



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

Papel de CCR4 na infecção experimental por
Paracoccidioides brasiliensis: controle da migração
de células $CD4^+CD25^+$ para o local da lesão

Fernanda Agostinho Rocha

Ribeirão Preto-SP

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

**Papel de CCR4 na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*:
controle da migração de células CD4⁺CD25⁺ para o local da lesão**

FERNANDA AGOSTINHO ROCHA

Ribeirão Preto-SP

2010

FERNANDA AGOSTINHO ROCHA

**Papel de CCR4 na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*:
controle da migração de células CD4⁺CD25⁺ para o local da lesão**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências-Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientação: Prof. Dr. João Santana da Silva

Ribeirão Preto-SP

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rocha, Fernanda Agostinho

Papel de CCR4 na infecção experimental por *Paracoccidioides brasiliensis*: controle da migração de células CD4⁺CD25⁺ para o local da lesão. Ribeirão Preto, 2009. 98 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Silva, João Santana.

1. Granuloma. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*.
3. Migração celular.

Trabalho realizado no departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (2007/05110-8).

À minha família...

*pelo amor incondicional, que me garante apoio em todas as
circunstâncias, incentivo de crescimento, exemplos a ser seguidos,
respeito às minhas escolhas, ombros fiéis e amigos, e companhias
confiáveis. Dedico todos os meus esforços a vocês.*

Agradecimentos

De modo especial, gostaria de expressar, brevemente, meus sinceros agradecimentos às pessoas que foram essenciais para a realização desta dissertação de mestrado:

Ao *Dr. João Santana da Silva*, pela orientação, pelo incentivo, pelo exemplo de responsabilidade, dedicação, honestidade, simplicidade e amor profissional. Muito obrigada por me ensinar que ser pesquisador é um dom que deve ser aprimorado através da curiosidade e do trabalho bem feito.

À *Fabríne*, por ter me ensinado, praticamente, quase todas as técnicas que utilizei durante o mestrado, por ser uma agradável companhia durante os experimentos e, principalmente, por ter se tornado uma amiga tão especial.

Ao *Dr. Leandro Licursi*, pela prestativa e alegre colaboração nos experimentos, enriquecendo-os com sua tranquilidade e sensata experiência.

À *Dra. Maria Heloísa Blotta*, (FCM-UNICAMP) e *Dr. Lúcia Helena Faccioli* (FCFRP-USP) pela disponibilidade em compor a banca examinadora de minha dissertação de mestrado.

À *Luciana*, pelo auxílio pessoal e profissional, por ser uma colega dedicada, responsável e uma admirável e especial amiga.

À *Cristiane Milanezi*, pelo prestativo apoio técnico e pelo carinhoso convívio.

Aos meus colegas de trabalho *Dr. Carlo, Diego, Djalma, Dr. Fabrício, Dr. Fredy, Giuliano, Gustavo, Dr. Paulo, Dr. Tiago, Dr. Wander, Walter, Dra. Alessandra, Dra. Beatriz, Dra. Cristina, Daniela, Elen, Grace, Dra. Isabel, Juliana, Maria Cláudia, Maria do Carmo, Dra. Renata, Sandra, Dra. Vanessa e Wanessa*, por me privilegiarem com sua convivência divertida e amigável, pelas discussões científicas, opiniões e pela ajuda sempre necessária. Muito obrigada a todos!

Às estagiárias *Carolina, Gisele, Karen e Lígia*, por me garantirem, de modo tão agradável, a oportunidade de aprender ensinando. Sinto saudades de vocês!

À *Dra. Karen Cavassani*, pelas preciosas e gentis dicas sobre a técnica de imuno-histoquímica.

Ao prestativo *Walter Turatto*, pelo auxílio nos experimentos com citometria de fluxo.

Ao *Dr. Marcos Rossi*, pelas prestativas opiniões, e às técnicas *Lena e Mônica*, pelo esclarecimento quanto ao processamento histológico e pelo gentil auxílio técnico.

Aos bioteristas *Júlio, Edinelson, Sávio, Devanir, Rinaldo, Rubens* e *Irapuã* pela dedicação na manutenção dos animais, fundamentais para a realização deste estudo.

Aos funcionários *Wander, D. Lúcia* e *D. Vera*, pela lavagem e autoclavagem dos materiais, organização e limpeza do laboratório, além do agradável convívio.

Às secretárias *Ana, Rosângela* e *Moira* pela disponibilidade em me auxiliar em todos os momentos que necessito, pela dedicação, competência e pelo precioso convívio.

Aos pós-graduandos e aos professores da Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, pela contribuição pessoal e científica.

À *Fabrine, Renata* e aos amados *Lucio* e *Mariana Bodini* pelas essenciais correções desta dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado e reserva técnica

Aos amados amigo(a)s-irmãos do *GOU Sopro de Vida* e da *Fraternidade Foca de Assis*, pelo essencial apoio, carinho, pela amizade, pelos ensinamentos altruístas e por tornarem a minha vida ainda mais rica e feliz durante esse mestrado. Gratidão!

Às minhas mães: *Clarete* (mãe), *Vera* (tia-madrinha) e *Magdalena* (vozinha);

Aos meus pais: *Jorge* (pai), *Pedro* (tio-padrinho Dinho) e *Anselmo* (vozinho);

Aos meus irmãos: *Wagner* e *Lucio* (irmãos); *Henrique, Lucas, Matheus* e *Thiago* (primos), pelo amor, apoio, cuidado, dedicação, exemplo, tolerância, respeito...

Muito obrigada por serem tanto para mim!

À *Deus* e à *Santíssima Virgem* por cuidarem de tudo que tenho e sou, e por me permitirem conhecer e conviver com todas as pessoas supracitadas. Os méritos são todos vossos.

*“Tu não deves trabalhar por
entusiasmo, mas por Amor; com
consciência do dever, que é abnegação.”*

São Josemaría

Sumário

Resumo	i
Abstract.....	iii
Introdução	1
Objetivo	21
Materiais e Métodos.....	23
1. Cultura de leveduras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	24
2. Preparo das leveduras para inóculo	24
3. Viabilidade das leveduras.....	25
4. Animais experimentais e infecção por Pb18	25
5. Análise da sobrevivência dos animais infectados por Pb18	26
6. Recuperação de fungos viáveis e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)	26
7. Obtenção do sobrenadante do homogenado do pulmão para ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocinas.....	26
8. Dosagem de citocinas por ELISA (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)	27
9. Extração de RNA para detecção de mRNA para fatores de transcrição, quimiocinas e receptor de quimiocinas	28
9.1. Quantificação de RNA	29
9.2. Síntese de cDNA.....	29
9.3. Detecção de mRNA de fatores de transcrição, quimiocinas e seu receptor por Real Time-PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real).....	29
10. Análise histopatológica das lesões	31
11. Análise morfométrica dos granulomas.....	31
12. Imuno-histoquímica (IH)	32
13. Obtenção de leucócitos dos pulmões	33
14. Citometria de fluxo para análise da expressão de moléculas de superfície	33
15. Transferência adotiva de linfócitos T	34

16. Análise estatística	35
Resultados	36
1. Validação do modelo de camundongos deficientes de CCR4.....	37
2. A expressão dos ligantes de CCR4, CCL17 e CCL22, não é alterada em camundongos CCR4 ^{-/-}	39
3. Camundongos CCR4 ^{-/-} são mais susceptíveis à infecção por <i>P. brasiliensis</i> durante a fase inicial da PCM.....	41
4. Camundongos CCR4 ^{-/-} apresentam maior susceptibilidade à infecção por <i>P. brasiliensis</i>	42
5. CCR4 não é essencial para o desenvolvimento inflamatório durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	44
6. A ausência de CCR4 induz menor expressão do fator de transcrição Foxp3 no pulmão de camundongos infectados com <i>P. brasiliensis</i>	46
7. CCR4, no dia 3 após a infecção, modula negativamente a migração celular durante a resposta imune inata contra <i>P. brasiliensis</i>	48
8. Papel do CCR4 na síntese de óxido nítrico na infecção por <i>P. brasiliensis</i>	50
9. CCR4 controla positivamente a migração de linfócitos T durante a infecção por <i>P. brasiliensis</i>	52
11. Quantificação de citocinas em lisado pulmonar de camundongos C57BL/6 e CCR4 ^{-/-} infectados por <i>P. brasiliensis</i>	58
12. Participação das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ CCR4 ⁺ na viabilidade fúngica nos pulmões dos animais CCR4 ^{-/-}	60
Discussão.....	62
Conclusão	74
Referências Bibliográficas	76

