialmente, o infiltrado celular presente nas lesões foi caracterizado quanto à expressão de moléculas de superfície que caracterizam a população de linfócitos (“gate” R1), macrófagos e células dendríticas (“gate” R2). Os leucócitos foram primeiramente divididos de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) (Figura 7A) e o fenótipo das células nas janelas R1 e R2 determinado. Os resultados revelaram que em R1 a população de células CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foi de 20,75±2,5% (3,1 x 10<sup>5</sup> células/biópsia, variando de 1,0 a 6,0 x 10<sup>5</sup> células/biópsia) e a de CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> foi 26,9±3,5% (3,8 x 10<sup>5</sup> células/biópsia, variando de 0,2 a 8,5 x 10<sup>5</sup> células/biópsia). Dentre a população de células T CD4<sup>+</sup>, em média de 7,0±1,2% (variando de 6,0 x 10<sup>3</sup> a 2,8 x 10<sup>5</sup> células/biópsia) das células co-expressaram CD25 (Figura 7B). Os leucócitos com fenótipo de macrófagos (CD1a<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) e células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup>) também foram detectados nessas lesões (13,4±2,7% e 8,6± 3,8%, respectivamente) (Figura 7A).

Para caracterizar a sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> determinamos a co-expressão de marcadores fenotípicos das Tregs naturais. A percentagem de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> apresentou um perfil homogêneo com relação à expressão das moléculas CTLA-4 (56,5±7,9%), GITR (68,7±11,7%), CD103 (23,1±7,8%), CD45RO (85,6±6,3%), e os receptores de quimiocinas CCR5 (63,9±9,2%) e CCR4 (70,5±9,2%) (Figura 8B). Adicionalmente, 17,2±7,5% e 38,2±1,5% das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> co-expressaram TGF-β associado à membrana celular (LAP) e Foxp3, respectivamente (Figura 8C e 8D).

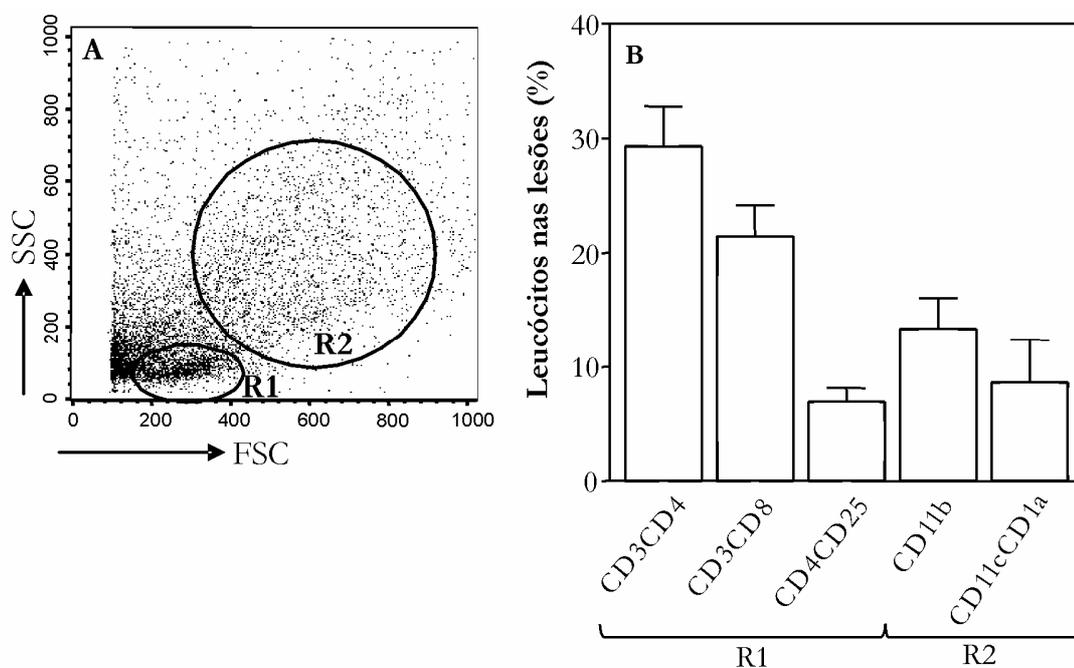


Figura 7: Caracterização do infiltrado celular presente nas lesões de pacientes com PCM. As biópsias de pele e mucosa obtidas de pacientes com PCM ( $n=17$ ) foram digeridas na presença de liberase e processadas utilizando-se Medimachine como descrito em material e métodos. (A) Os leucócitos isolados foram avaliados por citometria de fluxo e as populações R1 e R2 foram selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). (B) As células em R1 foram analisadas quanto à expressão das moléculas: CD3, CD8, CD25, CD4 para determinar a população de células T e, em R2 quanto à expressão de CD11b, CD1a, CD11c para determinar a população de macrófagos e células dendríticas. As barras representam a média  $\pm$  SEM da expressão dos antígenos em leucócitos presentes nas lesões dos pacientes com PCM.

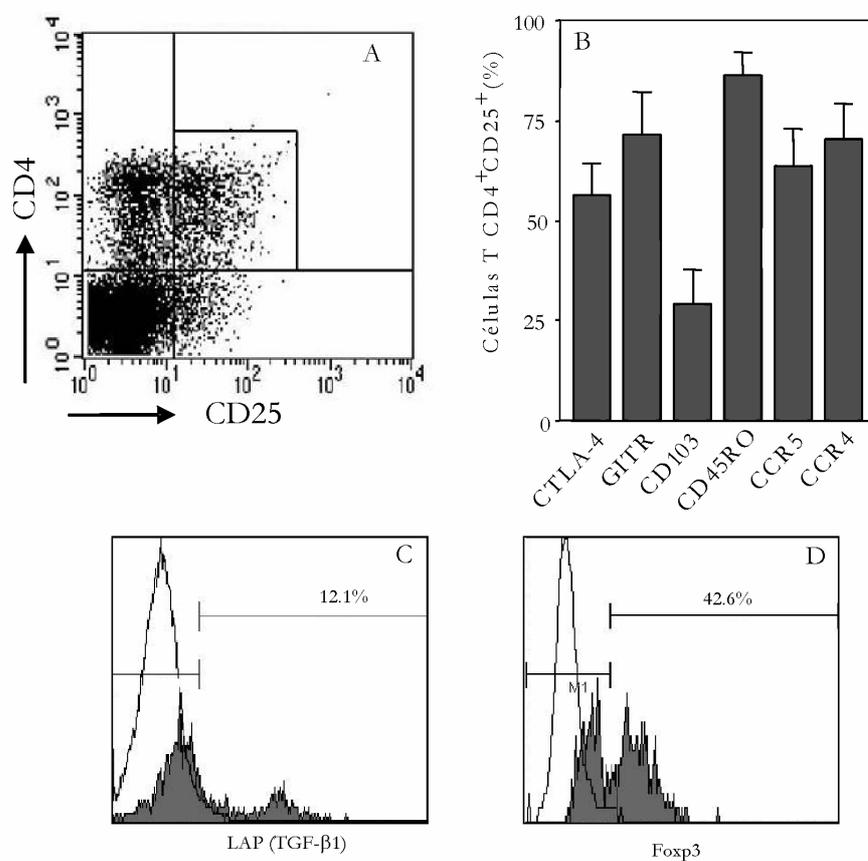


Figura 8. Caracterização fenotípica das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes nas lesões de pacientes com PCM. As biópsias de mucosa e pele de pacientes com PCM foram digeridas na presença de liberase e processadas utilizando-se Medimachine como descrito em material e métodos. As células recém isoladas foram selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) e, em seguida, a sub-população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foi selecionada e analisada quanto à expressão de moléculas CTLA-4, GITR, CD103, CD45RO, CCR5, CCR4, TGF-β1 (LAP) ou Foxp3 intracelular. (A) A sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de um paciente está representada na forma de “dot plot”. (B) As barras representam a média ± SEM da percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> que co-expressam as moléculas indicadas (n=17). Os histogramas sem preenchimento representam a ligação do isotipo controle e os preenchidos a ligação dos anticorpos anti-LAP (C) e anti-Foxp3 (D) às células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dos pacientes

De forma comparativa, analisamos a expressão de CTLA-4, GITR, CD103, CCR5, CCR4 (Figura 9B), TGF- $\beta$  associado à membrana (Figura 9C) e Foxp3 intracelular (Figura. 9D) na subpopulação CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Figura 9A). Uma percentagem significativamente menor de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> expressando tais moléculas foi observada (4,1 $\pm$ 2,0%; 1,6 $\pm$ 1,4%; 12,1 $\pm$ 2,9%; 45,7 $\pm$ 11,2%; 10,1 $\pm$ 3,8%; 12,9 $\pm$ 4,7%, 2,4 $\pm$ 1,2% e 1,6 $\pm$ 1,4%, respectivamente).

### 7. Expressão de Foxp3 nas lesões de pacientes com PCM

Embora a expressão de Foxp3 não se restringe à população das Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais, sua expressão é alta quando comparada com a expressão nas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (FOTENOTE *et al.*, 2003, revisto por FOTENOTE & RUDENSKY, 2005). Uma vez tendo detectado a presença de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nas lesões, avaliamos *in situ* a presença desse fator de transcrição nas biópsias de pacientes com PCM e controles. A análise por imunohistoquímica revelou que a intensidade de marcação para Foxp3 variou de moderada a alta (++/+++ ) (Figura 10A, Tabela 1). Adicionalmente, reações de imunofluorescência e análise por confocal revelaram que a maioria das células CD25<sup>+</sup>, presente nestas lesões, foi positiva para Foxp3 (Figura 10D). Em nenhum tecido cutâneo de indivíduos controles ( $n=3$ ) foi detectada a expressão de Foxp3 (Tabela 1).

Esses resultados reforçam nossa suposição de que as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes nas lesões induzidas por *P. brasiliensis* apresentam fenótipo e função de células T reguladoras.

