

**ELISEU FRANK DE ARAÚJO**

**A IDO CONTROLA A CARGA FÚNGICA E A IMUNIDADE CELULAR  
DE CAMUNDONGOS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES À INFECÇÃO  
PELO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de São  
Paulo, para obtenção do Título de Mestrado  
em Ciências (Imunologia).**

**São Paulo**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**ELISEU FRANK DE ARAÚJO**

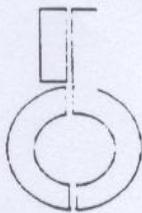
**A IDO CONTROLA A CARGA FÚNGICA E A IMUNIDADE CELULAR  
DE CAMUNDONGOS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES À INFECÇÃO  
PELO *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS***

**Dissertação apresentada ao Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do Título de  
Mestrado em Ciências (Imunologia).**

**Área de concentração: Imunologia  
Orientador(a): Profa. Dra. Vera Lúcia  
Calich**

**São Paulo**

**2009**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail:

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **76** nas fls. **7** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Vera Lúcia Garcia Calich, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Paracoccidioidomicose pulmonar. Fatores do fungo e do hospedeiro que influenciam a resposta imune e a gravidade da doença**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Adriana Pina, Laura Raquel Rios Ribeiro e Simone Bernardino** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.11.2004**.

São Paulo, 24 de novembro de 2004.

Profª. Dra. Marília C. Leite Seeiaender  
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira  
Secretário da CEEA

## **AGRADECIMENTOS**

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

*Aos meus pais, Manuel e Amélia que me amaram, cuidaram de mim e me ofereceram o que eles tinham de melhor. Tenham certeza de que todas as minhas conquistas são mais de vocês do que minhas.*

*À Daiana, por compartilhar todos os meus sentimentos, pelo valioso apoio, pela dedicação e paciência em todos os momentos.*

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

*Aos colegas do laboratório pela convivência, pelos sorrisos e pela disponibilidade em ajudar: Adriana Pina, Maira Felonato, Simone Bernardino, Claudia Feriotti, Flávio Loures, Tânia Costa, Bruno Motta e Wagner Alves;*

*A Profa. Dra. Ana Campa, Profa. Dra. Sônia Jancar Negro e Profa. Dra. Maria Heloisa Blotta pela rica participação no exame de qualificação de mestrado;*

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

*À Regina de Luca pela disponibilidade de camundongos para a realização dos experimentos;*

*Aos funcionários da secretaria Jotelma Ribeiro, Amarildo Utiana (in memorian), Amanda Souza e Eni;*

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

*Aos funcionários da Biblioteca SBIB que contribuíram na elaboração, na revisão textual e no apoio e suporte de informática das diretrizes para elaboração desta dissertação;*

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

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim; esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da tristeza. Todo caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta.”

*(Guimarães Rosa)*

## RESUMO

ARAÚJO, E.F. **AIDO controla a carga fúngica e a imunidade celular de camundongos suscetíveis e resistentes à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis***. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de evolução aguda, subaguda ou crônica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb). O propósito deste trabalho foi investigar *in vitro* e *in vivo* o efeito da indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) na infecção causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* utilizando camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Na PCM, os mecanismos de regulação mediada pela imunidade inata e celular ainda não estão totalmente esclarecidos. Os macrófagos possuem uma enzima induzida por IFN- $\gamma$ , a indolamine 2,3-dioxigenase (IDO), que catalisa o metabolismo do triptofano ao longo da via das quinureninas, inibindo a proliferação de microorganismos intracelulares. O papel da IDO na PCM murina, no entanto, nunca havia sido investigado. Assim, o objetivo do nosso trabalho foi investigar *in vitro* e *in vivo*, o papel da IDO nos mecanismos de imunoproteção de imunidade inata e adquirida de camundongos suscetíveis (B10.A) e resistentes (A/J) ao fungo *P.brasiliensis*. Macrófagos peritoneais induzidos com tioglicolato, previamente ativados ou não por IFN- $\gamma$ , foram co-cultivados com o fungo. 1-metil-triptofano (1MT, 1mM), um inibidor específico da enzima IDO foi utilizado para caracterizar a função da IDO nos mecanismos secretores e fungicidas de macrófagos. A gravidade da infecção, a produção de NO e de quinurenina foram avaliados após 48 horas. Pudemos demonstrar que 1MT inibe a atividade fungicida de macrófagos B10.A e A/J como evidenciado pelo aumento de carga fúngica nas culturas tratadas com a droga. Resultados equivalentes foram obtidos com macrófagos pré-ativados ou não com IFN- $\gamma$ . Nos experimentos *in vivo*, camundongos B10.A e A/J não tratados e tratados com 1MT (5mg/ml/animal) foram infectados pela via i.t. com 1 milhão de leveduras viáveis de Pb e sacrificados 2 e 8 semanas pós-infecção. Comparados com os grupos controle, camundongos B10.A e A/J 1MT-tratados apresentaram maior carga fúngica pulmonar com alterações nos níveis de NO apenas nos animais A/J na oitava semana pós-infecção. Depois de 2 semanas 1MT não influencia a frequência de leucócitos infiltrantes do pulmão de camundongos A/J, mas induz um maior afluxo de células TCD4+ e T CD8 + nos camundongos B10.A. Além disso, tanto em camundongos A/J como em B10.A ocorre um efeito tardio de IDO sobre a

expansão de células TCD4+. Em ambas as linhagens de camundongos, IDO mostrou-se indutora de células T regulatórias e apoptose de linfócitos. Este trabalho demonstrou pela primeira vez que a enzima IDO desempenha um duplo papel na PCM experimental murina, tanto de camundongos suscetíveis como resistentes. A enzima exerceu evidente efeito fungicida mas ao mesmo tempo regula negativamente a imunidade T-mediada que é um dos mecanismos efetores mais importantes contra esta micose profunda.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*. Indolamina-2,3-dioxigenase. 1-metil-triptofano. Linfócitos. Macrófagos.

## **ABSTRACT**

ARAÚJO, E.F. **IDO controls the fungal loads and cellular immunity in pulmonary paracoccidioidomycosis developed by susceptible and resistant mice to the fungus.** 2009. 106 p. Master Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the inhalation of *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*) spores, is a major pulmonary fungal disease in South America. In PCM, the regulatory mechanisms mediated by innate and cellular immunity are still unclear. Macrophages have the IFN- $\gamma$ -inducible enzyme, the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) which catalyses the tryptophan metabolism along the kynurenine pathway, inhibiting the proliferation of intracellular microorganisms. The role of IDO in murine PCM, however, was never previously investigated. Thus, the aim of our work was to investigate *in vitro* and *in vivo* the role of IDO in the immunoprotection of resistant (A/J) and susceptible (B10.A) mice against *Pb* infection. Thyoglycolate-induced peritoneal macrophages previously activated or not by IFN- $\gamma$ , were co-cultivated with fungal cells. 1-methyl-DL-tryptophan (1MT, 1 mM) was used in some cultures to inhibit IDO activity. The severity of infection and NO production were assessed 48h later by CFU assays and the Griess reaction, respectively. We could demonstrate that 1MT inhibits the fungicidal activity of both, B10.A and A/J macrophages as evidenced by the increased fungal loads obtained from 1MT-treated cultures. Equivalent results were obtained with normal and IFN- $\gamma$  activated macrophages. For *in vivo* experiments, normal and 1MT-treated (5 mg/ml) B10.A and A/J mice were infected by the i.t. route with one million yeast cells and sacrificed 2 and 8 weeks post-infection. Compared with control groups, 1MT-treated B10.A and A/J mice presented higher pulmonary fungal burdens and minor alterations in the levels of pulmonary NO. After week 2 post infection treatment with 1MT did not influence the frequency in lung infiltrating leukocytes of A/J mice but induced increased frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the lungs of B10.A mice. At week 8, however, IDO affected the expansion CD4<sup>+</sup> T cells in both, B10.A and A/J mice. In addition, in both mouse strains IDO was shown to induce increased numbers of apoptotic lymphocytes. This work demonstrated for the first time that the enzyme IDO plays a dual role in murine PCM of susceptible and resistant mice. A protective effect was mediated by tryptophan starvation which results in diminished fungal loads associated with

immunossuppressive activity on T cell immunity, the major protective mechanisms of hosts against *P.brasiliensis* infection.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*. Indoleamine-2,3-dioxygenase. 1-methyl-tryptophan. Lymphocytes. Macrophages.

## *LISTA DE ILUSTRAÇÕES*

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b>  | <b>Efeito da inibição de IDO na atividade fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos B10.A e A/J</b>  | <b>44</b> |
| <b>Figura 2.</b>  | <b>Inibição da atividade fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos B10.A e A/J pelo pré-tratamento com 1MT</b>   | <b>45</b> |
| <b>Figura 3.</b>  | <b>Efeito da inibição de IDO na produção de NO por macrófagos peritoneais de animais B10.A e A/J</b>  | <b>47</b> |
| <b>Figura 4.</b>  | <b>Efeito da inibição de IDO e de NO na atividade fungicida de macrófagos peritoneais de animais B10.A e A/J</b>  | <b>49</b> |
| <b>Figura 5.</b>  | <b>Influência do tratamento com 1MT na produção de IL-12 por macrófagos de camundongos B10.A e A/J</b>  | <b>51</b> |
| <b>Figura 6.</b>  | <b>Influência do tratamento com 1MT na produção de TNF-<math>\alpha</math> por macrófagos de camundongos B10.A e A/J</b>  | <b>53</b> |
| <b>Figura 7.</b>  | <b>Influência do tratamento com 1MT na produção de MCP-1 por macrófagos de camundongos B10.A e A/J</b>  | <b>55</b> |
| <b>Figura 8.</b>  | <b>Influência do tratamento com 1MT na produção de IL-6 por macrófagos de camundongos B10.A e A/J</b>   | <b>57</b> |
| <b>Figura 9.</b>  | <b>Influência do tratamento com 1MT na produção de TGF-<math>\beta</math> por macrófagos de camundongos B10.A e A/J</b>   | <b>59</b> |
| <b>Figura 10.</b> | <b>Influência do tratamento com 1MT na produção de quinurenina por macrófagos de camundongos B10.A e A/J</b>  | <b>61</b> |
| <b>Figura 11.</b> | <b>Avaliação da gravidade da doença por contagem de UFC nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas de infecção</b>   | <b>63</b> |
| <b>Figura 12.</b> | <b>Influência do 1MT na presença de quinurenina em homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas e infecção</b>   | <b>64</b> |
| <b>Figura 13.</b> | <b>Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-12, IFN-<math>\gamma</math> e TNF-<math>\alpha</math> nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas e infecção</b> | <b>66</b> |
| <b>Figura 14.</b> | <b>Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-10 e IL-4 nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas e infecção</b>   | <b>67</b> |
| <b>Figura 15.</b> | <b>Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de TGF-<math>\beta</math>, IL-6, IL-23 e IL-17 nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas e infecção</b>              | <b>68</b> |

## *LISTA DE ILUSTRAÇÕES*

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| <b>Figura 16.</b> | <b>Influência do tratamento com 1MT nas populações de leucócitos infiltrantes de pulmão nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas e infecção</b> | <b>71</b> |
| <b>Figura 17.</b> | <b>Quantificação de macrófagos infiltrantes de pulmão de camundongos B10.A e A/J após 2 e 8 semanas e infecção</b>   | <b>72</b> |
| <b>Figura 18.</b> | <b>Frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> presentes nos pulmões de camundongos B10.A e A/J após 2 e 8 semanas e infecção</b>           | <b>74</b> |
| <b>Figura 19.</b> | <b>Frequência de linfócitos apoptóticos presentes nos pulmões de camundongos B10.A e A/J após 2 e 8 semanas e infecção</b>   | <b>75</b> |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>Ac</b>                        | <b>Anticorpo</b>  |
| <b>AcM</b>                       | <b>Anticorpo monoclonal</b>   |
| <b>Ag</b>                        | <b>Antígeno</b>   |
| <b>AG</b>                        | <b>Aminoguanidina</b>   |
| <b>APC</b>                       | <b>Célula apresentadora de antígeno</b>   |
| <b>BHI</b>                       | <b>Infusão de cérebro e coração</b>   |
| <b>C3b</b>                       | <b>Proteína opsonina componente do sistema complemento</b>  |
| <b>CCL22</b>                     | <b>Quimiocina CCL22</b>   |
| <b>CXCL9</b>                     | <b>Quimiocina CXCL9</b>   |
| <b>CXCL10</b>                    | <b>Quimiocina CXCL10</b>  |
| <b>CCL5</b>                      | <b>Quimiocina CCL5</b>  |
| <b>CCR4</b>                      | <b>Receptor para quimiocina CCL22</b>   |
| <b>CCR5</b>                      | <b>Receptor para quimiocina CC5</b>   |
| <b>CD11b</b>                     | <b>Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides ou Mac-1</b>                  |
| <b>CD11c</b>                     | <b>Marcador de expressão celular para monócitos e células mielóides, ou CR4</b>                   |
| <b>CD25</b>                      | <b>Marcador de ativação celular em linfócitos, cadeia <math>\alpha</math> do receptor de IL-2</b> |
| <b>CD4</b>                       | <b>Marcador para linfócito Th1/Th2, co receptor para molécula MHC classe II</b>                   |
| <b>CD40</b>                      | <b>Molécula coestimuladora presente em MØ, DC, linfócito B, liga-se ao CD40L</b>                  |
| <b>CD69</b>                      | <b>Marcador de ativação celular inicial para linfócitos T e B</b>                                 |
| <b>CD8</b>                       | <b>Marcador para linfócito T citotóxico, co receptor para molécula MHC classe I</b>               |
| <b>CD80</b>                      | <b>Molécula coestimuladora ou B7.1, presente em monócitos, liga-se em CD28 e CTLA-4</b>           |
| <b>CD86</b>                      | <b>Molécula coestimuladora ou B7.2, presente em monócitos, DC, liga-se ao CD28 e CTLA-4</b>       |
| <b>CD8<math>\alpha</math>+DC</b> | <b>Célula dendrítica linfóide com o marcador CD8<math>\alpha</math></b>                           |
| <b>CpG</b>                       | <b>Sequência de DNA com bases Citosina e Guanina</b>  |
| <b>CTLA-4</b>                    | <b>“Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen”</b>  |
| <b>D.O.</b>                      | <b>Densidade óptica</b>   |
| <b>DC</b>                        | <b>Célula dendrítica</b>  |
| <b>E.P.</b>                      | <b>Erro padrão</b>  |
| <b>ELISA</b>                     | <b>“Enzyme-linked-immunosorbent assay”</b>  |
| <b>FA</b>                        | <b>Forma adulta da paracoccidiodomicose</b>   |
| <b>FACS</b>                      | <b>“Fluorescence-activated cell sorting”</b>  |
| <b>FITC</b>                      | <b>anticorpo marcado com isotiocinado de fluoresceína</b>   |
| <b>FJ</b>                        | <b>Forma Juvenil da paracoccidiodomicose</b>  |
| <b>Foxp3</b>                     | <b>“Forkhead family of transcriptional regulator Foxp3”</b>                                       |
| <b>FSC</b>                       | <b>“forward scatter”, tamanho celular</b>   |
| <b>GITR</b>                      | <b>“Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor”</b>                                    |
| <b>gp 43</b>                     | <b>Glicoproteína de 43 kilodalton</b>   |
| <b>i.p.</b>                      | <b>Intraperitoneal</b>  |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>i.t.</b>                    | <b>Intratraqueal</b>  |
| <b>Ia<sup>k</sup></b>          | <b>Marcador para expressão de MHC classe II em monócitos</b>  |
| <b>iC3b</b>                    | <b>Fragmento protéico integrante do sistema complemento</b>   |
| <b>IDO</b>                     | <b>“indoleamine 2,3-dioxygenase”</b>                          |
| <b>INDO</b>                    | <b>Gene da indolamina-2,3-dioxygenase</b>                     |
| <b>IFN-<math>\alpha</math></b> | <b>Interferon-<math>\alpha</math></b>                         |
| <b>IFN-<math>\beta</math></b>  | <b>Interferon-<math>\beta</math></b>                          |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | <b>Interferon-<math>\gamma</math></b>                         |
| <b>Ig</b>                      | <b>Imunoglobulina</b>   |
| <b>IgA</b>                     | <b>Imunoglobulina A</b>                                       |
| <b>IgE</b>                     | <b>Imunoglobulina isótipo E</b>                               |
| <b>IgG</b>                     | <b>Imunoglobulina isótipo G</b>                               |
| <b>IgG 2</b>                   | <b>Imunoglobulina isótipo 2</b>                               |
| <b>IgG 2a</b>                  | <b>Imunoglobulina isótipo 2a</b>                              |
| <b>IgG 4</b>                   | <b>Imunoglobulina isótipo 4</b>                               |
| <b>IL-1</b>                    | <b>Interleucina 1</b>   |
| <b>IL-2</b>                    | <b>Interleucina 2</b>   |
| <b>IL-4</b>                    | <b>Interleucina 4</b>   |
| <b>IL-5</b>                    | <b>Interleucina 5</b>   |
| <b>IL-10</b>                   | <b>Interleucina 10</b>  |
| <b>IL-12</b>                   | <b>Interleucina 12</b>  |
| <b>IL-17</b>                   | <b>Interleucina 17</b>  |
| <b>IL-23</b>                   | <b>Interleucina 23</b>  |
| <b>1MT</b>                     | <b>1-metil-triptofano</b>                                     |
| <b>iNOS</b>                    | <b>Óxido nítrico sintase induzida</b>                         |
| <b>KO</b>                      | <b>“Knockout” ou deficiente</b>                               |
| <b>L-NAME</b>                  | <b>“N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester”</b>           |
| <b>LPS</b>                     | <b>Lipossacáride de bactéria GRAM negativa</b>                |
| <b>MCP-1</b>                   | <b>“Monocyte chemoattractant protein-1”</b>                   |
| <b>MHC II</b>                  | <b>Complexo principal de histocompatibilidade classe II</b>   |
| <b>MØ</b>                      | <b>Macrófago</b>  |
| <b>MR</b>                      | <b>Receptor de manose</b>                                     |
| <b>MyD88</b>                   | <b>Proteína adaptadora MyD88</b>                              |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | <b>Fator nuclear <math>\kappa</math>B</b>                     |
| <b>NK</b>                      | <b>“natural killer”</b>                                       |
| <b>NKT</b>                     | <b>“natural killer” T</b>                                     |
| <b>NO</b>                      | <b>Óxido nítrico</b>  |
| <b>NOS II</b>                  | <b>Óxido nítrico sintase induzida</b>                         |
| <b><i>P. brasiliensis</i></b>  | <b><i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b>                   |
| <b>PAMP</b>                    | <b>“Pathogen-associated molecular patterns”</b>               |
| <b>Pb</b>                      | <b><i>Paracoccidioides brasiliensis</i></b>                   |
| <b>Pb 18</b>                   | <b><i>Paracoccidioides brasiliensis</i>, isolado 18</b>       |
| <b>PBS</b>                     | <b>Solução salina em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2</b>         |
| <b>PBS/AZIDA</b>               | <b>Solução salina em tampão fosfato 0,15M, pH 7,2 + AZIDA</b> |
| <b>PCM</b>                     | <b>Paracoccidioidomicose</b>                                  |
| <b>PMN</b>                     | <b>Neutrófilo polimorfonuclear</b>                            |

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

|  |   |
|--|---|
| <b>PRR</b>   | <b>“Pattern recognition receptors”</b>  |
| <b>RPMI</b>  | <b>Meio para cultura celular, tampão bicarbonato, pH 6,8</b>                              |
| <b>SFB</b>   | <b>Soro fetal bovino</b>  |
| <b>SOCS3</b>   | <b>Sinalizador de supressão de citocina 3</b>   |
| <b>SPF</b>   | <b>“Specific pathogen free”</b>   |
| <b>SSC</b>   | <b>“side scatter”, granulocidade celular</b>  |
| <b>T CD4<sup>+</sup></b>                                 | <b>Linfócito T CD4<sup>+</sup> auxiliar</b>   |
| <b>T CD8<sup>+</sup></b>                                 | <b>Linfócito T CD8<sup>+</sup> citotóxico</b>   |
| <b>TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup></b> | <b>Linfócito T regulador do fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup></b> |
| <b>TCR</b>   | <b>“T cell receptor”</b>  |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>                            | <b>“Transforming growth factor <math>\beta</math>”</b>                                    |
| <b>T<math>\delta</math></b>                              | <b>Linfócito T gama delta</b>   |
| <b>Th1</b>   | <b>Linfócito T “helper” tipo 1</b>  |
| <b>Th2</b>   | <b>Linfócito T “helper” tipo 2</b>  |
| <b>Th3</b>   | <b>Linfócito T “helper” tipo 3</b>  |
| <b>Th17</b>  | <b>Linfócito T “helper” tipo 17</b>   |
| <b>TLR</b>   | <b>“Toll like receptor”</b>   |
| <b>TLR1</b>  | <b>“Toll like receptor” 1</b>   |
| <b>TLR2</b>  | <b>“Toll like receptor” 2</b>   |
| <b>TL2 KO</b>  | <b>“Toll like receptor 2” nocaute</b>   |
| <b>TLR4</b>  | <b>“Toll like receptor” 4</b>   |
| <b>TLR9</b>  | <b>“Toll like receptor” 9</b>   |
| <b>TNFR</b>  | <b>“Tumor necrosis factor receptor”</b>   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>                           | <b>“Tumor necrosis factor <math>\alpha</math>”</b>  |
| <b>TNF-<math>\beta</math></b>                            | <b>“Tumor necrosis factor <math>\beta</math>”</b>   |
| <b>TR1</b>   | <b>Célula T reguladora 1</b>  |
| <b>Treg</b>  | <b>Célula T reguladora</b>  |
| <b>UFC</b>   | <b>Unidades formadoras de colônias</b>  |

## *SUMÁRIO*

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.1 EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> .....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.1.1 ANIMAIS .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>3.1.2 FUNGO.....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.1.3 LAVADO PERITONEAL E CULTIVO DE CÉLULAS ADERENTES .....</b>  | <b>34</b> |
| <b>3.1.4 TRATAMENTO DAS CULTURAS DE MACRÓFAGOS POR IFN-<math>\gamma</math>.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>3.1.5 INFECÇÃO DOS MACRÓFAGOS .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.1.6 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) ....</b>  | <b>36</b> |
| <b>3.1.7 DOSAGEM DE NO .....</b>   | <b>36</b> |
| <b>3.1.8 CARACTERIZAÇÃO DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS: ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DE IL-12, TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, TGF-<math>\beta</math>, IL-10 E MCP-1 .....</b> | <b>36</b> |
| <b>3.1.9 DOSAGEM DE QUINURENINA .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.1.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.2 EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>3.2.1 ANIMAIS .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>3.2.2 INFECÇÃO INTRATRAQUEAL (I.T.) .....</b>   | <b>38</b> |
| <b>3.2.3 AVALIAÇÃO DO GRAU DE INFECÇÃO ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DE UFC.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>3.2.4 PREPARO DE SUSPENSÕES DE LEUCÓCITOS INFILTRANTES DE PULMÃO (LIP).....</b>   | <b>38</b> |
| <b>3.2.5 CITOMETRIA DE FLUXO PARA CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES CELULARES.....</b>   | <b>39</b> |
| <b>3.2.6 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA NOS HOMOGENATOS DE PULMÃO .....</b>  | <b>39</b> |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.7 DOSAGEM DE NO .....  | 40 |
| 3.2.8 CITOMETRIA DE FLUXO PARA CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS TCD4+CD25+ ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3 .....   | 40 |
| 3.2.9 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE QUINURENINA .....   | 41 |
| 3.2.10 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE E APOPTOSE DOS LINFÓCITOS .....   | 41 |
| 3.2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 42 |
| <i>4 RESULTADOS</i> .....  | 43 |
| 4.1 ESTUDO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA ATIVIDADE FUNGICIDA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....   | 43 |
| 4.1.1 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA .....  | 45 |
| 4.2 EFEITO DO 1MT NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS .....   | 46 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO E DA INIBIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA ATIVIDADE FUNGICIDA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) ..... | 48 |
| 4.4 EFEITO DO 1MT NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS B10.A E A/J .....   | 50 |
| 4.4.1 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE IL-12 .....   | 50 |
| 4.4.2 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ .....   | 52 |
| 4.4.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE MCP-1 .....   | 54 |
| 4.4.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE IL-6 .....  | 56 |
| 4.4.5 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE TGF- $\beta$ .....  | 58 |
| 4.5 EFEITO DO 1MT NA PRODUÇÃO DE QUINURENINA POR MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS B10.A E A/J .....   | 60 |
| 4.6 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM 1MT NA GRAVIDADE DA DOENÇA E NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR CAMUNDONGOS B10.A E A/J .....  | 62 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.7 ESTUDO DO TRATAMENTO COM 1MT NOS NÍVEIS DE QUINURENINA PRESENTES NOS PULMÕES DE CAMUNDONGOS B10.A E A/J .....</b>  | <b>64</b> |
| <b>4.8 EFEITO DO TRATAMENTO COM 1MT NOS NÍVEIS DE CITOCINAS PULMONARES DE CAMUNDONGOS B10.A E A/J .....</b>   | <b>65</b> |
| <b>4.9 ANÁLISE FENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS INFILTRANTES DE PULMÃO DE ANIMAIS B10.A E A/J NAS SEGUNDA E OITAVA SEMANAS DE INFECÇÃO.....</b>                             | <b>69</b> |
| <b>4.10 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM 1MT NA EXPANSÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS DO FENÓTIPO T CD4+CD25+FOXP3+ NO PULMÃO DE ANIMAIS B10.A E A/J.....</b> | <b>73</b> |
| <b>4.11 CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS NO PULMÃO DE ANIMAIS B10.A E A/J NAS SEGUNDA E OITAVA SEMANAS DE INFECÇÃO.....</b>                        | <b>75</b> |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>76</b> |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>  | <b>88</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>89</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é em geral doença crônica e sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* e acredita-se ser adquirida pela inalação de propágulos do fungo (RESTREPO, 1988). A gravidade da doença depende, entre outros fatores, da resposta imune adquirida do hospedeiro, que, entretanto, sabe-se ser profundamente influenciada pelos mecanismos de imunidade inata. A doença grave cursa com anergia da resposta imune celular, grande ativação do compartimento humoral da imunidade e lesões teciduais frouxas, não organizadas. Ao contrário, a doença benigna, localizada em um órgão ou involutiva, devido ao tratamento quimioterápico adequado, apresenta-se associada a reações positivas de imunidade celular, produção de baixos títulos de anticorpos e lesões, quando presentes, sob a forma de granulomas bem organizados (FRANCO et al., 1989; BRUMMER et al., 1993).

Pouco se conhece sobre os mecanismos de imunidade inata associados a estes padrões diversos de resposta imune ao *P. brasiliensis*. Sabe-se, porém, que macrófagos são células importantes na regulação do crescimento fúngico e que a ativação pelas citocinas IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são fundamentais para o desenvolvimento de atividade fungicida (BRUMMER, 1994; CANO et al., 1994; GONZALEZ et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2002). Por outro lado, as prostaglandinas parecem regular negativamente a atividade protetora dos macrófagos humanos (SOARES et al., 2001).