Resumo

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença crônica, granulomatosa, causada pela inalação de propágulos aéreos do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. As células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Treg) estão presentes em lesões pulmonares de pacientes com PCM e podem estar envolvidas nos casos de recidivas, comumente relacionadas a esta micose. Como a migração dessas células é parcialmente dependente do receptor de quimiocina CCR4, avaliamos o papel deste receptor durante a infecção por *P. brasiliensis* em camundongos C57BL/6 e geneticamente deficientes de CCR4 (CCR4^{-/-}). Os dados obtidos neste estudo demonstraram que no dia 3 após a infecção, camundongos CCR4^{-/-} apresentam aumento significativo ($p < 0,05$) da migração de células CD11b⁺ e CD11b⁺CD11c⁺ para os pulmões, resultando em extensa lesão inflamatória, porém, reduzida produção de NOS2. Até a segunda semana após a infecção os camundongos CCR4^{-/-} são incapazes de controlar o crescimento e disseminação das leveduras, apresentando maior taxa de mortalidade durante esse período. A ausência de CCR4 prejudica a migração de linfócitos T para as lesões, sendo que o número de células T CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁺CD25⁺ foi significativamente ($p < 0,05$) diminuída e o número de células Foxp3⁺ no pulmão foi menor quando comparado com camundongos selvagens. Após a transferência adotiva de células T CD4⁺CD25⁺ provenientes de camundongos selvagens para CCR4^{-/-} ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da quantidade de fungos nos pulmões, enquanto que a transferência de células CD4⁺CD25⁻ não alterou significativamente o crescimento das leveduras. Em conjunto os resultados revelam que CCR4 modula a migração e a função supressora das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ controlando a sobrevivência do fungo dentro dos granulomas.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a chronic and granulomatous disease caused by the inhalation of conidia forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Tregs) are present in the pulmonary lesions of PCM patients, and can be involved with re-activation in this mycosis. As the migration of Tregs to inflammatory sites is supposed to be in part dependent on the CCR4 chemokine receptor, we aimed to evaluate the role of this receptor during the *P. brasiliensis* infection in C57BL/6 (WT) and CCR4 genetically deficient mice (CCR4^{-/-}). The results demonstrated that, in the day 3 after infection, CCR4^{-/-} mice presented significant ($p < 0,05$) increase in CD11b⁺ and CD11b⁺CD11c⁺ cell migration to the lungs, resulting in extensive inflammatory damage, however, decreased NOS2 production. Until the second week after the infection, the CCR4^{-/-} mice are unable to control the fungus growth and dissemination, presenting more death index during this period. The absence of CCR4 prejudices migration of T lymphocytes, since the number of CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁺CD25⁺ T cells was significantly decreased ($p < 0,05$) in CCR4^{-/-} mice. Moreover, the presence of Foxp3⁺ cells was lower in the absence of this receptor. After the adoptive transference of CD4⁺CD25⁺ T cells from WT to CCR4^{-/-} mice there was a significant decrease in the fungi amount recovered from the lungs. However, the adoptive transference of CD4⁺CD25⁻ T cells did not alter the growth of yeast cells. Overall, our data demonstrated that Tregs migrate, via CCR4, to the site of *P. brasiliensis* infection, favoring the immunity against this fungus, and prejudging their survival into the granulomas.

Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica, de evolução crônica e granulomatosa, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Historicamente, o primeiro relato da PCM foi feito em 1908 pelo médico e cientista Adolpho Lutz após isolar e caracterizar o fungo das lesões de pacientes. Depois, em 1912, Afonso Splendore sugeriu o nome *Zymonema brasiliense* e, em 1930, Floriano de Almeida distinguiu este agente do *Coccidioides immitis*, propondo o nome *Paracoccidioides brasiliensis*. A doença foi oficialmente nomeada como paracoccidioidomicose pela Organização Mundial de Saúde em 1971 (MARQUES, 1998).

A distribuição geográfica do fungo *P. brasiliensis* está diretamente relacionada ao clima. Essa micose tem alta incidência em países da América Latina como Brasil, Colômbia, Venezuela, Equador e Argentina (LACAZ; RAMOS, 1956). A prevalência da doença pode chegar a 30 por 100.000 habitantes em áreas endêmicas (SIDRIM; ROCHA, 2004). A PCM trata-se da oitava causa de morte dentre as doenças infecciosas e parasitárias e, dentre as micoses sistêmicas, apresenta-se com a mais elevada taxa de mortalidade (1,45/milhão de habitantes) sendo considerada endêmica em áreas não-metropolitanas, interioranas e rurais (COUTINHO, 2002).

A incidência desta doença em crianças até 12 anos de idade é similar entre os dois sexos. Após a pré-adolescência, essa doença se sobressai entre o sexo masculino (562 homens/100 mulheres), principalmente na faixa etária de 30 e 59 anos (COUTINHO, 2002). A presença de receptores do hormônio feminino β -estradiol no citoplasma das formas de micélio e levedura de *P. brasiliensis* pode ser capaz de inibir a transição da forma micelial para a de levedura, acarretando na menor incidência da PCM em mulheres adultas em idade fértil (SALAZAR et al., 1988). Por ser uma doença que geralmente leva à formação de sequelas anatômicas, que apresenta diversos casos de recidivas, e por estar associada

principalmente com o trabalhador agrícola, essa micose tornou-se uma importante doença ocupacional e um grave problema social.

Seu agente etiológico, *P. brasiliensis*, é um fungo termodimórfico e assexuado que se reproduz por gemulação. A uma temperatura de 19-28°C, apresenta-se sob a forma de micélio filamentoso e, a 33-37°C, é encontrado como colônias de leveduras (PARIS et al., 1985; SAN BLAS; SAN BLAS, 1985, 1994). A infecção do hospedeiro humano ocorre mais comumente pela via respiratória, quando propágulos aéreos do fungo, presentes no ambiente, alcançam os bronquíolos terminais e alvéolos pulmonares (DOMER et al., 1992; MONTENEGRO; FRANCO, 1994; RESTREPO et al., 1986). Neste momento, a forma micelial sofre conversão para a de levedura, intracelular facultativa, como reflexo de um efeito adaptativo do microorganismo (DA SILVA et al., 1994), uma vez que esta forma é capaz de sobreviver por longos períodos no tecido do hospedeiro mamífero.

Hábitos como tabagismo e alcoolismo são frequentemente associados à doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006), além disso, fatores hormonais, genéticos, imunológicos e nutricionais estão envolvidos no desenvolvimento da infecção e da doença em sua forma clínica (ALMEIDA et al., 2003). Uma vez adquirida, a imunidade do hospedeiro contribuirá para a extensão e a gravidade da doença (RAMOS-E-SILVA, 2004). A virulência da cepa confere outro fator importante no estabelecimento das manifestações clínicas desenvolvidas por cada indivíduo, visto que os isolados de *P. brasiliensis* variam em virulência e sua habilidade infectante influencia na relação parasito-hospedeiro, podendo afetar a sua persistência e, consequentemente, os quadros clínicos da doença (FRANCO et al., 1994; ZHANG et al., 2007).

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

Nessa interação, que leva à geração de complexos fenômenos inflamatórios e imunológicos, diferentes populações celulares estão envolvidas e são ativadas no sentido de desempenharem papel efetor direto contra o fungo ou de participarem dos mecanismos imunoreguladores desencadeados após o hospedeiro ser infectado (PERAÇOLI; SOARES, 1992).

Embora haja, até então, poucos estudos epidemiológicos sobre a PCM, evidencia-se que a grande maioria dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas não desenvolve a doença (BENARD, 2008). Alguns indivíduos desenvolvem uma infecção pulmonar assintomática, localizada e benigna, enquanto outros podem apresentar manifestações clínicas, dando origem a distintas formas da PCM, que pode evoluir de uma maneira disseminada, progressiva ou mesmo fatal (RAMOS-E-SILVA ; SARAIVA, 2008).

As manifestações clínicas da doença causada por *P. brasiliensis* podem ser provenientes de uma infecção primária, da reativação de focos quiescentes após um período de latência (reativação endógena) ou de uma re-infecção exógena, após prévia exposição ao agente infeccioso (MONTENEGRO; FRANCO, 1994). Em

muitos casos, a doença envolve primeiramente os pulmões e, em seguida, pode disseminar para outros órgãos através das vias hematogênica e linfática. Pacientes com doença grave têm frequentemente poucos granulomas associados a um grande número de fungos viáveis nas lesões (SHIKANAI-IASUDA et al., 2006; BRUMMER et al., 1993). Uma vez estabelecida e, dependendo dos fatores relacionados ao hospedeiro e ao fungo, a PCM pode regredir, com a destruição das leveduras, ou progredir, com a formação de focos quiescentes ou latentes (SAN BLAS; SAN BLAS, 1977; ROBLEDO et al., 1982). Ainda, pode ocorrer a evolução da doença, com a proliferação e disseminação do fungo e a formação de lesões ativas associadas a sintomas que são agrupados em dois padrões principais: forma aguda (incluindo a subaguda) e crônica (FRANCO et al., 1987; MONTENEGRO; FRANCO, 1994).

A forma aguda é também conhecida como tipo juvenil, pode atingir indivíduos entre 3 a 30 anos de idade e é caracterizada por evolução rápida, com lesões disseminadas. A ineficácia da resposta imune celular, neste caso, permite a grande proliferação do fungo, com necrose e supuração das lesões e ampliação progressiva de úlceras cutâneas e de mucosas. O acometimento pulmonar é raro, ocorrendo apenas em 5-11% dos pacientes (FRANCO et al., 1987; MENDES, 1994; SIDRIM; ROCHA, 2004). A forma aguda/subaguda da micose representa uma continuação da infecção inicial, enquanto que a forma crônica seria consequência da reativação de focos quiescentes do fungo (BENARD, 2008).