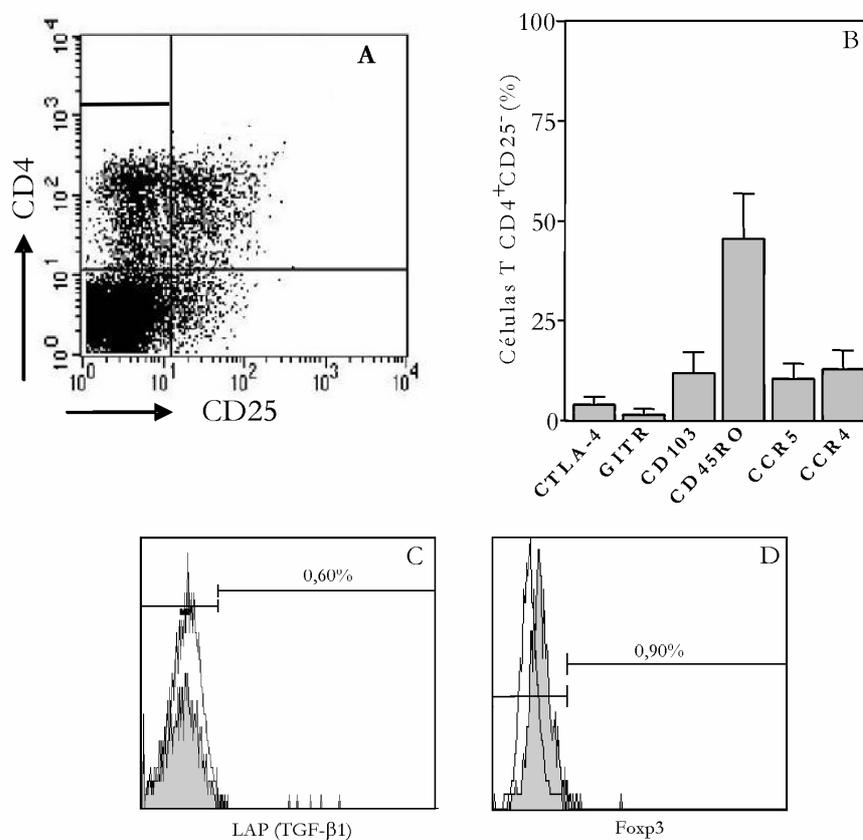
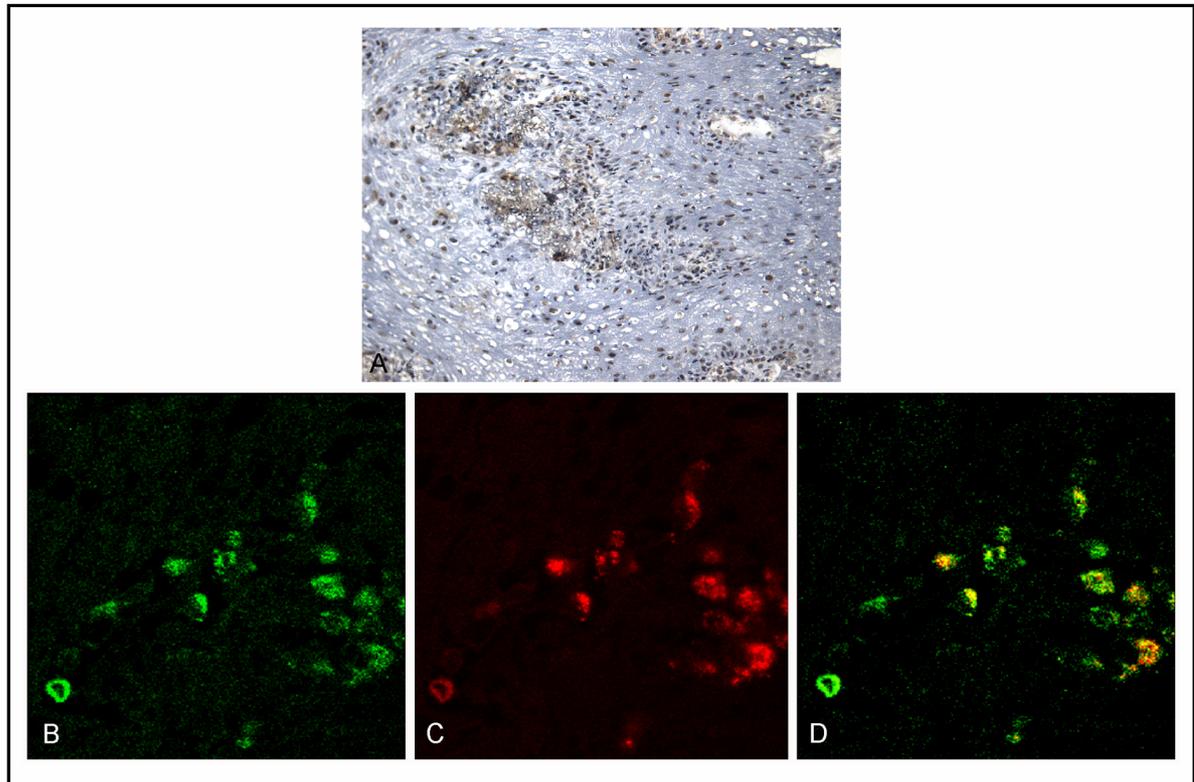


Figura 9. Caracterização fenotípica das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> presentes nas lesões de pacientes com PCM. As biópsias de mucosa e pele de pacientes com PCM foram digeridas na presença de liberase e processadas utilizando-se Medimachine como descrito em material e métodos. As células recém isoladas foram selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) e, em seguida, a sub-população CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> foi selecionada e analisada quanto à expressão de moléculas CTLA-4, GITR, CD103, CD45RO, CCR5, CCR4, TGF-β1 (LAP) ou Foxp3 intracelular. (A) A sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de um paciente está representada na forma de “dot plot”. (B) As barras representam a média ± SEM da percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> que co-expressam as moléculas indicadas (n=17). Os histogramas sem preenchimento representam a ligação do isotipo controle e os preenchidos a ligação dos anticorpos anti-LAP (C) e anti-Foxp3 (D) às células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> dos pacientes.



*Figura 10. Expressão de Foxp3 nas lesões de pacientes com PCM. Pele obtida através da biópsia de paciente com PCM foi analisada por imunohistoquímica e imunofluorescência. Em (A) nota-se imunorreatividade positiva para Foxp3. Método de detecção: Avidina Biotina-Peroxidase (ABC-complexo). Revelação: diaminobenzidina (DAB). Aumento de 200x. Em (B) visualização da imagem com filtro verde para as células CD25+, (C) visualização da imagem com filtro vermelho para as células Foxp3+, (D) visualização da imagem com filtro duplo (verde e vermelho), resulta na coloração amarelo-laranja que representa a co-localização das células CD25+ e do fator de transcrição Foxp3.*

Tabela 1. Expressão de *Foxp3* em leucócitos de lesões de tecido cutâneo de pacientes com PCM

	<sup>a</sup> B1	B2	B3	B4	B5	<sup>b</sup> C1	C2	C3
Foxp3	+++	++	+++	++	+++	-	-	-

Intensidade de marcação: -, ausente, +, leve, ++, moderada e, +++, intensa

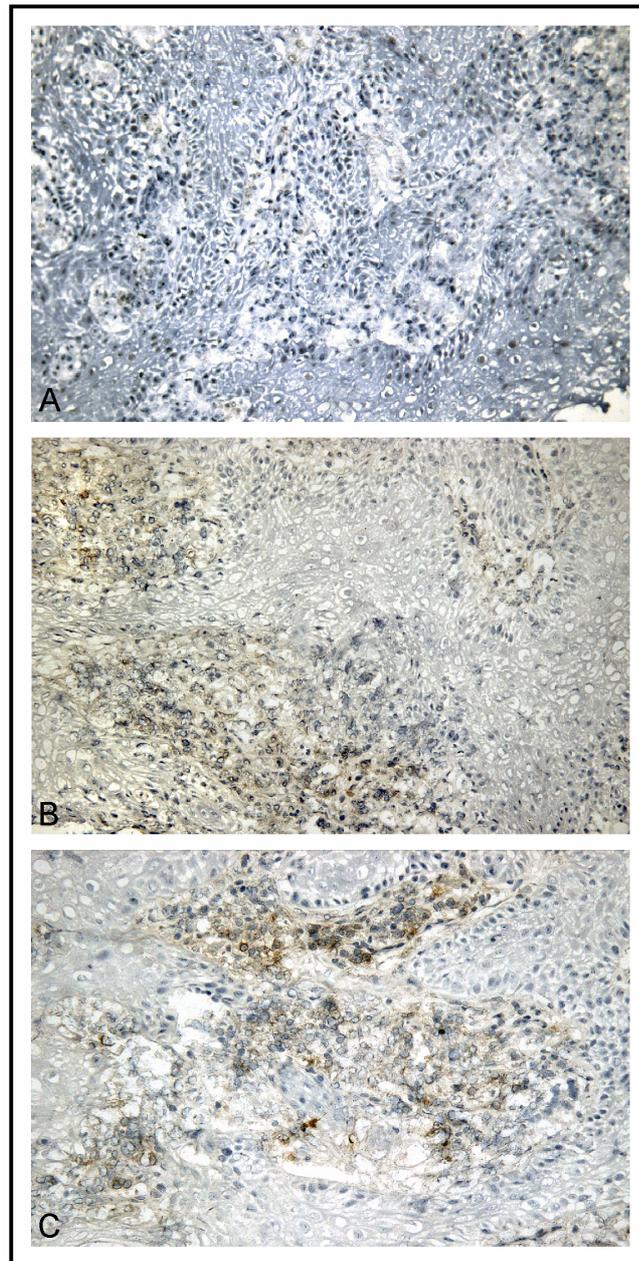
<sup>a</sup> Biópsias de pacientes

<sup>b</sup> Biópsias controles

### 8. A expressão de quimiocinas nas lesões induzidas por *P. brasiliensis*

Pouco se sabe quanto à migração de células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> para os sítios periféricos. Alguns estudos identificaram a presença dessa sub-população celular em sítios periféricos sob condições patológicas, incluindo tecidos inflamados, tumores e sítios infecciosos (revisto por HUEHN & HAMANN, 2005). A expressão de alguns receptores de quimiocinas, CCR4 e CCR8 em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> é descrita estar envolvida com sua migração ao microambiente contendo seus ligantes CCL17 e CCL22 (IELLEN *et al.*, 2001, CURIEL *et al.*, 2004, LEE *et al.*, 2005). Desde que 71% das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes co-expressaram CCR4<sup>+</sup> (Figura 8B), analisamos, por imunohistoquímica, a presença de seus ligantes CCL17 e CCL22 nas lesões causadas por *P. brasiliensis*.

A análise da expressão das quimiocinas revelou positividade para CCL22, de leve (+) a moderada (++) e de leve (+) a intensa (+++) para CCL17, em tecido cutâneo de pacientes (Figura 11 e Tabela 2) enquanto que em biópsia controle tais quimiocinas apresentaram níveis basais. Quanto à distribuição, as células imunomarcadas apresentaram-se agrupadas.



*Figura 11. Expressão de quimiocinas em tecido cutâneo de pacientes com PCM. Pele obtida através da biópsia de paciente com PCM foi analisada por imunohistoquímica para detecção das quimiocinas. Em A, o controle da reação. Em B e C, nota-se imunorreatividade positiva para CCL17 e CCL22, respectivamente. Método de detecção: Avidina Biotina-Peroxidase (ABC-complexo). Revelação: diaminobenzidina (DAB). Aumento de 200x.*

*Tabela 2. Expressão das quimiocinas nas lesões de tecido cutâneo de pacientes com PCM*

	<sup>a</sup> B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	<sup>b</sup> C1	C2	C3
CCL17	+++	+	++	+++	++	+++	++	++	+	+	+
CCL22	+	+	++	++	+	++	+	+	+	+	+

Intensidade de marcação: -, ausente, +, leve, ++, moderada e, +++, intensa

<sup>a</sup> Biópsias de pacientes

<sup>b</sup> Biópsias controles

A presença de tais células nessas lesões implicaria, dependendo do microambiente, em sobrepujar a ação de células efetoras sobre a eliminação do agente infeccioso e, como consequência promoveria a persistência das leveduras que por sua vez podem favorecer o recrutamento de mais Tregs para o local (via produção de quimiocinas). De fato, fungos ou restos dos mesmos foram detectados em cortes histológicos corados por Grocott em todas biópsias incluídas neste estudo. Ainda, leveduras viáveis de *P. brasiliensis* foram isoladas de algumas dessas lesões e cresceram em BHI suplementado com soro bovino fetal (dados não mostrados).

### *9. O perfil da produção de citocinas por células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> presentes nas lesões de pacientes com PCM*

Tem sido proposto que além do contato célula-célula, através de moléculas expressas na membrana celular (CTLA-4, GITR, TGF-β de membrana), outros fatores poderiam estar relacionados com o efeito supressor mediado pelas Tregs. Em algumas condições, a secreção de

fatores solúveis tais como IL-10 e TGF- $\beta$  ou a “captura” de IL-2 contribuem para a atividade funcional de tais células (revisto por FEHERVARI & SAKAGUSHI, 2004; FOTENOTE & RUDENSKY, 2005). Ademais, IL-10 e TGF- $\beta$  contribuem para a sobrevivência das células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais nos sítios de infecção (BELKAID & ROUSE, 2005) e a sinalização via TGF- $\beta$  está diretamente relacionada com a expressão de Foxp3 (COFFER & BURGERING, 2004).