A maioria dos indivíduos infectados desenvolve uma infecção pulmonar assintomática, são, porém, paracoccidioidina positivos e não apresentam sinais clínicos da doença. Correspondem àqueles que se infectaram, desenvolveram o complexo primário, mas não progrediram para a doença (ANGULO-ORTEGA, 1972). Recentemente, Mamoni et al. (2006) mostraram que esses indivíduos assintomáticos, infectados pelo Pb e quem não desenvolviam a doença, apresentavam uma resposta imunológica do perfil Th1 com predomínio de linfócitos TCD8<sup>+</sup> citotóxicos os quais eram fonte de IFN- $\gamma$  e aumento de linfócitos TCD4<sup>+</sup> auxiliares que produziam altos níveis de IL-2 e TNF- $\alpha$ , além de maior expressão das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 em linfócitos do sangue periférico as quais estão correlacionadas com a maior produção de IFN- $\gamma$ . Porém, decorrente da progressão do complexo primário, da reativação do foco quiescente (reinfecção endógena) ou, ainda, de reinfecção exógena é que se desenvolvem manifestações clínicas da doença.

As manifestações clínicas são classificadas como Forma Aguda ou Juvenil (FJ) e Forma Crônica ou Adulta (FA) da PCM (FRANCO et al., 1989). A FJ acomete mais crianças e jovens com idade inferior aos 30 anos, de ambos os sexos, desenvolve-se em semanas ou em poucos meses após a exposição ao fungo. Ocorre o comprometimento do sistema mononuclear fagocítico, apresenta altos títulos de anticorpos, aumento de linfonodos e hepatoesplenomegalia (BENARD et al., 1994). Não são comuns evidências radiológicas de comprometimento pulmonar, assim como envolvimento da mucosa oral. Do ponto de vista imunológico, a FJ apresenta predominância de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- $\beta$  nos linfonodos desses pacientes (NEWORAL et al., 2003), altos níveis de anticorpos específicos IgG4 e de IgE, eosinofilia e resposta imune celular específica suprimida (BENARD et al., 1997; MAMONI et al., 2002).

A FA, por outro lado, é mais frequente, corresponde a aproximadamente 90% dos casos, acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, geralmente lavradores rurais que apresentam maior contato com o fungo no solo numa possível área endêmica. Ainda, a FA apresenta longa duração; a instalação é lenta e gradual, resultando da reativação fúngica de focos quiescentes os quais podem persistir por décadas (FRANCO et al., 1989). Entre os fatores desencadeantes da doença, tem sido citados o alcoolismo, a desnutrição e, em inúmeros casos, o tabagismo (MURRAY et al., 1974; LEMLE et al., 1983).

Ainda nesta forma clínica ocorre o comprometimento pulmonar, que é praticamente a regra de manifestação clínica, com lesões granulomatosas, além de lesões em mucosas orais e linfonodos cervicais (MAGALHÃES et al., 1994). As lesões na cavidade oral são uma manifestação importante, pois permitem um diagnóstico clínico precoce (ALMEIDA e JUNIOR, 2003). Pode ocorrer disseminação para os linfonodos abdominais, fígado, baço, glândulas adrenais, pele, ossos e cérebro (RESTREPO, 2000; FAICAL, 1996). Esta bem estabelecida que a maioria dos pacientes com paracoccidioidomicose que desenvolvem lesões na mucosa oral refere-se a indivíduos masculinos que desenvolvem a forma crônica da doença (BLOTTA, 1999). O estudo de Villalba (1998) mostrou que em 64 casos de pacientes com PCM, 93% são homens, com idade média de 43 anos e a proporção entre homens e mulheres era de 15:1. Deste modo, a suspeita de que fatores hormonais femininos poderiam conferir proteção contra o desenvolvimento da PCM foi apoiada pela observação de estudos que mostraram que o hormônio 17- $\beta$  estradiol inibia a conversão de fase de conídio infectante para levedura patogênica (ARISTIZABAL et al., 1998). O mecanismo pelo qual o 17- $\beta$  estradiol atua no *P. brasiliensis* seria o bloqueio da síntese de proteínas que se expressam

durante a transformação da fase de micélio para levedura. Portanto, através desses mecanismos, o estrógeno pode interferir na patogenicidade do *P. brasiliensis* (LOOSE et al., 1983). Além disso, estudos recentes demonstraram que o 17- $\beta$  estradiol pode induzir *in vitro* a produção de óxido nítrico (NO) e aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos peritoneais (HONG e ZHU, 2004).

Do ponto de vista imunológico, Baida et al. (1999) demonstraram que a FA apresenta níveis elevados de citocinas do padrão Th1 (IFN- $\gamma$ ) além de anticorpos específicos IgG2 e IgA de mucosa, sugerindo certo controle da infecção e doença menos grave. As lesões de mucosa oral, típicas nessa forma clínica são ricas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que contem a quantidade de fungos na lesão (NEWORAL et al., 2003). Há, porém, casos graves associados com ativação exacerbada da imunidade humoral, prevalência de citocinas do padrão Th2 e imunidade celular deprimida.

Assim, os indivíduos que apresentam maior controle sobre a produção de anticorpos e apresentam imunidade celular preservada, correspondem à doença menos grave, enquanto que a presença de hipergamaglobulinemia, formação de imune complexos séricos, ativação policlonal de linfócitos B, relacionam-se aos quadros de maior gravidade da PCM (ARANGO e YARZABAL, 1982; SINGER-VERMES et al., 1993; CANO et al., 1995).

A resposta imune inata contra os fungos, por sua vez, baseia-se no reconhecimento de estruturas moleculares conservadas encontradas em inúmeros grupos de microrganismos, os PAMPS (“*pathogen-associated molecular patterns*”) (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002) que são reconhecidos pelos seus receptores, os PRR (“*pattern recognition receptors*”), sendo os TLR (“*toll like receptors*”) um dos grupos mais importantes. Os TLRs compreendem vários componentes designados de TLR1 a TLR9, que reconhecem diferentes estruturas moleculares nos patógenos, e estão presentes nas membranas celulares e endocelulares das células da imunidade inata; há ainda os receptores do tipo lectinas-c como os receptores para manose (MR), dectina 1 e 2 que reconhecem  $\beta$ -glucanas e os receptores tipo “*scavenger*” também presentes em células da imunidade inata, como neutrófilos (PMN), macrófagos (M $\phi$ ) e células dendríticas (DC) possibilitando a fagocitose dos patógenos (GORDON, 2002; BROWN e GORDON, 2003; AKIRA et al., 2006). Os TLRs são importantes em inúmeros aspectos na eliminação de micro-organismos. Sua ativação leva à produção de inúmeras moléculas de adesão e estimuladoras, dentre elas as quimiocinas que participam do recrutamento de fagócitos para o foco da infecção. A ativação de DCs, via TLRs, tornam estas células imunogênicas e com habilidade de induzir a ativação de linfócitos T “helper” Th1,

Th2, ou Th17 responsáveis pela resposta imune adaptativa. Por exemplo, os TLR4 de DCs estimuladas com LPS produzem altos níveis de IL-12 e TNF- $\alpha$ , e baixos níveis de IL-10, favorecendo a resposta do tipo Th1 (REIS e SOUSA, 2004). Netea et al. (2002) foram os primeiros a descreverem a importância dos TLRs no reconhecimento de estruturas fúngicas no modelo de *Candida albicans* no qual animais deficientes geneticamente de TLR4 apresentavam maior suscetibilidade à candidíase e menor recrutamento de neutrófilos para o foco da infecção, comparado ao grupo controle. Recentemente, nosso laboratório mostrou o papel destes receptores TLR na imunidade inata frente ao *P. brasiliensis*. Em revisão recente de Calich et al. (2008) foi relatado que camundongos deficientes de TLR2 e TLR4 e infectados pelo Pb, apresentavam menor carga fúngica pulmonar, com diminuição da produção de NO e de IL-12, aumento de IFN- $\gamma$ , diminuição do recrutamento de células mononucleares para os pulmões (macrófagos e linfócitos T CD4 ativados), paralelo aos níveis diminuídos da quimiocina MCP-1; havia, porém, aumento de neutrófilos para o foco da infecção. O resultado oposto, entretanto, foi visto com animais deficientes da proteína adaptadora MyD88, responsável pela ativação via NF $\kappa$ B de todos os TLRs, (TAKEDA e AKIRA, 2005). A infecção de camundongos MyD88<sup>-/-</sup> pelo Pb resultou em doença mais grave com maior carga fúngica, aumento da mortalidade e níveis diminuídos de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico (CALICH et al., 2008). Assim, estes estudos mostraram que a deficiência de MyD88 parece ser mais importante do que a deficiência de TLR2 e TLR4 na PCM murina e que o *P. brasiliensis* parece utilizar destes TLRs como mecanismo de virulência pois facilita o acesso do fungo aos macrófagos garantindo sua multiplicação no hospedeiro.

Somam-se à importância dos receptores do tipo TLR, os receptores para C3b (CR3, CD11b/CD18) que são integrinas de membranas que reconhecem iC3b do sistema complemento, além de receptores de  $\beta$ -glucanas e outros componentes da parede celular dos fungos que apresentam manose (BROWN e GORDON, 2003), são importantes no reconhecimento do patógeno. Nosso laboratório mostrou que a interação do *P. brasiliensis* com macrófagos peritoneais de camundongos era potencializada pela opsonização das leveduras por iC3b (CALICH et al., 1979).

Além dos receptores responsáveis pelo reconhecimento de patógenos durante a resposta imune inata é importante lembrar que a síntese de quimiocinas favorece o recrutamento e direcionamento de fagócitos, além disso, a síntese de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-12, produzidas por linfócitos T e células NK) aumenta o “burst” oxidativo de neutrófilos, com a

produção de radicais de oxigênio, bem como potencializa a fagocitose de macrófagos. Os PMN são amplamente encontrados em lesões de pacientes com PCM (NEWORAL et al., 2003) e participam das respostas inflamatórias ao *P. brasiliensis* através da liberação de radicais de oxigênio e nitrogênio; grânulos citoplasmáticos de peroxidase que são liberados durante a fagocitose e participam da morte de leveduras ingeridas ou extracelulares (MELONI-BRUNERI et al., 1996; GONZALEZ et al., 2000). Já a imunidade adaptativa caracteriza-se principalmente pela utilização do repertório heterogêneo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> que produzem citocinas, além de anticorpos que podem funcionar como opsoninas.

Nosso laboratório (CALICH et al., 1985) desenvolveu um modelo de infecção intraperitoneal (i.p.) com o *Paracoccidioides brasiliensis* e demonstrou que entre várias linhagens isogênicas de camundongo, havia diferenças significantes na susceptibilidade ao fungo. Foram caracterizadas como as mais resistentes as linhagens A/Sn e A/J, enquanto que animais B10.A mostraram-se altamente susceptíveis à infecção pelo fungo. No modelo de PCM pulmonar empregando as mesmas linhagens de camundongos, utilizando, porém, a via intratraqueal (i.t.) de infecção, foi observado que camundongos A/Sn desenvolvem PCM crônica, benigna, restrita aos pulmões, caracterizada por limitado número de lesões granulomatosas bem organizadas com poucas leveduras viáveis. Animais B10.A, ao contrário, desenvolvem doença disseminada, progressiva, caracterizada pela presença de numerosas lesões granulomatosas mal organizadas contendo muitos fungos viáveis, além de serem anérgicos nas reações de hipersensibilidade do tipo tardio (CALICH et al., 1994). Os resultados obtidos sugeriram que a resistência à PCM estava associada à atividade de linfócitos T, macrófagos e células B mediadas por IFN- $\gamma$  (CANO et al., 1995). Cano et al. (1998) demonstraram que ao início da infecção intratraqueal havia um balanço na produção de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) no local da inoculação. Inesperadamente, entretanto, verificou-se que na linhagem A/Sn o nível de produção dos dois grupos de citocinas era menor do que na linhagem B10.A, indicando que camundongos susceptíveis apresentavam uma maior resposta ao fungo.

As formas polares do nosso modelo experimental são similares à paracoccidioidomicose humana que se apresenta em padrões distintos, desde aqueles benignos, localizados, com preservação da imunidade celular, e aqueles disseminados, associados à supressão da resposta imune mediada por linfócitos T (CALICH e BLOTTA, 2005). Dentre as citocinas, o IFN- $\gamma$  parece ser a mais importante nos fenômenos de imunoproteção. A depleção de IFN- $\gamma$  por anticorpos monoclonais agravou a doença, tanto em

animais susceptíveis, como em animais resistentes ao fungo desencadeando exacerbada infecção pulmonar, disseminação para fígado e baço, diminuição da resposta imune celular específica e aumento dos níveis de anticorpos específicos (CANO et al., 1998). Souto et al. (2000) ao estudarem o papel do IFN- $\gamma$  (com animais KO, deficientes do gene funcional para IFN- $\gamma$ ) e do TNF- $\alpha$  (através de animais p55KO, deficientes para o componente de 55 kDa do receptor de TNF- $\alpha$ ) na resistência à infecção ao Pb, demonstraram que ambas as citocinas atuam no mecanismo de resistência à doença, e cuja presença leva a infecção com menor carga fúngica nos pulmões, formação de granulomas bem organizados e maior sobrevivência aos animais. Além disso, o IFN- $\gamma$  induz a produção de óxido nítrico que determina anergia de células T e diminui a proliferação celular.

Os macrófagos, além de produzirem e liberarem mediadores inflamatórios e quimiotáticos, também são eficientes células apresentadoras de antígenos (APCs). Participam do processo de fagocitose de partículas e agentes microbianos e os carrega via linfáticos aos linfonodos, onde as respostas imunes específicas são geradas. Assim, os macrófagos podem estar envolvidos tanto nas respostas imunes inatas como nas adquiridas ao *P. brasiliensis* atuando como células efetoras da imunidade inata e adquirida. Estudos realizados com o modelo intraperitoneal (i.p.) e com o modelo pulmonar da PCM demonstraram que a infecção pelo *P. brasiliensis* leva a diferentes graus de ativação de macrófagos, que dependem do padrão genético da linhagem de camundongo empregada (KASHINO et al., 1985). Macrófagos alveolares de camundongos resistentes produzem altos níveis de peróxido de hidrogênio a partir do segundo mês de infecção, enquanto que aqueles de animais susceptíveis não o fazem (CANO et al., 1995).

O óxido nítrico (NO) é gerado pela oxidação de um dos nitrogênios do aminoácido L-arginina e é um dos principais responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos (HIBBS et al., 1987, 1988). A enzima óxido-nítrico-sintetase induzida (iNOS ou NOS2) é produzida durante a ativação dos macrófagos pelos microrganismos ou produtos bacterianos como LPS, bem como por citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12 (CORRALIZA et al., 1995; MACMICKING et al., 1997). Em um modelo de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos por conídeos de *P. brasiliensis*, Gonzalez et al. (2000) demonstraram que o óxido nítrico (NO) induzido pela ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$  participa da inibição da transformação dos esporos em células leveduriformes e da estimulação da atividade fungicida. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Bocca et al. (1998) que demonstraram que o tratamento *in vivo* com um inibidor de óxido

nítrico agrava a doença de camundongos (C57BL/6) infectados pelo *P.brasiliensis*. Entretanto, no curso da doença o NO também induz imunossupressão que se manifesta por diminuição da expressão de antígenos Ia (MHC de classe II) em macrófagos, prejudicando desta forma a apresentação antigênica para os linfócitos T e conseqüente redução da linfoproliferação (BOCCA et al., 1998, 1999). Nesta mesma linha, nosso laboratório demonstrou que macrófagos de animais resistentes produzem baixos níveis de NO e altos de TNF- $\alpha$ , enquanto que macrófagos de camundongos susceptíveis estimulados por leveduras vivas do fungo produzem níveis elevados de NO e baixos de TNF- $\alpha$  (NASCIMENTO et al., 2002).

A IL-4, a mais típica citocina Th2, tem uma função dupla na PCM: dependendo do padrão genético do hospedeiro pode ser protetora ou exacerbadora da doença pulmonar (ARRUDA et al., 2004; PINA et al., 2004). Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) atuam na da imunidade inata e parecem proteger camundongos susceptíveis ao *P.brasiliensis*, enquanto que nos camundongos resistentes, a proteção ocorre somente no início da infecção. Em um trabalho recente realizado por Pina et al. (2006), foi observado que a depleção de PMN induzia doença muito grave nos camundongos susceptíveis, associada a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a ativação excessiva do sistema imune pode ser deletéria ao hospedeiro. Diferentemente do que se supunha na doença humana, experimentos de depleção *in vivo* e com camundongos nocaute (KO) para genes de subpopulações linfocitárias (CD4 e CD8) têm demonstrado que os linfócitos T CD8 são fundamentais para o controle da PCM pulmonar e podem se apresentar sob os padrões do tipo 1 (secretor de IFN- $\gamma$ ) ou tipo 2 (secretor de IL-4) de ativação. Além disso, estes linfócitos parecem ser fundamentais para o controle da carga fúngica pulmonar (CANO et al., 2000; CHIARELLA, 2003; CALICH e BLOTTA, 2005). Os linfócitos T CD4 do tipo 1 são ativados ao início da resposta imune de camundongos resistentes que mais tardiamente ativam subpopulações Th2. Esta ativação parece contribuir para o padrão resistente, talvez regulando negativamente processo inflamatório lesivo para tecidos do hospedeiro. A subpopulação T CD4 de camundongos susceptíveis é completamente anérgica e a doença destes animais não se altera pela depleção seletiva de linfócitos T CD4. Assim, em camundongos susceptíveis outros mecanismos imunorregulatórios parecem estar associados à susceptibilidade genética à doença. Neste aspecto, recentes trabalhos realizados com pacientes têm demonstrado que a imunossupressão na PCM está associada à expressão aumentada de moléculas CTLA-4 por linfócitos de pacientes (CAMPANELLI et al., 2003), à apoptose de células T (CACERE et

al., 2002) e à ação de células T reguladoras de fenótipo T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (CAVASSANI, 2006).

No nosso modelo experimental, várias observações indicam que o paradigma Th1/Th2 de ativação da resposta imune adaptativa não explica completamente os fenômenos de resistência e susceptibilidade ao fungo. Assim, a IL-4 é protetora para camundongos susceptíveis (ARRUDA et al., 2004), o tratamento com IL-12 exógena leva à menor disseminação do fungo, mas induz intensa patologia pulmonar associada com exuberante influxo de células inflamatórias (ARRUDA, et al., 2002), a depleção de células T CD4 não altera o curso da doença (CHIARELLA, 2003) e a produção excessiva de óxido nítrico induz anergia da imunidade celular (NASCIMENTO et al., 2002).

Recentemente têm sido descritos novos mecanismos de controle da resposta imune. Linfócitos reguladores T CD4<sup>+</sup> parecem exercer um papel fundamental nos processos de contenção de respostas imunes excessivas que podem levar a intensa patologia tecidual, assim como na manutenção da tolerância a auto antígenos. Há várias subpopulações de células T reguladoras (Treg), mas dentre elas as chamadas T reguladoras naturais e as T reguladoras induzidas têm sido as mais estudadas. As células Treg induzidas chamadas de TR1 que produzem IL-10, ou as “T helper 3” (Th3) associadas à produção de TGF- $\beta$  podem se desenvolver de células T CD4 convencionais quando expostas a condições estimulatórias especiais tais como a ausência de sinais coestimulatórios ou citocinas desativadoras (BLUESTONE et al., 2003; MILLS et al., 2004). As células Treg naturais são originárias do timo, têm o fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, e representam 5-10 % dos linfócitos CD4<sup>+</sup> em camundongos e em humanos normais (O’GARRA et al., 2004). A expressão constitutiva de CD25, CTLA-4 e GITR (receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide) caracteriza a subpopulação Treg natural. Entretanto, a expressão do fator de transcrição Foxp3, necessário para a geração destas células, tem sido considerado o melhor marcador fenotípico das Treg naturais (FONTENOT et al., 2005). Estas células são específicas para autoantígenos e críticas para a prevenção de doenças autoimunes, mas também exercem um controle efetivo de infecções, pois podem reconhecer antígenos de patógenos (BELKAID et al., 2005).

Células Treg atuam através da inibição da produção de IL-2 bloqueando o ciclo celular de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, além de suprimir a atividade proliferativa de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (NAKAMURA et al., 2001). O possível mecanismo da ação supressora dessas

Treg se dá pelo contato direto célula-célula, envolvendo sinais inibidores através da sinalização mediada por CTLA-4, GITR e TGF- $\beta$  de membrana (READ et al., 2000; SHIMIZU et al., 2002; NAKAMURA et al., 2001), ou pela produção, mas não exclusivamente dessas células, das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  (ASSEMAN et al., 1999). Muitos trabalhos relatam a importância dessas células reguladoras em casos crônicos de infecção onde, devido à persistência do patógeno, essas células estariam controlando as respostas imunes que poderiam causar quadros inflamatórios exacerbados na tentativa de erradicar o agente infeccioso. Além disso, por impedirem a cura asséptica, as células Treg controlariam a manutenção da memória imunológica.

Assim, quadros crônicos de tuberculose (GEROSA, 1999), malária (PLEBANSKI, 1999) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (OSTROWSKI, 2001) mostram que a persistência do patógeno está relacionada com a presença de células T reguladoras juntamente com a síntese de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ . É ainda interessante o fato de que em infecções crônicas como na leishmaniose, ocorre a persistência de células T reguladoras naturais de fenótipo T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, síntese aumentada de IL-10 e níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  (BELKAID et al., 2002). Porém, a permanência dessas células está relacionada com a homeostase do sistema imune, uma vez que minimizam os efeitos deletérios da inflamação (atribuída à produção de radicais de oxigênio e nitrogênio) durante a tentativa de eliminar o patógeno nos tecidos, trabalhando assim como um “feedback negativo” na ativação das respostas imunes (POWRIE et al., 2003). Cavassani et al. (2006) mostraram na paracoccidiodomicose crônica, forma adulta, que pacientes que apresentavam doença grave tinham aumento de células Treg TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> nas biópsias de lesões teciduais que continham grande carga fúngica. Essas células apresentavam receptores de migração para os tecidos lesados, ou seja, receptores de “*homing*”, CCR5 e CCR4, para as quimiocinas CCL5 e CCL22, respectivamente. Em concordância com esses resultados, Moreira et al. (2008) mostraram que animais deficientes de CCR5 apresentavam menor infiltrado de células Treg Foxp3<sup>+</sup> nas lesões e ainda maior controle do crescimento fúngico; mostrou-se, assim, que este receptor era fundamental para o recrutamento de Tregs para o local da infecção onde há persistência do patógeno.

Sabe-se ainda que um dos mecanismos inibitórios das células T-reg utiliza a molécula co-estimulatória CTLA-4 através da sua interação com moléculas B7 presentes nas células apresentadoras de antígenos, em especial as células dendríticas. Essa interação induz a

expressão da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima citosólica que catalisa a etapa inicial do aminoácido essencial triptofano na via das quinureninas que, por sua vez, inibem a imunidade mediada por linfócitos T (FALLARINO et al., 2003; MUNN et al., 1999). Estas descobertas fornecem uma nova visão da imunoregulação mediada por IDO que combina a função regulatória das células Tregs com a ação das DCs atuando como mediadores finais de respostas tolerogênicas (BEISSERT et al., 2006).

Novos mecanismos têm sido propostos para o controle da resposta imune. Vários estudos têm demonstrado um importante papel do catabolismo do triptofano e da produção de seu metabólito, a quinurenina, na indução da tolerância periférica a antígenos (MELLOR et al., 1999; GROHMANN et al., 2003). Os mamíferos possuem duas enzimas intracelulares contendo o grupo heme, a Indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e a triptofano-2,3-dioxigenase (TDO) que catalisam o metabolismo oxidativo do triptofano (TAYLOR et al., 1991). Essas enzimas têm diferente padrão de expressão, mas de maneira interessante alguns trabalhos têm demonstrado que a IDO é predominantemente expressa por algumas subpopulações de células mielóides, inclusive células dendríticas CD11c+CD8 $\alpha$ + de camundongos, uma subpopulação que medeia fenômenos imunoregulatórios (FALLARINO et al., 2002; MUNN et al., 2002; GROHMANN et al., 2001; SHORTMAN et al., 2002).

A IDO, e sua atividade nas células da imunidade inata tal como macrófagos, foi inicialmente associada com a defesa do hospedeiro contra patógenos tais como *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psittaci*, citomegalovírus (CMV) e na contenção do crescimento de células tumorais, por depletar triptofano e limitar a habilidade dos patógenos de sintetizar proteínas (TAYLOR et al., 1991; SEDLMAYR et al., 2002; UYTENHOVE et al., 2003).

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

Frumento et al. (2002) relataram que a atividade de IDO é efetiva em reduzir a proliferação de células CD4+ e CD8+, bem como de células NK, mas não de células B. Este

trabalho sugere também que tanto a depleção de triptofano bem como o excesso de quinurenina são necessários para que os efeitos antiproliferativos de IDO sejam completos (MULLEY et al., 2008).

A expressão de IDO é induzida principalmente por IFN- $\gamma$ , que controla a ativação transcricional de *INDO*; entretanto, outros fatores como IL1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , LPS e CpG também induzem a expressão de IDO, porém num patamar inferior ou de forma sinérgica com IFN- $\gamma$  (MOFFET et al., 2003; MELLOR et al., 2004; MUNN et al., 2007). Por outro lado, a atividade de IDO nas células é regulada por vários fatores bioquímicos tais como a presença de óxido nítrico e a biosíntese de grupos heme. Citocinas como IL-6, IL-4, IL-13 e TGF- $\beta$  são apontadas como supressoras de IDO (YUAN et al., 1998; ORABONA et al., 2005). Outras citocinas como as do eixo IL-17/IL-23 diminuem as atividades efetoras antifúngicas de PMN exatamente por contrapor a ativação IFN- $\gamma$ -dependente de IDO, conhecida por limitar o status inflamatório de PMN contra fungos, como explorado nos modelos de doença granulomatosa crônica (CGD) e candidíase mucocutânea crônica (CMC) (ZELANTE et al., 2009).

Outro aspecto importante demonstrado foi que o antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), ou seu recombinante solúvel sintético CTLA-4Ig, na ligação com as moléculas co-estimulatórias B7 (CD80 e CD86) de células apresentadoras de antígenos (APCs) induzem a expressão de IDO (GROHMANN et al., 2002; FALLARINO et al., 2003). Assim, células T regulatórias contendo moléculas CTLA-4 de membrana podem induzir a expressão de IDO em células dendríticas convertendo-as em células dendríticas tolerogênicas ou regulatórias. Por outro lado, CD28, outro ligante que sinaliza através das moléculas CD80/CD86 inibe IDO via expressão aumentada de SOCS3 (sinalizador de supressão de citocinas 3) (ZELANTE et al., 2009).

O composto 1-metil-triptofano (1MT) que compete pela enzima, inibe o efeito da ação da IDO, levando a um aumento de células Th1 e uma diminuição de células Th2 e Tregs. Mais ainda, por bloquear IDO, 1MT inibe a produção de catabólitos do triptofano como as quinureninas, que têm sido mostradas como capazes de reduzir tanto a proliferação de células T como NK. Este mecanismo regulador dependente de células dendríticas pode auxiliar no entendimento de como as células T regulatórias podem inibir outras células T sem contato celular. A expressão de IDO em células apresentadoras de antígenos (APCs) se correlaciona com fraca proliferação de células T, aumento de apoptose e fracas respostas imunológicas *in*

*vivo* (MUNN et al., 1999; MUNN et al., 2002; HWU et al., 2000; ROMANI et al., 2005; MELLOR et al., 2002; FALLARINO et al., 2002; MUNN et al., 1996). O inibidor 1MT, restaura a proliferação de células T, aumenta as respostas destas células durante a gestação, e abole processos regulatórios que suprimem as respostas a antígenos tumorais, a auto-antígenos em doenças auto-imunes e a rejeição de aloenxertos (MELLOR et al., 2002; ALEXANDER et al., 2002; MIKI et al., 2001).