A forma crônica da PCM ou tipo adulto acomete indivíduos com mais de 25 anos de idade e é caracterizada pelo comprometimento dos pulmões e mucosa orofaríngea, bem como das vias respiratórias. Neste caso, as lesões são mais localizadas e o processo inflamatório menor, porém, os granulomas podem estar presentes em uma grande variedade de tecidos. Os pacientes com imunidade mais

eficiente em eliminar o fungo geralmente apresentam doença menos grave, com lesões localizadas, caracterizadas pela tendência à formação de granulomas epitelióides bem definidos, menor número de fungos e sequelas fibróticas (FRANCO et al., 1993; MENDES, 1994; 1997).

A depressão da resposta imune celular é comumente encontrada na PCM e, em geral, correlacionada com a forma aguda e progressiva da doença (BENARD et al., 1996; 1997; CAMPANELLI et al., 2003; MOTA et al., 1985; OLIVEIRA et al., 2002). Contudo, em ambas as formas, a resposta imune celular pode ser insuficiente, resultando em alto índice de mortalidade na ausência de terapia (BRUMMER et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2002).

Apesar dos mecanismos relacionados com a permanência de *P. brasiliensis* em forma quiescente no tecido do hospedeiro não serem conhecidos, é possível que os granulomas representem um reservatório de leveduras viáveis. Paradoxalmente, a ausência de granulomas compactos guarda relação com doença grave e disseminada, uma vez que pacientes ou camundongos com resposta imune celular inadequada, apresentam granulomas frouxos e um elevado número de leveduras viáveis nas lesões (BENARD et al., 1997; BRUMMER, et al., 1993; MOREIRA et al., 2006; SOUTO et al., 2000). Dessa forma, a resposta imune protetora contra *P. brasiliensis*, além de contar com um correto recrutamento celular, também é dependente do estado de organização e ativação dessas células no sítio de infecção.

Embora a PCM pulmonar normalmente não seja adquirida pela via endovenosa, o inóculo de leveduras de *P. brasiliensis* em camundongos por essa via permite que os pulmões sejam afetados por uma quantidade padrão de fungos disseminados. O modelo experimental, portanto, é capaz de reproduzir as

características da forma pulmonar crônica da doença em humanos, oferecendo as vantagens de repetição e padronização da quantidade de leveduras a serem introduzidas no hospedeiro, favorecendo o estudo da formação de granulomas (MOSCARDI-BACCHI; FRANCO, 1985).

O granuloma paracoccidióidico é uma típica resposta imune celular produzida contra componentes de *P. brasiliensis* na tentativa de impedir a proliferação e disseminação do fungo (ROBLEDO et al., 1982). As células que participam deste processo inflamatório são: neutrófilos, macrófagos, células epitelióides, células gigantes, linfócitos e fibroblastos (DEFAVERI et al., 1989; KERR et al., 1988).

A defesa contra microorganismos é mediada, inicialmente, pelas reações da imunidade inata e depois, pelas respostas da imunidade adaptativa. A imunidade inata tem sido definida como a primeira fase da resposta imune e é baseada na pré-existência de elementos do sistema imune que interagem diretamente com todos os tipos de microorganismos, levando à sua destruição ou à inibição do seu crescimento. A imunidade inata, que não é específica para um patógeno particular e não gera memória específica, é mediada por barreiras físicas, elementos químicos, e componentes celulares do sistema imune. Vários elementos da imunidade inata agem em conjunto para controlar o crescimento inicial do patógeno e têm profundo efeito no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Durante a infecção com *P. brasiliensis*, as primeiras células do hospedeiro a entrar em contato com o fungo podem ser os macrófagos alveolares e as células epiteliais alveolares. Embora as células epiteliais sirvam como uma barreira física relativamente passiva à infecção, elas podem contribuir mais ativamente para a sinalização de eventos da resposta imune (MENDES-GIANNINI et al., 2008). A

resposta pulmonar à infecção é mediada pela secreção de diversas proteínas antimicrobianas pelo epitélio pulmonar e atividade fagocítica de macrófagos alveolares residentes (CALISH et al., 2008).

Células fagocíticas, constituintes da imunidade inata, a exemplo do que ocorre na maioria das doenças infecciosas, estão envolvidas na resposta imune inata a *P. brasiliensis*. O fungo, seus componentes metabólicos e somáticos, assim como os constituintes de sua parede celular, são capazes de ativar o sistema complemento e induzir a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, participando da imunidade inata durante a PCM (CALISH et al., 1979; CROTT et al., 1993; PINA et al., 2006). De fato, tais células estão presentes nos sítios inflamatórios durante estágios iniciais da doença, bem como nos granulomas desenvolvidos em humanos e animais de experimentação (MONTENEGRO; FRANCO, 1994; GONZALES et al., 2003).

As características histopatológicas iniciais da PCM em humanos não estão compreendidas completamente, mas alguns estudos *in vivo* têm demonstrado que, macrófagos em contato com *P. brasiliensis* provavelmente iniciam a neutrofilia extravascular pela liberação de peptídeos quimiotáticos (CALISH et al., 1985). A ampla infiltração de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) no pulmão, na fase aguda inicial da infecção com *P. brasiliensis* em camundongos, foi correlacionada com a liberação de quimioatraentes para essas células (SOUTO et al., 2003). Dados experimentais de Acorci e colaboradores (2009) demonstram que, em contraste com outros microorganismos patogênicos que direcionam os fagócitos à apoptose como mecanismo de escape, o fungo *P. brasiliensis* pode estender o tempo de sobrevivência de PMN humanos normais por induzir a produção autócrina de IL-8, favorecendo a disseminação fúngica.

A atividade fungicida de leucócitos PMN humanos e murinos é aumentada por *interferon* (IFN)- γ , fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) ou interleucina (IL)-1 β (KURITA et al., 2000). No entanto, o fator de necrose tumoral (TNF)- α produzido por macrófagos induz uma atividade anti-*P. brasiliensis* mais eficaz que IFN- γ (SOARES et al., 2001).

Dados obtidos de estudos clínicos de pacientes com PCM, assim como estudos com animais de experimentação, demonstram que, além de mecanismos da imunidade inata, os da imunidade adquirida são importantes para o controle desta infecção fúngica (MUSSATI et al., 1994; PERAÇOLI, 2000).

A imunidade adaptativa apresenta especificidade a distintas moléculas e os linfócitos possuem a habilidade em reconhecer e responder mais vigorosamente a repetidas exposições aos antígenos do mesmo microorganismo. As respostas imunes adaptativas são mediadas pela imunidade humoral e a imunidade mediada por células. A imunidade celular é desenvolvida pelos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e auxiliares (CD4⁺). As células T auxiliares (Th) apresentam as sub-populações Th1 e Th2, associadas aos especiais fatores de transcrição Tbet e GATA3, respectivamente, essenciais em regular a diferenciação desses subtipos celulares (SZABO et al., 2000; ZHENG; FLAVELL, 1997). Ambos os subtipos celulares apresentam distintos perfis de citocinas e funções no sistema imune. As citocinas de padrão Th1 incluem IL-18, IL-12, IL-2 e IFN- γ , e as de padrão Th2 incluem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. O balanço na expressão dessas citocinas é importante na diferenciação das respostas imunológicas contra os microorganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Um terceiro subtipo de células T auxiliares são as Th17, recentemente descobertas, que apresentam um particular potencial de produzir a citocina IL-17, sendo consideradas distintas das células Th1 e Th2. Essa sub-

população de células apresentam os fatores de transcrição ROR (*Retinoid-related orphan receptor*) γ T e RORa que direcionam o desenvolvimento dessas células (PARK et al., 2005; IVANOV et al., 2006).

Normalmente, um perfil Th1 de resposta é prevalente nas fases iniciais da doença, posteriormente esse perfil é substituído por uma resposta do tipo Th2, refletindo a ativação e diferenciação de linfócitos B. Estudos clássicos das respostas imunes desenvolvidas em pacientes e em modelos experimentais com PCM demonstram que o perfil de resposta Th1 está associado a uma forma assintomática ou branda da doença, enquanto que o perfil Th2 participa de uma doença mais grave (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

Neste sentido, vários trabalhos demonstraram com ênfase, a participação do IFN- γ e TNF- α nos processos de migração e ativação das células que conferem proteção à infecção pelo fungo (CALVI et al., 2003; CANO et al., 1998; SOUTO et al., 2000). Camundongos tratados com anticorpo que inibe a ação do IFN- γ ou ainda, camundongos geneticamente deficientes para o gene do IFN- γ , apresentam infecção disseminada e são susceptíveis à paracoccidiodomicose (CANO et al., 1998; SOUTO, et al., 2000). Esta citocina ativa macrófagos e polimorfonucleares, os quais passam a produzir reativos intermediários do nitrogênio e oxigênio, metabólitos importantes para a atividade microbida dessas células (GONZALEZ et al., 2000). Essas, quando ativadas, exercem um papel protetor na paracoccidiodomicose, podendo fagocitar e destruir intracelularmente o fungo (MELONI-BRUNERI et al., 1996; PINA et al., 2006).