Baseando-se no exposto, foi relevante avaliarmos o perfil das citocinas, IL-10, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , produzidas por células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e por células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> isoladas de biópsias dos pacientes com PCM. Os resultados, indicados na Figura 12A, mostraram que um maior número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> apresentaram positividade para IL-10 ( $12,8 \pm 5,7 \times 10^4$  células/biópsia) quando comparada à sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $3,5 \pm 1,1 \times 10^4$  células/biópsia) sem, contudo, ser estatisticamente significativo. Da mesma forma, embora detectamos um maior número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> produzindo IFN- $\gamma$ , este não foi significativo ( $5,5 \pm 5,1$  e  $1,54 \pm 0,3 \times 10^4$  células/biópsia). Entretanto, o número absoluto de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> positivas para TGF- $\beta$  foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado à população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup> ( $6,6 \pm 2,4$  [78,4 $\pm$ 4,3%] e  $0,2 \pm 0,2$  [1,0 $\pm$ 0,6%]  $\times 10^4$  células/biópsia, respectivamente). Quanto aos níveis destas citocinas nas sub-populações presentes no infiltrado celular das lesões, observamos que a quantidade de TGF- $\beta$  embora maior na sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $67,7 \pm 21,9$ ) do que na sub-população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ( $15,9 \pm 8,2$ ) não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,0571$ ). Com relação aos níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$ , não houve diferenças em ambas sub-populações analisadas (Figura 12B).

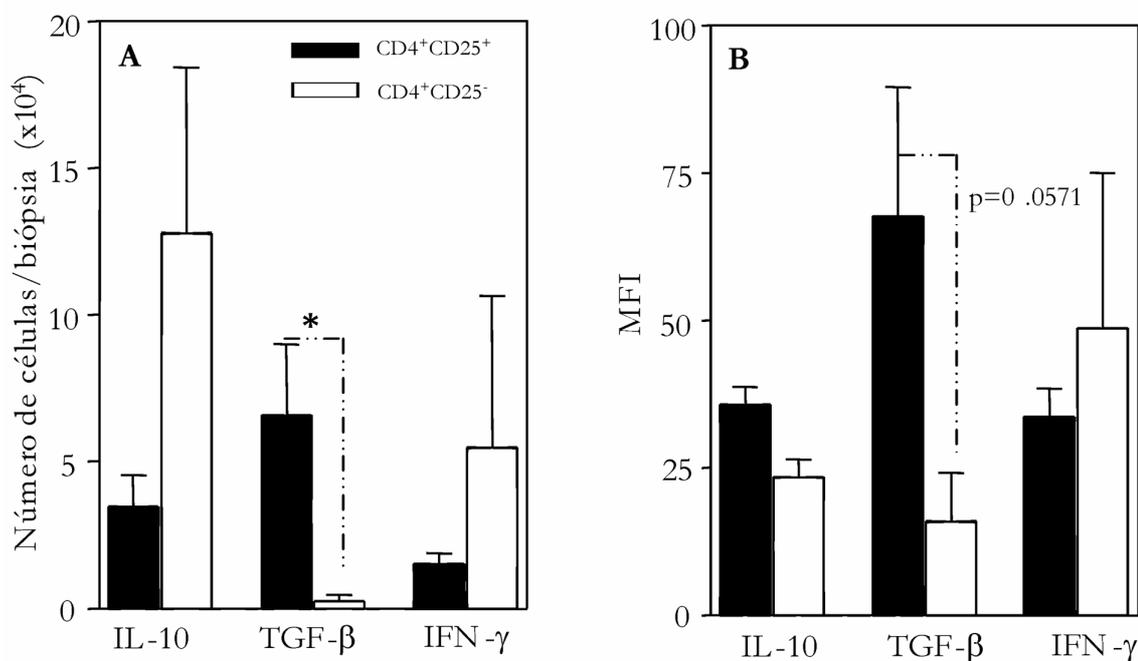


Figura 12. Perfil de citocinas produzidas pelas sub-populações de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> presentes nas lesões de pacientes com PCM. As biópsias de pele e mucosa obtidas de pacientes com PCM (n=4) foram digeridas na presença de liberase e processadas utilizando-se Medimachine como descrito em material e métodos. A percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (barras preenchidas) e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (barras abertas) positivas para IL-10, TGF-β e IFN-γ foi determinada por citometria de fluxo. As barras representam a média ± SEM correspondente ao número absoluto de células (A) ou a média de intensidade de fluorescência (B) para cada citocina analisada dentro das sub-populações indicadas. \* p<0,05 em comparação ao número de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>TGF-β<sup>+</sup>.

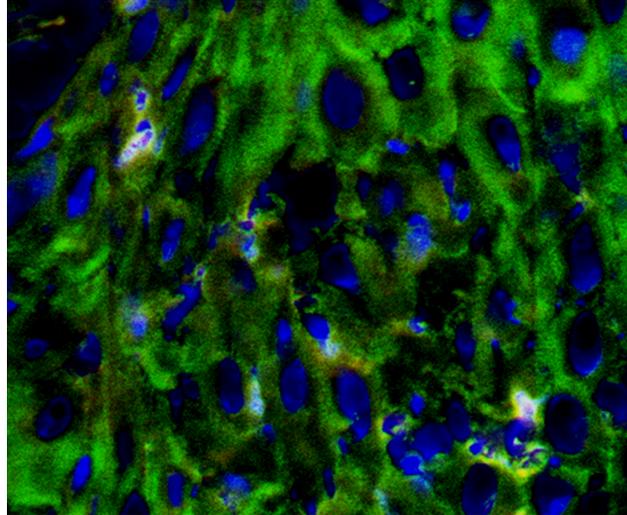
Por análise de imunofluorescência foi possível detectar a presença de células CD25<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup> em lesões de tecido cutâneo de pacientes infectados por *P. brasiliensis* (Figura 13).

#### 10. Caracterização funcional das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas das lesões de pacientes com PCM

Uma vez que as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes nas lesões de pacientes com PCM foram caracterizadas quanto ao seu fenótipo e produção de citocinas, o próximo passo foi analisar as propriedades funcionais de tais células. A presença de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, na proporção 1:10, isoladas após a expansão prévia dos leucócitos das lesões não alterou significativamente a proliferação de células T alogeneicas mediada por PHA (IE: 40,6±8,5 e 30,1±10,1; respectivamente). Entretanto, a adição de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de cinco pacientes (RSSR, ABF, BLF, GSS e CJC) foi capaz de suprimir a proliferação policlonal de células T alogeneicas (61,8±8,5%; 52,0±2,3%; 80,4±16,6%; 74,4±3,5% e 51,4±0,1%; respectivamente). Curiosamente, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de três pacientes (JAGA, JDT e JCS) aumentaram a proliferação das células T alogeneicas (94,8±4,1%; 40,9±2,1% e 143,3±10,6%, respectivamente) (Figura 14). Tais resultados mostraram que células Tregs com atividade reguladora estão presentes em alguns pacientes com PCM, enquanto que em outros tais células não foram funcionais, alçando a hipótese de que a ampla variação da resposta imune observada nos pacientes com PCM pode influenciar diretamente a capacidade funcional de uma célula T reguladora.

#### 11. Histomorfologia das lesões granulomatosas tegumentares dos pacientes

Uma vez observada uma heterogeneidade quanto à atividade funcional das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de biópsias de pele ( $n=7$ ) e de mucosa ( $n=1$ ) dos pacientes com PCM,



*Figura 13. Células CD25<sup>+</sup>TGF-β<sup>+</sup> nas lesões de pacientes com PCM. Pele obtida através da biópsia de paciente com PCM foi analisada por imunofluorescência para a detecção de células CD25<sup>+</sup> produzindo TGF-β. Observa-se a coloração esbranquiçada que representa a co-localização da citocina (vermelho), células CD25<sup>+</sup> (verde) e o núcleo celular (azul).*

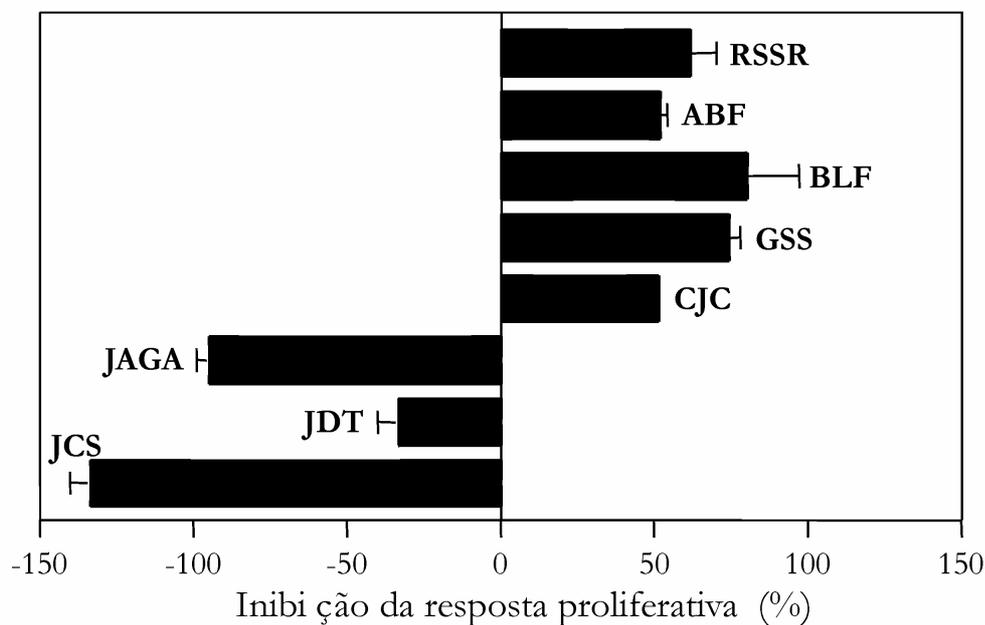
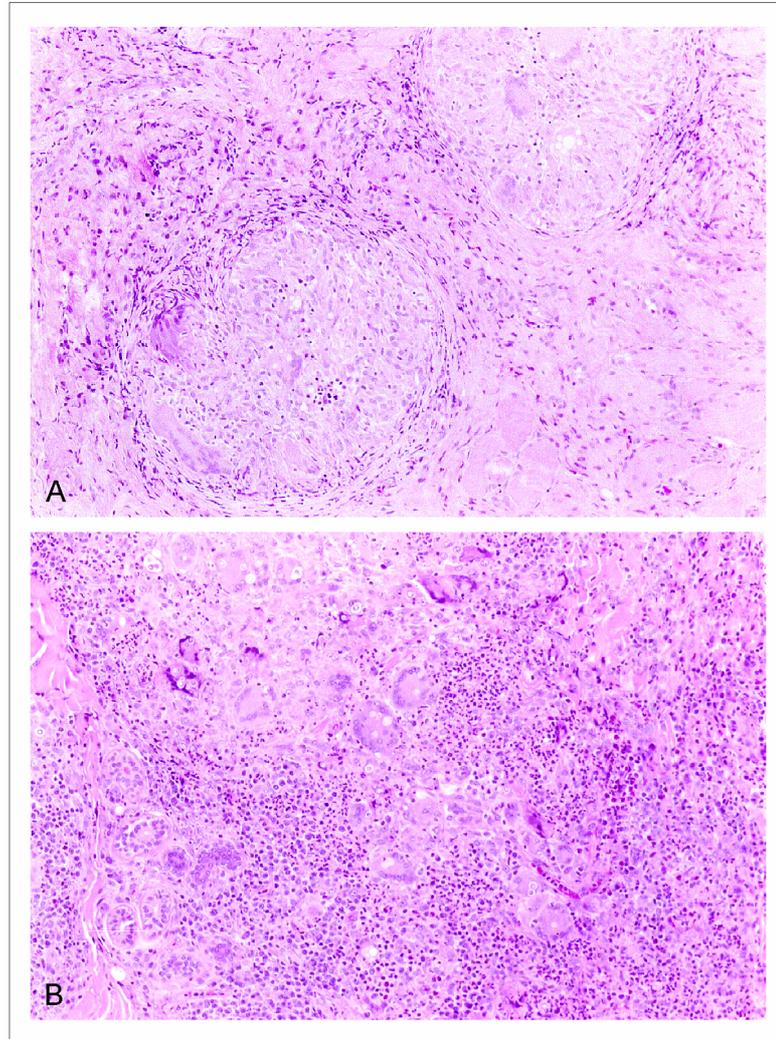