A expressão de IDO, induzida nos sítios inflamatórios *in vivo* principalmente por IFN- $\gamma$ , é considerada parte da resposta imune inata do hospedeiro associada a inflamações crônicas e a infecções persistentes, tendo como função impedir o crescimento de certos vírus, bactérias, patógenos intracelulares, e células tumorais via depleção de triptofano, o menos abundante de todos os aminoácidos essenciais (TAYLOR et al., 1991; THOMAS et al., 1999; MELLOR et al., 2004; PFEFFERKORN et al., 1984, SANNI et al., 1998, SILVA et al., 2002, BEATTY et al., 1993, MACKENZIE et al., 1998, HAYASHI et al., 2001; ROTTENBERG et al., 2002). A diminuição da concentração de triptofano disponível pode desempenhar efeito microbicida sobre patógenos cuja multiplicação seja triptofano-dependente, mas, concomitantemente, pode induzir o controle da resposta imune por células T regulatórias o que pode resultar em respostas imunes menos eficientes que permitiriam a manutenção dos patógenos nos tecidos e a cronicidade da doença. Trabalho pioneiro do grupo da Dra. Luigina Romani demonstrou um papel muito importante da IDO e do catabolismo do triptofano na infecção por *Candida albicans*. Verificou-se que a IDO é expressa por células dendríticas e leucócitos polimorfonucleares nos sítios da infecção pelo fungo e sua ação realizava-se por mecanismos dependentes de CTLA-4 e IFN- $\gamma$ . A inibição de IDO levou a infecção mais grave devido à maior carga fúngica, paradoxalmente associada a aumento da resposta inflamatória do tipo Th1 que é protetora contra a *C.albicans*. Entretanto, a diminuição de células T-regulatórias induzida pela inibição da enzima IDO, resultou em patologia tecidual exacerbada devido à resposta inflamatória excessiva (ROMANI et al., 2005). Assim, os mecanismos microbicidas e de resposta imune adaptativa têm que ser bastante equilibrados para que o hospedeiro possa se defender adequadamente das agressões por patógenos.

## Justificativa

Na PCM os fenômenos imunoregulatorios são pouco conhecidos. Sabe-se, porém, que animais suscetíveis ao início da doença secretam quantidades apreciáveis de IFN- $\gamma$  e NO (CANO, 2000; NASCIMENTO, 2002) e apresentam intensa anergia de células T-CD4 que não é regulada por IL-4 e nem por IL-12 (ARRUDA, 2002, 2004). É ainda digno de nota o fato de que linfócitos T CD4+ não regulam a gravidade da doença, eliminando um papel preponderante das células T, principalmente as Th2 que produzem citocinas desativadoras de macrófagos (CHIARELLA, 2003). Além disso, várias evidências têm demonstrado que a síntese aumentada de mediadores pró-inflamatórios por células da imunidade inata associa-se a padrões mais graves da doença (CALICH et al., 2005). Assim, a síntese de leucotrienos no curso da PCM pulmonar, ao contrário de outras patologias infecciosas e parasitárias (FACCIOLI, 2005), leva ao aumento da carga fúngica no sítio da infecção. Este fato foi associado à ativação de células fagocíticas, à síntese aumentada de IL-12 e NO e possivelmente à maior expressão de receptores de membrana que levam à maior endocitose e crescimento fúngico (RIBEIRO et al., 2005).

Em trabalho recente de Pina et al. (2008) verificou-se que a interação de macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e susceptíveis (B10.A) com o *P. brasiliensis* levava a processos de ativação celular totalmente distintos. Assim, macrófagos de camundongos susceptíveis são facilmente ativáveis por IFN- $\gamma$  e IL-12, e desenvolvem eficiente atividade fungicida. Após a interação com o *P. brasiliensis*, estas células secretam altos níveis de óxido nítrico (NO), IL-12 e da quimiocina MCP-1. A atividade microbicida era bloqueada pela inibição da síntese de NO, mas não era alterada pela neutralização de IL-10 ou TGF- $\beta$  por anticorpos monoclonais. Macrófagos de animais resistentes (A/J), entretanto, apresentavam atividades totalmente opostas. Estas células eram fracamente ativáveis por IFN- $\gamma$  e IL-12, e apresentavam atividade fungicida bastante baixa. Havia a síntese de baixos níveis de NO e a atividade microbicida era restaurada pela inibição do TGF- $\beta$ , mas não se alterava pelo bloqueio de NO ou de IL-10 (PINA et al., 2008; CALICH e BLOTTA, 2004).

Em trabalhos recentes realizados em nosso laboratório, foi estudado envolvimento do receptor TLR2 e da proteína adaptadora de sinalização intracelular MyD88 no reconhecimento do *P. brasiliensis* na paracoccidiodomicose pulmonar, através da utilização de camundongos nocautes de TLR2 da linhagem C57Bl/6 (TLR2<sup>-/-</sup>) (LOURES et al., 2009; CALICH et al., 2008). Foi observada a diminuição da recuperação de fungos viáveis dos

animais deficientes no ensaio fungicida utilizando macrófagos peritoneais (*in vitro*), bem como dos homogenatos de pulmão (*in vivo*). Observou-se também menor fagocitose ou aderência de *P. brasiliensis* à macrófagos TLR2 KO, concomitante à menor produção de NO. Estes dados sugerem que os TLR2 participam ativamente no reconhecimento de leveduras de *P. brasiliensis*. Observou-se também, nos animais TLR2 KO, *in vivo*, uma diminuição da síntese de IL-10 com concomitante diminuição de IL-12 e MCP-1 e aumento da produção de IL-23 e IL-17 indicando a ativação predominante de uma resposta do tipo Th17. Ao analisar os infiltrados inflamatórios de pulmão, observou-se também a diminuição da frequência de células T regulatórias (Treg) (LOURES et al., 2009).

Na PCM a ausência da molécula microbicida (NO) parece estar sendo compensada pela produção aumentada de TNF- $\alpha$  na fase aguda da doença. Trabalho recente do nosso laboratório mostrou que os animais deficientes de iNOs apresentaram uma redução da carga fúngica pulmonar concomitante à produção aumentada dos níveis de TNF- $\alpha$  em 2 semanas de infecção. (BERNARDINO et al., 2005). A depleção desta citocina nestes animais resultou em aumento da carga fúngica e diminuição no tempo de sobrevivência (BERNARDINO et al., 2009).

Em conjunto, estes dados têm demonstrado que a susceptibilidade genética ao *P. brasiliensis* não pode ser atribuída a uma ativação preferencial de respostas do tipo Th2 e nem a uma baixa reatividade do sistema imune inato ao fungo. Ao contrário, mecanismos de ativação excessiva parecem condicionar infecções mais graves e imunidade adaptativa ausente ou inadequada.

Assim, o presente trabalho pretende verificar se aIDO e o catabolismo do triptofano têm um papel relevante na imunorregulação da doença desenvolvida por camundongos suscetíveis e resistentes ao *P. brasiliensis*. Com este objetivo, estudaremos o efeito da inibição *in vivo* da enzimaIDO na gravidade da doença e nos mecanismos imunológicos associados à mesma. A PCM pulmonar será estudada *in vivo* em camundongos B10.A e A/J tratados ou não com 1-metil-triptofano (1MT), um conhecido inibidor da indolamina-2,3-dioxigenase. Além disso, macrófagos de camundongos B10.A e A/J normais serão tratados ou não por 1MT, posteriormente serão ativados ou não por IFN- $\gamma$  e a inibição da atividade fungicida sobre o *P. brasiliensis*, bem como a secreção de citocinas e de NO serão estudadas *in vitro*.

## **2 OBJETIVOS**

O propósito deste trabalho foi verificar se a enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e o catabolismo do triptofano têm um papel relevante na imunorregulação da paracoccidiodomicose pulmonar murina (PCM) desenvolvida por camundongos susceptíveis (B10.A) e resistentes (A/J) ao *P. brasiliensis*. Para tanto estudamos o efeito da inibição *in vitro* e *in vivo* da enzima IDO na gravidade da doença e nos mecanismos imunológicos associados à mesma. A PCM pulmonar foi estudada em camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1-metil-triptofano, um inibidor da IDO. Os animais foram estudados em fases precoces e tardias da infecção quanto:

- a atividade fungicida *in vitro* na cultura de macrófagos peritoneais de animais susceptíveis e resistentes;
- a presença de óxido nítrico (NO) e quinurenina produzida na cultura de macrófagos de animais B10.A e A/J;
- a presença de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias nos sobrenadantes de cultura de macrófagos de animais B10.A e A/J;
- a gravidade da infecção pulmonar e disseminação para fígado e baço através da quantificação de fungos viáveis pela técnica de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nas 2 e 8 semanas de infecção de animais B10.A e A/J;
- a presença de óxido nítrico (NO) e quinurenina produzida nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J;
- a presença de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J nas segunda e oitava semanas de infecção;
- a caracterização dos leucócitos infiltrantes do pulmão, células T reguladoras e apoptose nos pulmões de animais B10.A e A/J nas segunda e oitava semanas de infecção por citometria de fluxo.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO***

##### **3.1.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos isogênicos machos das linhagens A/J resistentes e B10.A suscetíveis ao *P. brasiliensis* (CALICH et al., 1985) com idade entre 6 a 8 semanas. Esses animais são criados sob condições SPF no Biotério de camundongos isogênicos do Depto. de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e mantidos no biotério de animais de experimentação do referido Departamento.

##### **3.1.2 FUNGO**

Foi utilizado o isolado Pb 18 (virulento) do *P. brasiliensis*, (KASHINO et al., 1985; SINGER-VERMES et al, 1989). O fungo foi mantido em meio semi-sólido de Fava Netto (1955) a 36 °C, realizando-se repiques semanais. Suspensões celulares foram obtidas na fase exponencial de crescimento leveduriforme, ou seja, após 1 semana de cultivo, e lavadas 3 vezes em solução salina estéril. A concentração de células fúngicas foi ajustada após contagem em câmara hemocitométrica. A viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando-se o corante vital Janus Green B, (BERLINER e RECA, 1966) e foi sempre superior a 80%.

##### **3.1.3 LAVADO PERITONEAL E CULTIVO DE CÉLULAS ADERENTES**

Camundongos pré-inoculados com 3 ml de meio tioglicolato a 4% (DIFCO) foram submetidos a um processo de obtenção de lavado peritoneal (LP). Para isto, os animais foram sacrificados por excesso do anestésico hidrato de cloral seguido de deslocamento cervical, a pele abdominal rebatida, e exposta à musculatura abdominal. O peritônio foi lavado com injeção de 5 - 6 mL de PBS estéril ou meio de cultura não suplementado (RPMI-1640 Medium). O número total de células do LP foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, após a mistura de 90 µL do diluente Turk e 10 µL da suspensão celular. A viabilidade da suspensão celular foi avaliada utilizando-se o corante Trypan Blue, e foi usada

sempre quando superior a 80%. As suspensões celulares foram mantidas em gelo para contagem diferencial de células e então centrifugadas a 1200 rpm, a 4 °C por 10 minutos e ressuspensas em 1,0 ml de meio de cultura (RPMI-1640 Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram ajustadas para  $1 \times 10^6$  /mL e utilizadas nos ensaios de produção de citocinas, NO e quinurenina. Um volume de 500  $\mu$ L de células foi dispensado em cada poço de placas de cultivo de 24 poços. As culturas foram incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% CO<sub>2</sub> por duas horas. As células não aderentes foram removidas por aspiração e a monocamada aderente foi lavada com o meio de cultura não suplementado (RPMI-1640 Medium). O número de células não aderentes foi determinado por contagem em câmara hemocitométrica, sendo subtraído do número de células peritoneais incubadas.

### **3.1.4 TRATAMENTO DAS CULTURAS DE MACRÓFAGOS POR IFN- $\gamma$**

Monocamadas de macrófagos peritoneais de camundongos foram incubadas durante a noite a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> tendo sido tratados previamente com 500  $\mu$ L de meio de cultura suplementado contendo IFN- $\gamma$  (10.000 pg/ml), na presença ou ausência do inibidor de IDO (1-metil-triptofano, Sigma, 1mM). Em alguns experimentos os macrófagos foram tratados com aminoguanidina (AG, Sigma, 1mM), para inibir a síntese de NO.

### **3.1.5 INFECÇÃO DOS MACRÓFAGOS**

As leveduras de Pb foram suspensas em 2 mL de RPMI-1640 Medium. Os macrófagos foram infectados com a suspensão de leveduras, em uma relação levedura-macrófago de 1:25 (CANO et al., 1992, 1994). Foi realizado o co-cultivo por 2 horas, as culturas foram lavadas e novamente incubadas por 48 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e armazenados a – 70 °C para determinar a presença de NO e citocinas.

Os cultivos de 48h foram lisados com água destilada (0,5 ml), o processo repetido por mais três vezes, a suspensão recolhida, centrifugada, ressuspensa em 1,0 ml de RPMI-1640 Medium e plaqueada em meio de cultura adequado para avaliar o número de fungos viáveis recuperados.

### **3.1.6 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)**

As suspensões obtidas dos co-cultivos de 48h foram plaqueadas (100 µL/placa) em meio BHI-ágar com 5% de “fator de crescimento do fungo” e 4% de soro eqüino, especial para recuperação de *P. brasiliensis* viáveis (SINGER-VERMES et al., 1992). As placas foram incubadas a 35 °AZC e as colônias contadas diariamente até que nenhum aumento em UFC fosse observado. Foi ainda realizada a inibição da atividade fungicida de macrófagos pelo pré-tratamento com 1MT. Os dados foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:  $[100 - (\text{CFU experimental} * 100 / \text{CFU controle})]$ .

### **3.1.7 DOSAGEM DE NO**

A concentração de óxido nítrico nos sobrenadantes das co-culturas foi medida com o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% diidrocloreto de naftiletlenodiamina, 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), sendo utilizado um volume de 50 µL do sobrenadante da cultura e igual volume do reagente de Griess. Foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e então determinada a absorbância em equipamento Labsystems Multiskan MCC/340 (leitor). A concentração de óxido nítrico foi determinada utilizando-se curva padrão padronizada com diferentes concentrações de nitrito de sódio (DING et al., 1988).

### **3.1.8 CARACTERIZAÇÃO DAS CITOCINAS E QUIMIOCIAS: ELISA PARA QUANTIFICAÇÃO DE IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF-B, IL-10 E MCP-1**

Foram obtidos sobrenadantes nas diversas condições experimentais e a presença de citocinas analisadas por ELISA de captura utilizando-se pares de AcM para cada citocina murina (Pharmlingen ou RD Systems). As concentrações previamente determinadas para cada um dos AcM primário e secundário no ELISA, contra cada citocina, foram previamente determinadas em nosso laboratório.

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

### **3.1.9 DOSAGEM DE QUINURENINA**

A concentração de quinurenina nos sobrenadantes de co-cultura foi obtida através de ensaio espectrofotométrico. As culturas de macrófagos foram cultivadas em meio suplementado contendo IFN- $\gamma$  (20.000 pg/ml), na presença ou ausência do inibidor de IDO (1-metil-triptofano, Sigma, 1mM). Uma quantidade de 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético 30% foi adicionado a 100  $\mu$ L de sobrenadante de cultura, vortexado e centrifugado a 8000g (10000 rpm) por 5 minutos. O volume de 75  $\mu$ L deste sobrenadante foi então adicionado a um igual volume de reagente de Erlich (100 mg P-dimetilbenzaldeído, 5 mL de ácido acético glacial) em uma microplaca de 96 poços. A densidade óptica foi medida a 492 nm usando equipamento Labsystems Multiskan MCC/340 (leitor). Uma curva padrão definida de concentração de quinurenina (0 - 100  $\mu$ M) permitiu a análise das amostras.

### **3.1.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS**

Comparações entre os diferentes tratamentos foram feitas utilizando análise de variância ou teste  $t$  de Student, dependendo do número de grupos. Foi utilizado o programa Prisma 5 (GraphPad Software). Como nível de significância foi considerado  $p < 0,05$ .

## **3.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO***

### **3.2.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos B10.A e AJ normais. Todos os camundongos tinham a condição de SPF (Specific Pathogen Free) e foram criados no Biotério do Departamento de Imunologia do ICB-USP. Foram utilizados ao atingirem 6 a 8 semanas de idade.

### **3.2.2 INFECCÃO INTRATRAQUEAL (I.T.)**

Os animais foram infectados por injeção i.t. de  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 50  $\mu$ l de PBS. O procedimento foi realizado com os animais sob anestesia como previamente descrito por CANO et al. (1995).

O composto 1-metil-triptofano (1MT, Sigma) um conhecido inibidor da enzima indolamina dioxigenase (IDO) (MUNN et al., 2002) foi administrado aos animais pela via intraperitoneal. Para tanto, 1 mL de uma solução de 1MT dissolvida em PBS (5 mg/ml/animal,) foi inoculada nos animais durante 2 semanas a partir do dia zero da infecção. Nos animais controle foi administrado uma solução de amido de arroz (Sigma) no mesmo volume e concentração dos animais tratados.

### **3.2.3 AVALIAÇÃO DO GRAU DE INFECCÃO ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DE UFC**

O grau da infecção em camundongos tratados ou não com 1MT foi avaliado em todos os animais através da recuperação de fungos viáveis do pulmão, fígado e baço, 2 e 8 semanas após a infecção, usando meio BHI suplementado da mesma forma que o experimento *in vitro*.

### **3.2.4 PREPARO DE SUSPENSÕES DE LEUCÓCITOS INFILTRANTES DE PULMÃO (LIP)**

As suspensões celulares de linfócitos infiltrantes de pulmão foram preparadas de acordo com HUFFNAGLE et al. (1991). Os linfócitos pulmonares foram homogeneizados em meio

RPMI para se obter uma suspensão de células isoladas. Os eritrócitos foram lisados com tampão de lise (cloreto de amônio + TRIS) antes da marcação celular. Os pulmões foram removidos e digeridos por 60 minutos em tampão de digestão contendo colagenase (1 mg/mL) e DNase (30 µg/mL). Os linfócitos foram isolados por centrifugação em Percoll – 20% (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). As células foram contadas e a viabilidade determinada pela marcação de azul de Trypan.

### **3.2.5 CITOMETRIA DE FLUXO PARA CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES CELULARES**

Células infiltrantes dos pulmões (CANO et al., 2000) foram obtidas nas segunda e oitava semanas após infecção. A concentração celular foi ajustada, e os linfócitos foram adicionados à placas de fundo em U na quantidade de  $2 \times 10^6$  céls/poço. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS-azida (0,1%) contendo soro fetal bovino (SFB, 5%). As placas foram centrifugadas, os sobrenadantes foram dispensados e o Ac marcado (20 µL no título adequado) foi adicionado. Após incubação por 20 minutos em geladeira, as células foram lavadas, ressuspensas em PBS-azida e transferidas para tubos de leitura de FACS. Todas as amostras foram mantidas em banho de gelo e protegidas da luz. As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickison) e software FlowJo (Tree-Star). Foram usados anticorpos marcados com isotiocinado de fluoresceína, ficoeritrina ou outro fluorocromo (BD Biosciences) na combinação adequada para a população celular a ser analisada (marcadores celulares de linfócitos: CD4, CD8, CTLA-4, CD25, CD69, GITR e CD62L e marcadores celulares de macrófagos: CD11b, CD11c, CD40, TLR-2, CD86 e Ia<sup>K</sup>).

### **3.2.6 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA NOS HOMOGENATOS DE PULMÃO**

A dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-6, TGF- $\beta$ , IL-23 e IL-17) foi realizada no sobrenadante dos macerados dos órgãos utilizados na determinação de UFC dos animais. A presença e concentração das citocinas foram determinadas de acordo com a técnica descrita no item 3.1.8.

### 3.2.7 DOSAGEM DE NO

A concentração de nitritos nos homogenatos de órgãos e sobrenadantes foi utilizada como indicadora de síntese de NO através do reativo de Griess, seguindo a mesma técnica descrita para o experimento *in vitro*.

### 3.2.8 CITOMETRIA DE FLUXO PARA CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3

Após a obtenção de suspensão contendo  $1 \times 10^6$  células/mL, procedeu-se a marcação de proteínas de membrana com anti-CD4 PE (1/100) e de anti-CD25 FITC (1/100), por 30 minutos em temperatura a 4 °C. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão de coloração (“*staining buffer*”) contendo 2% de soro fetal bovino, 0,1% de azida, 100 mL de PBS (1x). A seguir, foi feita a permeabilização da membrana plasmática com a adição de 200 µL/poço de Cytotfix/Cytoperm (“*Fixation/Permeabilization*” Kit BD Biosciences®) em temperatura ambiente por 30 minutos, protegido da luz. Após a lavagem das células, realizou-se a permeabilização da membrana nuclear com a utilização de 130 µL/poço de solução contendo 750 µL de PBS 1x, 250 µL de paraformaldeído 4%, 5 µL de Tween 20 Sigma® e as células, então, foram encubadas por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro.

Após lavagem das células com PBS (1x) gelado, prosseguiu-se a marcação com o anticorpo para o fator de transcrição nuclear FoxP 3, Cy, diluído a 1/50 em tampão de coloração. As células foram incubadas por 1,5h a 4 °C, posteriormente lavadas com PBS gelado e fixadas com 2% de paraformaldeído, armazenadas a 4 °C no escuro até a análise por citometria de fluxo. Foram feitos os “gates” primeiramente para linfócitos totais, depois para linfócitos T CD4<sup>+</sup>, linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e finalmente, o gate para linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>.

A aquisição das células (100.000 eventos) foi feita pelo FACS Calibur (BD Pharmingen®) utilizando o software Cell-Quest software (BD Pharmingen®). O número de células T reg (T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) foi apresentado pela porcentagem (%) a partir do número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> obtido.

### **3.2.9 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE QUINURENINA**

A concentração de quinurenina nos sobrenadantes de homogenato de pulmão foi obtida através de ensaio espectrofotométrico. Uma quantidade de 50 µL de ácido tricloroacético 30% foi adicionado a 100 µL de sobrenadante de cultura, vortexado e centrifugado a 8000g (10000 rpm) por 5 minutos. O volume de 75 µL deste sobrenadante foi então adicionado a um igual volume de reagente de Erlich (100mg P-dimetilbenzaldeído, 5 mL de ácido acético glacial) em uma microplaca de 96 poços. A densidade óptica foi medida a 492 nm usando equipamento Labsystems Multiskan MCC/340 (leitor). Uma curva padrão definida de concentração de quinurenina (0 – 100 µM) permitiu a análise das amostras.

### **3.2.10 ENSAIOS PARA VERIFICAÇÃO DA VIABILIDADE E APOPTOSE DOS LINFÓCITOS**

Linfócitos obtidos ( $1.0 \times 10^5$  cels/ml) de animais B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT, foram coletados e centrifugados a 4 °C,  $200 \times g$  por 10 min. Posteriormente, os linfócitos viáveis, em apoptose e inviáveis foram determinados utilizando-se o conjunto reativo para detecção de apoptose ANNEXIN V-FITC contendo anexina V-FITC, iodeto de propídio e tampão (SIGMA Chemical Co. Saint Louis, MO, EUA)

Após a segunda centrifugação, as células foram ressuspendidas no tampão de ligação. Em seguida, 500 µL da suspensão de células foram marcados com 5 µL de anexina V-FITC e 10 µL de iodeto de propídio. Após 10 minutos de repouso ao abrigo da luz, a fluorescência das células foi imediatamente determinada em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA). As células que se encontravam nos estágios iniciais da apoptose foram marcadas intensamente por anexina V-FITC, que emite fluorescência verde como resultado de sua ligação preferencial aos resíduos de fosfatidilserina, externalizados no início do processo. Já as células necróticas ou inviáveis foram marcadas intensamente por iodeto de propídio, que emite fluorescência vermelha, e menos intensamente por anexina V-FITC. As células viáveis, por sua vez, não foram marcadas nem por anexina V-FITC, nem por iodeto de propídio.

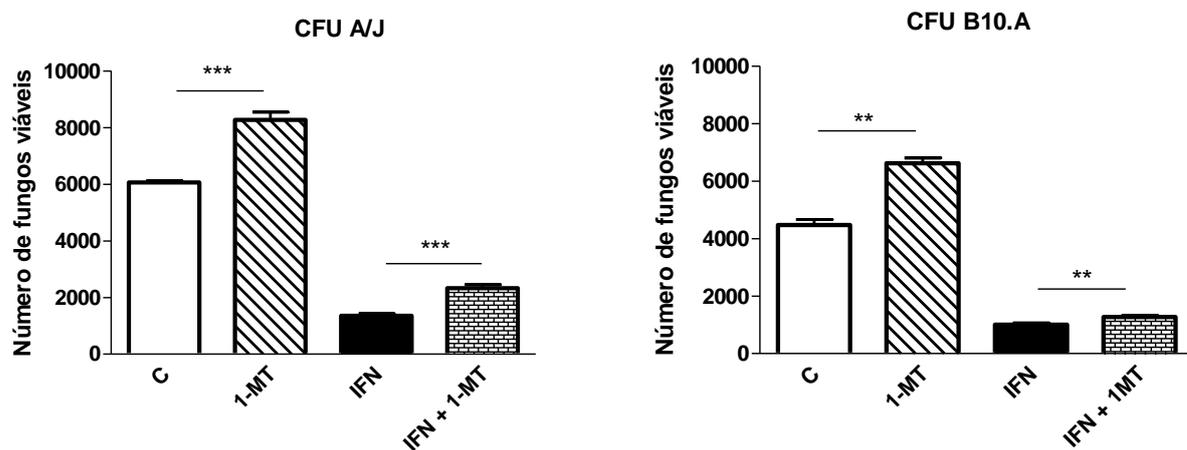
### **3.2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Comparações entre os diferentes tratamentos foram feitas utilizando análise de variância ou teste *t* de Student, dependendo do número de grupos. Foi utilizado o programa Prisma 5 (GraphPad Software). Como nível de significância foi considerado  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 ESTUDO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA ATIVIDADE FUNGICIDA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.**

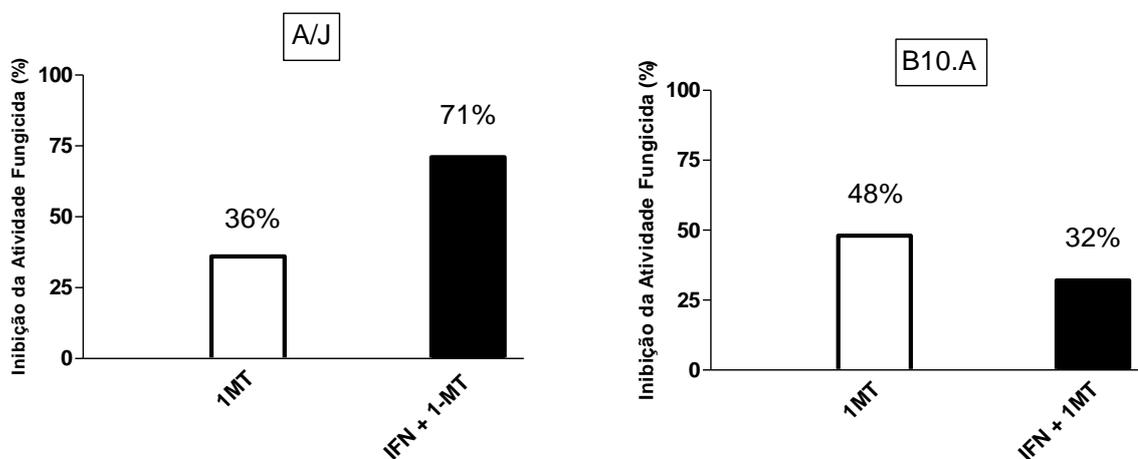
Inicialmente estudamos a influência da adição de 1-metil-triptofano (1MT) no número de fungos recuperados nas culturas de macrófagos dos camundongos A/J e B10.A previamente tratados ou não com IFN- $\gamma$  durante a noite. Após este período, as culturas foram tratadas ou não com 1MT na concentração de 1 mM e posteriormente infectadas com *P. brasiliensis* (relação macrófago:fungo = 25:1). O 1MT foi mantido durante o co-cultivo de 48 horas. Como pode ser observado na figura 1, a presença de 1MT diminuiu a capacidade fungicida de macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A). Conforme previamente demonstrado (PINA et al., 2008) observou-se menor recuperação de leveduras de macrófagos B10.A, uma vez que estas células de camundongos suscetíveis têm uma maior capacidade intrínseca de matar leveduras de *P. brasiliensis*. Além disso, um menor número de fungos foi recuperado das culturas de ambas as linhagens tratadas com IFN- $\gamma$ . O inibidor de IDO, 1MT, adicionado ao meio de cultura aumentou a carga fúngica para ambas as linhagens, e os dados foram mais marcantes para a linhagem A/J ( $p < 0,001$ ). Este dado sugere que os macrófagos de ambas as linhagens utilizam mecanismo IDO-mediado para conter o crescimento de *P. brasiliensis*. Estes experimentos foram repetidos por 3 vezes com resultados equivalentes.