IFN- γ também está relacionado com a indução do aumento da produção de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como TNF- α , CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10, além de induzir aumento da expressão da molécula de adesão intercelular-

1 (ICAM-1), favorecendo a migração de linfócitos e macrófagos e a formação e manutenção dos granulomas (SOUTO et al., 2003; MOREIRA et al., 2006).

Além da reação pró-inflamatória, a interação persistente do fungo com o sistema imune do hospedeiro resulta, frequentemente, na produção de citocinas de padrão Th2, no sentido de modular reações inflamatórias exacerbadas e danos teciduais. Como consequência, a resposta imune local pode ser suprimida e os granulomas incapazes de controlar o crescimento do fungo, aumentando a susceptibilidade à doença. Assim, alguns pacientes com forma disseminada da PCM, apresentam altos níveis de citocinas IL-4, IL-5, IL-10, fator transformador de crescimento (TGF- β) assim como a produção de anticorpos, IgE e IgG4, acompanhado de baixos níveis de IFN- γ (BENARD et al., 2001; BAIDA et al., 1999; MAMONI et al., 2002; 2005; OLIVEIRA et al., 2002). Ainda mais interessante, pacientes frequentemente apresentam depressão da resposta proliferativa de seus linfócitos quando estimulados com mitógenos ou com antígenos, incluindo antígenos provindos de *P. brasiliensis* (BENARD et al., 1996; 1997; CAMPANELLI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2002).

A inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a indução de citocinas com atividade supressora, como IL-10 e TGF- β , fornecem sinais reguladores para muitos processos celulares, como inibição da aderência e ativação de macrófagos, supressão da produção de H₂O₂ (HO; MOORE, 1994; MOORE et al., 1993; TSUNAWAKI et al., 1988), inibição da expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS2) e intermediários reativos do nitrogênio (BOUTARD et al., 1995; GAZZINELLI et al., 1992). De fato, essas citocinas encontram-se no tecido cutâneo de lesões induzidas por *P. brasiliensis* e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados (BENARD et al., 2001;

CAMPANELLI et al., 2003; NEWORAL et al., 2003; MAMONI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2002; PAGLIARI; SOTTO, 2003; PARISE-FORTES et al., 2006). TGF- β , além de inibir a proliferação e diferenciação de células T e B, a ativação de macrófagos e a atividade citotóxica de células NK (BARRAL-NETTO et al., 1992), está envolvida com ativação dos processos de fibrose e reparo tecidual (NISHIKAKU; BURGER, 2003).

Além da produção de citocinas antiinflamatórias, outros mecanismos também foram correlacionados com a depressão da resposta imune celular do hospedeiro durante a PCM, tais como: a alta produção de óxido nítrico (BOCCA et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2002; SOUTO et al., 2000), baixa síntese de IL-2 (DEFAVERI et al., 1992), aumento da sinalização inibitória via antígeno 4 de linfócitos T citotóxico (CTLA-4), assim como o aumento da apoptose celular (CACERE et al., 2002; CAMPANELLI et al., 2003). No entanto, os mecanismos que delineiam a manutenção da latência das leveduras ou o desenvolvimento da forma disseminada da doença são ainda incompreendidos e certamente diversos subtipos celulares ou padrões moleculares devem estar envolvidos nesse processo. É evidente, então, que sua elucidação poderia favorecer a compreensão da evolução da PCM e promoveria uma maior possibilidade de intervenção terapêutica.

O sistema imune deve trabalhar de modo sincronizado para manter a homeostase imune, portanto, esse sistema está constantemente sujeito a mecanismos reguladores. Além da tolerância central, vários mecanismos operam na periferia para prevenir respostas inflamatórias excessivas a antígenos próprios e estranhos. Vários subtipos supressores de células T têm sido caracterizados, incluindo: (a) células T reguladoras naturais $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ (nTregs), que originam-se diretamente do timo e têm a habilidade de suprimir respostas de ambas

células T $CD4^+CD25^-$ e $CD8^+CD25^-$ de modo dependente de contato e inespecífico ao antígeno (TODA; PICCIRILLO, 2006); (b) T reguladoras do tipo 1 (Tr1) $CD4^+CD25^-Foxp3^{low}$ produtoras de IL-10, que originam-se na periferia onde ocorre o reconhecimento do antígeno, em um microambiente tolerogênico, através de um processo dependente de IL-10 (GROUX et al., 1997), (c) células Th3 produtoras de TGF- β (CHEN et al., 1994); (d) células T $CD8^+$ supressoras (POMIÉ et al., 2008); e (e) células T *natural killer* (NKT) (EBATA et al., 2006).

Dentre essas populações, as células Tregs $CD4^+CD25^+$ têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos. Essas subpopulações de linfócitos são capazes de regular a resposta imune, de tal forma que a eliminação ou inativação destas células resulta no desenvolvimento de doenças auto-imunes, tais como gastrites, diabetes mellitus dependente de insulina, colites e artrites (ITOH et al., 1999; SAKAGUCHI et al., 1995; 2001; SHEVACH, 2000; 2002). Essas células também estão presentes em tecidos inflamados, tumores, ou em sítios infectados por patógenos (BELKAID et al., 2002; HONTSU et al., 2004; HORI et al., 2003; SUFFIA et al., 2005). Embora células T supressoras induzidas *in vivo* por antígenos de *P. brasiliensis* tenham sido descritas pela primeira vez na década de 80 (JIMENEZ-FINKEL; MURHY, 1988), apenas recentemente Cavassani e colaboradores (2006) demonstraram que células T $CD4^+CD25^+$, com características fenotípicas e funcionais idênticas às células Tregs, estão presentes em lesões e sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose. Tal trabalho relata, pela primeira vez, que tais células estão envolvidas nos mecanismos responsáveis pela regulação e manutenção da infecção crônica por *P. brasiliensis*. De fato, as células Tregs estão presentes em diversos sítios de infecções crônicas, como na leishmaniose humana (CAMPANELLI et al., 2006) e experimental (BELKAID et al.,

2002; JI et al., 2005), na infecção por *Schistosoma mansoni* (BAUMGART et al., 2006; HESSE et al., 2004; MCKEE; PEARCE, 2004;), por *Plasmodium falciparum* (WALTHER et al., 2005), em diversas infecções bacterianas e virais, causadas por *Helicobacter pylori* (RAGHAVAN et al., 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (GUYOT-REVOL et al., 2006), HIV (ANDERSSON et al., 2005), na hepatite C (BOYER et al., 2004) ou em infecções fúngicas experimentais por *Candida* sp (MONTAGNOLI et al., 2002).

Além da expressão constitutiva da cadeia α do receptor de IL-2 (CD25), as células Treg são caracterizadas por apresentarem o seguinte fenótipo: CD25^{high}, GITR⁺, CD62L⁺, CD103⁺, CD45Rb^{low} (BAECHER-ALLEN et al., 2001; FEHÉRVARI; SAKAGUCHI, 2004). A identificação do fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3) específico à essa linhagem celular determina seu fenótipo supressor (YAGI et al., 2004). O antígeno 4 de linfócitos T citotóxico (CTLA-4), ou CD152, é também expresso constitutivamente nesta população celular, e promove a interação das Treg com células apresentadoras de antígenos (APCs) através de receptores, CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2), presentes em sua superfície celular. Atualmente, diversos trabalhos demonstram que as células dendríticas (DC) são APCs essenciais na indução de Treg na periferia. Em contrapartida, células T reguladoras são capazes de inibir a maturação das APCs, diminuindo o desenvolvimento de uma resposta imune efetora (CEDERBOM et al., 2000; MIN et al., 2003).

Cavassani e colaboradores (2006) demonstraram que, além da expressão de moléculas que caracterizam as células Tregs CD4⁺CD25⁺ naturais, tais como CTLA-4, GITR, CD45RO, Foxp3 e TGF- β ancorado à membrana, as células T CD4⁺CD25⁺ presentes nas lesões dos pacientes com PCM também co-expressam receptores envolvidos com a migração e retenção das mesmas aos sítios periféricos como

CD103, observado na infecção por *Leishmania major* e *Schistosoma mansoni* (SUFFIA et al., 2005; BAUMGART et al., 2006). Além dessas moléculas, as células T CD4⁺CD25⁺ expressam os receptores de quimiocinas, CCR4 e CCR5, os quais estão envolvidos com o recrutamento das Tregs em tumores (CURIEL et al., 2004), na tolerância aos aloenxertos (LEE et al., 2005), no lavado broncoalveolar de pacientes com sarcoidose (MIYARA et al., 2006) e nos sítios de inflamação em modelo da doença aguda enxerto versus hospedeiro (WYSOCKI et al., 2005).