Figura 14. Caracterização funcional das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> das lesões de pacientes infectados por *P. brasiliensis*. As biópsias foram incubadas durante 1h em uma solução contendo liberase e então as células obtidas com o auxílio do Medimachine como descrito em material e métodos. As células obtidas foram expandidas *in vitro* em placas cobertas com anticorpo anti-CD3 (0,5µg/ml) e fatores solúveis como PHA (1µg/ml), anti-CD28 (1µg/ml) e rhIL-2 (10ng/ml). Decorridas duas semanas, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (1x10<sup>4</sup>/poço) foram isoladas utilizando-se “micro-beads” (MACS®) e então co-cultivadas com PBMC alogeneico (1x10<sup>5</sup>/poço) estimulado com PHA. Decorridas 96h de incubação as células foram pulsadas com metil-H-timidina e a quantidade de timidina incorporada determinada. As barras representam a média ± SEM da percentagem de inibição da proliferação celular que foi calculada baseando-se nos valores de IE relativo à proliferação do PBMC alogeneico mediada por PHA na ausência das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

despertou-nos o interesse em avaliar a histomorfologia dos granulomas nestas lesões. O infiltrado inflamatório granulomatoso observado nas biópsias das lesões de pacientes cujas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas apresentaram atividade reguladora caracterizou-se morfológicamente por apresentar um padrão hiperérgico (paciente CJC) ou “dimórfico” (pacientes BLF, ABF). Curiosamente, um dos casos relatados (paciente RSSR) apresentou granulomas epitelióides de padrão hiperérgico na biópsia cutânea, entretanto foi o único que apresentou a forma clínica aguda da PCM. Nesse caso, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas da lesão foram capazes de suprimir a resposta proliferativa *in vitro*, similar aos demais casos que foram obtidos de pacientes com a forma crônica da PCM.

As lesões de padrão hiperérgico foram caracterizadas pela presença de granulomas epitelióides compactos e organizados, com formação de tubérculos cujos centros agregaram-se numerosas células epitelióides coesas e permeadas por poucas células gigantes multinucleadas do tipo Langerhans (Figura 15A). Tais tubérculos demonstraram ainda, presença de afluxo de linfócitos à periferia, contornando-os e formando halos linfocitários. A histomorfologia dos granulomas epitelióides presentes nas lesões analisadas neste estudo condizem com morfologia classicamente descrita na patogênese da PCM (MONTENEGRO & FRANCO, 1994; SIDRIM & ROCHA, 2004). As lesões da PCM descritas, como processo inflamatório granulomatoso de padrão “dimórfico” caracterizaram-se por: 1) granulomas epitelióides compactos e organizados, isto é, do tipo hiperérgico clássico, em variáveis quantidades, e dispostos adjacentes ou permeados por; 2) outros granulomas morfológicamente diferentes, com a formação dos tubérculos desorganizados e frouxos, quando comparados aos granulomas hiperérgicos clássicos primeiramente descritos.

De forma contrária aos dados histomorfológicos descritos acima, as lesões dos pacientes JAGA e JDT apresentaram um infiltrado inflamatório granulomatoso que se enquadra no pólo hipoérgico (anérgico) da PCM (Figura 15B). Neles, observamos granulomas epitelióides frouxos,



*Figura 15. Histomorfologia das lesões de pacientes com PCM. As figuras representam o processo inflamatório granulomatoso observado nas lesões cujas células T CD4+CD25<sup>+</sup> suprimiram (A) ou não (B) a resposta proliferativa de células T alogeneicas. Em A, é possível observar a presença de granulomas compactos e organizados. Em B, a lesão apresenta granulomas epitelióides frouxos, coalescentes e desorganizados. Coloração H&E: aumento de 100x.*

coalescentes e desorganizados. Tais granulomas demonstraram acúmulos coalescentes de células epitelióides descoesas, permeadas por conspícuas células gigantes multinucleadas e de grandes dimensões, com fenótipo do tipo Langerhans. Ainda nessas lesões, os linfócitos apresentaram-se dispersos no infiltrado, sem formação de linfocitários ao redor dos granulomas.

Cabe aqui esclarecer que não foi possível analisar as características morfológicas das lesões cutâneas obtidas dos pacientes GSS e JCS.

Distúrbios imunoreguladores durante a progressão da paracoccidiodomicose (PCM) caracterizam essa infecção sistêmica causada pelo fungo dimórfico *P. brasiliensis*. O comprometimento da resposta imune celular é caracterizado pela depressão na resposta proliferativa frente a estímulos mitogênicos e antígenos de *P. brasiliensis* (revisito por PERAÇOLI, 2000; BENARD *et al.*, 1996; MUSATTI *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2002; CAMPANELLI *et al.*, 2003), por distúrbios na produção de citocinas por células T (BENARD *et al.*, 2001), pelo aumento da sinalização inibitória via CTLA-4 em células T CD4<sup>+</sup> e o aumento da apoptose em células recém isoladas de pacientes com PCM ou cultivadas com antígenos de *P. brasiliensis* (CACERE *et al.*, 2002; CAMPANELLI *et al.*, 2003). As disfunções de células T durante a resposta imune, em diversas infecções crônicas, contribuiriam para a longa persistência dos patógenos no hospedeiro em focos quiescentes e estes mecanismos ainda são pouco esclarecidos. Na PCM, a manutenção dos reservatórios da infecção pode ocasionar manifestações clínicas em indivíduos infectados há mais de uma década após terem deixado a região endêmica latino-americana, ocasionando a reativação da doença (BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO & MONTENEGRO, 1994).

Os mecanismos que governam os diferentes graus de comprometimento da resposta imune celular durante a PCM, desde anergia até a resposta imune aparentemente preservada, ainda não estão totalmente estabelecidos. Atualmente, sabe-se que a sinalização inibitória via CTLA-4 modula ativamente a resposta imune dos pacientes infectados com *P. brasiliensis* e a adição de anticorpos neutralizantes anti-FasL e anti-CTLA-4 resulta em um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e um significativo aumento na proliferação celular. Entretanto a produção de TGF- $\beta$  e a hiporresponsividade de células T aos antígenos fúngicos se mantêm (CAMPANELLI *et al.* 2003). A citocina IL-10, considerada imunomoduladora (MOCELLIN *et al.*, 2003; O'GARRA *et al.*, 2004), também está presente no tecido cutâneo de lesões causadas por *P. brasiliensis* (CAMPANELLI, 2003; PAGLIARI & SOTTO, 2003), assim como em culturas e transcritos em mRNA de PBMC

providos de pacientes com PCM (BENARD *et al.*, 1996; OLIVEIRA *et al.*, 2002; MAMONI *et al.*, 2005) e está intimamente relacionada com a supressão de citocinas secretadas por linfócitos Th1 nesses pacientes (BENARD *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2002; ROMANO *et al.*, 2002; 2005; MAMONI *et al.*, 2005). Baseando-se nessas evidências, a suposição de que outros mecanismos supressores envolvidos na hiporesponsividade de células T estejam contribuindo para o desenvolvimento e estabelecimento da PCM humana é pertinente.

É sabido que as células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais (Tregs) suprimem a proliferação de células T efectoras, utilizam a IL-2 produzida, produzem citocinas reguladoras como TGF-β e IL-10 e expressarem de maneira constitutiva CTLA-4 (revisito por SHEVACH, 2002; FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004; VON BOEHMER, 2005). De forma interessante, todos esses fenômenos podem ser observados nos linfócitos de pacientes com PCM (REZKALLAH-IWASO *et al.*, 1992; BENARD *et al.*, 1996; 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2002; CAMPANELLI *et al.*, 2003; MAMONI *et al.*, 2005; ROMANO *et al.*, 2002; 2005). Assim, nós investigamos o possível envolvimento desta população celular no controle da resposta imune sistêmica - sangue periférico e, local - nas lesões induzidas por *P. brasiliensis*.

As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladoras (Tregs) têm sido descritas por estarem envolvidas com a manutenção do estado de latência em diversas infecções crônicas (BELKAID & ROUSE, 2005). Em modelos experimentais, tais como as infecções causadas por *Leishmania major* (BELKAID *et al.*, 2002; MENDEZ *et al.*, 2004), *Schistosoma mansoni* (HESSE *et al.*, 2004), *Candida albicans* (MONTAGNOLI *et al.*, 2002; NETEA *et al.*, 2004) e por vírus como HIV e Hepatites (SUVAS *et al.*, 2004; VAHLENKAMP *et al.*, 2005) é proposto que tais células migram para os sítios de infecção e controlem a resposta imune efectora local, limitando as conseqüências patológicas e, conseqüentemente, o dano tecidual. Entretanto, tais células contribuem à permanência do agente infeccioso (BELKAID & ROUSE, 2005).

A presença de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> com características fenotípicas e funcionais de Tregs foram identificadas em lesões de pacientes causadas por *Leishmania brasiliensis* (CAMPANELLI *et al.*, 2006), nos tecidos linfóides de pacientes infectados cronicamente por HIV (ANDERSSON *et al.*, 2005), nos pacientes infectados por *Plasmodium falciparum* (WALTHER *et al.*, 2005), nas mucosas do duodeno e estômago infectadas por *Helicobacter pylori* (LUNDGREN *et al.*, 2005), no pulmão de pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (GUYOT-REVOL *et al.*, 2005) e nos granulomas sarcóidicos (MIYARA *et al.*, 2006).

Nossos dados mostraram que não houve diferenças entre a percentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> assim como as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> presentes no sangue periférico dos pacientes com PCM e indivíduos controles. Esses achados estão de acordo com inúmeras evidências que têm mostrado a presença de Tregs no sangue periférico em condições homeostáticas (JONULEIT *et al.*, 2001; DIECKMANN *et al.*, 2001) e em condições patológicas, podendo ou não haver uma alteração em seu número (KINTER *et al.*, 2004; VIGLIETTA *et al.*, 2004; SUGIYAMA *et al.*, 2005). Além disso, de forma contrária aos resultados obtidos por Bava *et al.* (1991) e Peraçoli (2000) não observamos alterações no número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, células B (CD19) ou monócitos (CD11b) no sangue dos pacientes. As diferenças entre esses resultados podem estar relacionadas ao nível de imunossupressão dos pacientes analisados neste estudo. Por outro lado, uma maior percentagem de células CD1a<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>, um subtipo de células dendríticas consideradas precursoras de células de Langerhans (ITO *et al.*, 1999) foi observada em nosso estudo. Vários estímulos inflamatórios estão relacionados a um maior recrutamento de células dendríticas provindas da medula óssea aos sítios periféricos (GALLUCCI *et al.*, 1999). Assim, poderíamos propôr que a infecção por *P. brasiliensis*, com conseqüente produção e liberação de seus antígenos na circulação (SUGIZAKI *et al.*, 1999; PERAÇOLI, 2000), seria um estímulo que favoreceria o “turnover” e recrutamento de células dendríticas ao sangue periférico.