**Figura 1.** Efeito da inibição de IDO na atividade fungicida de macrófagos peritoneais através da recuperação de fungos viáveis (Unidades Formadoras de Colônia-UFC/mL). As monocamadas de macrófagos de A/J e B10.A foram tratadas ou não com IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL), tratadas ou não com 1MT (1 mM) e 24 horas após infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 25 macrófagos. As células foram co-cultivadas por um período adicional de 48h. As barras representam as médias  $\pm$  EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (\*\*P< 0,01 e \*\*\*P< 0,001).

#### 4.1.1 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA

Pelos resultados obtidos na recuperação de fungos através de CFU foi possível aferir o nível de inibição da atividade fungicida, em virtude da adição de 1MT, em duas situações: na presença e ausência de IFN- $\gamma$  (Figura 2). Para a linhagem A/J, houve 36% de inibição da atividade fungicida para as culturas infectadas com Pb + 1MT e 71% para as culturas infectadas com Pb + 1MT, na presença de IFN- $\gamma$ . Na linhagem B10.A, considerando os mesmos parâmetros, houve maior carga fúngica recuperada das culturas tratadas com 1MT e conseqüentemente a inibição da atividade fungicida foi de 48% do controle somente infectado com o fungo. Já na presença de IFN- $\gamma$ , as culturas com 1MT apresentaram 32% de inibição da atividade fungicida em relação ao controle infectado com fungo. Este cálculo demonstra que macrófagos de camundongos B10.A têm uma atividade intrínseca de IDO um pouco mais eficiente que aquelas de animais A/J. Após ativação com IFN- $\gamma$ , observou-se que a ação da IDO era mais efetiva nos macrófagos de camundongos A/J.

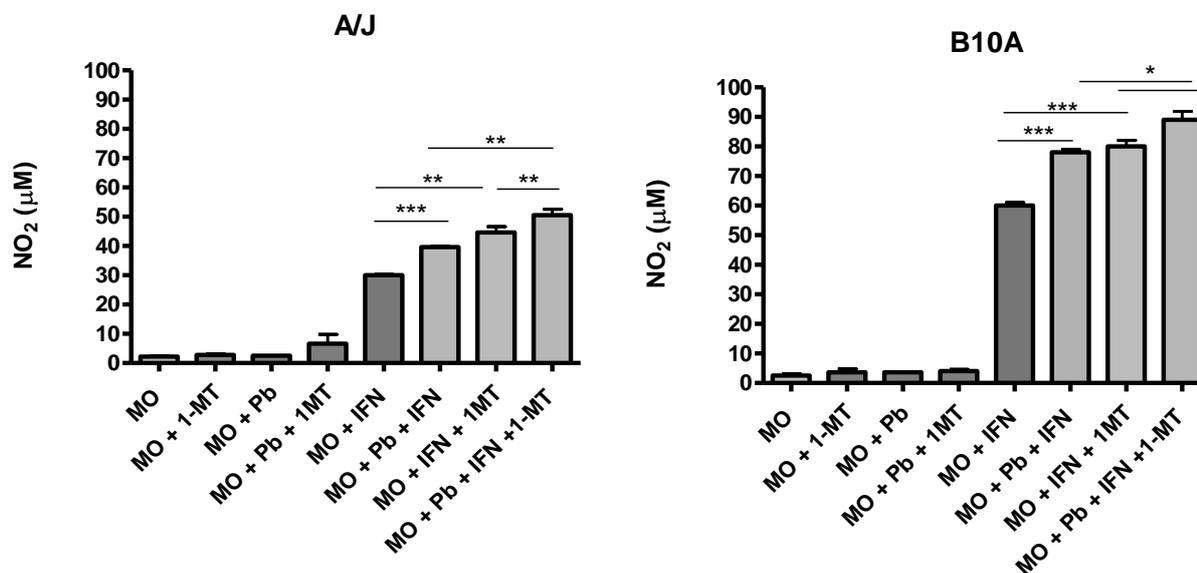


**Figura 2.** Inibição da atividade fungicida de macrófagos pelo pré-tratamento com 1MT. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL) durante a noite e no dia seguinte foram tratados com 1-metil-triptofano (1 mM), e infectados com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. As células foram co-cultivadas por 48h. Os dados foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:  $[100 - (CFU_{\text{experimental}} \times 100 / CFU_{\text{controle}})]$ .

## **4.2 EFEITO DO 1MT NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS**

Os níveis de NO foram determinados nos sobrenadantes de cultivo dos ensaios de atividade fungicida (48 h de cultivo). Houve produção residual de NO nas culturas não tratadas com IFN- $\gamma$  ou somente tratadas com 1MT. A figura 3 mostra que, após a ativação por IFN- $\gamma$ , houve a produção de NO nas culturas de macrófagos de ambas as linhagens de camundongos, porém foi menor para os macrófagos da linhagem A/J. Para ambas as linhagens a adição de IFN- $\gamma$  levou à produção de NO, independentemente da presença do fungo. A adição do fungo potencializou esta produção, assim como a adição de 1MT. Os valores mais altos foram obtidos com a presença de ambas as drogas em ambas as linhagens. Assim, o 1MT faz um efeito sinérgico com o IFN- $\gamma$  na indução da síntese de NO.

A presença de 1MT induziu maior produção de NO com concomitante maior recuperação do número de fungos viáveis, sugerindo que o aumento na produção de NO não foi suficiente para compensar a baixa atividade fungicida conferida pela inibição da enzima IDO.



**Figura 3.** Efeito da inibição de IDO na produção de NO por macrófagos peritoneais de animais A/J e B10.A. Macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL) durante a noite e no dia seguinte foram tratados ou não com 1-metil-triptofano (1MT, 1 mM), e infectados com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. As células foram co-cultivadas por um período adicional de 48h. Os controles correspondem aos macrófagos tratados com IFN- $\gamma$  e macrófagos tratados com 1MT com ou sem IFN- $\gamma$ . Nos grupos que não foram tratados com IFN- $\gamma$  não houve produção de NO. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 5 poços por grupo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ).

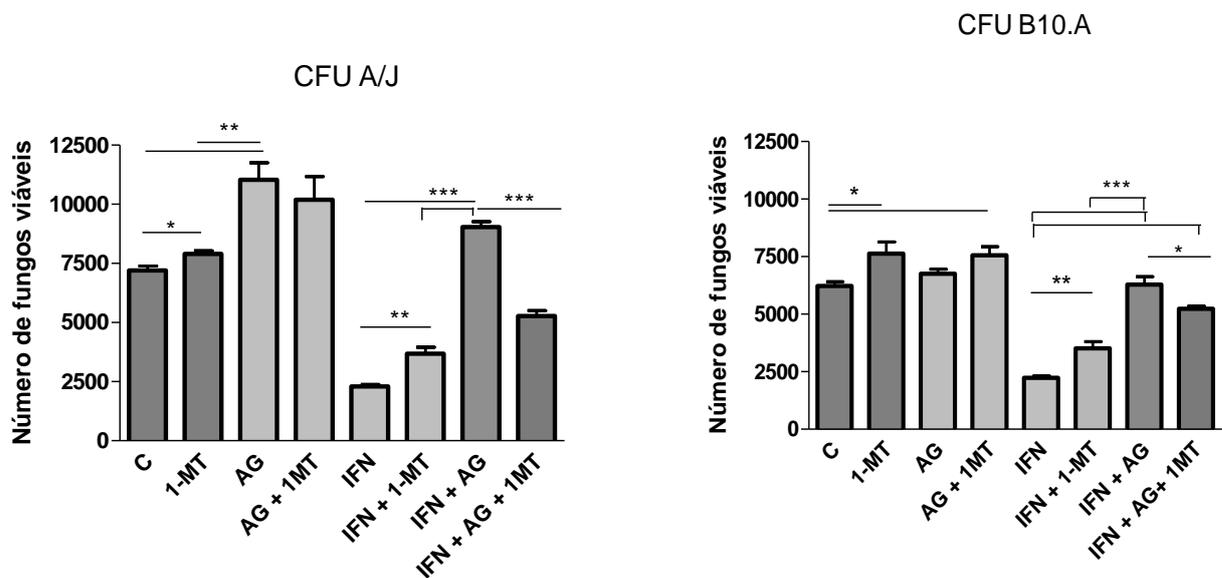
### **4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO E DA INIBIÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) NA ATIVIDADE FUNGICIDA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC)**

Para caracterizar a importância do óxido nítrico e da depleção do triptofano na atividade fungicida dos macrófagos, as culturas foram realizadas na presença de inibidores da IDO, o 1MT, e da iNOS, a aminoguanidina (AG).

A figura 4 mostra a influência da adição de 1-metil-triptofano (1MT) e aminoguanidina (AG) no número de fungos recuperados nas culturas de macrófagos dos camundongos A/J e B10.A previamente tratados ou não com IFN- $\gamma$  durante a noite. Após este período, as culturas foram tratadas ou não com 1MT e/ou AG na concentração de 1 mM e posteriormente infectadas com *P. brasiliensis*. Os inibidores foram mantidos durante o co-cultivo de 48 horas. Como pode ser observado na figura 4, a presença de 1MT e/ou AG alterou a capacidade fungicida de macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A). Na avaliação das culturas de A/J foi observado que o tratamento com AG nas culturas infectadas com fungo, na presença ou não de IFN- $\gamma$  levou a aumento da carga fúngica. No caso de camundongos B10.A, nas culturas infectadas com fungo, sem a presença de IFN, houve uma maior recuperação de fungos nas culturas tratadas com 1MT. Isto demonstra que para macrófagos B10.A sem prévia ativação com IFN- $\gamma$  a IDO exerce função mais importante na ação microbicida do que o NO. Quando foi adicionado IFN- $\gamma$  às culturas de B10.A a inibição com AG favoreceu uma maior recuperação de fungos.

Em conjunto, estes dados demonstram que ambas as linhagens utilizam mecanismos IDO e NO mediados para matar o *P. brasiliensis*. Em macrófagos não ativadas de camundongos B10.A a atividade de IDO parece ser mais importante que aquela mediada por NO. Este fato, entretanto, se perde quando os macrófagos são ativados por IFN- $\gamma$  em que se observa, para ambas as linhagens, uma maior atividade fungicida mediada por NO.

Não foi observado efeito sinérgico de NO e IDO quando ambos os mediadores foram inibidos por AG + 1MT. Inesperadamente, a inibição concomitante de IDO e NO resultou em menores cargas fúngicas. Apesar de não termos explicação para o fato, existe a possibilidade de a AG em conjunto com o 1MT terem sido citotóxicos para os macrófagos.

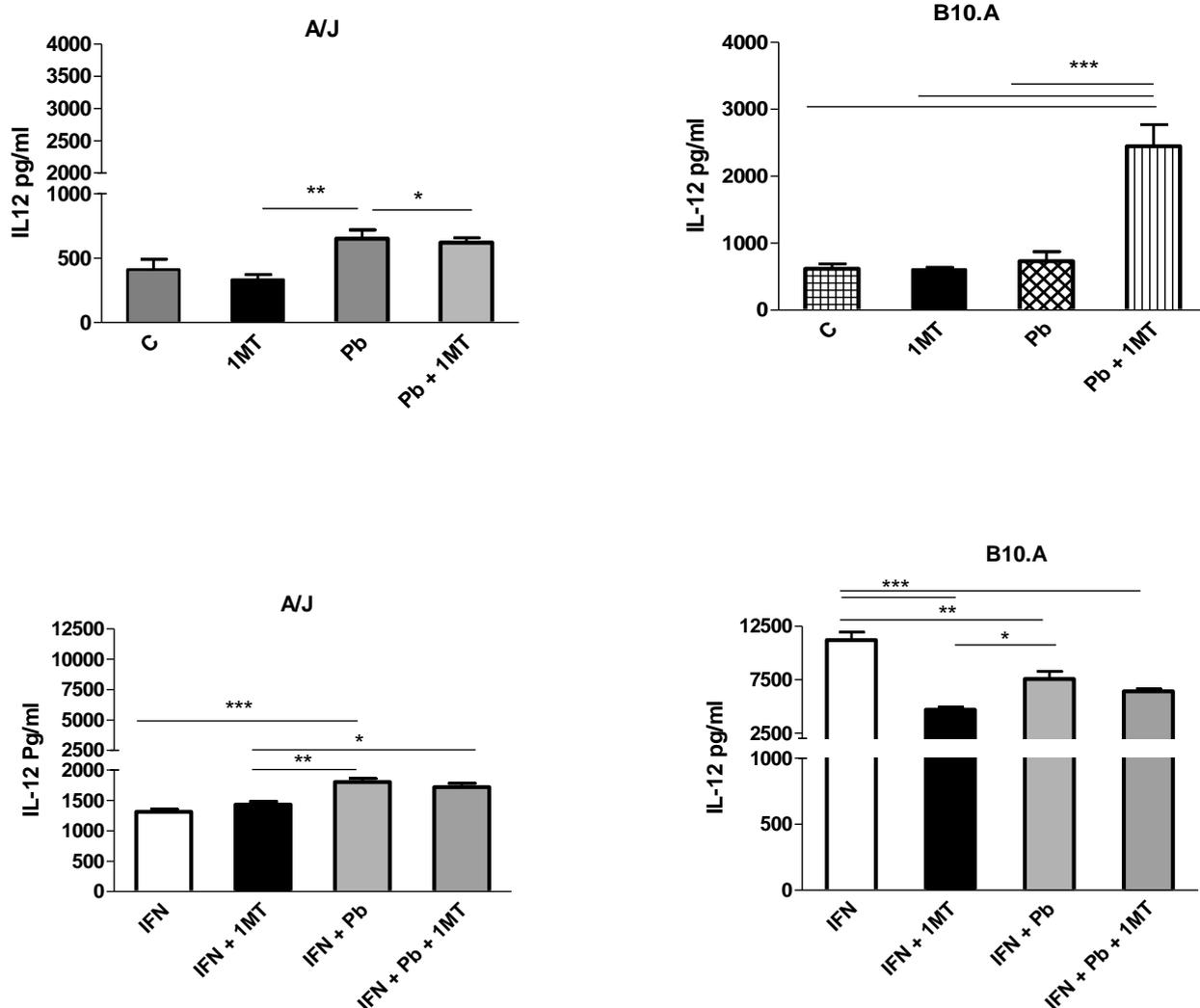


**Figura 4.** Efeito da inibição de IDO e do NO na atividade fungicida de macrófagos peritoneais através da recuperação de fungos viáveis (Unidades Formadoras de Colônia-UFC/mL). As monocamadas de macrófagos de A/J e B10.A foram tratadas ou não com IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL), tratadas ou não com 1-metil-triptofano (1MT, 1 mM) e/ou aminoguanidina (AG, 1 mM) e 24 horas após infectadas com o *P. brasiliensis* na proporção 1 fungo para 25 macrófagos. As células foram co-cultivadas por um período adicional de 48h. As barras representam as médias  $\pm$  EP de 5 poços por grupo ensaiado. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligados pela barra (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01 e \*\*\*P < 0,001).

## **4.4 EFEITO DO 1MT NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS B10.A E A/J**

### **4.4.1 EFEITO NA PRODUÇÃO DE IL-12**

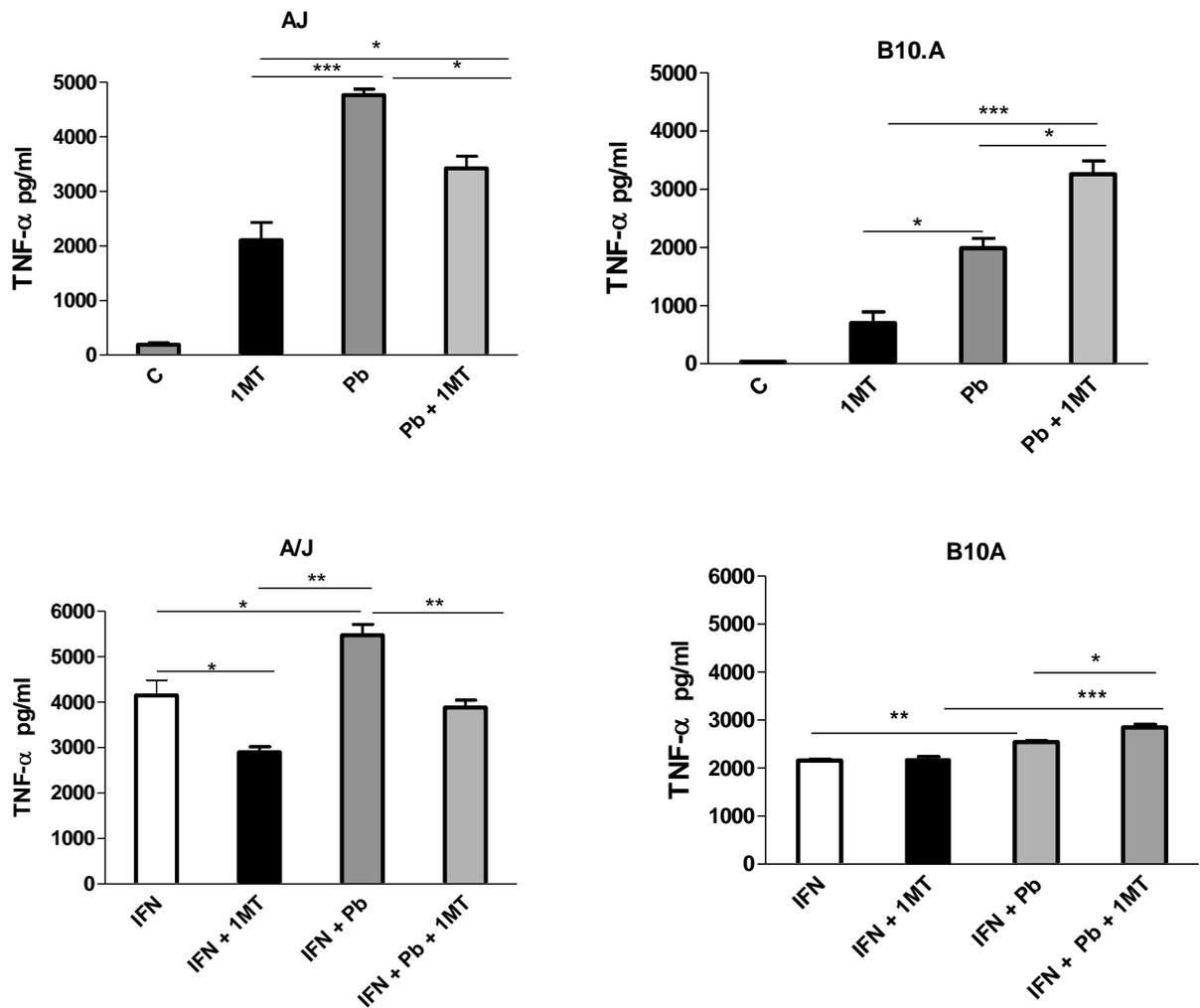
A análise dos níveis da citocina IL-12 medidos dos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A, após 48 horas de co-cultivo com o fungo estão demonstrados na figura 5. As culturas de macrófagos foram infectadas ou não com *P. brasiliensis* e tratadas ou não com IFN- $\gamma$ . Algumas culturas foram tratadas com 1MT, na concentração de 1 mM. Comparada a seus grupos controle, houve maior expressão da citocina IL-12 nas culturas de ambas as linhagens infectadas com fungo de. Já a adição de 1MT nas culturas infectadas levou a um decréscimo na síntese de IL-12 em macrófagos de camundongos A/J porém a um acréscimo marcante de IL-12 produzida por animais B10.A. As culturas de macrófagos dos animais B10.A e A/J quando tratadas com IFN- $\gamma$  produziram maiores concentrações de IL-12 quando comparadas às culturas sem tratamento, com valores expressivos de IL-12 na linhagem B10.A. Na presença de *P. brasiliensis* e IFN- $\gamma$ , o tratamento com 1MT não alterou a produção de IL-12, tanto nas culturas de macrófagos de B10.A como de A/J. Em resumo, o maior efeito do 1MT foi a indução de maiores níveis de IL-12 por macrófagos de camundongos B10.A não estimulados por IFN- $\gamma$ , porém infectados com o *P. brasiliensis*.



**Figura 5.** Influência do tratamento com 1MT na síntese de IL-12 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram tratadas com 1MT na concentração de 1 mM e infectadas ou não com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de IL-12 foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa (\*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001). “C” representa as culturas controle de macrófagos sem tratamento.

#### 4.4.2 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$

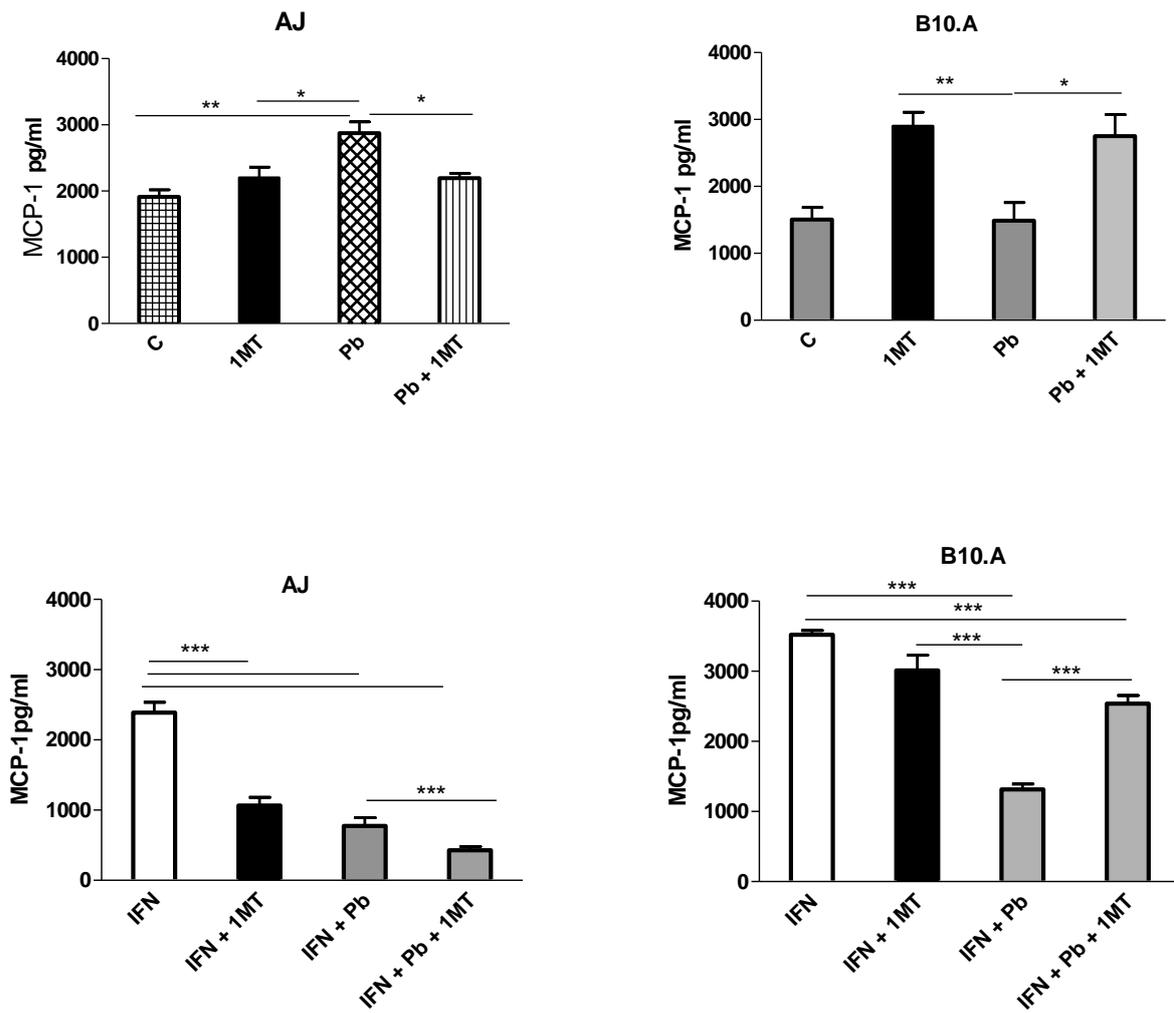
A figura 6 mostra as concentrações de TNF- $\alpha$  obtidas dos sobrenadantes de cultura de macrófagos das linhagens A/J e B10.A, respectivamente. No caso da linhagem A/J, o tratamento com 1MT interfere com a síntese da citocina TNF- $\alpha$ , diminuindo sua produção tanto nas culturas infectadas somente com *P. brasiliensis* quanto nas tratadas com fungo + IFN- $\gamma$ . Por sua vez, quando analisamos a linhagem B10.A, verificamos um resultado oposto em relação ao de camundongos A/J. Na presença de 1MT tanto nas culturas infectadas com *P. brasiliensis* como nas culturas tratadas com fungo + IFN- $\gamma$  houve um aumento significativo da expressão de TNF- $\alpha$ .