A migração dos linfócitos da corrente sanguínea para os órgãos linfóides secundários, ou sítios inflamados, depende necessariamente do reconhecimento de uma rede de quimiocinas. Estudos *in vivo* sugerem que os perfis de expressão de receptores de quimiocinas são mais complexos e flexíveis do que sugeriram estudos de polarização *in vitro*. As populações de células Th1 e Th2 distinguem-se quanto à produção de citocinas, mas também quanto à expressão de receptores de quimiocinas. A expressão de CXCR3, CCR2 e CCR5 é observada principalmente em células Th1 (QIN et al., 1998; BONECCHI et al., 1998; LOETSCHER et al., 1998), enquanto CCR3, CCR4, CCR8 e CCR5 são detectados entre as células T CD4⁺ da linhagem Th2 (SALLUSTO et al., 1997; IMAI et al., 1999; D'AMBROSIO et al., 1998; NAGATA et al., 1999).

Células Tregs expressam uma variedade de receptores de quimiocinas que permitem a entrada dessas células em tecidos específicos. Além do mais, uma expressão diferencial de receptores de migração garante uma imunossupressão por guiar as Tregs para tecidos onde elas são requeridas. Muitas Tregs residentes nos órgãos periféricos expressam os receptores CCR4 e CCR8. Essas células têm o potencial de entrar em sítios inflamatórios na pele e no pulmão (SOLER et al., 2006; HIRAHARA et al., 2006).

De fato, a migração das Tregs foi descrita como sendo dependente da produção das quimiocinas CCL22 e/ou CCL17 (IELLEN et al., 2001; CURIEL et al., 2004; LEE et al., 2005) e a presença dessas nas lesões induzidas por *P. brasiliensis* sugere seu envolvimento na migração das células T CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ em direção às lesões causadas pelo fungo. Tais observações permitem inferir que a secreção de tais ligantes seja proveniente de macrófagos e DC presentes no infiltrado das lesões granulomatosas assim como ocorre no microambiente tumoral (CURIEL et al., 2004). Perros e colaboradores (2009) demonstraram que as DC são a principal fonte das quimiocinas ligantes de CCR4 em modelo de asma, essenciais no recrutamento de células Th2 e indução da inflamação das vias aéreas.

Além das quimiocinas CCL22 e CCL17, CCL5 também foi detectada no tecido cutâneo das lesões de pacientes com PCM (CAMPANELLI, 2003), à qual interage com o receptor CCR5, altamente expresso nas células T CD4⁺CD25⁺ presentes nas lesões de pacientes com PCM, reforçando a suposição de que o ligante deste receptor (CCL5) também contribui para a migração das Tregs durante a infecção por *P. brasiliensis*. De fato, no modelo experimental da PCM, resultados do nosso laboratório têm revelado que animais deficientes de CCR5 são capazes de inibir o crescimento fúngico como consequência de um menor número de Tregs CD4⁺CD25⁺ recrutadas ao pulmão (MOREIRA et al., 2008).

Após infecção intratraqueal com leveduras da cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18), células T CD4⁺CD25⁺ migram rapidamente para o pulmão de camundongos C57BL/6. Tal migração é dependente parcialmente da expressão do receptor de quimiocina CCR5, uma vez que camundongos geneticamente deficientes de CCR5 (CCR5^{-/-}) apresentam significativa redução na migração das mesmas para os granulomas formados no pulmão, bem como reduzida quantidade de leveduras

viáveis no pulmão, baço e fígado quando comparados aos animais selvagens. Assim, esta evidência sugere a hipótese de que a ausência de célula T $CD4^+CD25^+$ no pulmão de camundongos $CCR5^{-/-}$ leva ao controle mais efetivo do patógeno, impedindo seu crescimento e disseminação para tecidos extrapulmonares. Podemos inferir que células T reguladoras migram para o sítio de infecção com *P. brasiliensis* com o intuito de controlar a magnitude da resposta de células efetoras contra o fungo e, como consequência, podem levar à manutenção do *P. brasiliensis* no tecido do hospedeiro (MOREIRA et al., 2008).

Zhang e colaboradores (2009) demonstraram que as células Treg migram do sangue para o sítio de inflamação onde elas são essenciais para a supressão da imunidade. Este processo é dependente dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR4, CCR5 e dos ligantes P- e E-selectina. No sítio de inflamação, essas Tregs são ativadas e, subsequentemente, migram para os linfonodos de modo dependente de CCR2, CCR5 e CCR7.

CCR4 é um receptor de alta afinidade para CCL17 e CCL22 (SALLUSTO et al., 1998), encontrado em DCs, macrófagos, células NK, plaquetas e basófilos (GODISKA et al., 1997; BOEHLEN; CLEMETSON, 2001; NESS et al., 2006), além de ser conhecido por sua expressão em células T. Este receptor possui papel chave na migração celular, na interação célula-célula, bem como na regulação de várias respostas imunes (HADDELAND et al., 2007). A expressão aumentada de CCR4 e seus ligantes está associada com a patogênese de várias doenças, incluindo fibrose pulmonar (INOUE et al., 2004), pneumonia eosinofílica (KATOH et al., 2003), inflamação hepática (YONEYAMA et al., 1998), desenvolvimento de granulomas (FREEMAN et al., 2006) e diabetes (KIM et al., 2002). CCR4 ou seus ligantes têm sido associados a um perfil Th2 de resposta imune, importante no desenvolvimento

da asma pulmonar e na dermatite atópica (PANINA-BORDIGNON et al., 2001; NOURI-ARIA et al., 2002).

Além disso, estudos demonstraram que uma eficiente polarização tipo Th1 e um aumento nas respostas de células T antígeno-específicas podem ser alcançados via estratégias que preferencialmente depletam células que expressam CCR4 (BAATAR, et al., 2007). Contrário a isso, a deleção gênica de CCR4 não influenciou em um modelo murino de inflamação das vias aéreas, dependente do perfil Th2, induzida por OVA (CHVATCHKO et al., 2000).

Em uma análise detalhada de células T do sangue periférico humano, a expressão de CCR4 foi detectada em células T CD4⁺ de memória, com características tanto Th1 quanto Th2 (ANDREW et al., 2001). Já foi demonstrado, também, que os ligantes específicos de CCR4, CCL17 e CCL22, podem induzir a migração de células Th1 e Th2 *in vitro* (LIEBERAM; FÖRSTER, 1999; SCHANIEL et al., 1999). O papel do receptor CCR4 foi analisado em modelos bem definidos de granulomas pulmonares mediados por células Th1 (induzidos por *Mycobacteria*) e Th2 (induzidos por *Schistosoma*). A comparação entre os modelos indica que CCR4 participa em ambas as respostas granulomatosas (Th1 e Th2), e sugere que o estabelecimento da formação do granuloma pulmonar Th1 requer a interação de células T CCR4⁺ e células apresentadoras de antígenos, para sustentar uma resposta Th1 efetora e de memória a antígenos de *Mycobacteria* (FREEMAN et al., 2006). Logo, esse receptor de quimiocinas não é restrito a um perfil Th2 de resposta imune.

A expressão de CCR4 em células T reguladoras é considerada um importante determinante na migração dessas células para sítios inflamatórios (IELLEM et al., 2001; ISHIDA et al., 2006; SATHER et al., 2007). Além disso, um elegante trabalho

demonstrou que CCR4 caracteriza dois subtipos fenotipicamente distintos de Tregs (Tregs CCR4⁺ e Tregs CCR4⁻), que parecem ter diferentes propriedades funcionais e de migração (BAATAR, et al., 2007). De forma interessante, camundongos com ausência de CCR4 nas células Treg apresentam infiltrados linfocitários e desenvolvem doença inflamatória grave na pele e pulmão, acompanhado por linfadenopatia periférica e aumentada diferenciação de células TCD4⁺Foxp3⁻ com tropismo à pele. Por outro lado, a ausência de CCR4 prejudica gravemente o acúmulo de células Tregs ou TCD4⁺ efetoras nas vias aéreas pulmonares, mesmo com a expressão constitutiva de seu ligante CCL17 nas células epiteliais dos brônquios e APCs pulmonares CD11c⁺. Além disso, a expressão de CCL17 e CCL22 é fortemente regulada neste órgão durante a inflamação pulmonar (SATHER et al., 2007).

Com uma atenção especial para a relação entre células Treg CD4⁺CD25⁺ e CCR4, Yagi e colaboradores (2004) reportaram que células T CD4⁺CD25⁻ *naïve* humanas, transduzidas com Foxp3, aumentaram a expressão de CCR4 e adquiriram funções supressoras de células Treg CD4⁺CD25⁺. Essa observação indica uma significativa relação entre Foxp3 e CCR4. Outro dado importante é que a expressão natural de Foxp3 em células Tregs CD4⁺CD25⁺ ocorre principalmente na população CD4⁺CD25^{high}CCR4⁺, mas não na população CD4⁺CD25^{high}CCR4⁻ (ISHIDA; UEDA, 2006).

A compreensão dos fatores que contribuem para a migração das Tregs durante a infecção por *P. brasiliensis* pode ser uma ferramenta útil no controle da doença. A presença do receptor de quimiocinas CCR4 é importante durante a migração e atuação de células Tregs CD4⁺CD25⁺ na supressão do processo inflamatório durante a PCM. É considerável, então, que o entendimento da atuação

do receptor CCR4 nas infecções por *P. brasiliensis* pode auxiliar no desenvolvimento de novos estudos para o controle da doença, tendo essa molécula como alvo terapêutico. Desse modo, avaliamos o papel do receptor de quimiocinas CCR4 durante a infecção experimental induzida por *P. brasiliensis*.