Desde que a presença de algumas moléculas, concomitante à expressão de CD25, podem melhor caracterizar a população de Tregs naturais (revisito por JONULEIT & SCHMITT, 2003; FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004; PICCIRILLO & THORNTON, 2004), analisamos o fenótipo da população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no sangue periférico. Em pacientes, a frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> co-expressando CTLA-4, GITR, TGF-β de superfície e Foxp3 e de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> co-expressando CTLA-4 e Foxp3 foi significativamente maior com relação aos controles. De fato, dados da literatura mostram que a alta expressão de Foxp3 se encontra na população CD25<sup>high</sup> e não em células cuja expressão de CD25 é negativa ou intermediária condizendo com nossos resultados (MIYARA *et al.*, 2006; SUFFIA *et al.*, 2006). Contudo com relação ao aumento de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, possivelmente a PCM tem um efeito sobre as mesmas, uma vez que a expressão dessa molécula inibitória é significativamente maior em PBMC de pacientes do que em células de indivíduos saudáveis (CAMPANELLI *et al.*, 2003). Assim sendo, a expressão destas moléculas em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes no sangue periférico de pacientes com PCM define um subtipo de células fenotipicamente similares às Treg naturais.

Adicionalmente à análise fenotípica da população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, células T com fenótipo de memória, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> co-expressando CCR4 e CD45RO, foram detectadas, em proporções similares, nos pacientes com PCM e controles. Semelhante população celular está presente no sangue de pacientes infectados por HIV (OSWALD-RICHTER *et al.*, 2004).

De forma notável, embora as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes no sangue periférico estejam em proporções similares aos controles, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de pacientes com PCM quando co-cultivadas com células alogeneicas foram capazes de inibir 94% a proliferação policlonal mediada por PHA, enquanto que as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de indivíduos controles inibiram apenas 67%. Essa forte atividade supressora mediada pelas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dos pacientes pode estar correlacionada com uma maior frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> co-expressando CTLA-4,

GITR, TGF- $\beta$  de membrana e Foxp3. Tal suposição baseia-se em diversos trabalhos que demonstram o envolvimento, ainda não completamente definido, dessas moléculas em Tregs funcionalmente ativas (revisto por FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004; VON BOEHMER, 2005). A expressão de moléculas inibitórias, tais como CTLA-4, está relacionada com as funções reguladoras das Tregs sobre as células T efetoras ou APCs presentes no microambiente (revisto por SHEVACH *et al.*, 2002; FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004 SAKAGUCHI, 2005; VON BOEHMER, 2005). Além de CTLA-4, a expressão de Foxp3 e GITR é correlacionada com a supressão da resposta imune em pacientes infectados com HIV. De fato, a expressão de CTLA-4, GITR e Foxp3 foi associada com a replicação viral nos sítios periféricos, sugerindo que as Tregs contribuem para a progressão da doença (ANDERSSON *et al.*, 2005).

Embora não encontramos uma influência dos antígenos de *P. brasiliensis* sobre a função das Tregs, a possibilidade de antígenos circulantes na PCM (PERAÇOLI, 2000) estarem relacionados à alta frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> e ao maior potencial supressor de tais células encontradas no sangue desses pacientes não pode ser descartada desde que Tregs naturais proliferam de maneira antígeno-específica em resposta aos antígenos de *Leishmania major* e aos ligantes de receptores do tipo Toll 2 e essas expressaram maiores quantidades de Foxp3 (SUFFIA *et al.*, 2006; SUTMULLER *et al.*, 2005).

Além do efeito inibitório das Tregs sobre a proliferação celular foi demonstrado que a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células T CD25<sup>-</sup> é inibida na presença de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (JONULEIT *et al.*, 2001) condizendo aos nossos resultados. No entanto, os níveis de IL-10 mantiveram-se discretos nessas co-culturas, um fato relevante, uma vez que essa citocina está correlacionada com a inibição de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (PESTKA *et al.*, 2004). Ainda que haja controvérsias com relação ao envolvimento de IL-10 na supressão mediada por Tregs naturais (revisto por SHEVACH, 2002; FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004; EHRENSTEIN *et al.*, 2004),

sua função reguladora durante a inflamação crônica experimental induzida por *Schistosoma masoni* independe da secreção dessa citocina (BAUMGART *et al.*, 2006). Entretanto, o envolvimento de IL-10 na supressão mediada pelas Tregs presentes no sangue periférico de pacientes permanece por ser testado.

Além destas citocinas, níveis abaixo de 7pg/ml de IL-2 foram detectados no sobrenadante das co-culturas, possivelmente devido ao consumo dessa citocina pelas Tregs ali presentes. Essa explicação sustenta-se por observações de que a IL-2 secretada por células T CD4<sup>+</sup> “naïve” convencionais ativadas é necessária para a manutenção/sobrevivência das células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais (MALOY & POWRIE, 2005). Sugere-se que tais células “capturam” IL-2 para sobrevivência e, de modo paradoxal, inibem a transcrição do gene para IL-2 nas células T CD25<sup>+</sup> inibindo assim sua proliferação (THORNTON & SHEVACH, 1998; THORNTON *et al.*, 2004; MALOY & POWRIE, 2005). Ainda não podemos descartar a possibilidade de que 48h de incubação não foi o melhor momento para detectar esta citocina no sobrenadante das co-culturas realizadas durante esse estudo.

Uma vez observada a presença de células fenotipicamente e funcionalmente similares às Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais no sangue de pacientes com PCM e sabendo que as mesmas acumulam-se nos sítios periféricos onde exercem suas funções (BELKAID *et al.*, 2002; BELKAID & ROUSE, 2005), avaliamos a presença e função das T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nas lesões de pacientes com PCM.

Primeiramente, investigamos o fenótipo do infiltrado celular nas lesões induzidas por *P. brasiliensis*. A presença de ambas populações de linfócitos T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, foi detectada nas biópsias de pele e mucosa analisadas, de acordo com os dados *in situ* de CAMPANELLI (2003). Dentre a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, 7% co-expressaram a molécula CD25. Ainda, detectou-se a presença de macrófagos e células dendríticas, novamente corroborando com os dados *in situ* (CAMPANELLI, 2003). A presença de células fagocíticas está de acordo com a característica de

lesões granulomatosas e propõe um papel primordial de tais células sobre a migração de células T via a produção de quimiocinas. Adicionalmente à secreção de quimiocinas, as células dendríticas no sítio da infecção apresentam antígenos via MHC II às Tregs naturais ativando-as (SUFFIA *et al.*, 2006), nos sugere uma outra função para as APC presentes nas lesões induzidas por *P. brasiliensis* em humanos.

Além da expressão de moléculas que caracterizam as células Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> naturais, tais como CTLA-4, GITR, CD45RO, Foxp3 e TGF-β ancorado à membrana, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> presentes nas lesões dos pacientes com PCM também co-expressaram receptores envolvidos com a migração e retenção das mesmas aos sítios periféricos como CD103, observado na infecção por *Leishmania major* e *Schistosoma mansoni* (SUFFIA *et al.*, 2005; BAUMGART *et al.*, 2006) e os receptores de quimiocinas, CCR4 e CCR5, os quais estão envolvidos com o recrutamento das Tregs em tumores (CURIEL *et al.*, 2004), na tolerância aos aloenxerto (LEE *et al.*, 2005), no lavado broncoalveolar de pacientes com sarcoidose (MIYARA *et al.*, 2006) e nos sítios de inflamação em modelo da doença aguda enxerto versus hospedeiro (WYSOCKI *et al.*, 2005). De fato, a migração das Tregs foi descrita ser dependente da produção das quimiocinas CCL22 e/ou CCL17 (IELLEN *et al.*, 2001; CURIEL *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2005) e a presença dessas nas lesões de induzidas por *P. brasiliensis* sugere seu envolvimento na migração das células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> em direção às lesões causadas pelo fungo. Tais observações permitem inferir que a secreção de tais ligantes seria proveniente de macrófagos e células dendríticas presentes no infiltrado das lesões granulomatosas assim como ocorre no microambiente tumoral (CURIEL *et al.*, 2004).

Além das quimiocinas CCL22 e CCL17, CCL5 também foi detectada no tecido cutâneo das lesões de pacientes com PCM (CAMPANELLI, 2003), à qual interage com o receptor CCR5, altamente expresso nas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (63%) presentes nas lesões de pacientes com PCM, reforçando a suposição de que o ligante deste receptor (CCL5) também contribui para a migração

das Treg durante a infecção por *P. brasiliensis*. De fato, no modelo experimental da PCM, resultados do nosso laboratório têm revelado que animais deficientes de CCR5 são capazes de inibir o crescimento fúngico como consequência de um menor número de Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> recrutadas ao pulmão (MOREIRA *et al.*, MS em preparação).

Assim sendo, de acordo com estas evidências e das observações de Belkaid & Rouse, (2005) a presença destes fatores quimiotáticos está envolvida com estabelecimento de condições favoráveis à migração das Tregs para os sítios periféricos.

Após a migração das Tregs naturais para os sítios de infecção via quimiocinas, tais células podem se tornar “ativas” e essa ativação reflete-se na produção de citocinas reguladoras IL-10 e TGF-β (revisto por BELKAID & ROUSE, 2005; HUBER *et al.*, 2004). Assim, embora haja controvérsias quanto à exata influência de fatores solúveis sobre a função das Tregs naturais (revisto por SHEVACH, 2002; FEHÉRVARI & SAKAGUCHI, 2004; VON BOHEMER *et al.*, 2005), a presença dos patógenos tem sido definida por criar um microambiente favorável à sobrevivência e ativação das Tregs no sítio de infecção. Baseando-se nessas observações e no fato destas citocinas estarem presentes nas lesões de tecido cutâneo de pacientes com PCM (CAMPANELLI, 2003; PAGLIARI & SOTTO, 2003), outra abordagem desse estudo foi avaliar o perfil da produção de citocinas pelas sub-populações de células T, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, presentes nas lesões induzidas por *P. brasiliensis*.

De forma contrária à população de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, 78% de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando altos níveis de TGF-β<sup>+</sup> foram detectadas nas lesões dos pacientes. Na infecção humana por *Plasmodium falciparum*, um aumento de células caracterizadas quanto ao seu fenótipo como Tregs está associado à secreção de TGF-β, com uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, ao crescimento do parasita *in vivo* (WALTHER *et al.*, 2005). Como exposto anteriormente, sugere-se que as Tregs naturais produzam citocinas em resposta aos antígenos

presentes nos tecidos infectados (revisito por BELKAID & ROUSE, 2005). De fato, a ativação com PHA, por 6h, não aumentou o número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> positivas para as citocinas analisadas (dados não mostrados), sugerindo que a presença de *P. brasiliensis* nas lesões seria um estímulo suficiente para a produção de citocinas as quais contribuem para a sobrevivência de células Tregs “ativas” nos sítios periféricos.

Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> positivas para IL-10 também foram detectadas nessas lesões, sugerindo a presença de diferentes sub-populações de células T CD4<sup>+</sup> com propriedades reguladoras (JONULEIT & SCHMITT, 2003; VIEIRA *et al.*, 2004, LEVINGS *et al.*, 2002) durante a PCM. Ainda, nossos resultados mostraram que algumas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foram positivas para IFN- $\gamma$  (37%) assim como as Tregs naturais presentes no sítios periféricos da infecção crônica experimental por *L. major* (SUFFIA *et al.*, 2006). A pequena proporção dessas pode estar relacionada justamente ao papel regulador das mesmas. Além da presença de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> produtoras de citocinas nas lesões induzidas por *P. brasiliensis*, células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, provavelmente células de memória (já que a maioria dessas células eram CCR4<sup>+</sup> e CD45RO<sup>+</sup>) estão presentes nessas lesões contribuindo para a modulação da resposta imune efetora local durante a PCM humana.