**Figura 6.** Influência do tratamento com 1MT na síntese de TNF- $\alpha$  por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de TNF- $\alpha$  foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O grupo controle (C) de macrófagos foi mantido sem tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 5 poços por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes (\*\*\*P<0,001, \*\* P<0,01 e \* P<0,05).

#### **4.4.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE MCP-1**

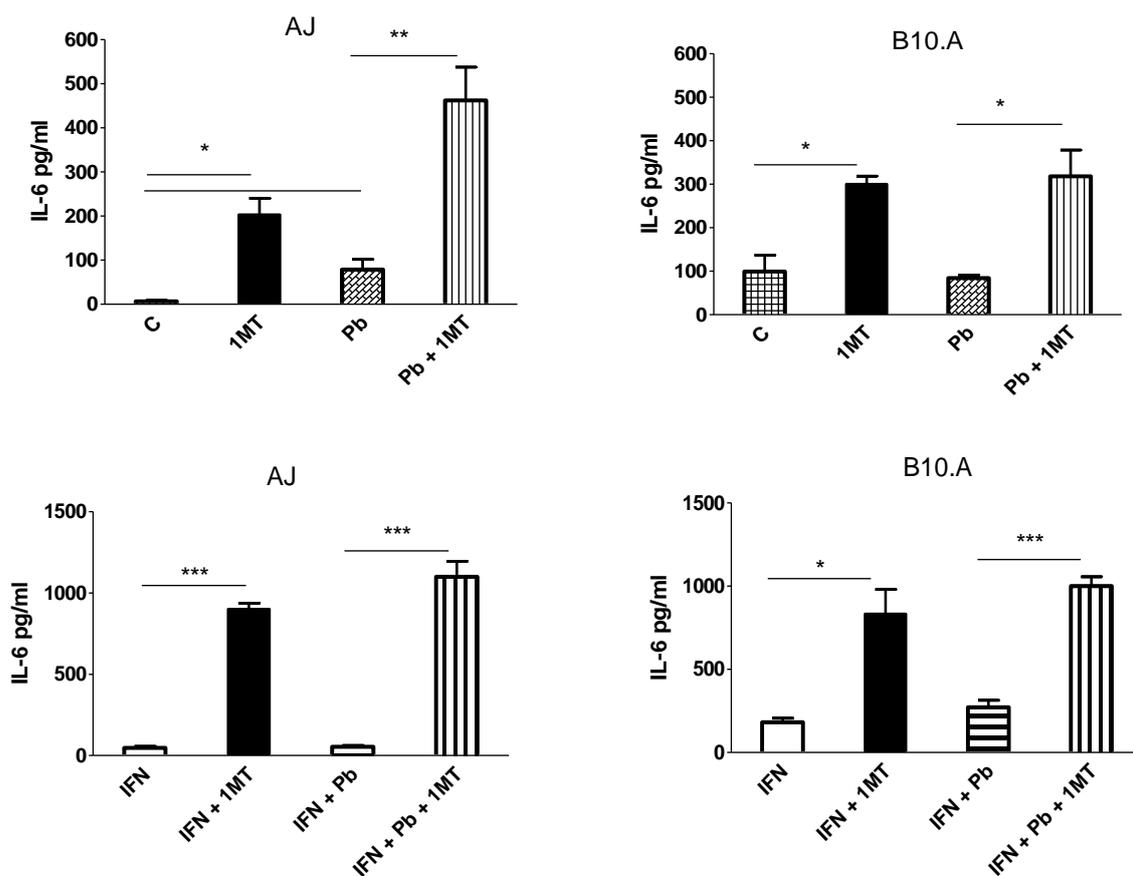
Os efeitos inibitórios de 1MT sobre a ação de IDO resultaram na expressão oposta da quimiocina MCP-1 (Figura 7) por macrófagos de camundongos A/J e B10.A, quando da presença de IFN- $\gamma$  nas culturas. Na linhagem resistente (A/J), as culturas desafiadas ou não com *P. brasiliensis* + 1MT apresentaram concentrações inferiores da quimiocina quando comparadas com seus controles sem 1MT. Quando em presença do fungo a produção de MCP-1 por macrófagos de camundongos B10.A estimulados ou não por IFN- $\gamma$ , aumentou significativamente em relação aos controles.



**Figura 7.** Influência do tratamento com 1MT na síntese de MCP-1. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de quimiocina foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O grupo controle (C) de macrófagos foi mantido sem tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 5 poços por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes (\*\*\* $P$ <0,001, \*\*  $P$ <0,01 e \*  $P$ <0,05).

#### 4.4.4 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE IL-6

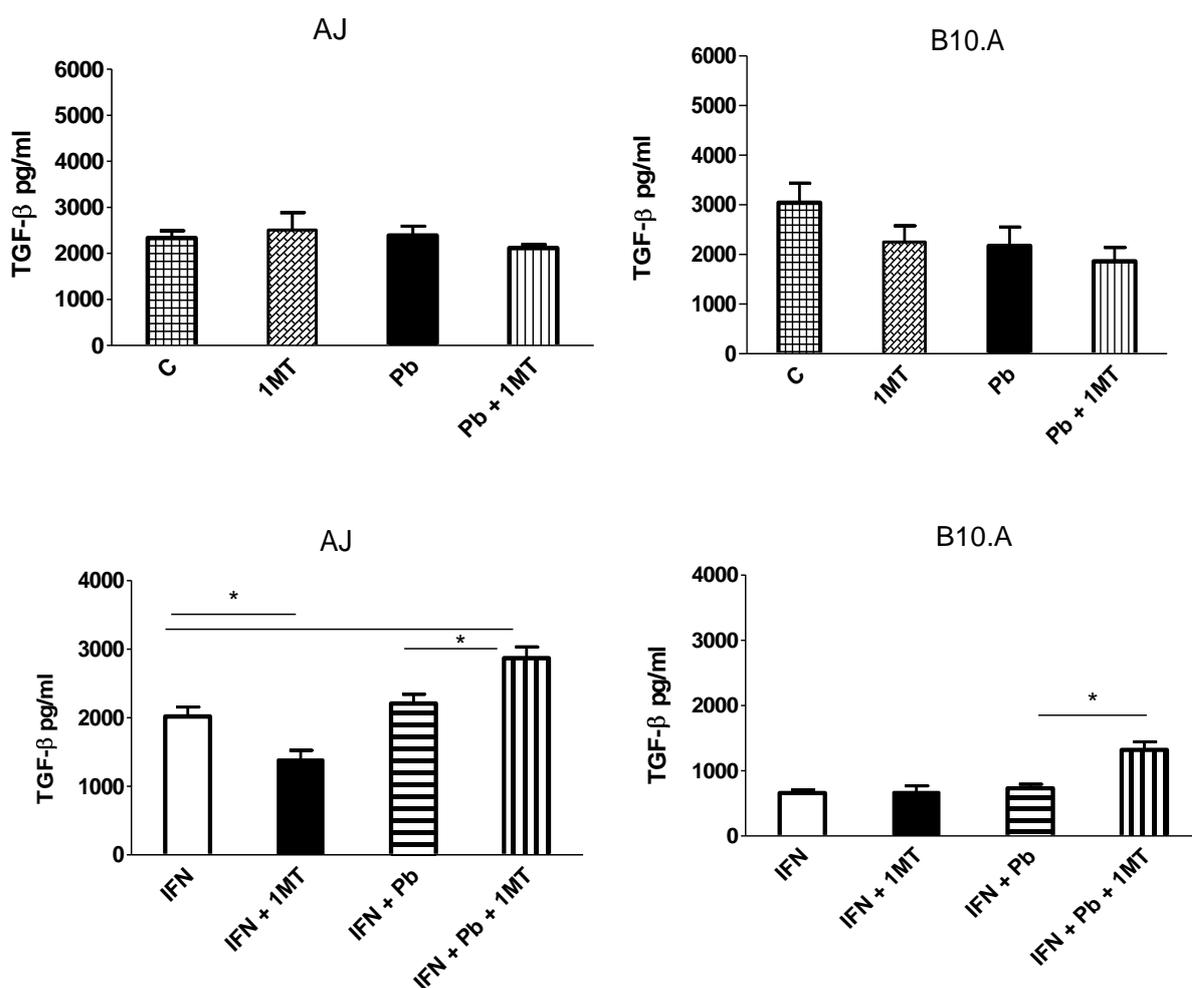
A figura 8 mostra os níveis da citocina IL-6 medidos dos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos resistentes A/J e suscetíveis B10.A, após 48 horas de co-cultivo com o fungo. Só a presença do inibidor de IDO foi suficiente para produzir aumento na produção basal de IL-6 nas culturas de macrófagos. Já após a infecção com *P. brasiliensis*, em ambas as linhagens estudadas, a adição de 1MT nas culturas de macrófagos favoreceu um significativo aumento da síntese de IL-6, nas culturas tratadas e não tratadas com IFN- $\gamma$ . Em resumo, um dos efeitos marcantes da inibição da IDO via 1MT é liberar a expressão desta citocina, com um visível aumento desta síntese nos macrófagos de B10.A e A/J infectados com o *P. brasiliensis*.



**Figura 8.** Influência do tratamento com 1MT na síntese de IL-6 por macrófagos de camundongos resistentes (A/J) e suscetíveis (B10.A) ao fungo. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de TNF- $\alpha$  foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O grupo controle (C) de macrófagos foi mantido sem tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 5 poços por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes (\*\*\*P<0,001, \*\* P<0,01 e \* P<0,05).

#### **4.4.5 EFEITO DA INIBIÇÃO DE IDO NA PRODUÇÃO DE TGF- $\beta$**

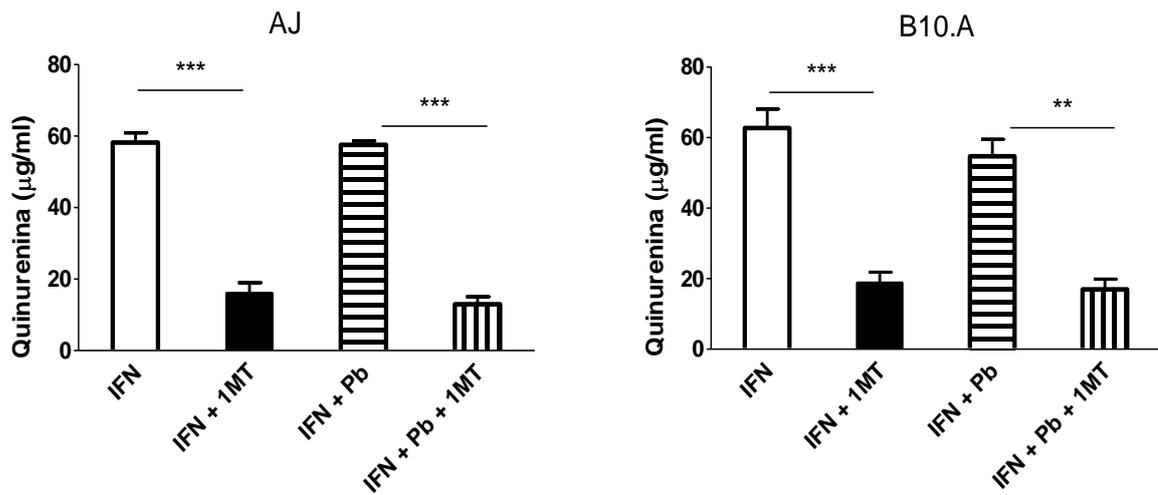
O inibidor 1MT não alterou a produção da citocina TGF- $\beta$  por macrófagos de camundongos A/J e B10.A nas culturas infectadas ou não por *P. brasiliensis* sem a presença de IFN- $\gamma$ , tratadas ou não com 1MT (Figura 9). Por outro lado, quando os macrófagos foram pré-ativados com IFN- $\gamma$ , em ambas as linhagens houve incremento da síntese de TGF- $\beta$  após a adição do inibidor de IDO, o 1MT. Foi observado que nos macrófagos da linhagem resistente (A/J), a quantidade da citocina produzida foi maior que aquela sintetizada pelos camundongos macrófagos de B10.A.



**Figura 9.** Influência do tratamento com 1MT na síntese de TGF- $\beta$ . Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- $\gamma$  (10.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo. Após 48 horas de incubação a produção de quimiocina foi avaliada no sobrenadante do cultivo. O grupo controle (C) de macrófagos foi mantido sem tratamento. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 5 poços por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes (\*  $P < 0,05$ ).

#### **4.5 EFEITO DO 1MT NA PRODUÇÃO DE QUINURENINA POR MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS B10.A E A/J**

Como verificamos que a adição de 1MT interferia na atividade fungicida e secretora de macrófagos B10.A e A/J, julgamos que seria importante caracterizar a ação desta droga na produção de quinurenina, o metabólito produzido pela ação enzimática da IDO sobre o triptofano. Dessa forma, analisamos a produção de quinurenina em culturas de macrófagos de camundongos B10.A e A/J após tratamento com IFN- $\gamma$ , que é a principal citocina indutora da atividade de IDO. Verificamos que em ambas as linhagens, as culturas infectadas ou não com *P. brasiliensis*, a adição de 1MT provocou uma acentuada diminuição na produção de quinurenina nas culturas de macrófagos. Este fato decorreu por ser o 1MT um inibidor competitivo do aminoácido essencial triptofano, levando a uma menor hidrólise enzimática deste aminoácido nos sítios ativos da IDO.



**Figura 10.** Influência do 1MT na produção de quinurenina. Os macrófagos foram cultivados com a adição ou não de IFN- $\gamma$  (20.000 pg/mL) durante a noite. Algumas monocamadas de macrófagos foram infectadas com o *P. brasiliensis* em uma proporção de 25 macrófagos para 1 fungo e tratadas ou não com 1MT (1mM). Após 48 horas de incubação a produção de quinurenina foi avaliada. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 5 poços por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes (\*\* P<0,01, (\*\*\*)P<0,001).

#### **4.6 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM 1MT NA GRAVIDADE DA DOENÇA E NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) POR CAMUNDONGOS B10.A E A/J.**

Camundongos B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT, foram infectados pela via i.t. com um milhão de células leveduriformes do *P. brasiliensis*. A gravidade da infecção e os níveis de NO foram estudados 2 e 8 semanas pós-infecção.

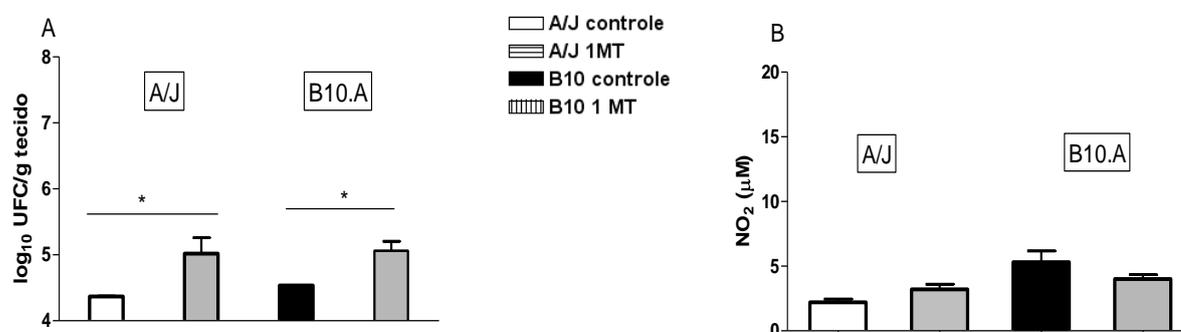
Grupos de animais B10.A e A/J foram sacrificados e um dos pulmões foi removido, pesado, macerado e plaqueado em ágar BHI suplementado. Durante 15 dias foi contado o número de colônias, e o número final foi transformado em  $\log_{10}/g$  de tecido.

Analisou-se a carga fúngica no sítio primário de infecção e a disseminação para fígado e baço. Os dados da figura 11A mostram que o pulmão de animais B10.A e A/J tratados com 1MT apresenta aumento significativo da carga fúngica comparada ao dos animais controle.

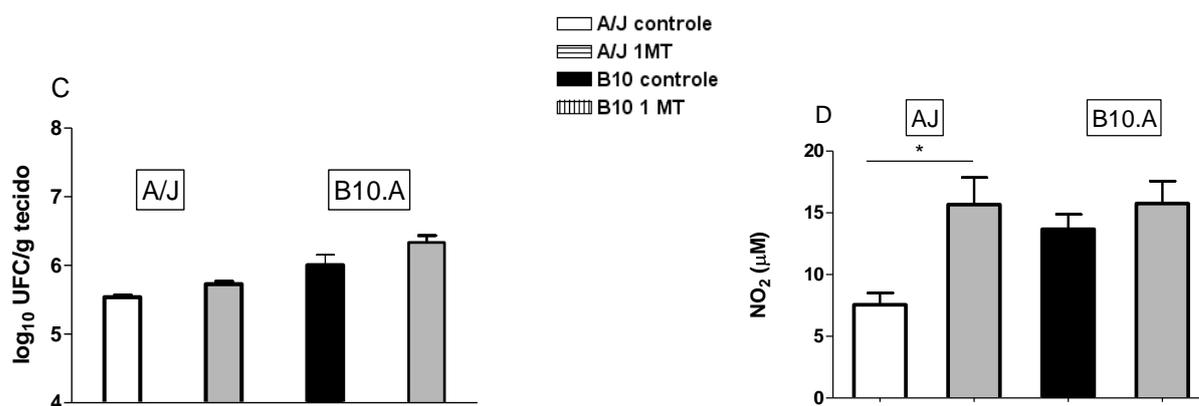
Observou-se disseminação para o fígado e baço nos grupos não havendo, entretanto, diferenças estatisticamente significantes (dados não mostrados). Pelos dados obtidos neste experimento, verificamos que, no período de 2 semanas de infecção, o tratamento com 1MT levou a aumento da carga fúngica em ambas as linhagens. Já na semana 8 pós-infecção não foram observadas diferenças significantes em ambas as linhagens (Figura 11C).

Na segunda semana pós-infecção não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de NO dos grupos controle e os tratados com 1MT, bem como entre as linhagens estudadas (Figura 11B). Na semana 8 (Figura 11D) houve aumento na síntese de NO em ambas as linhagens, porém, diferença estatística só foi observada nos camundongos A/J.

## 2 Semanas pós infecção



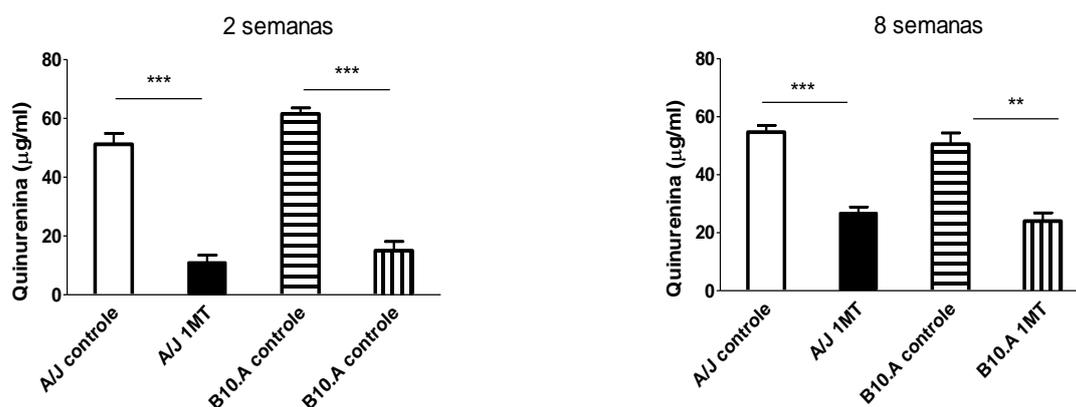
## 8 Semanas pós infecção



**Figura 11.** Avaliação da gravidade da doença por contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de tecido (em  $\log_{10}$ ) em camundongos B10.A (n = 6) e A/J (n = 6) após 2 (A) e 8 semanas (C) de infecção com  $1 \times 10^6$  leveduras de *P. brasiliensis* inoculadas pela via i.t. As barras apresentam as médias  $\pm$  EP dos grupos ensaiados. Resultado representativo de dois experimentos realizados com resultados equivalentes. Níveis de NO nos homogenatos de pulmão de camundongos B10.A e A/J com leveduras de *P. brasiliensis* após 2 (B), e 8 semanas (D) de infecção. As barras representam as médias  $\pm$  EP do número de UFC (6 animais por grupo) \* ( $P < 0.05$ ) comparado com os grupos controle.

#### 4.7 ESTUDO DO TRATAMENTO COM 1MT NOS NÍVEIS DE QUINURENINA PRESENTES NOS PULMÕES DE CAMUNDONGOS B10.A E A/J

Da mesma forma que foi feito com as culturas de macrófagos na análise da produção de quinurenina foi analisada a produção dos metabólitos originados do catabolismo do triptofano depois da ação da enzima IDO e também depois da sua inibição por 1MT. Os homogenatos de pulmão das linhagens B10.A e A/J foram avaliados e vimos que houve produção de quinurenina nos grupos controle, infectados com fungo e estes níveis sofreram redução expressiva após tratamento com 1MT nas linhagens também infectadas com *P. brasiliensis*.



**Figura 12.** Influência do 1MT na presença de quinurenina em homogenatos de pulmão. Foram analisados os homogenatos de pulmão das linhagens B10.A e A/J, tratados ou não com 1MT, quanto à presença de quinurenina no tempo de 2 e 8 semanas pós-infecção com *P. brasiliensis*. Os dados representam a média  $\pm$  EP de 5 animais por grupo. Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significantes (\*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ).

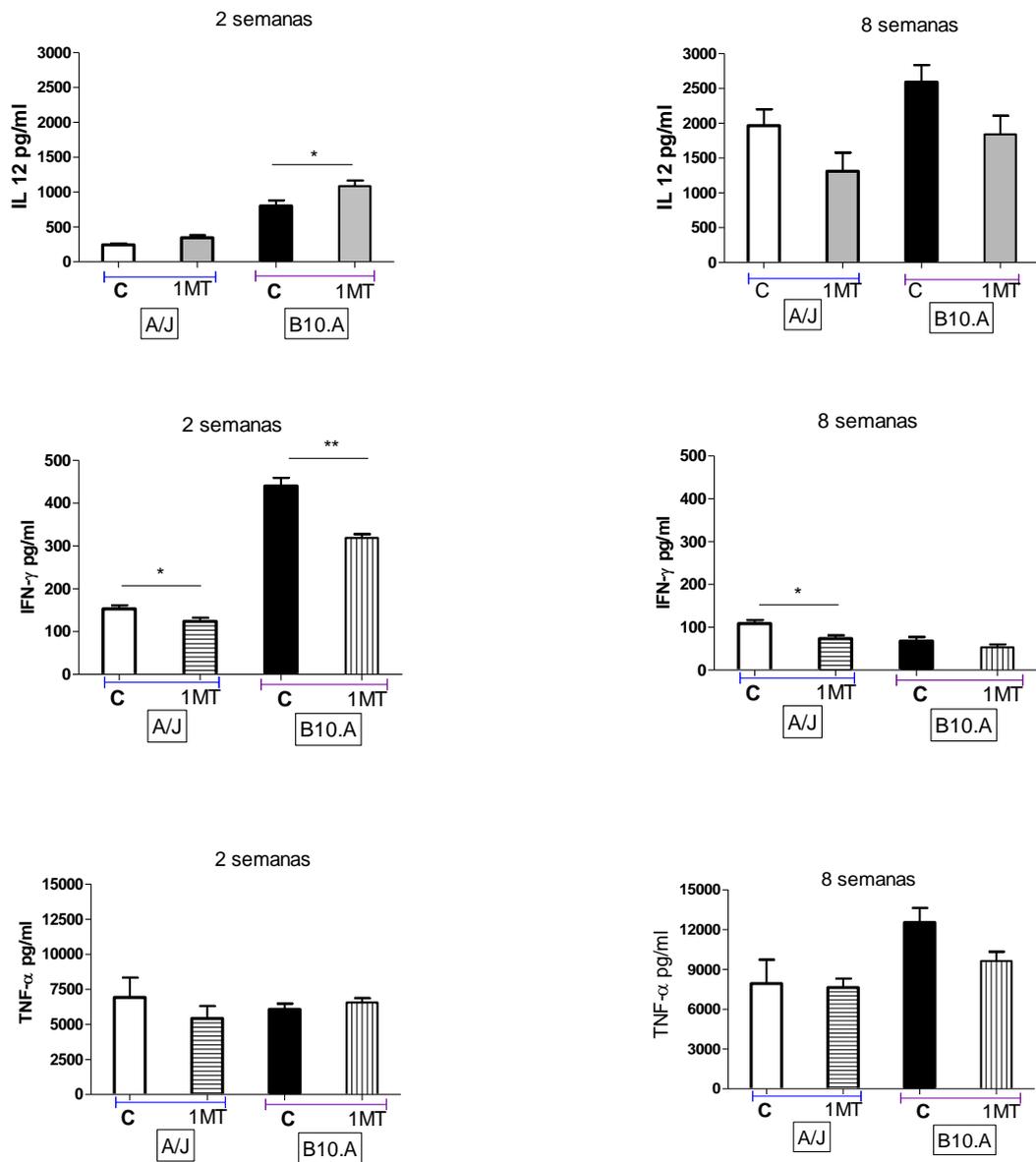
#### **4.8 EFEITO DO TRATAMENTO COM 1MT NOS NÍVEIS DE CITOCINAS PULMONARES DE CAMUNDONGOS B10.A E A/J.**

Os homogenatos dos pulmões, obtidos durante o experimento para a quantificação de UFC, foram conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  e utilizados para a pesquisa de citocinas em animais B10.A e A/J nas segunda e oitava semanas de infecção.