Objetivo

Avaliar a participação do receptor de quimiocinas CCR4 na migração celular e a consequente formação de granuloma no local da lesão experimental causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

Materials e Métodos

1. Cultura de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*

As leveduras da amostra 18 (Pb18) foram cultivadas em meio BHI-ágar por 7 dias à temperatura média de 36°C.

1.1. Meio BHI (*Brain Heart Infusion*)-Ágar

Para recuperação das leveduras foram adicionados 35 g de BHI e 18 g de Ágar (Oxoid Basingstoke, Hampshire, England) em um litro de água destilada. O meio foi autoclavado por 15 minutos/121°C. Após esfriamento até aproximadamente 50°C, foram adicionados gentamicina (100 µg/mL), 50 ml de soro bovino fetal (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.) e 50 ml de sobrenadante filtrado de cultura da cepa 265 de *P. brasiliensis* (cepa não virulenta). O meio foi, em seguida, distribuído em placas estéreis descartáveis.

2. Preparo das leveduras para inóculo

Após o período de cultura, as colônias de fungo foram transferidas para um tubo de 50 mL contendo tampão fosfato estéril (PBS, pH 7,2). Os grumos foram separados através de agulha de calibre semelhante à utilizada para infecção (29 G), e a suspensão centrifugada a 400 g com PBS estéril. A suspensão fúngica foi ressuspendida em PBS estéril e as leveduras contadas em câmara de Neubauer. A concentração de células fúngicas foi ajustada para 1×10^7 leveduras / mL em PBS estéril, sendo que 100 µl dessa solução foram inoculados em cada animal pela via endovenosa.

3. Viabilidade das leveduras

Para determinar a viabilidade das células fúngicas, 100 µl da suspensão de fungos em PBS foram incubados por 15 minutos em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, com 100 µl de diacetato de fluoresceína (2 µg/ml) e 100 µl de brometo de etídio (50 mg/ml) e a contagem de leveduras viáveis determinada através da análise da fluorescência das células marcadas, utilizando-se microscópio de fluorescência. As células fúngicas têm a propriedade de acumular fluoresceína (fluocromasia) enquanto o brometo de etídio penetra rapidamente em células danificadas, ligando-se ao DNA por intercalação, formando um complexo vermelho fluorescente com o material nuclear da célula. Desse modo, uma boa viabilidade foi considerada quando mais de 90% das leveduras eram FITC positivas.

4. Animais experimentais e infecção por Pb18

Foram utilizados camundongos isogênicos machos C57BL/6 e geneticamente deficientes de CCR4 (CCR4^{-/-}), adultos, com 6-7 semanas de idade. Todos os animais foram mantidos, segundo as recomendações da CETEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal), no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Camundongos com mutação alvo no gene CCR4 foram obtidos dos laboratórios Tularik, Inc. Two Corporate (San Francisco, CA United States). A infecção dos animais foi feita pela via endovenosa com 1x10⁶ leveduras viáveis de Pb18, e os experimentos realizados utilizando 3 a 4 camundongos por grupo. Todos os experimentos foram desenvolvidos de acordo com protocolo aprovado pela CETEA da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP (processo 153/2007).

5. Análise da sobrevivência dos animais infectados por Pb18

Observamos a sobrevivência de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} infectados pela via endovenosa com 1×10^6 leveduras da cepa Pb18. Foram utilizados 12 animais por grupo. Um prazo máximo de observação de 100 dias foi estabelecido. Os animais que sobreviveram após o período do experimento foram eutanasiados por deslocamento cervical.

6. Recuperação de fungos viáveis e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

Camundongos infectados por *P. brasiliensis* foram eutanasiados nos dias 0, 3, 7, 30 e 60 após a infecção. Os fragmentos de pulmão, fígado e baço foram assepticamente colhidos, pesados, e homogenizados em 1 ml PBS estéril com auxílio de um triturador de tecidos (IKA®-Werke; Deutschland, Germany). Após esse procedimento, 50 µl do macerado foram diluídos em 450 µl de PBS estéril e, em seguida, 100 µl da amostra foram semeados em placas de Petri contendo meio BHI-água enriquecido com 5% de soro fetal bovino e 5% de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* da cepa 265. As placas foram mantidas por um período de 7 dias à temperatura de 36°C e então a avaliação da recuperação de fungos viáveis foi determinada através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e os valores foram expressos por grama de tecido.

7. Obtenção do sobrenadante do homogenado do pulmão para ensaio imunoenzimático (ELISA) para citocinas

Fragmentos de pulmão foram coletados em tubos criogênicos contendo 1 ml de PBS estéril e 1,6 mM de inibidor de proteases Complete (Roche, Cat. 11 734 334

001). Em seguida, os órgãos foram lisados por homogeneização com triturador mecânico (IKA®-Werke). Após centrifugação a 1600 g a 4°C por 10 minutos, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C, até o momento, para dosagem de citocinas por ELISA.

8. Dosagem de citocinas por ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas, recobrimo-as com tampão de ligação contendo o anticorpo de captura (diluído conforme recomendações dos fabricantes). As placas foram incubadas por aproximadamente 15 horas a 4°C e lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20. Os sítios não específicos foram bloqueados com 100 µl/ poço de tampão de bloqueio específico à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas como descrito acima. Os padrões de citocinas foram diluídos em tampão de bloqueio. Diluições dos padrões (curva padrão) e das amostras foram adicionadas aos poços, seguindo-se incubação à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e, em seguida, adicionou-se anticorpos de detecção biotinilados, diluídos segundo orientações dos fabricantes nos respectivos tampões de bloqueio. Após lavagem foram adicionados em cada poço solução contendo substrato e cromógeno da peroxidase, Tetra-methyl-benzidine (TMB, KPL, Gaithersburg, MA, USA). Esperou-se o desenvolvimento de cor por 15 minutos, quando a reação foi finalizada pela adição de H₂SO₄ 1N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA eMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), medindo-se a densidade óptica por poço, em 450 nm. A detecção e quantificação foram avaliadas segundo a curva padrão obtida.

9. Extração de RNA para detecção de mRNA para fatores de transcrição, quimiocinas e receptor de quimiocinas

Os menores lóbulos pulmonares de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} infectados ou não com leveduras de *P. brasiliensis* foram obtidos e armazenados em Trizol® (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) a -70°C até o momento da extração de RNA total. Utilizando uma haste de trituração autoclavada e tratada com DEPC (dimetil pirocarbonato), o tecido foi homogeneizado em 1 ml de Trizol e, à mistura, adicionou-se 200 µl de clorofórmio e a submeteu à centrifugação a 12000 g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA foi cuidadosamente coletada e transferida para outro tubo com 350 µl de etanol 70%. Para a purificação do RNA, utilizou-se o RNeasy Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare Bio-Sciences). A mistura foi pipetada sobre uma coluna contendo uma membrana de sílica acoplada a um tubo coletor, e centrifugada a 8000 g por 1 minuto à temperatura ambiente. O procedimento foi repetido até que todo o líquido obtido no tubo coletor fosse descartado. Removeu-se o sal da membrana com a adição de MDB (*Membrane Desaltin Buffer*) e posterior centrifugação a 11000 g por 1 minuto. O líquido centrifugado foi descartado do tubo coletor. Preparou-se uma mistura de DNase e 95 µl desta foram aplicados diretamente sobre o centro da membrana e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente. A DNase foi inativada com a adição do tampão RA2 à coluna e posterior centrifugação por 1 minuto a 11000 g, e a membrana foi lavada com o tampão RA3 com a centrifugação por 2 minutos a 11000 g. Trocou-se os tubos coletores por tubos identificados com os dados das amostras e o RNA altamente puro foi eluído em água livre de RNase através da adição de 100 µl desta sobre a membrana de sílica e centrifugação a 11000 g por 1 minuto. O RNA das amostras foi armazenado a -70°C até a confecção do cDNA.

9.1. Quantificação de RNA

Para a quantificação foram diluídos 2 µl de RNA em 198 µl de água Milli-Q estéril. O RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro a 260 nm de absorbância. O aparelho foi zerado com água destilada estéril a cada nova leitura. A concentração de RNA foi determinada pela fórmula $[RNA] = A_{260} \times 40 \text{ (co-fator)} \times \text{fator de diluição da amostra (100)} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

9.2. Síntese de cDNA

Para obtenção do cDNA foram adicionados, mantendo-se o tubo em gelo, 0,5 µg/µl de Oligo (dT)₂₀ a 50 µM, 2 µg de RNA da amostra e completou-se a mistura para 13,5 µl com água Milli-Q estéril. Essa mistura foi aquecida a 70°C por 5 minutos e incubada em gelo. Durante a incubação foram adicionados, em outro tubo, 4,0 µl de tampão Improm II Buffer (5x) (Promega), 2,5 µl de MgCl₂ a 25 mM, 4 µl de dNTPs a 2,5 mM e 1 µl da enzima Improm II. Após a incubação do cDNA em gelo, adicionou-se 11,5 µl do mix às amostras e incubou-se a mistura a 42°C por 1 hora em termociclador. Posteriormente, a mistura foi diluída em 175 µl de água Milli-Q estéril e armazenada a -20°C até o uso.