A capacidade de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suprimirem a ativação de células T alogeneicas é uma característica peculiar e inicialmente descrita para essas células (THORNTON & SHEVACH, 1998; DIECKMANN *et al.*, 2001). Desde que detectamos a presença de células fenotipicamente similares às Tregs nas lesões dos pacientes com PCM, nossa próxima etapa foi avaliar a capacidade de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> exercerem sua função sobre a ativação policlonal de células T alogeneicas. Em ensaios de co-cultura, foi possível observar que as T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas das lesões de cinco dos oito pacientes analisados foram capazes de inibir a resposta proliferativa de células T em uma razão 1:10. Curiosamente, essas lesões apresentaram um processo granulomatoso padrão “dimórfico” ou então hiperérgico-benigno com características que as aproximam de uma menor gravidade clínica. De

fato, as células foram isoladas de pacientes com a forma crônica da PCM (exceto RSSR, porém apresentou lesões granulomatosas de padrão hiperérgico). De forma contrária, as células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> incapazes de suprimir a resposta proliferativa foram isoladas de lesões características de um padrão hipoérgico (anérgico-maligno) resultante do desequilíbrio entre os fatores que governam a formação de granulomas compactos capazes de conter as leveduras, condizendo com a forma aguda ou subaguda da PCM. As disfunções nas Tregs, tanto na sua capacidade de suprimir a resposta proliferativa e/ou a secreção de citocinas pró-inflamatórias por células ativadas podem ser observadas em pacientes com psoríase (SUGIYAMA *et al.*, 2005), esclerose múltipla (VIGLIETTA *et al.*, 2004), artrite reumatóide (EHRENSTEIN *et al.*, 2004), sarcoidose (MIYARA *et al.*, 2005) e, correlacionadas com as injúrias teciduais decorrentes de uma inflamação exacerbada.

Ainda que não compreendamos este resultado, uma possível explicação é fundamentada na presença de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  nas lesões analisadas. Assim a proporção de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladoras “ativas” com relação às efetoras CD25<sup>-</sup> (as quais também foram expandidas *in vitro* e, possivelmente se tornaram CD25<sup>+</sup>) pode ser menor, sendo insuficientes para exercerem sua atividade supressora. Deste modo, um maior número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> seria necessário para se observar a supressão (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001; EHRENSTEIN *et al.*, 2004; BOYER *et al.*, 2004; MIYARA *et al.*, 2005). A realização de co-culturas que permitam uma variação no número de T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> seria apropriada, todavia, esses ensaios foram dificultados devido ao rendimento das células da biópsia que, mesmo após expansão *in vitro* por 15 dias, não foi suficiente para realizar todos os ensaios necessários para responder tais questões. Além da variação no número de T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, a análise da expressão de CTLA-4, TGF- $\beta$  de membrana, Foxp3 (cujas moléculas estão correlacionadas com as características funcionais de Tregs naturais) e da integrina  $\alpha_E$ , a qual foi descrita ser expressa em um subtipo de Tregs com forte atividade supressora

(HUEHN *et al.* 2004), seria relevante no sentido de compreender essa heterogeneidade quanto ao efeito supressor das Treg presentes nas lesões dos pacientes com PCM.

Em suma, os dados obtidos neste estudo revelam um possível mecanismo envolvido no controle da resposta imune sistêmica e local durante a PCM. Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> com características fenotípicas e funcionais similares às Tregs naturais estão presentes no sangue periférico e nas lesões de pacientes infectados.

Estudos que permitam uma melhor compreensão entre as Tregs e a ativação de células T efectoras, assim como os mecanismos que modulam a formação, manutenção e resolução dos granulomas induzidos por *P. brasiliensis* podem contribuir no tratamento dos pacientes com esta infecção fúngica. Portanto, estudos que esclareçam a localização, quantidade, fenótipo, especificidade e mecanismos de ação das Tregs são relevantes no sentido de se implantar protocolos terapêuticos que se apliquem nas infecções de caráter crônico, em particular interesse, a PCM.

Assim, poderíamos sugerir que em pacientes com a progressão de um processo granulomatoso organizado, freqüentemente observado na forma crônica da PCM, há um equilíbrio entre células Tregs “ativas” e as funções efectoras da resposta imune. Uma consequência desse balanço seria o controle de uma resposta inflamatória exacerbada com dano tecidual e, portanto, a sobrevivência dos patógenos em focos quiescentes (latência). A persistência de *P. brasiliensis* nos sítios periféricos pode representar um “compromisso” entre patógeno e hospedeiro quando condições homeostáticas se tornam estabelecidas.

→ Células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> com características fenotípicas e funcionais similares às Tregs naturais estão presentes no sangue periférico e nas lesões induzidas por *P. brasiliensis* na PCM humana.

→ A percentagem de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> co-expressando CTLA-4, GITR, TGF-β1 ancorado à membrana ou Foxp3 foi significativamente maior no sangue periférico de pacientes com PCM e tais células apresentaram uma maior atividade supressora quando comparadas às células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas de indivíduos controles.

→ Uma alta frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> no sangue de pacientes com PCM co-expressaram CTLA-4 e altos níveis de Foxp3.

→ A expressão dos ligantes de CCR4, CCL17 e CCL22, associados com a migração de Tregs para os sítios periféricos, foram detectadas nas lesões de pele dos pacientes infectados por *P. brasiliensis*.

→ As células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> isoladas das lesões causadas por *P. brasiliensis* apresentaram uma heterogeneidade quanto à sua função supressora e essa heterogeneidade está supostamente envolvida com a formação do processo granulomatoso durante a PCM.

ANDERSSON, J., BOASSO, A., NILSSON, J., ZHANG, R., SHIRE, N. J., LINDBACK, S., SHEARER, G. M., CHOUGNET, C. A. The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. **J. Immunol.**, v. 174, p. 3143-3147, 2005.

ANNACKER, O., PIMENTA-ARAUJO, R., BURLIN-DEFRANOUX, O., BARBOSA, T.C., CUMANO, A., BANDEIRA, A. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. **J. Immunol.**, v. 166, p. 3008-3018, 2001.

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

BAECHER-ALLAN, C., BROWN, J. A., FREEMAN, G. J., HAFLER, D. A. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, p. 1245-1253, 2001.

BAECHER-ALLAN, C., WOLF, E., HAFLER, D.A. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. **Clin. Immunol.**, v. 115, p. 10-18, 2005.

BAIDA, H., BISELLI, P. J., JUVENALE, M., DEL NEGRO, G. M., MENDES-GIANNINI, M. J., DUARTE, A. J, *et al.* Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 273-278, 1999.

BAUMGART, M., TOMPKINS, F., LENG MATTHIAS HESSE, J. Naturally Occurring CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells Are an Essential, IL-10-Independent Part of the Immunoregulatory Network in *Schistosoma mansoni* Egg-Induced Inflammation. **J. Immunol.**, v. 176, p. 5374-5387, 2006.

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, p. 167-174, 1991.

BELKAID, Y., PICCIRILLO, C. A., MENDEZ, S., SHEVACH, E. M., SACKS, D. L. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 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, p. 353-360, 2005.

BENARD, G., HONG, M. A., DEL NEGRO, G. M., BATISTA, L., SHIKANAI-YASUDA, M. A., DUARTE, A. J. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 7-12, 1996.

BENARD, G., MENDES-GIANNINI, M. J., JUVENALE, M., MIRANDA, E. T., DUARTE, A. J. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, v. 175, p. 1263-1267, 1997.

BENARD, G., ROMANO, C. C., CACERE, C. R., JUVENALE, M., MENDES-GIANNINI, M. J., DUARTE, A. J. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 13, p. 248-252, 2001.

BICALHO, R. N., SANTOS, M. F., DE AGUIAR, M. C., SANTOS, V. R. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. **Oral Dis.**, v. 7, p. 56-60, 2001.

BIREBENT, B., LORHO, R., LECHARTIER, H., DE GUIBERT, S., ALIZADEH, M., VU, N., BEAUPLET, A., ROBILLARD, N., SEMANA, G. Suppressive properties of human

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 3485-3496, 2004.

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

BOYER, O., SAADOUN, D., ABRIOL, J., DODILLE, M., PIETTE, J. C., CACOUB, P., KLATZMANN, D. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixedcryoglobulinemia vasculitis. **Blood**, v. 103, p. 3428-3430, 2004.

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

BRUSKO, T. M., WASSERFALL, C. H., AGARWAL, A., KAPTURCZAK, M.H, ATKINSON, M. A. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 174, p. 5181-5186, 2005.

CACERE, C. R., ROMANO, C. C., MENDES-GIANNINI, M. J., DUARTE, A. J., BENARD, G. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin. Immunol.**, v. 105, p. 215-222, 2002.

CALICH, V. L., KIPNIS, T. L., MARIANO, M., NETO, C. F., DIAS, D. A., SILVA, W. D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*: its opsonic effect and possible significance for an *in vivo* model of infection. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 12, p. 21-30, 1979.

CALVI, S. A., PERACOLI, M. T., MENDES, R. P., MARCONDES-MACHADO, J., FECCHIO, D., MARQUES, S. A., SOARES, A. M. Effect of cytokines on the *in vitro* fungicidal activity of monocytes from paracoccidioidomycosis patients. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 107-113, 2003.

CALVI, S. A., SOARES, A. M., PERACOLI, M. T., FRANCO, M., RUIZ, R. L. JR, MARCONDES-MACHADO, J., FECCHIO, D., MATTOS, M. C., MENDES, R. P. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 1371-1379, 2003.

CAMPANELLI, A. P. **Modulação da resposta imune e inflamatória após infecção por *P. brasiliensis***. 2003. 127f. Doutorado (Tese apresentada para a obtenção do título de Doutor) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2003.

CAMPANELLI, A. P., ROSELINO, A. M., CAVASSANI, K. A., PEREIRA, M. S. F., MORTARA, R. A., BRODSKYN, C. I., GONÇALVES, H. S., BELKAID, Y., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., SILVA, J. S. The CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells of skin lesions from cutaneous leishmaniasis patients exhibit phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **J. Infect. Dis.**, v. 193, 2006. No prelo.

CAMPANELLI, A. P., MARTINS, G. A., SOUTO, J. T., PEREIRA, M. S., LIVONESI, M. C., MARTINEZ, R., SILVA, J. S. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1496-1505, 2003.

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

CHEN, W., JIN, W., HARDEGEN, N., LEI, K. J., LI, L., MARINOS, N., MCGRADY, G., WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1875-1886, 2003.

COFFER, P. J., BURGERING, B. M. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 889-899, 2004.

COUTINHO, Z. F., SILVA, D., LAZERA, M., PETRI, V., OLIVEIRA, R. M., SABROZA, P. C., WANKE, B. Paracoccidiodomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno Saúde Pública**, v. 18, p. 1441-1454, 2002.

CROTT, L. S., VALIM, Y. M., SILVA, C. L., BARBOSA, J. E. The role of the complement system in the neutrophil functions stimulated *in vitro* by an alkali-insoluble cell wall fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 17-27, 1993.

CURIEL, T. J., COUKOS, G., ZOU, L., ALVAREZ, X., CHENG, P., MOTTRAM, P., EVDEMON-HOGAN, M., CONEJO-GARCIA, J. R., ZHANG, L., BUROW, M., ZHU, Y., WEI, S., KRYCZEK, I., DANIEL, B., GORDON, A., MYERS, L., LACKNER, A., DISIS, M. L., KNUTSON, K. L., CHEN, L., ZOU, W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat. Med.**, v. 10, p. 942-949, 2004.

DA SILVA, A. M., BORBA, C. M., DE OLIVEIRA, P. C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, v. 37, p. 165-169, 1994.

DEL NEGRO, G. Outras lesões. Formas de ocorrência rara e associações com outros processos. In: DEL NEGRO, G., LACAZ, C. S., FIORILLO, A. M. **Paracoccidiodomicose (blastomicose sul-americana)**. São Paulo: Savier-Edusp, 1982. p. 229-43.

DIECKMANN, D., BRUETT, C. H., PLOETTNER, H., LUTZ, M. B., SCHULER, G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 247-253, 2002.

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

DOMER, J. E., MURPHY, W., DEEPE, G. S., FRANCO, M. Immunomodulation in the mycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 157-166, 1992.