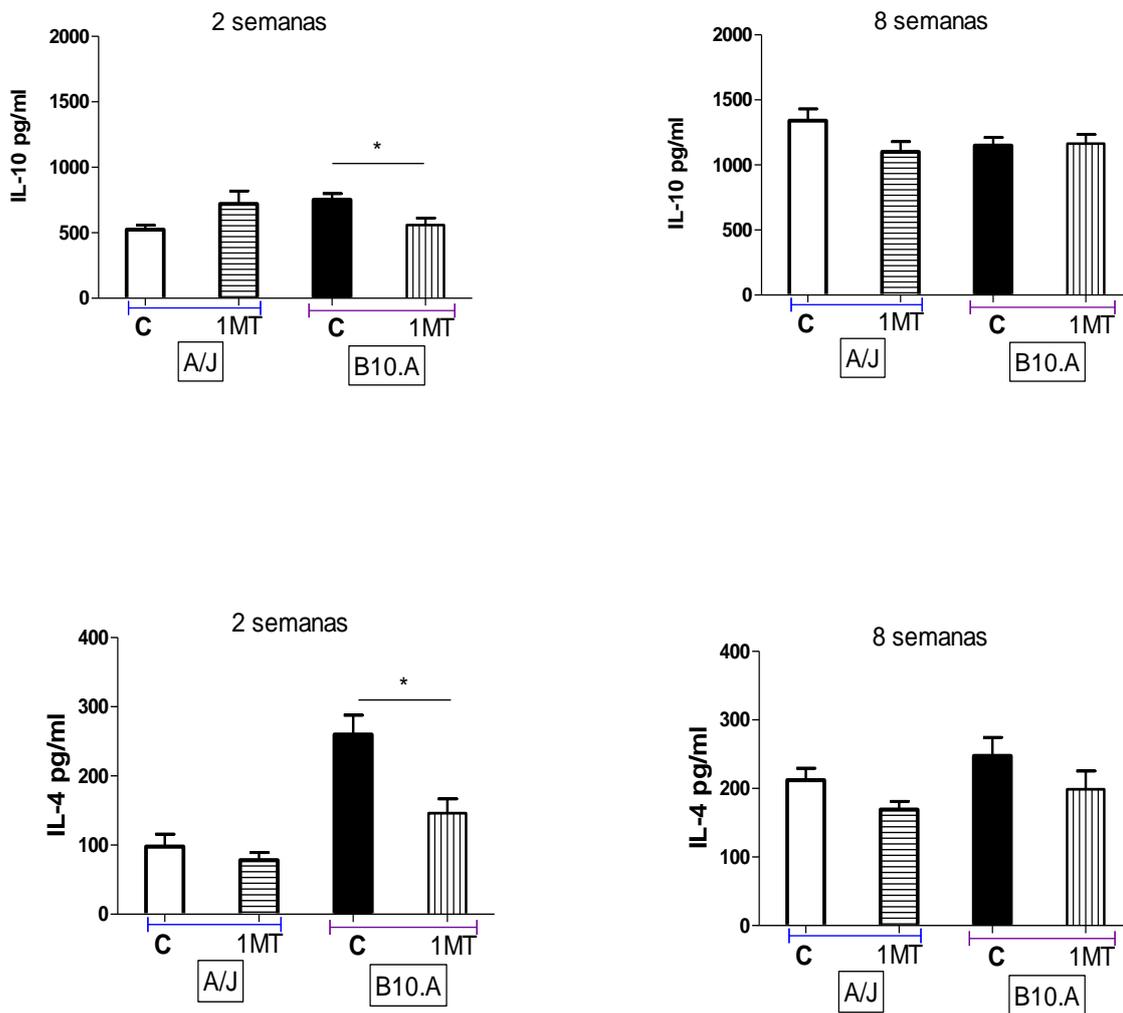
A figura 13 mostra a produção das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos homogenatos de pulmão de camundongos após 2 e 8 semanas de infecção com o *P. brasiliensis*. Em camundongos B10.A, o tratamento com 1MT provocou um aumento na expressão de IL-12, no tempo de 2 semanas pós-infecção, em relação aos animais controle. Por outro lado, houve uma menor produção de IFN- $\gamma$  nesta linhagem após tratamento com 1MT. Na linhagem A/J, o 1MT alterou a produção de IFN- $\gamma$  comparado aos animais controle, neste tempo de infecção. Já no tempo de 8 semanas também encontramos diferenças na produção de IFN- $\gamma$  na linhagem resistente.

A figura 14 mostra os níveis das citocinas IL-10 e IL-4 nos tempos de 2 e 8 semanas pós-infecção. Na semana 2, a adição de 1MT provocou diminuição na produção de IL-10 e IL-4 em camundongos B10.A, enquanto nenhuma diferença foi observada nos camundongos resistentes A/J. Já na semana 8, a produção das citocinas estudadas não foi alterada em nenhuma das linhagens.

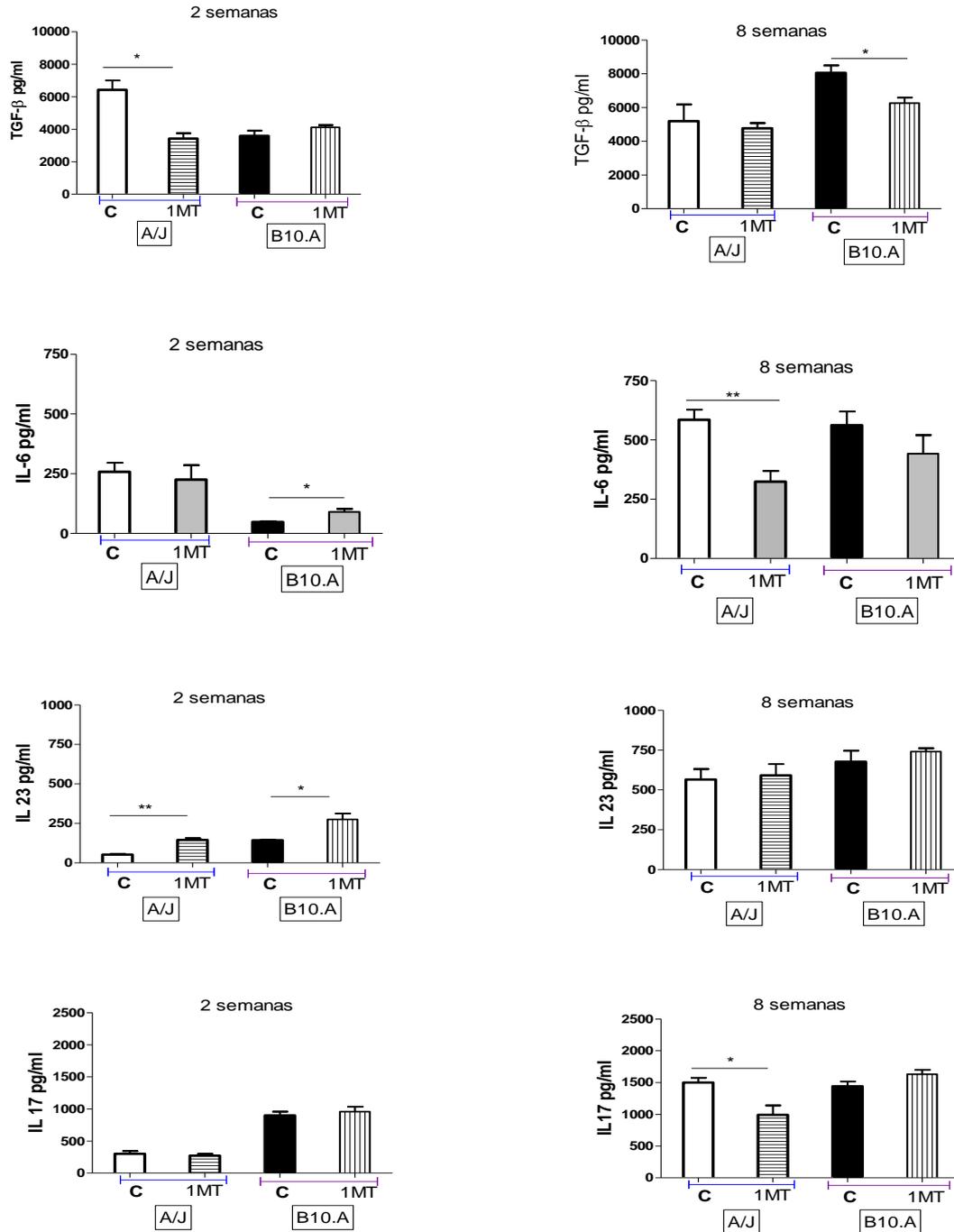
A figura 15 mostra a produção de citocinas TGF- $\beta$ , IL-6, IL-17 e IL-23 nos homogenatos de pulmão de camundongos após 2 e 8 semanas de infecção com o *P. brasiliensis*. Na semana 2, a adição de 1MT provocou diminuição na produção de TGF- $\beta$  nos camundongos resistentes A/J. Por outro lado, neste mesmo tempo de infecção com *P. brasiliensis* verificou-se um aumento significativo na síntese de IL-6 por parte dos camundongos B10.A. Já para IL-23, houve aumento significativo de IL-23 para o grupo tratado com 1MT nas duas linhagens estudadas, enquanto que para IL-17 não observamos diferenças. Já na semana 8, a produção de TGF- $\beta$  se mostrou menor apenas em camundongos B10.A. Este fato também acontece na linhagem A/J em que houve diminuição de IL-6 apenas no tempo longo de infecção. Quando analisamos a produção de IL-23 e IL-17 no tempo longo, 8 semanas, verificamos que o tratamento com 1MT diminuiu a produção de IL-17 apenas na linhagem A/J enquanto que os níveis de IL-23 não sofreram alterações.



**Figura 13.** Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas de infecção (\*P<0,05).



**Figura 14.** Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de IL-10 e IL-4 nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas de infecção (\* $P < 0,05$ ).



**Figura 15.** Efeito do tratamento com 1MT nos níveis de TGF-β, IL-6, IL-23 e IL-17 nos homogenatos de pulmão de animais B10.A e A/J após 2 e 8 semanas de infecção ( \*\*P<0,01, \*P<0,05).

#### **4.9 ANÁLISE FENOTÍPICA DE LEUCÓCITOS INFILTRANTES DE PULMÃO DE ANIMAIS B10.A E A/J NAS SEGUNDA E OITAVA SEMANAS DE INFECÇÃO**

Há vários trabalhos que demonstram que IDO é um potente composto microbicida por diminuir a disponibilidade de triptofano, um aminoácido essencial para a multiplicação de muitos patógenos (SEDLMAYR et al., 2002, UYTENHOVE et al., 2003). Um outro efeito mediado pela IDO é o controle dos processos inflamatórios imuno-mediados. Assim, a quinurenina, produto do catabolismo do triptofano é potente supressor da resposta imune (MELLOR et al., 1999, GROHMANN et al., 2003).

Como verificamos que o tratamento com 1MT alterava a carga fúngica, resolvemos investigar o efeito deste composto no afluxo de células inflamatórias para o sítio de infecção. Assim, células infiltrantes dos pulmões foram obtidas nas segunda e oitava semanas após a infecção. A concentração celular foi ajustada a  $1 \times 10^6$  cels/mL e marcadas com anticorpos marcados no título previamente determinado e na combinação adequada para a população celular a ser estudada. Como pode ser observado na Figura 16A, na segunda semana, a inibição da IDO pelo tratamento com 1MT levou à maior frequência de linfócitos TCD4+ e TCD8+ nos pulmões dos camundongos B10.A. Neste tempo houve diminuição das células CTLA-4 e GITR positivas sugerindo diminuição de expressão das células T reguladoras. O tratamento, entretanto, não alterou as duas subpopulações TCD4+ e TCD8+ em camundongos A/J. Como esperado, a frequência de células TCD4+ e TCD8+ foi sempre maior nos pulmões de camundongos resistentes que nos suscetíveis. Já na oitava semana de infecção (Figura 16B), a inibição de IDO com 1MT levou a um quadro de afluxo ainda acentuado de células TCD4+ e TCD8+ nos camundongos B10.A, porém sem alteração da expressão de marcadores de células Treg, (CTLA-4 e GITR). Já para os camundongos resistentes (A/J), diferentemente da segunda semana, após 8 semanas de infecção houve um incremento no afluxo celular de linfócitos TCD4+ demonstrando um efeito tardio da IDO na inibição da expansão de células T. Somado a este fato foi verificada uma diminuição dos marcadores de ativação associados a células Treg (CTLA-4 e GITR) nos camundongos tratados com 1MT indicando uma provável diminuição deste fenótipo celular.

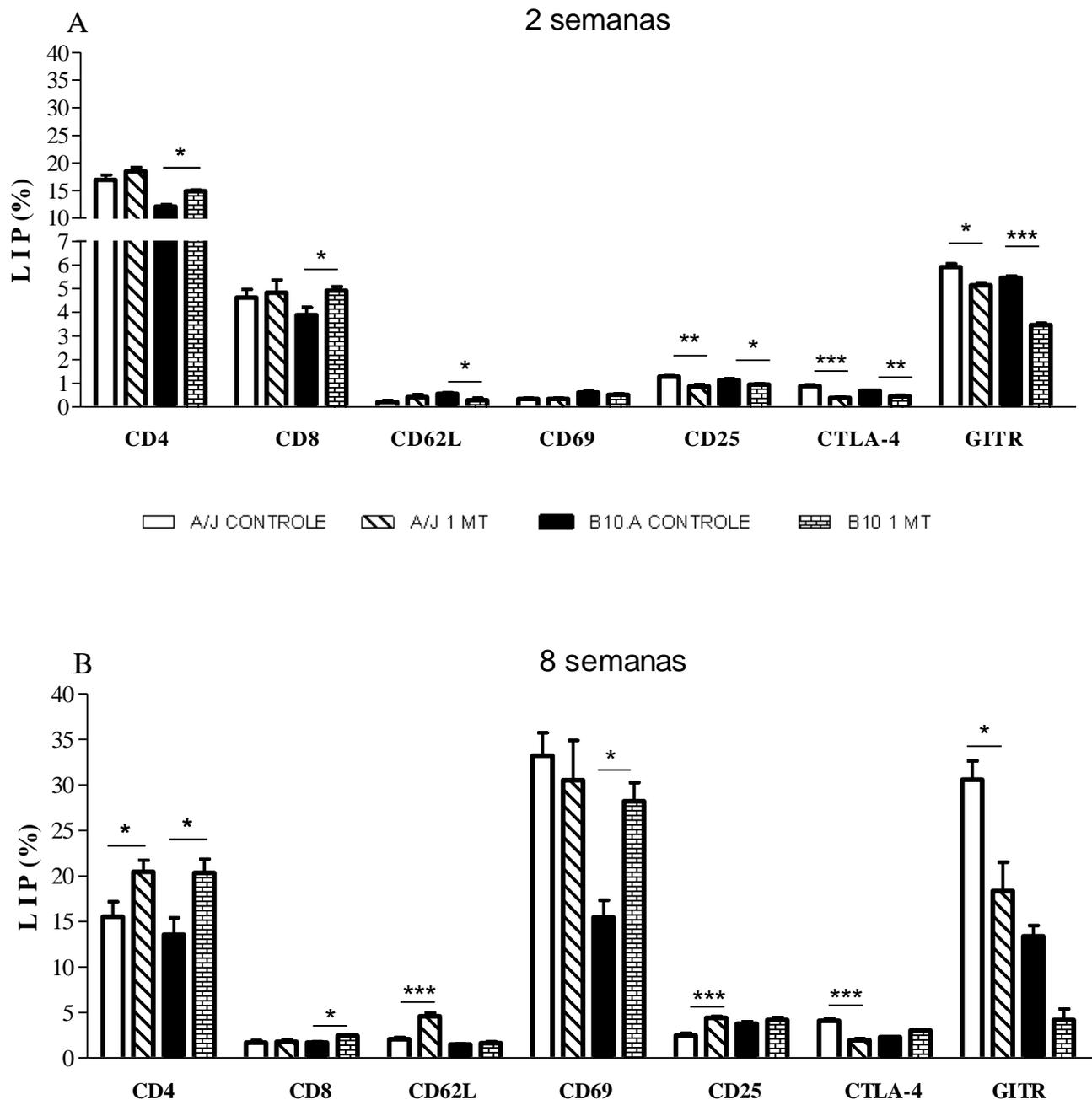
Em macrófagos (ou monócitos) de camundongos suscetíveis o tratamento com 1MT levou à redução da frequência de células expressando moléculas de MHC de classe II (Ia<sup>K</sup>) na segunda semana pós-infecção (Figura 17A). Ainda observamos um aumento na expressão de CD11b e diminuição marcante de CD86. Por outro lado, o tratamento com 1MT levou à

aumentos na expressão de TLR-2. Já na oitava semana, apenas CD86 sofreu redução após tratamento com 1MT, enquanto os outros marcadores de ativação de macrófagos não sofreram alterações significativas (Figura 17B).

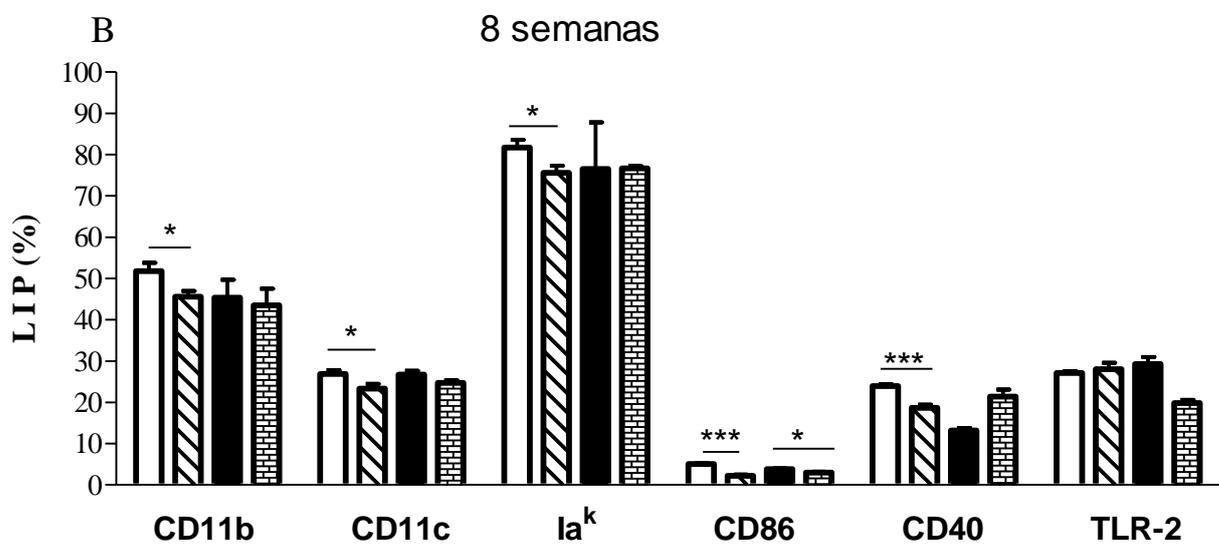
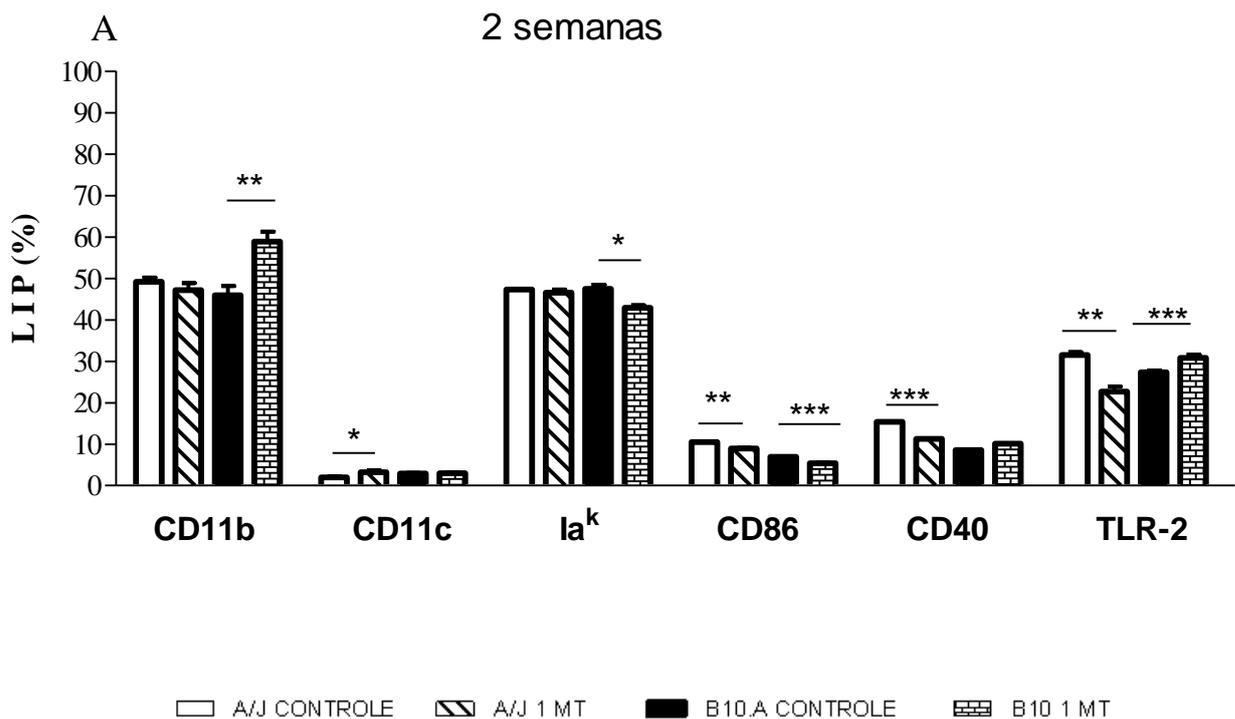
Em macrófagos de camundongos A/J, na segunda semana (Figura 17A), houve redução da frequência de células expressando CD86, CD40 e TLR-2. Por outro lado, maior frequência de macrófagos expressando CD11c foi observada. Já na oitava semana (Figura 17B) o tratamento com 1MT levou à redução da frequência de células expressando moléculas de CD11b, CD11c, MHC de classe II (Ia<sup>K</sup>), CD86 e CD40.

Podemos sugerir que a inibição daIDO incrementou o afluxo de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> para os pulmões de camundongos B10.A. A alteração mais marcante nos macrófagos foi a diminuição de células Ia<sup>K+</sup>.

A inibição de IDO não alterou a frequência de linfócitos T nos pulmões de camundongos resistentes na segunda semana, ao passo que na oitava semana houve afluxo aumentado de TCD4<sup>+</sup>. Por outro lado parece haver reduzido a frequência de macrófagos ativados no local de infecção.



**Figura 16.** Influência do tratamento com 1MT nas populações de leucócitos infiltrantes de pulmão (LIP). Caracterização das subpopulações de linfócitos presentes nos pulmões de camundongos B10.A (n = 5) e A/J (n = 5) nas segunda (A) e oitava (B) semanas de infecção com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t.. A expressão foi determinada por citometria de fluxo (\*\*\*) $P < 0,001$ , \*\*)  $P < 0,01$  e \*)  $P < 0,05$

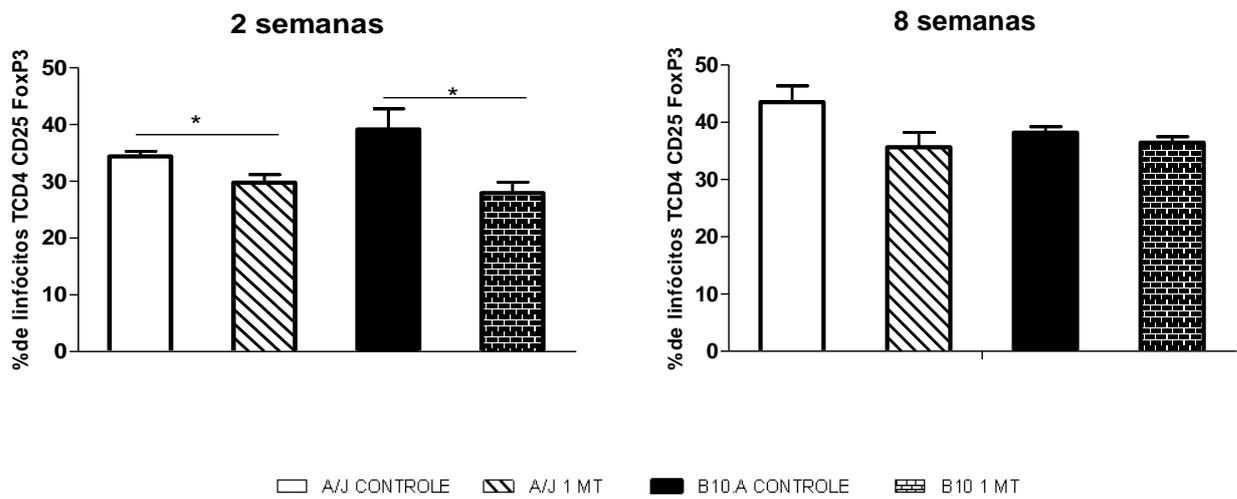


**Figura 17.** Quantificação de macrófagos infiltrantes de pulmão de camundongos B10.A (n = 5) e A/J (n = 5) nas segunda (A) e oitava (B) semanas de infecção com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t.. A expressão de marcadores foi determinada por citometria de fluxo. (\*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 e \*P<0,05).

#### **4.10 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM 1MT NA EXPANSÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS DO FENÓTIPO T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> NO PULMÃO DE ANIMAIS B10.A E A/J**

Analisamos a presença de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> no infiltrado pulmonar de camundongos B10.A e A/J, pela técnica de citometria de fluxo. A porcentagem de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foi obtida pela quantificação de células triplamente positivas em gate de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. As populações de linfócitos totais, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> com relação ao tamanho e granulosidade dessas células, foram determinadas em porcentagem utilizando “gates” individuais.

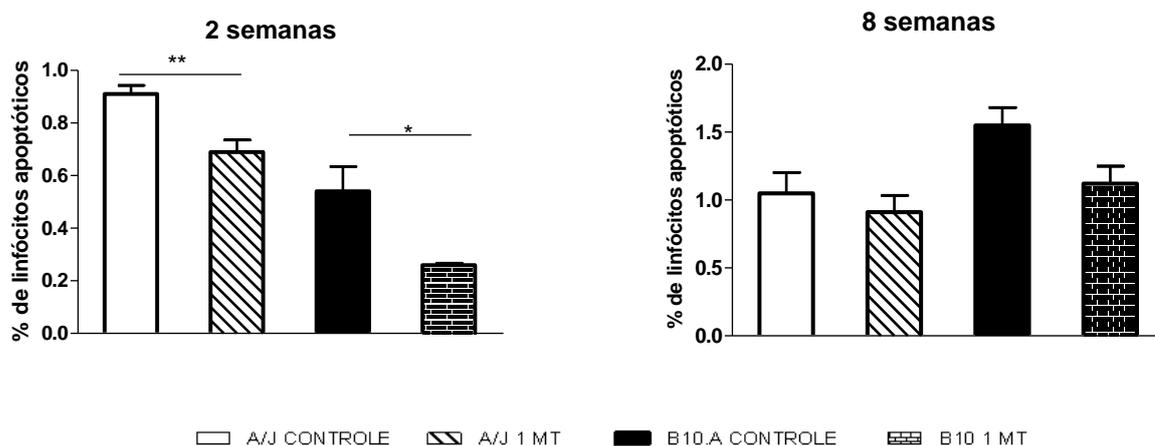
A figura 18 mostra que na segunda semana de infecção, o número de células T reguladoras em animais B10.A e A/J tratados com 1MT foi menor que seus grupos controles. Por outro lado, na oitava semana, não observamos diferenças na frequência de células T reguladoras nos pulmões dos animais B10.A tratados com 1MT, contudo constatamos uma tendência de manutenção do número maior de células T reguladoras nos animais A/J sem tratamento, repetindo assim o comportamento do tempo de 2 semanas de infecção. Em resumo as populações de células T reguladoras repetem o que nós vimos na fase crônica da doença quanto à carga fúngica, em que as diferenças bem claras obtidas após o tratamento com 1MT se perderam, possivelmente pela recuperação do controle da enzima IDO sobre a ação inibitória de 1MT.



**Figura 18.** Frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> presentes nos pulmões de camundongos B10.A e A/J (n = 6) nas segunda e oitava semanas de infecção com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t.. A expressão de linfócitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> foi determinada por citometria de fluxo. O valor em porcentagem (%) de cada população é apresentado como média  $\pm$  EP. \*P < 0,05 estatisticamente significante.

#### 4.11 CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS APOPTÓTICAS NO PULMÃO DE ANIMAIS B10.A E A/J NAS SEGUNDA E OITAVA SEMANAS DE INFECCÃO

Um das ações da IDO é a produção de metabólitos derivados da quinurenina. Esses metabólitos por sua vez tem entre outras propriedades o aumento da apoptose de células como linfócitos T e B, macrófagos, dentre outras. Dessa forma, analisamos a frequência de linfócitos T em apoptose através do marcador Anexina V após infecção por *P. brasiliensis* no tempo de 2 e 8 semanas. O tratamento com 1MT, nas duas linhagens, B10.A e A/J, diminuiu a frequência de células apoptóticas comparando com seus grupos controles, na semana 2. Já na semana 8, não observamos diferenças nas frequências de células em apoptose.