9.3. Detecção de mRNA de fatores de transcrição, quimiocinas e seu receptor por Real Time-PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

Os mRNAs do receptor de quimiocinas CCR4, seus ligantes CCL17 e CCL22, os fatores de transcrição GATA3, Tbet, Foxp3 e RORγT, e o controle GAPDH foram analisados por Real Time-PCR. As sequências dos *primers* estão sumarizadas na tabela I.

A 5 µl de cDNA de cada amostra adicionou-se 6,5 µl de Platinum® SYBR® Green qPCR (Invitrogen), 0,5µl dos *primers* (sense/anti-sense) (**Tabela I**) e 2,5 µl de água Milli-Q estéril. O material foi incubado a 50°C por 2 minutos, submetido à desnaturação a 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de repetição de 95°C por 15 segundos, 58°C para anelamento por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos.

Tabela I. Sequência de *primers* utilizados em Real Time-PCR

Gene	Sequência (sense)	Sequência (anti-sense)
CCR4	CGA TTC CAA AGA TGA ATG CCA	TCC CCA AAT GCC TTG ATA CC
CCL17	GAA GTC CCT GTT CCC TTT TTT	TGT GTT CGC CTG TAG TGC ATA
CCL22	ATG GTG CCA ATG TGG AAG A	TAA ACG TGA TGG CAG AGG GT
GATA3	AGG AGT CTC CAA GTG TGC GAA	TTG GAA TGC AGA CAC CAC CT
Tbet	CTT CTC TGT TTG GCT GGC T	CCC CTG TCC AGT CAG TAA CTT
Foxp3	ACA ACC TGA GCC TGC ACA AGT	GCC CAC CTT TTC TTG GTT TTG
RORγT	TGG AAG ATG TGG ACT TCG TTT	TGG TTC CCC AAG TTC AGG AT
GAPDH	TGC AGT GGC AAA GTG GAG AT	CGT GAG TGG AGT CAT ACT GGA

Todos os genes foram amplificados observando-se a curva exponencial de amplificação. A validação do método foi realizada através de análise de regressão, sendo estabelecido o coeficiente de amplificação. Foi empregado o método de quantificação relativa de mRNA utilizando-se o gene da GAPDH como controle. Foram obtidos os valores de ΔCt para cada uma das amostras avaliadas de acordo com a seguinte fórmula:

$\Delta Ct = Ct_{\text{gene interesse}} - Ct_{\text{gene controle (GAPDH)}}$, onde Ct (*threshold Cycle*) trata-se do ciclo onde a detecção da fluorescência ultrapassa o nível basal. Assim, quanto menor o valor de ΔCt maior a expressão do gene de interesse em relação ao gene controle.

Calculou-se, então, a expressão do mRNA amostral relativa ao grupo controle de animais C57BL/6 não infectados, através da fórmula: Expressão relativa = $2^{-\Delta\Delta CT}$, sendo que $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{animal infectado}} - \Delta CT_{\text{grupo controle}}$.

10. Análise histopatológica das lesões

Fragmentos de pulmão, baço e fígado foram coletados nos dias 0, 3, 7, 15, 30 e 60 após a infecção, fixados em formol tamponado e, após 48 horas, desidratados e diafanizados em concentrações crescentes de álcool e xilol. Então, os órgãos foram incluídos em blocos de parafina e cortes de 5 µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 60°C para fixação. Em seguida foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao álcool 80%). Os cortes foram então corados com hematoxilina e eosina (HE), desidratados com concentrações crescentes de álcool (de 80% ao absoluto), lavados com xilol e, as lâminas, montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil) e cobertas com lamínula.

11. Análise morfométrica dos granulomas

Com o intuito de avaliar a área de inflamação presente nos tecidos, cortes histológicos de pulmão de camundongos do grupo selvagem e CCR4^{-/-} foram corados previamente com HE e analisados em microscópio óptico comum acoplado a uma câmara digital e a um sistema de computação que possui o programa HLIMAGE++97 Application Western Vision Software L.C. Calculamos a morfometria da área inflamada pela área total das secções pulmonares avaliadas. Foram

observados os maiores lóbulos pulmonares de 3 camundongos por grupo em 6 a 8 distintos campos por lâmina.

12. Imuno-histoquímica (IH)

O método para análise imuno-histoquímica da expressão de CCL17, CCL22, NOS2, IL-10, Foxp3, CCR4 e CD4 no pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis* foi o da imunoperoxidase, por meio da avidina-biotina-peroxidase. A análise foi realizada em cortes de 5 µm de pulmão congelado em meio OCT (Sakura Finetek Inc., Torance, CA), os quais foram provenientes de camundongos selvagens ou CCR4^{-/-} em diferentes dias após a infecção. A reação iniciou-se com a fixação dos cortes em acetona 100% por 10 minutos à -20°C. A peroxidase endógena do tecido foi bloqueada através da incubação dos cortes com água oxigenada a 3% em PBS, por 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS e incubados com 3% de leite desnatado (Nestle, SP, Brasil) por 30 minutos a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. Os cortes foram finalmente incubados com anticorpos primários em câmara úmida, à temperatura ambiente por 1 hora e, em seguida, mantidos a 4°C até o dia seguinte. Foram utilizados os anticorpos IgG anti-CCL17, anti-CCL22, anti-NOS2, anti-IL-10, anti-Foxp3, (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluído 100 vezes em 0,01% de saponina (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) para a análise das marcações intracelulares, e anti-CCR4, anti-CD4 para marcações de superfície.

Após esse período, as lâminas foram lavadas e incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente com os anticorpos secundários biotinilados provenientes da Vector Laboratories. Após novas lavagens, foi adicionado o complexo avidina-biotina peroxidase (Vector Laboratories) por 45 minutos, à temperatura ambiente.

Decorridos os minutos de incubação, os cortes foram lavados com PBS e procedeu-se a revelação da reação através do substrato revelador diaminobenzidina DAB (Vector Laboratories). As reações foram interrompidas com água, as lâminas contracoradas com Hematoxilina de Mayer por 20 segundos e, então, montadas com Bálsamo do Canadá (Vetec Química, Rio de Janeiro, Brasil).

13. Obtenção de leucócitos dos pulmões

Os pulmões foram fragmentados e incubados durante 1 hora a 37°C em RPMI-1640, adicionados de 50 µg/ml da enzima liberase CI (Boehringer Ingelheim Chemicals, Inc. Petersburg, VA) para a digestão do tecido. Após esse período, os fragmentos foram macerados e passados através de poros de 50 µm para obtenção de células. A suspensão celular foi centrifugada a 400 g a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante descartado e, ao homogenado de células, adicionou-se 1 mL de tampão de lise. Após 1 minuto, as células foram lavadas com 10 mL de PBS, centrifugadas nas mesmas condições anteriores e ressuspensas em PBS. Alíquotas celulares foram diluídas 100x em azul de Tripán e a contagem de leucócitos efetuada em câmara de Neubauer. Em seguida, distribuiu-se 1×10^5 células por tubo de análise.

14. Citometria de fluxo para análise da expressão de moléculas de superfície

A análise da expressão de marcadores de superfície, no intuito de caracterizar a população de linfócitos T e monócitos foi realizada em células recuperadas do pulmão (3º, 7º e 30º dia de infecção) de camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Foi caracterizada a expressão das seguintes moléculas: CD3, CD8, CD4, CD25, CTLA-4, CD103, GITR, FOXP3, CD11c, CD11b, MHC-II, CD86 e NK. Em geral, as

células foram incubadas com 0,5 µg de anticorpo monoclonal anti-CD16/CD32 (Fc block), bloqueador da porção Fc de imunoglobulinas, por 45 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 0,5 µg por 10⁶ células de anticorpos monoclonais conjugados a FITC, PE, PerCP, APC, APC-Cy7 e PE-Cy7 (todos obtidos da BD Pharmingen, San Jose, Ca USA) por 30 minutos a 4°C. As marcações intracelulares foram efetuadas através da incubação das células com anticorpos diluídos em PBS contendo 0,01% de saponina. Após a incubação, as amostras foram lavadas com PBS, sendo centrifugadas a 400 g por 10 minutos e ressuspensas em PBS contendo 1% de formaldeído. Após estes procedimentos, as amostras foram adquiridas em BD FACS CantoTMII (BD Biosciences, San Jose, CA) . As análises foram feitas usando o programa FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) o qual permite analisar todas as células adquiridas (100000 por amostra de pulmão total) baseado em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência.