EHRENSTEIN, M. R., EVANS, J. G., SINGH, A., MOORE, S., WARNES, G., ISENBERG, D. A., MAURI, C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF alpha therapy. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 277-285, 2004.

FEHERVARI, Z., SAKAGUCHI, S. CD4(+) Tregs and immune control. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 1209-1217, 2004.

FEHERVARI, Z., YAMAGUCHI, T., SAKAGUCHI, S. The dichotomous role of IL-2: tolerance versus immunity. **Trends Immunol.**, v. 27, p. 109-11, 2006.

FIGUEIREDO, F., ALVES, L. M., SILVA, C. L. Tumour necrosis factor production *in vivo* and *in vitro* in response to *Paracoccidioides brasiliensis* and the cell wall fractions thereof. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 93, p. 189-194, 1993.

FONTENOT, J. D., GAVIN, M. A., RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, p. 1057-1061, 2003.

FONTENOT, J. D., RUDENSKY, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 331-337, 2005.

FRANCO, M; MONTENEGRO, M. R., MENDES, R. P., MARQUES, S. A; DILLON, N. L. MOTA, N. S. Paracoccidioidomycosis. A recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p. 129-132, 1987.

FRANCO, M., PERACOLI, M. T., SOARES, A., MONTENEGRO, R., MENDES, R. P., MEIRA, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Top. Méd. Mycol.**, v. 5, p. 115-49, 1993.

GALLUCCI, S., LOLKEMA, M., MATZINGER, P. Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 5, p. 1249-1255, 1999.

GONZALEZ, A., SAHAZA, J. H., ORTIZ, B. L., RESTREPO, A., CANO, L. E. Production of pro-inflammatory cytokines during the early stages of experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 391-399, 2003.

GUYOT-REVOL, V., INNES, J. A., HACKFORTH, S., HINKS, T., LALVANI, A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 173, p. 803-810, 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.

HORI, S., TAKAHASHI, T., SAKAGUCHI, S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. **Adv. Immunol.**, v. 81, p. 331-371, 2003.

HUBER, S., SCHRAMM, C., LEHR, H. A., MANN, A., SCHMITT, S., BECKER, C., PROTSCHKA, M., GALLE, P. R., NEURATH, M. F., BLESSING, M. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the *in vivo* expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. **J Immunol.**, v. 173, p. 6526-6531, 2004.

HUEHN, J., HAMANN, A. Homing to suppress: address codes for Treg migration. **Trends Immunol.**, v. 26, p. 632-636, 2005.

HUEHN, J., SIEGMUND, K., LEHMANN, J. C., SIEWERT, C., HAUBOLD, U., FEUERER, M., DEBES, G. F., LAUBER, J., FREY, O., PRZYBYLSKI, G. K., NIESNER, U., DE LA ROSA, M., SCHMIDT, C. A., BRAUER, R., BUER, J., SCHEFFOLD, A., HAMANN, A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 303-313, 2004.

IELLEM, A., MARIANI, M., LANG, R., RECALDE, H., PANINA-BORDIGNON, P., SINIGAGLIA, F., D'AMBROSIO, D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 847-853, 2001.

ITO, T., INABA, M., INABA, K., TOKI, J., SOGO, S., IGUCHI, T., ADACHI, Y., YAMAGUCHI, K., AMAKAWA, R., VALLADEAU, J., SAELAND, S., FUKUHARA, S., IKEHARA, S. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. **J. Immunol.**, v. 163, p. 1409-1419, 1999.

ITOH, M., TAKAHASHI, T., SAKAGUCHI, N., KUNIYASU, Y., SHIMIZU, J., OTSUKA, F., SAKAGUCHI, S. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **J. Immunol.**, v. 162, p. 5317-5326, 1999.

JI, J., MASTERSON, J., SUN, J., SOONG, L. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection **J. Immunol.**, v. 174, p. 7147-7153, 2005.

JONULEIT, H., SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. **J. Immunol.**, v. 171, p. 6323-6327, 2003.

JONULEIT, H., SCHMITT, E., STASSEN, M., TUETTENBERG, A., KNOP, J., ENK, A. H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1285-1294, 2001.

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

KELSEN, J., AGNHOLT, J., HOFFMANN, H. J., ROMER, J. L., HVAS, C. L., DAHLERUP, J. F. FoxP3(+)/CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 141: 549-57.

KINTER, A. L., HENNESSEY, M., BELL, A., KERN, S., LIN, Y., DAUCHER, M., PLANTA, M., MCGLAUGHLIN, M., JACKSON, R., ZIEGLER, S. F., FAUCI, A. S. CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 331-343, 2004.

KURITA, N., OARADA, M., ITO, E., MIYAJI, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 261-267, 1999.

KUROKAWA, C. S., SUGIZAKI, M. F., PERACOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 40, p. 125-135, 1998.

LACAZ, C. S. & RAMOS, H. Anatomia patológica das micoses. **Méd. Cir. Farm.**, v. 246, p. 443-484, 1956.

LEE, I., WANG, L., WELLS, A. D., DORF, M. E., OZKAYNAK, E., HANCOCK, W. W. Recruitment of Foxp3+ T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 1037-1044, 2005.

LEVINGS, M. K., SANGREGORIO, R., RONCAROLO, M. G. Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells suppress naive and memory T-cell proliferation and can be expanded *in vitro* without loss of suppressor function. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1295-1302, 2001.

LEVINGS, M. K., SANGREGORIO, R., SARTIRANA, C., MOSCHIN, A. L., BATTAGLIA, M., ORBAN, P. C., RONCAROLO, M. G. Human CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 1335-1346, 2002.

LIN, C. H., HUNIG, T. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 626-638, 2003.

LINSLEY, P. S., GREENE, J. L., TAN, P., BRADSHAW, J., LEDBETTER, J. A., ANASETTI, C., DAMLE, N. K. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1595-15604, 1992.

LUNDGREN, A., STROMBERG, E., SJOLING, A., LINDHOLM, C., ENARSSON, K., EDEBO, A., JOHNSON, E., SURI-PAYER, E., LARSSON, P., RUDIN, A., SVENNERHOLM, A. M., LUNDIN, B. S. Mucosal FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 523-531, 2005.

MALOY, K. J., POWRIE, F. Fueling regulation: IL-2 keeps CD4<sup>+</sup> Treg cells fit. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 1071-1072, 2005.

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

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

MANZOTTI, C. N., TIPPING, H., PERRY, L. C., MEAD, K. I., BLAIR, P. J., ZHENG, Y., SANSOM, D. M. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 2888-2896, 2002.

MCHUGH, R. S., WHITTERS, M. J., PICCIRILLO, C. A., YOUNG, D. A., SHEVACH, E. M., COLLINS, M., BYRNE, M. C. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. **Immunity**, v. 16, p. 311–323, 2002.

MCKEE, A. S., PEARCE, E. J. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J. Immunol.**, v. 173, p. 1224-1231, 2004.

MENDES, R. P. Quadro clínico. In: VERONESI, R., FONSECA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 1803.

MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations of paracoccidioidomycosis. In: FRANCO M. F., LACAZ, C. S, RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1994. cap. 19, p. 233-58.

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. Exp. Med.**, v. 200, p. 201-10, 2004.

MEKALA, D. J., ALLI, R. S., GEIGER, T. L. IL-10-dependent infectious tolerance after the treatment of experimental allergic encephalomyelitis with redirected CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, p. 11817-1822, 2005

MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 841-55, 2004.

MIYARA, M., AMOURA, Z., PARIZOT, C., BADOUAL, C., DORGHAM, K., TRAD, S., KAMBOUCHNER, M., VALEYRE, D., CHAPELON-ABRIC, C., DEBRE, P., PIETTE, J. C., GOROCHOV, G. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 359-370, 2006.

MOCELLIN, S., PANELLI, M. C., WANG, E., NAGORSEN, D., MARINCOLA, F. M. The dual role of IL-10. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 36-43, 2003.

MONTAGNOLI, C., BACCI, A., BOZZA, S., GAZIANO, R., MOSCI, P., SHARPE, A. H., ROMANI, L. B7/CD28-dependent CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6298-6308, 2002.

MONTENEGRO, M. R. G., FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M. F., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1994. cap. 9, p. 131-150.

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

MUNN, D. H., SHARMA, M. D., MELLOR, A. L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4<sup>+</sup> T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 4100-4110, 2004.

MUSSATI, C. C., PERAÇOLI, M. S. T., SOARES, A., M. V. C., REZKALLAH-IWASSO, M. T. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: FRANCO M. F., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1994. cap. 11, p. 175-184.

NAKAMURA, K., KITANI, A., STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 629-644, 2001.

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

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

NG, W. F., DUGGAN, P. J., PONCHEL, F., MATARESE, G., LOMBARDI, G., EDWARDS, A. D., ISAACS, J. D., LECHLER, R. I. Human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. **Blood**, v. 98, p. 2736–2744, 2001.

NG-CASHIN, J., KUHNS, J. J., BURKETT, S. E., POWDERLY, J. D., CRAVEN, R. R., VAN DEVENTER, H. W., KIRBY, S. L., SERODY, J. S. Host absence of CCR5 potentiates dendritic cell vaccination. **J. Immunol.**, v. 170, p. 4201-4208, 2003.

NISHIMURA, E., SAKIHAMA, T., SETOGUCHI, R., TANAKA, K., SAKAGUCHI, S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. **Int. Immunol.**, v.16, p. 1189-201, 2004.

O'GARRA, A., VIEIRA, P. L., VIEIRA, P., GOLDFELD, A. E. IL-10-producing and naturally occurring CD4<sup>+</sup>Tregs: limiting collateral damage. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 1372-1378, 2004.

O'GARRA, A., VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat. Med.**, v. 10, p. 801-805, 2004.

OLIVEIRA, S. J., MAMONI, R. L., MUSATTI, C. C., PAPAORDANOU, P. M., BLOTTA, M. H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 139-44, 2002.

OSTROUKHOVA, M., SEGUIN-DEVAUX, C., ORISS, T. B., DIXON-MCCARTHY, B., YANG, L., AMEREDES, B. T., CORCORAN TE, RAY A. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 28-38, 2004.

OSWALD-RICHTER, K., GRILL, S. M., SHARIAT, N., LEELAWONG, M., SUNDRUD, M. S.D., HAAS, W., UNUTMAZ, D. HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. **PLoS Biol.**, v. 2, p. 955-966, 2004.

PAGLIARI, C., SOTTO, M. N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **Am. J. Dermatopathol.**, v. 25, p. 107-112, 2003.

PARIS, S., DURAN-GONZALEZ, D., MARIAT, F. Nutritional studies on *Paracoccidioides brasiliensis*: the role of organic sulfur in dimorphism. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 85-82, 1985.

PERAÇOLI, M. T., MOTA, N. G., MONTENEGRO, M. R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster. Morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. **Mycopathologia**, v. 79, p. 7-17, 1982.

PERAÇOLI, M. S. T. **Paracoccidioidomicose: Imunidade inata e adquirida na interação parasita-hospedeiro.** 2000. 158f. Livre docência (Texto apresentado para obtenção do título de Professor Livre-Docente) Instituto de Biociências, Campus Botucatu - UNESP, Botucatu, 2000.

PERAÇOLI, M. T. S., SOARES, A., M. V. C. Imunologia da Paracoccidioidomicose. In: TOSTA, C. E. **Imunologia das Infecções**. Uberaba: FUNEPU; 1992. p.15-36.

PESTKA, S., KRAUSE, C. D., SARKAR, D., WALTER, M. R., SHI, Y., FISHER, P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 929-979, 2004.

PICCIRILLO, C. A., THORNTON, A. M. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 374-380, 2004.

PINA, A., SALDIVA, P. H., RESTREPO, L. E., CALICH, V. L. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J. Leukoc. Biol.**, v. 7, 2006. No prelo.