**Figura 19.** Frequência de linfócitos apoptóticos presentes nos pulmões de camundongos B10.A e A/J (n = 6) nas segunda e oitava semanas de infecção com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de *P. brasiliensis* por via i.t.. A expressão de linfócitos apoptóticos foi determinada por citometria de fluxo. O valor em porcentagem (%) de cada população é apresentado como média  $\pm$  EP. \*P < 0,05 estatisticamente significativa.

## 5 DISCUSSÃO

Muitos trabalhos têm descrito a função da enzima indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), especialmente o seu efeito imunomodulador ligado não somente à depleção de triptofano, mas também aos metabólitos que são gerados a partir deste aminoácido, mais especificamente os derivados da quinurenina. Fallarino et al. (2002) expuseram células T, macrófagos e DCs aos metabólitos do triptofano, ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA) e quinolato, e demonstraram aumento de apoptose. Outro estudo demonstrou que quinurenina, 3-HAA e hidroxiquinurenina (3-HK) suprimiram a proliferação alogênica de células T de uma forma aditiva, e verificaram que células T efetoras eram mais sensíveis aos metabólitos do triptofano do que células T naïve (TERNESS et al., 2002).

Como a enzima IDO tem ação localizada depois de sua expressão intracelular, a possibilidade de imunorregulação através da manutenção de sua atividade no sistema imune se constitui em desafio atual da pesquisa. Nos casos de hiper-ativação do sistema imune pretende-se obter uma indução enzimática que se mantenha sustentada talvez pela introdução do gene IDO por transfecção em células alvo (MULLEY et al., 2008).

Resultados de Fallarino et al. (2006) apoiam a sugestão que a expressão de IDO pode induzir células T regulatórias. Estes autores demonstraram o aparecimento de células regulatórias T CD4<sup>+</sup> expressando Foxp3 originárias de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naïve depois de serem expostas à depleção de triptofano combinado com excesso de quinureninas. Ao mesmo tempo, IDO se estabelece como um verdadeiro mecanismo imunoregulador na infecção controlando o balanço entre células Th17 e Tregs. Somado a isso, é sugerido que IDO e quinureninas, na sua capacidade de induzir Tregs e inibir Th17, contribuem de forma fundamental para a definição da linhagem celular efetora nas infecções fúngicas (ZELANTE et al., 2009).

A enzima IDO não parece ser necessária para a manutenção constitutiva da tolerância ao próprio. Isto foi demonstrado pelo fato de que camundongos KO para IDO (Ido<sup>-/-</sup>) não desenvolverem doenças linfoproliferativas ou autoimunes letais (MELLOR et al., 2003).

Os macrófagos parecem não expressar IDO de forma constitutiva, mas o fazem após receberem um sinal de indução de IFN- $\gamma$ , mesmo assim não expressam altas concentrações de IDO. Pelo contrário, IDO pôde ser detectada de forma constitutiva em DCs plasmocitóides (células CD123<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>). Entretanto, a ativação com IFN- $\gamma$  era ainda requerida para a

atividade funcional da enzima, sugerindo que a proteína IDO poderia existir tanto nas formas enzimaticamente ativas como nas inativas (THOMAS et al., 2007; MUNN et al., 2002). Por outro lado, Munn et al. (1999) demonstraram que macrófagos estimulados por IFN- $\gamma$  inibiram respostas de células T alogênicas in vitro e que a inibição foi revertida pela adição de 1MT.

Neste trabalho investigamos o efeito da inibição da IDO na gravidade da PCM desenvolvida por camundongos resistentes e suscetíveis ao *P.brasiliensis*. Caracterizamos também o efeito deste tratamento na atividade fungicida e secretora de macrófagos. Além disso, estudamos o efeito do tratamento com 1MT nas populações celulares (linfócitos e macrófagos) que compunham as lesões pulmonares de ambas as linhagens de camundongos.

No estudo da inibição da atividade fungicida realizado através da determinação de unidades formadoras de colônias (UFC), foi observado que a adição de 1MT nas culturas de macrófagos de animais A/J e B10.A, sem tratamento com IFN- $\gamma$ , induziu uma recuperação sempre maior de fungos viáveis em relação aos macrófagos sem tratamento. Isto nos permite concluir que a inibição de IDO por 1MT disponibiliza maior quantidade do substrato essencial, o aminoácido triptofano, levando ao aumento da carga fúngica. Já quando tratamos as culturas de macrófagos previamente com IFN- $\gamma$ , verificamos claramente uma redução nas cargas fúngicas destas culturas, tratadas ou não com 1MT, sugerindo que a ativação dos macrófagos favoreceu diversas vias de ação microbicida como as mediadas pelo NO e IDO. Contudo, o efeito da inibição de IDO é evidente uma vez que houve uma maior recuperação de fungos viáveis de culturas IDO-inibidas quando comparadas às culturas não tratadas com 1MT. Este dado demonstra que ambas as linhagens utilizam de mecanismo IDO-mediado para impedir o crescimento do fungo *P.brasiliensis*. A porcentagem de inibição da atividade fungicida obtida em nossos ensaios de CFU in vitro mostrou diferenças entre as linhagens quanto à ação indutora de IFN- $\gamma$ . Constatamos uma inibição maior para os macrófagos de animais B10.A. sem adição de IFN- $\gamma$  e, por outro lado, já com IFN- $\gamma$ , a porcentagem de inibição foi maior para os macrófagos de camundongos A/J. Este resultado é bastante interessante, pois mostra que macrófagos não tratados, tanto de camundongos B10.A como A/J, ativam a enzima IDO mesmo sem a adição de IFN- $\gamma$  exógeno. A interação entre os receptores de reconhecimento de patógenos (PRR, “pathogen recognition receptors”) dos macrófagos e substâncias agonistas presentes na superfície do *P.brasiliensis* foram suficientes para induzir a atividade de IDO. Não se pode excluir, entretanto, de nossos experimentos a possibilidade da existência de alguma subpopulação linfocitária (p.ex. NK, T $\gamma$  $\delta$ , NKT) que seja a produtora endógena de IFN- $\gamma$ . Nossos dados corroboram com outras publicações que

demonstram que outros mediadores (p.ex. TNF- $\alpha$ , CD40L, CTLA4-Ig, ligantes de TLR4 e TLR9, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , molécula 4-1BB ou CD137) ou mecanismos podem levar à ativação desta enzima (THOMAS et al., 1999; GROHMANN et al., 2003; MELLOR et al., 2004; TAKIKAWA et al., 2005; MUNN et al., 2007).

Nosso laboratório mostrou recentemente que os macrófagos alveolares de animais suscetíveis ao *P.brasiliensis* eram os que apresentavam eficiente atividade fungicida concomitante com níveis elevados de NO, sendo que os macrófagos de animais resistentes tinham baixa atividade fungicida, pouca produção de NO e altos níveis de TGF- $\beta$  (PINA et al., 2008). Assim, o óxido nítrico é importante como molécula microbicida, porém a sua produção contínua ou exagerada para a eliminação do patógeno leva à imunossupressão (BOCCA et al., 1998; DALTON et al., 2000; VEEN et al., 2000; FERNANDES et al., 2008).

A maior habilidade fungicida dos macrófagos B10.A poderia estar correlacionada com a produção de NO, visto que macrófagos destes animais sintetizaram maiores quantidades de NO quando comparados aos A/J. Contudo, quando infectamos as culturas de macrófagos B10.A sem adição de IFN- $\gamma$  e ao mesmo tempo inibimos estas culturas com 1MT e/ou aminoguanidina (AG) observamos claramente que a via de ação IDO-mediada foi mais importante do que a NO-mediada. Este fato não se repetiu em nenhum outro quadro de tratamento nos quais a via NO-mediada se mostrou muito mais importante do que a IDO-mediada. Pudemos observar também que nas culturas de macrófagos que foram tratadas com 1MT e IFN- $\gamma$ , mas não foram posteriormente infectadas com o fungo, houve produção significativa de NO; no entanto, foram menos expressivas que aquelas das culturas tratadas com 1MT e IFN- $\gamma$  e que foram infectadas. Assim, pode-se sugerir que o 1MT, por barrar a via de ação de IDO levou os macrófagos a redirecionar ação microbicida para uma maior produção de NO. Há alguns trabalhos (CANO et al., 1998; GONZALEZ, et al., 2000) que demonstram que o NO é molécula essencial e importante para a atividade fungicida de macrófagos de camundongos. A ação reguladora do óxido nítrico (NO) sobre a atividade de IDO no ambiente inflamatório já é bastante conhecida (THOMAS et al., 1994, 2007). A iNOS, também induzida por IFN- $\gamma$ , é responsável pela produção de NO que atua como inibidor da atividade de IDO. Recentemente, foi demonstrado que este fato é devido aos efeitos pós-tradução, que são reversíveis, sobre IDO, fornecendo assim uma visão mais aprofundada na complexidade dos mecanismos de controle inflamatório (THOMAS et al., 1994, 1999, 2007).

A relação NO e IDO foi demonstrada na infecção pelo *T. gondii* quando se utilizou um inibidor da iNOS, o L-NAME, e foi observado aumento dos níveis plasmáticos de quinurenina nos animais infectados em relação aos animais não tratados, mostrando assim a ação compensatória da IDO na tentativa de eliminar o patógeno na ausência da iNOS (FUJIGAKI et al., 2002).

Alberati-Giani et al. (1997) encontraram outro mecanismo NO-mediado na regulação da função de IDO em macrófagos murinos. Nestas células, o NO modulou negativamente a transcrição do gene IDO. Além disso, LPS e o metabólito do triptofano, o ácido picolínico, dois agentes co-estimulatórios que regulam positivamente iNOS em células ativadas, diminuíram a transcrição do gene *IDO* nos macrófagos, de forma aparentemente NO-independente (HUCKE et al., 2004).

Por outro lado, a descoberta de um sistema de transporte de triptofano de alta afinidade em macrófagos, que contribui para a sua resistência aos efeitos da deficiência de triptofano e excesso de quinurenina, sugere que os macrófagos estão equipados de forma única para o uso da via catabólica do triptofano desencadeada por IDO, favorecendo uma ação microbicida; este fato foi demonstrado nos nossos ensaios com macrófagos de camundongos B10.A sem a adição de IFN- $\gamma$  em que se privilegia a via IDO-dependente em detrimento da produção de NO como agente microbicida principal (SEYMOUR et al., 2006).

Em virtude destes mecanismos imunoregulatórios envolvendo IDO e NO, podemos sugerir que macrófagos estimulados por IFN- $\gamma$ , ao fagocitar o fungo *P.brasiliensis*, utilizaram as vias microbicida tanto de iNOS como de IDO de forma auto-regulada; porém, na presença de 1MT como inibidor da via de IDO, a síntese de NO não foi suficiente para compensar a baixa atividade fungicida conferida pela inibição de IDO. Devemos lembrar que estes dados estão de acordo com o fenótipo de macrófagos alveolares dos camundongos suscetíveis B10.A que apresentam eficiente habilidade fungicida pela alta produção de NO e síntese de um padrão pró-inflamatório de citocinas, com produção proeminente de IL-12 (PINA et al., 2008).

As citocinas são potentes reguladoras da função macrofágica. As chamadas pró-inflamatórias desempenham importante papel na indução da atividade microbicida dos fagócitos, e entre elas estão incluídas o IFN- $\gamma$ , o TNF- $\alpha$ , e a IL-12. As citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- $\beta$  desempenham atividade desativadora de M $\phi$  e a sua

produção desbalanceada leva a infecções graves, principalmente aquelas produzidas por patógenos intracelulares (MOSMANN et al., 1991; HOFT et al., 2000; REINER et al., 1995; SCOTT et al., 1998).

No nosso modelo foram avaliadas as citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- $\alpha$ , a citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$ , a citocina pleiotrópica IL-6, além da quimiocina MCP-1, em sobrenadantes de culturas de macrófagos tratados e não tratados pelo 1MT. Nossos dados confirmam aqueles de Pina et al. (2008) trabalhando com macrófagos alveolares infectados pelo fungo. Houve a produção de altos níveis de IL-12 pelos macrófagos de animais suscetíveis B10.A associados a baixos níveis de TNF- $\alpha$ . Em contraste, os macrófagos de camundongos resistentes A/J produziram elevados níveis de TNF- $\alpha$  e baixos níveis de IL-12. Nós observamos que as culturas de macrófagos de camundongos B10.A que foram tratadas com 1MT, na ausência de IFN- $\gamma$ , sintetizam mais IL-12. Contudo este fato não se repete quando há IFN- $\gamma$  nas culturas, em que há menos expressão da citocina IL-12 quando da adição de 1MT. Por outro lado, tanto a presença como a ausência de IFN- $\gamma$ , levou os macrófagos B10.A tratados por 1MT a apresentarem maior produção de TNF- $\alpha$  e MCP-1. Mais uma vez, quando comparamos as linhagens estudadas, vimos um comportamento contrastante nas culturas de macrófagos de animais resistentes, nas quais houve menor expressão de TNF- $\alpha$  e MCP-1 quando tratadas com 1MT, na presença ou ausência de IFN- $\gamma$ .

Os altos níveis de IL-12 produzidos pelos macrófagos de animais B10.A aqui confirmado, indica um padrão de ativação pró-inflamatório que regularmente está associado com a eficiente morte de patógenos intracelulares via produção de radicais de oxigênio ou nitrogênio, além de estimular células NK a produzir elevadas quantidades de IFN- $\gamma$  que irão induzir espécies reativas de oxigênio e outros mediadores pró-inflamatórios pelos macrófagos, os quais desenvolvem uma eficiente habilidade fungicida. Este perfil está usualmente associado a um padrão de imunidade preferencial do tipo Th1 (NATHAN e SHILOH, 2000). A alta produção de NO, entretanto, leva a anergia da imunidade celular nos camundongos B10.A e este fato pode ser revertido pela inibição NO-sintase pela aminoguanidina (BOCCA et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2002).

Ao analisarmos a presença das citocina TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes de cultura dos macrófagos de animais resistentes e suscetíveis, nossos resultados mostraram que os macrófagos de animais A/J tiveram a habilidade de secretar altas quantidades de TNF- $\alpha$ . O contrário foi observado nos animais B10.A, os quais produziram quantidades mínimas correspondentes aos níveis basais destas citocinas. Podemos observar que, em macrófagos

pré-ativados com IFN- $\gamma$  a inibição de IDO por 1MT reduziu a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos de animais A/J. A citocina TNF- $\alpha$  é importante na promoção da maturação e ativação de DCs, então pode-se inferir que estas células de camundongos A/J teriam uma melhor função de APC que as DCs de camundongos B10.A. Realmente, Ferreira et al. (2007), verificaram que as APCs de camundongos A/J são melhores ativadoras de linfócitos que as de camundongos B10.A. Nossos resultados sugerem também que a atividade da IDO nos macrófagos de camundongos B10.A inibia a síntese de TNF- $\alpha$  induzida pela ativação pelo IFN- $\gamma$  e infecção pelo *P.brasiliensis*. Este fato deve se refletir no desenvolvimento subsequente da imunidade adaptativa.

Quando avaliamos a citocina pleiotrópica IL-6, isto é, com propriedades anti e pró-inflamatórias, vimos que em macrófagos de camundongos suscetíveis B10.A e de resistentes A/J os altos níveis de produção de IL-6 estão associados a dois eventos: macrófagos ativados e tratados com 1MT. Esta citocina é conhecida como tendo efeitos inibitórios sobre a enzima IDO por modular a expressão do receptor de IFN- $\gamma$  e ainda é requerida para geração periférica de células Treg (GROHMANN et al., 2001; ROMANI et al., 2008). Os altos níveis de expressão de IL-6 após a adição de 1MT podem ser atribuídos à deve-se ao efeito sinérgico de inibição de IDO, que funcionaria assim como um regulador negativo da citocina. No contexto de culturas de macrófagos pré-ativados com IFN- $\gamma$  e infectados com *P.brasiliensis*, a adição de 1MT aumentou ainda mais a produção de IL-6.

Quanto à citocina anti-inflamatória TGF- $\beta$ , que se contrapõe ao IFN- $\gamma$ , o efeito da inibição da enzima indolamina-2,3-dioxigenase pela adição de 1MT levou à maior produção da citocina nos macrófagos de camundongos B10.A e A/J. Contudo, nos macrófagos de camundongos suscetíveis os níveis de síntese foram expressivamente menores que em A/J, denotando assim um comportamento de maior ativação por parte da linhagem suscetível B10.A. Sabe-se que o TGF- $\beta$  tem participação efetiva na regulação do desenvolvimento da resposta imune do tipo Th1, Th17 ou Treg (WAHL et al., 2006) e sua modulação por IDO em nosso modelo poderia influenciar estas populações celulares. Foi demonstrado por Smeltz et al. (2005) que o TGF- $\beta$  inibe a expressão do fator de transcrição GATA-3 que participa da diferenciação de células T precursoras para uma resposta Th2. Por outro lado, na infecção por *C. albicans* a presença do TGF- $\beta$  ao início da doença é fundamental para a síntese de IL-12 e resposta Th1, protetora contra o fungo (MONTAGNOLI et al., 2002). Outra ação do TGF- $\beta$  em associação com IL-6 na interação célula e patógeno é o aumento expressão de IL-23R que resulta na produção sustentada de IL-17 por células T CD4<sup>+</sup> (MORISHIMA et al., 2009). Há

outras atividades biológicas do TGF- $\beta$  que se realizam no contexto do ambiente de citocinas em que ele é produzido (COOPER et al., 2007).

Outro resultado aqui relatado foi a produção de metabólitos do catabolismo do aminoácido triptofano, as quinureninas. Elas são resultantes da ação da IDO sobre esse aminoácido essencial e que pode ser inibida pela ação do 1MT, que ao competir pelo sítio ativo da enzima diminui a expressão da via das quinureninas, por limitar a hidrólise do triptofano. De fato, a presença de 1MT nas culturas de macrófagos de ambas as linhagens de camundongos levou à produção bastante reduzida de quinurenina em relação aos grupos controle. Estes dados estão de acordo com o aumento das cargas fúngicas encontradas nas linhagens B10.A e A/J, após a adição de 1MT nas culturas de macrófagos.

Em conjunto, nossos estudos *in vitro* demonstram que tanto macrófagos de camundongos resistentes como suscetíveis têm mecanismos fungicidas IDO-dependentes. A ação da IDO, entretanto, parece ser mais marcante para camundongos suscetíveis. Mais ainda, a ação dessa enzima traduz-se por efeitos opostos sobre a produção de algumas citocinas e quimiocinas, fato este que sugere efeitos diversos destas células ao executarem as suas funções apresentadoras de antígenos para linfócitos T. Deve-se destacar a maior produção de TNF- $\alpha$  pela ação de 1MT sobre macrófagos de camundongos B10.A. Esta citocina é importante na regulação e organização de granulomas (SOUTO et al., 2000; CO et al., 2004; HERRING et al., 2005) e na indução da maturação de células dendríticas, o que facilitaria a sua função como APC. (HUFFNAGLE et al., 1996; FLYNN et al.; 1995, MOHAN et al., 2001). Corroborando com esta possibilidade, vimos no modelo *in vivo* que a inibição de IDO resulta em maior expansão de linfócitos T de camundongos suscetíveis, já ao início da infecção.

A ação da IDO na paracoccidiodomicose foi também estudada *in vivo*. A caracterização da carga fúngica tecidual feita a partir do macerado do pulmão em tempo de infecção de 2 semanas estão de acordo com os dados obtidos *in vitro*, uma vez que o número de fungos recuperados foi maior nos pulmões dos animais tratados com 1MT. Entretanto, não houve alteração na produção de NO. Nossos dados sugerem que a maior carga fúngica pulmonar pode ser atribuída à menor capacidade das células da imunidade inata como macrófagos e células dendríticas (DCs) de depletar triptofano, contribuindo assim para o crescimento de *P.brasiliensis*. Já 8ª semana pós-infecção os efeitos inibitórios de 1MT são perdidos, uma vez que houve interrupção do tratamento com 1MT duas semanas após a infecção. Neste ponto é restabelecida a ação de IDO no controle da carga fúngica, que se

igualdade nos grupos tratados e não tratados. Contudo na análise dos níveis de NO nesta fase mais tardia da infecção encontramos uma maior produção dos níveis de óxido nítrico nas linhagens estudadas, sendo que na linhagem A/J tratada com 1MT houve aumento de NO. Este aumento, entretanto, não resultou em maior controle da carga fúngica pulmonar.

Avaliamos também a produção de quinureninas, só que agora nos homogenatos de pulmão dos camundongos das duas linhagens tratados e não tratados com 1MT. Na segunda semana pós-infecção com *P.brasiliensis*, assim como no modelo de infecção in vitro, encontramos níveis maiores de produção de quinurenina nos grupos controle em relação aos grupos tratados com o inibidor de IDO, o 1MT, em ambas as linhagens estudadas. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados na medição de UFC neste tempo de infecção, com aumento de carga fúngica depois da inibição com 1MT, demonstrando assim que a maior disponibilidade do aminoácido triptofano permitiu um aumento no crescimento fúngico associado também com a menor produção dos metabólitos da via das quinureninas. Já na oitava semana pós-infecção, para nossa surpresa, os níveis de quinurenina ainda se encontraram aumentados nos grupos controle comparados aos grupos tratados com 1MT, não refletindo os resultados de UFC neste tempo de infecção, em que as cargas fúngicas se igualam, provavelmente devido à uma perda do efeito de inibição de IDO. Pode-se então sugerir que neste tempo de infecção a produção de quinurenina nos sobrenadantes de pulmão seja residual, refletindo uma ação prolongada, porém de menor intensidade do 1MT no metabolismo do triptofano.

Em relação à síntese de citocinas, observamos que após 2 semanas de infecção os animais da linhagem B10.A apresentaram aumento na produção de IL-12 e IL-6 após inibição de IDO por 1MT. Esta droga, diminuiu a produção de IL-10 e IL-4 por camundongos B10.A e também levou a menor síntese de TGF- $\beta$  na linhagem A/J. Assim, em animais B10.A houve aumento de citocinas pró-inflamatórias, que levaria à maior atividade fungicida, fato que não ocorreu. Assim a inibição de IDO exerceu efeito preponderante sobre o possível grau de ativação por citocinas das células fagocíticas. As menores concentrações de TGF- $\beta$  observadas nos camundongos A/J tratados poderiam ter resultado em maior atividade macrofágica e menor carga fúngica, fato que também não ocorreu. Assim, para ambas as linhagens o tratamento com 1MT alterou o perfil de citocinas para um padrão que poderia ter melhor controlado o crescimento fúngico, mas isso não ocorreu, indicando o efeito preponderante da disponibilidade de triptofano para o crescimento do *P.brasiliensis*. Os resultados obtidos na dosagem do IFN- $\gamma$  merecem ser destacados. Pode-se observar que ao

início da infecção (semana 2) camundongos B10.A não tratados produzem quantidades maiores de IFN- $\gamma$  que os camundongos A/J, porém em ambas as linhagens o tratamento com 1MT leva à diminuição desta citocina. Os altos níveis de IFN- $\gamma$  justificam e explicam o maior efeito da inibição da IDO, uma enzima IFN- $\gamma$ -dependente, em camundongos suscetíveis ao início da doença. Assim, observamos que nestes animais a inibição de IDO não somente levou a aumento da carga fúngica mas restaurou a anergia de células T, possibilitando maior afluxo celular para o pulmão. NO tempo de 8 semanas são os animais A/J que produzem mais IFN- $\gamma$  e isto se reflete no controle da ativação de células T neste período por nós observado. Já na análise das citocinas do perfil Th17 não encontramos diferenças na produção de IL-17, enquanto que para IL-23 a adição do inibidor de IDO levou a níveis maiores de síntese desta citocina em camundongos B10.A e A/J. Segundo a literatura, IDO e as quinureninas, na sua capacidade de induzir células Tregs e inibir Th17, contribuem de forma fundamental na decisão da linhagem celular de imunidade adaptativa contra infecções fúngicas (ROMANI et al, 2008). Em nosso trabalho, entretanto, não verificamos efeito marcante nas citocinas envolvidas na imunidade Th17.

Quando analisamos a produção de citocinas na oitava semana pós-infecção vimos que a inibição de IDO não alterou os níveis da grande maioria de citocinas estudadas (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4) em ambas as linhagens. Já a expressão de citocinas TGF- $\beta$  nos camundongos B10.A assim como IL-6 e IL-17 nos camundongos A/J sofreram diminuição nos seus níveis após tratamento com 1MT, ou seja, a inibição da enzima IDO alterou citocinas reguladoras das células do perfil Th17 e Treg. Nossos dados, entretanto, não permitem caracterizar quais subpopulações foram afetadas pelo tratamento com 1MT. O único achado consistente foi a diminuição das células Treg na 2ª semana pós-infecção de camundongos suscetíveis e resistentes tratados com 1MT, mas este fato não pôde ser relacionado com as citocinas medidas nos homogenatos pulmonares. Estudos com subpopulações celulares mais purificadas poderão trazer novos esclarecimentos sobre o efeito do 1MT na imunidade adaptativa da PCM.

Células produtoras de IDO mostram resistência aos efeitos de IDO. Este fato é explicado pela descoberta de que células IDO-competentes também expressam uma outra enzima IFN- $\gamma$ -induzível, a triptofanil-tRNA sintetase que gera uma fonte de triptofano IDO-resistente para a síntese de proteínas (FLECKNER et al.,1995, TOLSTRUP et al.,1995). Além disso, macrófagos têm sido recentemente descritos como possuidores de um sistema de

transporte de alta afinidade para triptofano que pode permití-los acessar o escasso triptofano disponível quando a atividade de IDO está aumentada (SEYMOUR et al., 2006). O triptofano disponibilizado pela inibição de IDO por 1MT nos camundongos infectados com *P.brasiliensis* favoreceu o crescimento fúngico, comprovado pelo ensaio de recuperação de fungos viáveis por UFC.

Por sua vez, o inibidor de IDO, 1-metil-triptofano, poderia influenciar o metabolismo em DCs de forma mais geral; 1MT poderia inibir a atividade de IDO enquanto aumentaria o transporte e atividade de enzimas envolvidas na formação de serotonina. Estudos recentes indicam que IDO e o transportador de serotonina (SERT) são reciprocamente regulados em DCs por sinais derivados de células T; além disso, foi demonstrado que a serotonina atua sobre DCs por diminuir sua secreção de IL-12 e TNF- $\alpha$  depois da maturação por estímulo com LPS (IDZKO et al., 2004; O'CONNELL et al., 2006). Este fato, contudo não poderia explicar o estímulo antigênico induzido pela infecção com o *P.brasiliensis*, já que para camundongos resistentes não houve diferenças tanto na expressão destas citocinas como de NO, após inibição de IDO por 1MT e em camundongos suscetíveis a citocina IL-12 aumenta sua expressão não sendo, portanto regulados por serotonina.