PINA, A., VALENTE-FERREIRA, R. C., MOLINARI-MADLUM, E. E., VAZ, C. A., KELLER, A., C., CALICH, V. L. Absence of interleukin-4 determines less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2369-78, 2004.

RAGHAVAN, S., FREDRIKSSON, M., SVENNERHOLM, A. M., HOLMGREN, J., SURIPAYER, E. Absence of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 132, p. 393-400, 2003.

READ, S., MALMSTROM, V., POWRIE, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 295-302, 2000.

RESTREPO, B. I., MCEWEN, J. G., SALAZAR, M. E., RESTREPO, A. Morphological development of the conidia produced by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **J. Med.Vet. Mycol.**, v. 24, p. 337-339, 1986.

REZKALLAH-IWASSO, M. T. R., SOARES, A. M. V. C., SANTANA, J., SARTORI, A., MENDES, R. P., MARQUES, S. A., PERAÇOLI, M. T. S. Interleukin-2 in paracoccidioidomycosis. **Rev. Arg. Micol.**, v. 15, p. 59, 1992.

ROBLEDO, M. A., GRAYBILL, J. R., AHRENS, J., RESTREPO, A., DRUTZ, D. J., ROBLEDO, M. Host defense against experimental paracoccidioidomycosis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 125, p. 563-567, 1982.

ROMANO, C. C., MENDES-GIANNINI, M. J., DUARTE, A. J., BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine**, v. 18, p. 149-157, 2002.

ROMANO, C. C., MENDES-GIANNINI, M. J., DUARTE, A. J., BENARD, G. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. **Clin. Immunol.**, v. 114, p. 86-94, 2005.

RONCHETTI, S., G. NOCENTINI, C. RICCARDI, P. P. PANDOLFI. Role of GITR in activation response of T lymphocytes. **Blood**, v. 100, p. 350-352, 2002.

SAKAGUCHI, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v. 101, p. 455-458, 2000.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 345-352, 2005.

SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N., ASANO, M., ITOH, M., TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155, p. 1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI, N., SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S., SAKIHAMA, T., ITOH, M., KUNIYASU, Y., NOMURA, T., TODA, M., TAKAHASHI, T. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 18-32, 2001.

SAN-BLAS, F. & SAN-BLAS, G.. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: SZANISZLO, P. J., **Fungal Dimorphism**. New York: Plenum; 1985. p. 93-120.

SAN-BLAS, G. & SAN-BLAS, F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis*. Dimorphism. In: FRANCO, M. F., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1994. cap. 4, p. 49-66.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 99-113, 1993.

SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F. Paracoccidioides brasiliensis: cell wall structure and virulence. **Mycopathologia**, v. 62, p. 77-86, 1977.

SHEVACH, E. M. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 389-400, 2002.

SHEVACH, E. M. Regulatory T cells in autoimmunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 423-49, 2000.

SHIMIZU, J., YAMAZAKI, S., TAKAHASHI, T., ISHIDA, Y., SAKAGUCHI, S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 135-42, 2002.

SIDRIM, J. J. C. ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de autores contemporâneos**. Guanabara, Rio de Janeiro, p. 388, 2004.

SOUTO, J. T., FIGUEIREDO, F., FURLANETTO, A., PFEFFER, K., ROSSI, M. A., SILVA, J. S. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 156, p. 1811-1820, 2000.

STEPHENS, L. A., MOTTET, C., MASON, D., POWRIE, F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity *in vitro*. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1247-1254, 2001.

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, p. 777-788, 2006.

SUFFIA, I., RECKLING, S. K., SALAY, G., BELKAID, Y. A role for CD103 in the retention of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg and control of Leishmania major infection. **J. Immunol.**, v. 174, p. 5444-5455, 2005.

SUGIYAMA, H., GYULAI, R., TOICHI, E., GARACZI, E., SHIMADA, S., STEVENS, S. R., MCCORMICK, T. S., COOPER, K. D. Dysfunctional blood and target tissue CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. **J. Immunol.**, v. 174, p. 164-173, 2005.

SUGIZAKI, M. F., PERACOLI, M. T., MENDES-GIANNINI, M. J., SOARES, A. M., KUROKAWA, C. S., MENDES, R. P., MARQUES, S. A., FREIRE-MAIA, D. V. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 37, p. 277-284, 1999.

SURI-PAYER, E., AMAR, A. Z., THORNTON, A. M., SHEVACH, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. **J. Immunol.**, v. 160, p. 1212-1218, 1998.

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

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

TAKAHASHI, T., TAGAMI, T., YAMAZAKI, S., UEDE, T., SHIMIZU, J., SAKAGUCHI, N., MAK, T. W., SAKAGUCHI, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 303-310, 2000.

TANCHOT, C., VASSEUR, F., PONTOUX, C., GARCIA, C., SARUKHAN, A. Immune regulation by self-reactive T cells is antigen specific. **J Immunol**, v. 172, p. 4285-4291, 2004.

TANG, Q., BODEN, E. K., HENRIKSEN, K. J., BOUR-JORDAN, H., BI, M., BLUESTONE, J. A. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 2996–3005, 2004.

TANG, Q., HENRIKSEN, K. J., BODEN, E. K., TOOLEY, A. J., YE, J., SUBUDHI, S. K., ZHENG, X. X., STROM, T. B., BLUESTONE, J. A. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 171, p. 3348-3352, 2003.

THORNTON, A. M., DONOVAN, E. E., PICCIRILLO, C. A., SHEVACH, E.M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell suppressor function. **J. Immunol.**, v. 172, p. 6519-6523, 2004.

THORNTON, A. M., SHEVACH, E. M. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. **J. Exp.Med.**, v. 188, p. 287–296, 1998.

THORNTON, A. M., SHEVACH, E. M. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. **J. Immunol.**, v. 164, p. 183-90, 2000.

TONE, M., TONE, Y., ADAMS, E., YATES, S. F., FREWIN, M. R., COBBOLD, S. P., WALDMANN, H. Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 100, p. 15059-15064, 2003.

VAHLENKAMP, T. W., TOMPKINS, M. B., TOMPKINS, W. A. The role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in viral infections. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 108, p. 219-225, 2005.

VIEIRA, P. L., CHRISTENSEN, J. R., MINAEE, S., O'NEILL, E. J., BARRAT, F. J., BOONSTRA, A., BARTHLOTT, T., STOCKINGER, B., WRAITH, D. C., O'GARRA, A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5986-5993, 2004.

VIGLIETTA, V., ALLAN, C., WEINER, H. L., BAECHE-ALLAN, C., HAFLE, D. A. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **J. Exp. Med.**, v. 199, p. 971-979, 2004.

VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 338-344, 2005.

WALTHER, M., TONGREN, J. E., ANDREWS, L., KORBEL, D., KING, E., FLETCHER, H., ANDERSEN, R. F., BEJON, P., THOMPSON, F., DUNACHIE, S. J., EDELE, F., DE SOUZA, J. B., SINDEN, R. E., GILBERT, S. C., RILEY, E. M., HILL, A. V. Upregulation of TGF-

beta, FOXP3, and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. **Immunity**, v. 23, p. 287-296, 2005.

WYSOCKI, C. A., JIANGX, Q., PANOSKALTSIS-MORTARI, A., TAYLOR, P. A. , MCKINNON, K. P., SU, L. , BLAZAR, B. R., SERODY, J. S. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. **Blood**, v. 106, p. 3300-3307, 2005.

ZUANY-AMORIM, C., SAWICKA, E., MANLIUS, C., LE MOINE, A., BRUNET, L. R., KEMENY, D. M., BOWEN, G., ROOK, G., WALKER, C. Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells. **Nat. Med.**, v. 8, p. 625-629, 2002.

*Pacientes com paracoccidioidomicose: idade, sexo, etnia, forma clínica da doença, título de anticorpos na reação de contra imunoelektroforese e local da lesão biopsiada*

<b>Paciente</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Cor</b>	<b>Forma Clínica</b>	<b>CIE</b>	<b>Biópsia</b>
<sup>a</sup> BLF	50	M	Branca	Crônica	1/512	Mucosa
<sup>a</sup> JCS	32	M	Mulata	Aguda	1/256	Pele
<sup>a</sup> CJC	51	M	Branca	Crônica	1/64	Pele
<sup>a</sup> RSSR	40	F	Branca	Aguda	1/1024	Pele
<sup>a,b</sup> JDT	33	M	Mulata	Subaguda	1/256	Pele
<sup>a,b</sup> ABF	47	M	Mulata	Crônica	1/1024	Pele
<sup>a</sup> JAGA	53	M	Mulata	Aguda	1/32	Pele
<sup>a</sup> GSS	34	M	Mulata	Crônica	1/256	Pele
<sup>a,b</sup> LAC	40	M	Negra	Crônica	1/128	-
<sup>a,b</sup> AM	70	M	Branca	Crônica	1/128	-
<sup>a,b</sup> JG	46	M	Branca	Crônica	1/256	-
<sup>a,b</sup> JB	45	M	Branca	Crônica	1/16	-
<sup>a,b</sup> ALO	56	M	Parda	Crônica	1/8	-
<sup>a,b</sup> JFB	70	M	Negra	Crônica	1/128	-
<sup>b</sup> CAM	59	M	Branca	Crônica	1/256	Mucosa
<sup>b</sup> LCL	59	M	Branca	Crônica	1/16	Mucosa
<sup>b</sup> MR	52	M	Parda	Crônica	1/32	Pele
<sup>b</sup> AO	64	M	Branca	Crônica	1/64	Mucosa
<sup>b</sup> JMS	64	M	Branca	Crônica	NR	Mucosa
<sup>b</sup> CM	60	M	Mulata	Crônica	1/256	Pele
<sup>b</sup> LDS	64	M	Mulata	Crônica	1/128	Mucosa

<sup>b</sup> MFS	57	M	Parda	Crônica	1/1024	Mucosa
<sup>b</sup> DJR	38	M	Branca	Crônica	1/215	Mucosa
<sup>b</sup> LJS	50	M	Branca	Crônica	1/512	Mucosa
<sup>b</sup> CHL	45	M	Branca	Crônica	1/256	Mucosa
<sup>b</sup> SAS	48	M	Branca	Crônica	1/128	Pele
<sup>b</sup> DJST	71	M	Branca	Crônica	1/32	Pele
<sup>b</sup> SF	51	M	Branca	Crônica	1/16	Pele
<sup>b</sup> JACR	47	M	Branca	Crônica	1/4	Mucosa
<sup>b</sup> VMP	27	F	Branca	Subaguda	1/1024	-
<sup>b</sup> FGS	21	F	Branca	Subaguda	1/256	-
<sup>b</sup> SLTD	31	M	Branca	Crônica	1/128	-
<sup>b</sup> EVS	22	M	Negra	Subaguda	1/2048	-
<sup>b</sup> FOC	56	M	Branca	Crônica	1/256	-
<sup>b</sup> JDF	41	M	Branca	Crônica	1/32	-
<sup>b</sup> CMC	49	M	Branca	Crônica	NR	-
<sup>b</sup> JL	71	M	Branca	Crônica	1/1	-
<sup>b</sup> AMP	67	M	Branca	Crônica	1/8192	-
<sup>b</sup> IAF	56	M	Branca	Crônica	1/128	-
<sup>b</sup> RPE	58	M	Branca	Aguda	1/256	-
<sup>b</sup> P67	36	M	Branca	Crônica	1/2048	-
<sup>b</sup> MRP	38	M	Mulata	Crônica	1/256	-
<sup>c</sup> RHL	36	M	Branca	Crônica	1/256	Mucosa
<sup>c</sup> AM	43	M	Branca	Crônica	1/32	Pele

(-) não foi realizada a biópsia

(a) ensaios de co-cultura

- (b) fenotipagem por citometria (sangue periférico e biópsia quando realizada)
- (C) não foram incluídas nesse estudo devido à contaminação nas culturas de células

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)