O estudo das sub-populações de linfócitos infiltrantes de pulmão de animais A/J e B10.A, assim como o perfil fenotípico de macrófagos alveolares nos forneceu novos dados sobre a função da IDO na resistência e susceptibilidade genética ao *P.brasiliensis*. Na segunda semana de infecção observamos um incremento no afluxo de linfócitos TCD4 e TCD8, nos camundongos suscetíveis tratados com o inibidor de IDO, 1MT, apontando assim para uma restauração da imunidade celular, típico efeito da inibição da indolamina-2,3-dioxigenase. Em contraste há uma marcante diminuição nos marcadores de ativação associados a células T-reg (CD25, CTLA-4 e GITR) sugerindo uma ação eficiente da imunidade TCD4 e TCD8 após inibição com 1MT (MELLOR et al., 2002). Por outro lado, observamos em linfócitos dos animais B10.A tratados uma diminuição da expressão da molécula CD62L, a selectina que comanda a migração de linfócitos T naive para os linfonodos. Estes dados em conjunto sugerem: aumento da expansão e migração de linfócitos TCD4 e TCD8 para o sítio da infecção e ação eficiente devido à concomitante diminuição de células T reguladoras. Apesar de claramente aumentada, a imunidade celular não foi capaz de controlar o crescimento de *P.brasiliensis* na ausência da ação da IDO. Assim, neste ponto da doença puderam ser caracterizadas as duas funções típicas da IDO: o controle da carga parasitária e a inibição da inflamação mediada pela expansão da imunidade T-dependente. A interrelação dos

mecanismos IDO-mediados com a expansão da sub-população Treg foi também sugerida em nosso modelo (FALLARINO et al., 2006; ROMANI et al., 2006). O tratamento com 1MT nos camundongos suscetíveis infectados com Pb diminuiu a frequência de macrófagos expressando moléculas de MHCII (Ia<sup>K</sup>) e poderíamos supor que houve maior migração do sítio de infecção para linfonodos drenantes, uma vez que a imunidade T mediada ampliou-se. Esta possibilidade poderá ser investigada posteriormente. Já na oitava semana de infecção encontramos um quadro em que a imunidade celular controlada por linfócitos TCD4 e TCD8 aparece em níveis ainda altos, refletida pelo maior afluxo celular, sem alterações de marcadores de células Tregs (CTLA-4 e GITR). Este fato é coincidente com a carga fúngica que se iguala nos animais suscetíveis tratados e não tratados sugerindo que a imunidade celular foi mantida neste tempo, mas devido à restauração da atividade da IDO e sob o controle das células Treg que puderam ser expandidas. O controle da carga fúngica neste ponto pôde então ser efetuado pela restauração da atividade IDO e pela concomitante ação de células T CD4 e TCD8 reguladas por células T regulatórias. Neste aspecto, o estudo da histopatologia pulmonar de camundongos tratados e não tratados pelo 1MT poderá trazer informações sobre a relação entre a síntese da IDO e a regulação dos processos inflamatórios no sítio da infecção.

Na segunda semana pós-infecção, nos experimentos com camundongos A/J, apesar de maior carga fúngica associada à depleção de IDO, a frequência das células TCD4 e TCD8 infiltrantes dos pulmões não se alterou. Já na oitava semana foi observado um afluxo consistente de células TCD4 com uma concomitante diminuição de CTLA-4 e GITR, marcadores de ativação de células T e, em especial, Treg. Pode-se então sugerir que durante a inibição de IDO houve expansão de células TCD4 ativadas que expressavam tanto marcadores de ativação (CD44) como de controle de ativação (CTLA-4) em maior frequência. Este fato demonstra que em camundongos A/J a IDO não controla a expansão de linfócitos Treg e TCD4 e TCD8 ao início da infecção (semana 2), ao passo que na oitava semana ocorre um efeito tardio de IDO apenas sobre a expansão de células TCD4. As diferenças na ativação dos macrófagos, apesar de presentes, não foram marcantes. Houve uma diminuição dos marcadores de ativação dos macrófagos (CD11b, CD11c, Ia<sup>K</sup>) e isso poderia ser atribuído à maior expansão de células Treg, como sugerido pela maior expressão de CTLA-4 por linfócitos infiltrantes de pulmão. Estudos adicionais poderão resolver esta possibilidade. Isso, aliado à ausência de diferenças da produção de citocinas e NO pelo tratamento com 1MT

sugere que o aumento na carga fúngica seja realmente mediado pela inibição da IDO das células fagocíticas.

Em conjunto, os resultados sobre a ação de IDO no modelo de camundongos resistente e suscetíveis à PCM são consistentes com aqueles previamente publicados (CANO et al., 1995, 2000). Camundongos B10.A controlam a carga fúngica ao início da infecção e produzem níveis altos de IFN- $\gamma$ . Entretanto, logo após a 1ª semana de infecção ocorre a anergia total da imunidade celular. Nossos dados atuais demonstram que o controle inicial da carga fúngica destes animais é ao menos parcialmente mediado pela IDO e que esta enzima deve estar ativada pela produção precoce de IFN- $\gamma$  que ocorre in vivo. A IDO parece ser também protagonista da inibição da imunidade adaptativa pois sua inibição restaura a imunidade celular e permite o maior afluxo de células efetoras TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> para o sítio primário da infecção.

Em camundongos A/J a produção de IFN- $\gamma$  é menor e mais tardia, mas já na segunda semana pós-infecção a IDO controla a carga fúngica pulmonar destes animais. A ação supressora da IDO sobre linfócitos TCD4<sup>+</sup> ocorre, entretanto, somente na 8ª semana pós-infecção, e podemos supor que isso ocorra quando os níveis de IFN- $\gamma$  atingem valores mais altos.

Outro dado interessante por nós observado foi a diminuição de linfócitos em apoptose na 2ª semana de infecção de animais B10.A e A/J tratados. Um dos efeitos da ação da IDO é na indução da apoptose de linfócitos (FALLARINO et al., 2003; LIU et al., 2007) e a sua inibição levou a frequência diminuída de células em processo de morte programada nos pulmões dos animais infectados. Outro dado que deve ser valorizado foi a menor frequência de células T reguladoras presentes nos pulmões de camundongos B10.A e A/J ao terem a IDO inibida. Este achado permite entender a maior expansão e migração de células efetoras para o pulmão de camundongos tratados, e está de acordo com trabalhos da literatura que demonstram que a ação da IDO induz a expansão das células T reguladoras (BABAN et al., 2009).

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que a IDO é enzima importante nos mecanismos microbicidas usados pelos hospedeiros para controlar o crescimento do *P.brasiliensis*. A ação desta enzima foi caracterizada em modelos *in vivo* e *in vitro* e mostrou-se diferente quando se utilizava camundongos resistentes ou suscetíveis ao fungo. Observou-se uma ação marcante da IDO ao início da doença de camundongos suscetíveis onde a enzima controla a carga fúngica mas, concomitantemente, induz anergia de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Parte desta anergia pode ser creditada à expansão de células Treg e aumento de linfócitos em apoptose.

Em camundongos resistentes a IDO controla a carga fúngica inicial, porém, o seu efeito supressor sobre linfócitos T é somente observado na 8ª semana pós-infecção. Este efeito tardio pode ser correlacionado à síntese mais tardia de IFN- $\gamma$  por camundongos resistentes. Mesmo assim a IDO mostra exercer efeitos reguladores tanto da gravidade da infecção como da imunidade celular de camundongos resistentes. Mais ainda, assim como em camundongos suscetíveis, a IDO mostrou-se indutora de células Treg e linfócitos em apoptose durante a imunidade desenvolvida por camundongos resistentes.

Nosso trabalho não pode explicar vários aspectos da ação da IDO na paracoccidiodomicose experimental mas abriu novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos reguladores da imunidade e gravidade da doença de hospedeiros infectados com o *P.brasiliensis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

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

ALBERATI-GIANI, D.; MALHERBE, P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; KÖLLER, C.; DENIS-DONINI, S.; CESURA, A.M. Differential regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN- $\gamma$ -activated murine macrophages and microglial cells. **J. Immunol.**, v. 159, p. 419–426, 1997.

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

ALMEIDA, O. P.; JUNIOR, J. J. Paracoccidioidomycosis of the mouth: na emerging deep mycosis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, p. 268-274, 2003.

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

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

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeasts cells: in vivo inhibition in females. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5587-5591, 1998.

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

---

\* De acordo com:

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

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

ASSEMAN, C.; MAUZE, S.; LEACH, M.W. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **J. Exp. Med.**, v, 190, p. 995-1004, 1999.

BABAN B.; CHANDLER, P.R.; SHARMA, M.D.; PIHKALA, J.; KONI, P.A.; MUNN, D.H.; MELLOR, A.L. IDO activates regulatory t cells and blocks their conversion into Th17-like t cells. **J. Immunol.**, v. 183, n. 4, p. 2475-83, 2009.

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

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

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

BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with janus green b. **Sabouradia**, v. 5, p. 26-29, 1966.

BENARD, G.; ORIL, N.M.; MARQUES, H.H.S.; MENDONÇA, M.; AQUINO, M.Z.; CAMPEAS, A.; DEL NEGRO, G.M.B.; DURANDY, A.; DUARTE, A.J.S. Severe juvenile paracoccidioidomycosis in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.13, p.510-515, 1994.

BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E.T.; DUARTE, A.J.S. 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.

BERNARDINO, S. **Paracoccidioidomicose pulmonar em camundongos geneticamente deficientes da enzima iNOS**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BERNARDINO, S. **Caracterização dos mecanismos imunológicos associados com os efeitos protetores e deletérios do óxido nítrico na paracoccidioidomicose pulmonar.** Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BEISSERT, S.; SCHWARZ, A.; SCHWARZ, T. Regulatory T Cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, p. 15–24, 2006.

BLOTTA, M.H; MAMONI, R.L.; OLIVIEIRA, S.J.; NOUER, S.A.; PAPAORDANOU, P.M.; GOVEIA, A. Endemic regions of paracocci-dioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast regions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p. 390-394, 1999.

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

BOASSO, A.; SHEARER, G.M. How does indoleamine 2,3-dioxygenase contribute to HIV-mediated immune dysregulation. **Curr. Drug Metab.**, v. 8, p. 217–23, 2007.

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

BOCCA, A.L.; SILVA, M.F.; SILVA, C.L.; CUNHA, F.Q.; FIGUEIREDO, F. Macrophage expression of class II major histocompatibility complex gene products in *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 280, 1999.

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

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An update. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6, p. 89–117, 1993.

BRUMMER, E. Interaction of *Paracoccidioides brasiliensis* with host defense cells. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p. 213–224.

CACERE, C.R.; ROMANO, C.C.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.; BENARD, G.; The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clin. Immunol.**, v. 105, p. 215-22, 2002.

CALICH, V.L.; KIPNIS, T.L.; MARIANO, M.; NETO, C.F.; DIAS DA 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. Immunophatol.**, v.12, p. 21-30, 1979.

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

CALICH, V. L. G.; BLOTTA, M. H. S. L. Paracoccidioidomycosis. In: HUFFNAGLE, G.; FIDEL, P. (Ed.). **Fungal immunology**. New York, N.Y.: Kluwer, 2004.

CALICH, V.L.G.; BLOTTA, M.H.S.L. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. In: FIDEL, P. L.; HUFFNAGLE, G.B. (Ed.). **Fungal Immunology: From an Organ Perspective**. New York, NY: Springer, 2005. p. 201-228.

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

CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; RUSSO, M.; VAZ, C.A.C.; BURGER, E. Immunogenetics in paracoccidioidomycosis. In: FRANCO M.; LACAZ, C.S. RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p. 151–173.

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 1496-1505, 2003.

CANO, L. E.; BRUMMER, E.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Fate of conidia from *Paracoccidioides brasiliensis* after ingestion by resident macrophages or cytokine-treated macrophages. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 2096-2100, 1992.

CANO, L.E.; GÓMEZ, B.; BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibitory effect of deferoxamine or macrophage activation on transformation of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia by ingested macrophages: Reversal by holotransferrin. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1494–1496, 1994.

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

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

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

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

CAVASSANI, K. A. **Participação de células T-reguladoras no controle da resposta imune durante a paracoccidiodomicose humana.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

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

CHIARELLA, A.P. **Caracterização da função das células TCD4+ e T CD8+ na paracoccidiodomicose pulmonar de camundongos isogênicos. Características imunopatológicas da paracoccidiodomicose experimental.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

CHOI, B.K.; ASAI, T.; VINAY, D.S.; KIM, Y.H.; KWON, B.S. 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. **Cytokine**, v. 34, p. 233–42, 2006.

CO, D.O.; HOGAN, L.H.; KIM, I.S.; SANDOR, M. T cell contributions to the different phases of granuloma formation. **Immunol. Lett.**, v. 92, p. 135-142, 2004.

COOPER, A.M. IL-23 and IL-17 have a multi-faceted largely negative role in fungal infection. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, 2680-2682, 2007.

CORRALIZA, M. I.; SOLER, G.; EICHMANN K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE<sub>2</sub>) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, v. 206, p. 667-673, 1995.

DALTON, D.K.; HAYNES, L.; CHU, C.Q.; SWAIN, S.L.; WITTMER, S. Interferon  $\gamma$  eliminates responding CD4 T cells during Mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 117-122, 2000.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

FACCIOLI, L.H. Immune Response to Histoplasma Capsulatum. **Mod. Asp. Immunobiol.**, v. 17, p. 12-13, 2005.

FAICAL, S.; BORRI, M.L.; HAUACHE, O.M.; AIZEN, S. Addison's disease caused by *Paracoccidioides brasiliensis*: diagnosis by needle aspiration biopsy of the adrenal gland. **Am. J. Roentgenol.**, v. 166, p. 461-462, 1996.

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

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

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; VACCA, C.; ORABONA, C.; SPRECA, A.; FIORETTI, M.C.; PUC CETTI, P. T cell apoptosis by kynurenines. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 527, p. 183-90, 2003.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; YOU, S. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 6752–61, 2006.

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

FERNANDES, K.S.S.; NETO, E.H.; BRITO, M.M.S.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q.; FIDALGO, C.B. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporotrix schenckii*. **Immunology**, v. 123, p. 469-479, 2008.

FERREIRA, K. S.; BASTOS, K. R.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S. R. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **J. Infect. Dis.**, v. 196, p. 1108-1115, 2007.

FLECKNER, J.; MARTENSEN, P.M.; TOLSTRUP, A.B.; KJELDGAARD, N.O.; JUSTESEN, J. Differential regulation of the human, interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. **Cytokine**, v. 7, p. 70–7, 1995.

FLYNN, J.L.; GOLDSTEIN, M.M.; CHAN, J. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, v. 2, p. 561-572, 1995.

FONTENOT, J.D.; RUDENNKY, A.Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 331-337, 2005.

FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACHI, M.; RESKALLAH-IWASSO, M.T.; MONTENEGRO, M.R. Paracoccidioidomycosis. **Baillières Clin. Trop. Méd. Comum.**, v. 4, p. 185–220, 1989.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G.; BENATTI, U.; FERRARA, G.B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 459–68, 2002.

FUJIGAKI, S.; SAITO, K.; TAKEMURA, M.; MAEKAWA, N.; YAMADA, Y.; WADA, H.; SEISHIMA, M. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by

*Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient-mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine 2,3-dioxygenase. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 779-786, 2002.

GEROSA, F. CD4+T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. **Clin. Immunol.**, v. 92, p. 224-234, 1999.

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

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

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

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M. L.; VACCA, C.; ORABONA, C.; UYTENHOVE, C.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 $\alpha$ + dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **J. Immunol.**, v. 167, p. 708, 2001.

GROHMANN, U.; ORABONA, C.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; CALCINARO, F.; FALORNI, A.; CANDELORO, P.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 1097–1101, 2002.

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

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

HERRING, A.C.; FALKOWSKI, N.R.; CHEN, G.H.; MCDONALD, R.A.; TOEWS, G.B.; HUFFNAGLE, G.B. Transient neutralization of tumor necrosis factor alpha can produce a

chronic fungal infection in an immunocompetent host: potential role of immature dendritic cells. **Infect. Immun.**, v. 2005, 73, p. 39-49, 2005.

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

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

HOFT, D.F.; SCHNAPP, A.R.; EICKHOFF, C.S.; ROODMAN, S.T. Involvement of CD4<sup>+</sup> Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 197-204, 2000.

HONG, M.; ZHU, Q. Macrophages are activated by 17 beta-estradiol: possible permission role in endometriosis. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 55, n. 5, p. 385-391, 2004.

HUCKE, C.; MACKENZIE, C. R.; ADJOGLE, K. D. Z.; TAKIKAWA, O.; DAÜBENER, W. Nitric Oxide-Mediated Regulation of Gamma Interferon-Induced Bacteriostasis: Inhibition and Degradation of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 5, p. 2723-2730, 2004.

HUFFNAGLE, G. B.; YATES, J. L.; LIPSCOMB, M. F. T cell-mediated immunity in the lung: a *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection model using SCID and athymic nude mice. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 4, p. 1423-1433, 1991.

HUFFNAGLE, G.B.; TOEWS, G.B.; BURDICK, M.D.; BOYD, M.B.; MCALLISTER, K.S.; MCDONALD, R.A.; KUNKEL, S.L.; STRIETER, R.M. Afferent phase production of TNF-alpha is required for the development of protective T cell immunity to *Cryptococcus neoformans*. **J. Immunol.**, v. 157, p. 4529-4536, 1996.

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

IDZKO, M.; PANTHER, E.; STRATZ, C.; MULLER, T.; BAYER, H.; ZISSEL, G.; DURK, T.; SORICHTER, S.; DI VIRGILIO, F.; EISSLER, M. The serotonergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. **J. Immunol.**, v. 172, p. 6011-6019, 2004.

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

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

KWIDZINSKI, E.; BUNSE, J.; AKTAS, O. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. **Faseb J.**, v. 19, p. 1347–9, 2005.

LEMLE, A.; WANKE, B.; MANDEL, M.B. Pulmonary localization of *Paracoccidioidomycosis*: Lung functions atudies before and after treatment. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 25, p.73-78, 1983.

LOGAN, G.J.; SMYTH, C.M.; EARL, J.W. HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immuno-inhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. **Immunology**, v. 105, p. 478–87, 2002.

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

LOURES, F. V. **Caracterização da função do receptor TLR-2 e da proteína adaptadora MyD88 na paracoccidioidomicose pulmonar.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LOURES, F.V.; PINA, A; FELONATO, M, CALICH, V.L.G. TLR is a negative regulator of TH17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. **J. Immunol.**, v. 183, n. 2, p. 1279-90, 2009.

LIU, Z.; DAI, H.; WAN, N.; WANG, T.; BERTERA, S.; TRUCCO, M.; DAI, Z. Suppression of Memory CD8 T Cell Generation and Function by Tryptophan Catabolism. **J. Immunol.**, v. 178, p. 4260–4266, 2007.

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

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

MAGALHÃES, A.E.A.; GUERRINI, R. Roentgenographic patterns of chest lesions. The use of computerized tomography in paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. v. 20.

MAMONI, R.L.; NOUER, A.S.; OLIVEIRA, S.J.; MUSATTI, C.C.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. Enhanced production of specific IgG 4, IgE and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 153-159, 2002.

MELONI-BRUNERI, L.H.; CAMPA, A.; ABDALLA, D.S.; CALICH, V.L.G.; LENZI, H.L.; BURGER, E. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, p. 526-533, 1996.

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

MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 762-74, 2004.

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

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

MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. Cutting edge: Induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. **J. Immunol.**, v. 171, p. 1652-1655, 2003.

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

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

MOFFETT, J.R.; NAMBOODIRI, M.A. Tryptophan and the immune response. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 3; 81, p. 247–65, 2003.

MOHAN, V.P.; SCANGA, C.A.; YU, K.; SCOTT, H.M.; TANAKA, K.E.; TSANG, E.; TSAI, M.M.; FLYNN, J.L.; CHAN, J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1847-1855, 2001.

MONTAGNOLI, C. 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.

MOREIRA, A.P.; DIAS-MELICIO, L.A.; PERAÇOLI, M.T.S.; CALVI, S.A.; SOARES, A.M.V.C. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeasts cells by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO effector mechanisms. **Mycopathology**, v. 166, p. 17-23, 2008.

MORISHIMA, N.; MIZOGUCHIA, I.; TAKEDAC, K.; MIZUGUCHIA, J.; YOSHIMOTO, T. TGF- $\beta$  is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 105-110, 2009.

MOSMANN, T.R.; SCHUMAKER, J.H. STREET, N.F.; BUD, R.; O'GARRA, A.; BOND, M.W.; MOORE, K.W.M.; SHER, A.; FIORENTINO, D.F. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4<sup>+</sup>T cells. **Immunology**, v. 123, 209-229, 1991.

MULLEY, W.R.; NIKOLIC-PATERSON, D.J. Indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation. **Nephrology**, v. 13, p. 204–21, 2008.

MUNN, D.H.; MELLOR, A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor induced tolerance. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1147–54, 2007.

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

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

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

MURRAY, H.W.; LITTMAN, M.L.; ROBERTS, R.B. Disseminated paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in the United States. **Am. J. Med.**, v. 56, p. 209-220, 1974.

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

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

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, p. 8841-8848, 2000.

NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.A.; VONK, A.G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 1377-1379, 2002.

NEWORAL, E.P.M.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R.L.; NORONHA, I.L.; BLOTTA, M.H.S.L. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 21, p. 234-241, 2003.

O'CONNELL, P. J.; WANG, X.; LEON-PONTE, M; GRIFFITHS, C.; PINGLE, S.C. AHERN, G.P. A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. **Blood**, v. 107, p. 1010-1017, 2006.

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

ORABONA, C.; BELLADONNA, M.L.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; FALLARINO, F.; VOLPI, C.; GIZZI, S.; FIORETTI, M.C.; GROHMANN, U.; PUC CETTI, P. Cutting edge:

silencing suppressor of cytokine signaling 3 expression in dendritic cells turns cd28-ig from immune adjuvant to suppressant. **J. Immunol.**, v. 174, p. 6582–6586, 2005.

OSTROWSKI, M.A. Quantitative and qualitative assessment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4+T cell immunity to gag in HIV-1 infected individuals with differential disease progression: reciprocal interferon-gamma and interleukin-10 responses. **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 1268-1267, 2001.

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

PINA, A.; SALDIVA, P.H.N.; RESTREPO, L.E.C; CALICH, V.L.G. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J. Leukocyte Biol.**, v. 79, p. 1202-1213, 2006.

PINA, A.; VALENTE-FERREIRA, R.C.; VAZ, C.A.C.; MOLINARI-MADLUM, E.E.I.W.; KELLER, A.C.; CALICH, V.L.G. Absence of IL-4 determines a less severe pulmonary paracoccidioidomycosis associated with impaired Th2 response. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2369–2378, 2004.

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

PLEBANSKI, M. Interleukin-10-mediated immunosuppression by a variant CD4T cell epitope of *Plasmodium falciparum*. **Immunity**, v. 10, p. 651-660, 1999.

POWRIE, F.; READ, S.; MOTTET, C.; UHLIG, H.; MALOY, K. Control of immune pathology by regulatory T cells. **Novartis Found. Symp.**, v. 252, p. 92-98, 2003.

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

REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 13, 151-177.1995.

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

RESTREPO, A. Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. In: MCGINNIS, M.R. (Ed.). **Current Topics Medical Mycology**. New York: Springer, 1988. Vol. 2, p. 235–239.

RESTREPO, A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? **Med. Mycol.**, v. 38, p. 317-322, 2000.

RIBEIRO, L.R.R.; CALICH, V.L.G. Caracterização do papel dos leucotrienos na paracoccidioidomicose (PCM) pulmonar e na atividade fungicida e secretora de macrófagos peritoneais infectados pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ROMANI, L.; BOZZA, S.; FALLARINO, F.; PITZURRA, L.; ZELANTE, T.; MONTAGNOLI, C.; BELLOCCHIO, S.; MOSCI, P.; VACCA, C.; PUC CETTI, P. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. **J. Immunol.**, v. 174, p. 2910-8, 2005.

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

ROMANI, L.; FALLARINO, F.; DE LUCA, A.; MONTAGNOLI, C.; D'ANGELO, C.; ZELANTE, T.; VACCA, C.; BISTONI, F.; FIORETTI, M.C. GROHMANN, U.; SEGAL, B.H.; PUC CETTI, P. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. **Nature**, v. 451, 211-215, 2008.

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

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

SANNI, L. A.; THOMAS, S.R.; TATTAM, B.N.; MOORE, D.E.; CHAUDHRI, G.; STOCKER, R.; HUNT, N.H. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria. **Am. J. Pathol.**, v. 152, p. 611, 1998.

SCHROECKSNADEL, K.; ZANGERLE, R.; BELLMANN-WEILER, R.; GARIMORTH, K.; WEISS, G.; FUCHS, D. Indoleamine-2,3-dioxygenase and other interferon-gamma-mediated pathways in patients with human immunodeficiency virus infection. **Curr. Drug Metab.**, v. 8, p. 225–36, 2007.

SCOTT, P.; FARREL, J.P. Experimental cutaneous leishmaniasis, induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. **Chem. Immunol.**, v. 70, p. 60–80, 1998.

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

SEYMOUR, R.L.; GANAPATHY, V.; MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. A high affinity, tryptophan-selective amino acid transport system in human macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, p. 1320–7, 2006.

SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; TAKAHASHI, T. Stimulation of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 135–142, 2002.

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

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

SINGER-VERMES, L. M.; CIAVAGLIA, M.C.; KASHINO, S.S.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. The source of the growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 261–264, 1992.

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

SMELTZ, R.B.; CHEN, J.; SHEVACH, E.M. Transforming growth factor-beta 1 enhances the interferon-gamma-dependent, interleukin-12-independent pathway of T helper 1 cell differentiation. **Immunology**, v. 114, p. 484-492, 2005.

SOARES, A.M.; CALVI, S.A.; PERAÇOLI, M.T.; FERNANDEZ, A.C.; DIAS, L.A.; DOS ANJOS, A.R. Modulatory effect of prostaglandins on human monocytes activation for killing of high and low virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology**, 102, p. 480-485, 2001.

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

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int. Immunol.**, v.1, p. 1-14, 2005.

TAKIKAWA, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated l-tryptophan metabolism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, n. 1, p. 12-19, 2005.

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

TERNESS, P.; BAUER, T.M.; ROSE, L. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 447-57, 2002.

THOMAS, S.R.; MOHR, D.; STOCKER, R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 14457-64, 1994.

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

THOMAS, S.R.; TERENTIS A.C.; CAI, H. Post-translational regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 23778-87, 2007.

TOLSTRUP, A.B.; BEJDER, A.; FLECKNER, J.; JUSTESEN, J. Transcriptional regulation of the interferon-gamma-inducible tryptophanyl-tRNA synthetase includes alternative splicing. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 397–403, 1995.

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

VEEN, R.; DIETLIN, T.A.; GRAY, J.D.; GILMORE, W. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. **Cell Immunol.**, v. 199, p. 43-49, 2000.

VILLALBA, H. **Características microscópicas da paracoccidioidomicose bucal.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de Campinas, Piracicaba, SP, 1998.

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

WAHL, S.M.; WEN, J.; MOUTSOPOULOS, N. TGF- $\beta$ : a mobile purveyor of immune privilege. **Immunol. Rev.**, v. 213, p. 213–227, 2006.

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

# 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](#)