15. Transferência adotiva de linfócitos T

Células totais obtidas do baço de um camundongo C57BL/6 infectado por *P. brasiliensis* (dia 7 após a infecção) foram lavadas em PBS gelado acrescido de 0,5% de BSA e 3 mM de EDTA e a sub-população de células T CD4⁺ separada utilizando um kit comercial proveniente da Miltenyi Biotec (Auburn, CA). Resumidamente, as células foram primeiramente marcadas com um coquetel de anticorpos monoclonais biotinilados específicos para camundongos: CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγδ e, subsequentemente a suspensão celular foi incubada com *micro-beads* cobertas com biotina. Após 15 minutos de incubação, as células foram lavadas, 300 g por 10 minutos a 4°C e, a população CD4⁺ foi separada

magneticamente por MACS®-*sorting* através da seleção negativa em colunas adequadas ao número de células.

Em uma segunda etapa, as células T CD4⁺ previamente selecionadas foram diretamente marcadas com *micro-beads* cobertas com anticorpos anti-CD25 e então foram obtidas as sub-populações de interesse. As células T CD4⁺CD25⁻ foram selecionadas positivamente através da separação com colunas MACS® adequadas ao número de células. As células T CD4⁺CD25⁺ retidas na coluna magnética, foram lavadas da coluna, com o auxílio de um êmbolo, e transferidas para um tubo coletor. Separadamente, 1x10⁵ células T CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ foram transferidas, pela via intravenosa, para grupos distintos de camundongos CCR4^{-/-}. Logo em seguida, os animais foram infectados com 1x10⁶ leveduras de *P. brasiliensis*. Camundongos selvagens e deficientes de CCR4 que não receberam a transferência celular foram usados como controles.

16. Análise estatística

As diferenças observadas entre os camundongos do grupo selvagem e geneticamente deficiente de CCR4, infectados ou não, foram analisadas aplicando-se o teste ANOVA seguido de múltipla comparação segundo o método de Bonferroni (GraphPad Prism, GraphPad Software, San Diego, Ca, USA). Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). Todos os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

1. Validação do modelo de camundongos deficientes de CCR4

Até o momento, sabe-se que o receptor de quimiocinas CCR4 encontra-se presente em distintos subtipos celulares, como DC, macrófagos, células T CD4⁺, CD8⁺ e T reguladoras, desempenhando uma importante função no recrutamento dessas células para o sítio de infecção ao qual se dirigem. Confirmar a ausência desse receptor no modelo a ser utilizado no trabalho assegura-nos eficácia nos estudos propostos. Assim, verificamos a expressão de mRNA de CCR4 no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} não infectados e com 7 dias após a infecção por *P. brasiliensis*. A expressão do mRNA do receptor de quimiocinas no pulmão dos animais foi quantificada e comparada em relação ao grupo de camundongos controle (C57BL/6 não infectado) através da técnica de Real Time-PCR. A expressão do mRNA do receptor de quimiocinas foi aumentada após a infecção com *P. brasiliensis* nos animais C57BL/6, e, como esperado, foi positiva e significativamente maior quando comparada aos camundongos deficientes de CCR4 (**Figura 1A**). Com o mesmo objetivo, avaliamos, também, a expressão desse receptor *in situ*, através da técnica de imuno-histoquímica no pulmão de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} após 7 dias de infecção. A análise de secções de tecidos marcados com anticorpo anti-CCR4 demonstrou a presença de células CCR4⁺ somente no sítio inflamatório de camundongo C57BL/6 (**Figura 1B**).

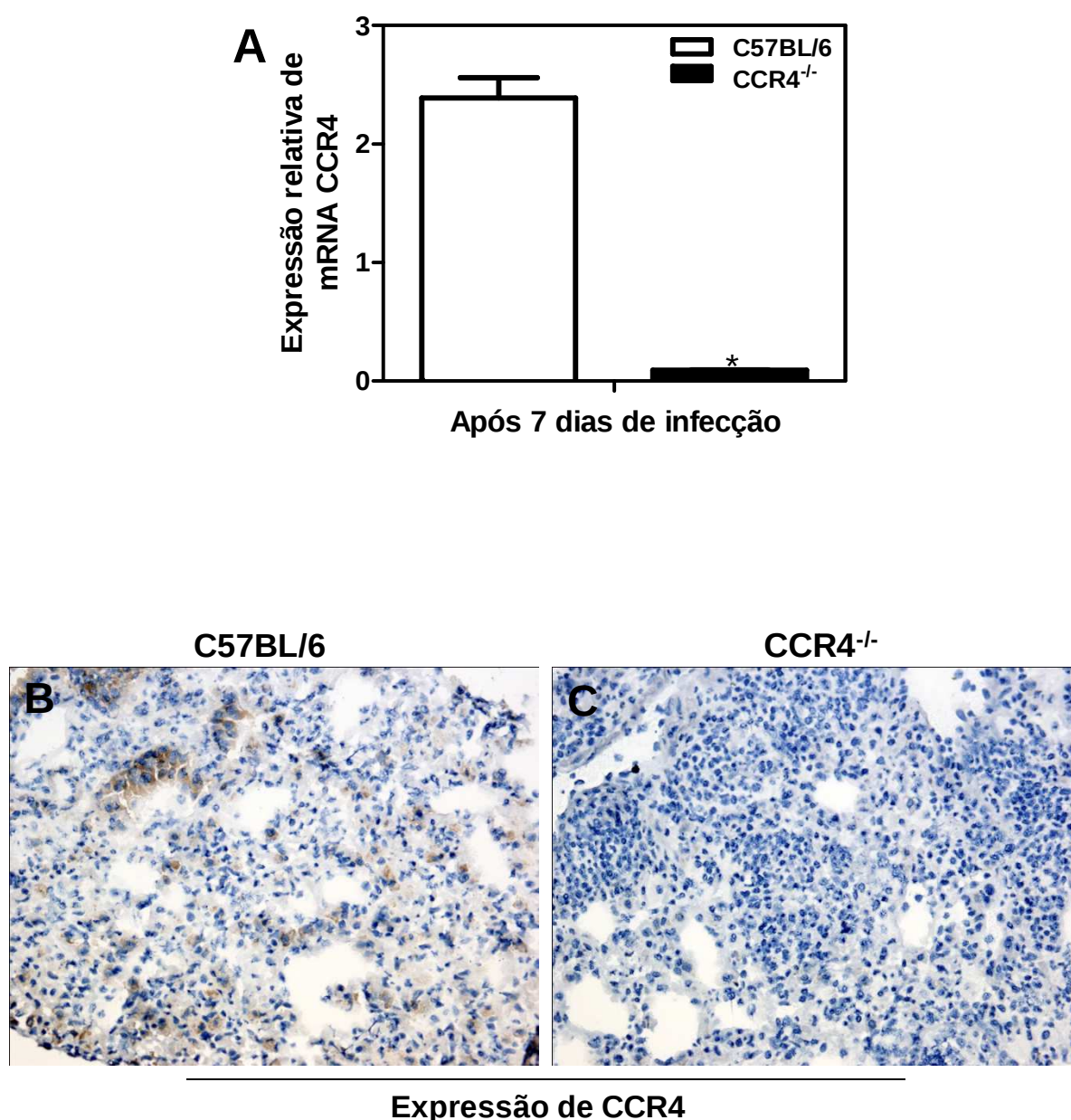


Figura 1. Expressão do receptor de quimiocinas CCR4 no sítio de infecção causada por *P. brasiliensis*. Obteve-se o mRNA do pulmão de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} nos dias 0 e 7 após infecção endovenosa com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18 e avaliou-se a expressão relativa do receptor de quimiocinas CCR4 em relação ao grupo de animais do tipo selvagem não infectados (A). Secções de lóbulos pulmonares de camundongos C57BL/6 (B) e CCR4^{-/-} (C) com 7 dias de infecção foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica para verificar a expressão de CCR4 em regiões inflamadas do tecido (Aumento de 400x). Nota-se imunorreatividade positiva em marrom. Método de detecção: Avidina Biotina-Peroxidase. Revelação: diaminobenzidina (DAB).

2. A expressão dos ligantes de CCR4, CCL17 e CCL22, não é alterada em camundongos CCR4^{-/-}

Uma vez que a resposta imune celular é um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra *P. brasiliensis* e o receptor de quimiocina CCR4 está intimamente relacionado com o recrutamento de diferentes tipos de células para os tecidos periféricos, analisamos inicialmente a expressão desse receptor e seus ligantes no tecido pulmonar de animais C57BL/6 e CCR4^{-/-} nos dias 0, 7 e 30 após infecção pelo fungo. A expressão do mRNA das quimiocinas CCL17 e CCL22 (**Figura 2A**), foi avaliada, por Real Time-PCR, nos pulmões de camundongos normais e geneticamente modificados. Observamos expressões similares de mRNA das quimiocinas em ambas as linhagens de camundongos, e um aumento na expressão de mRNA das quimiocinas após a infecção por *P. brasiliensis*. Semelhante expressão das quimiocinas também foi observada, por imuno-histoquímica, no pulmão de ambas as linhagens de camundongos infectados (**Figura 2B e C**), sugerindo que a interação entre essas quimiocinas e seu receptor pode estar envolvida com a migração e a retenção das células CCR4⁺ no interior do granuloma.

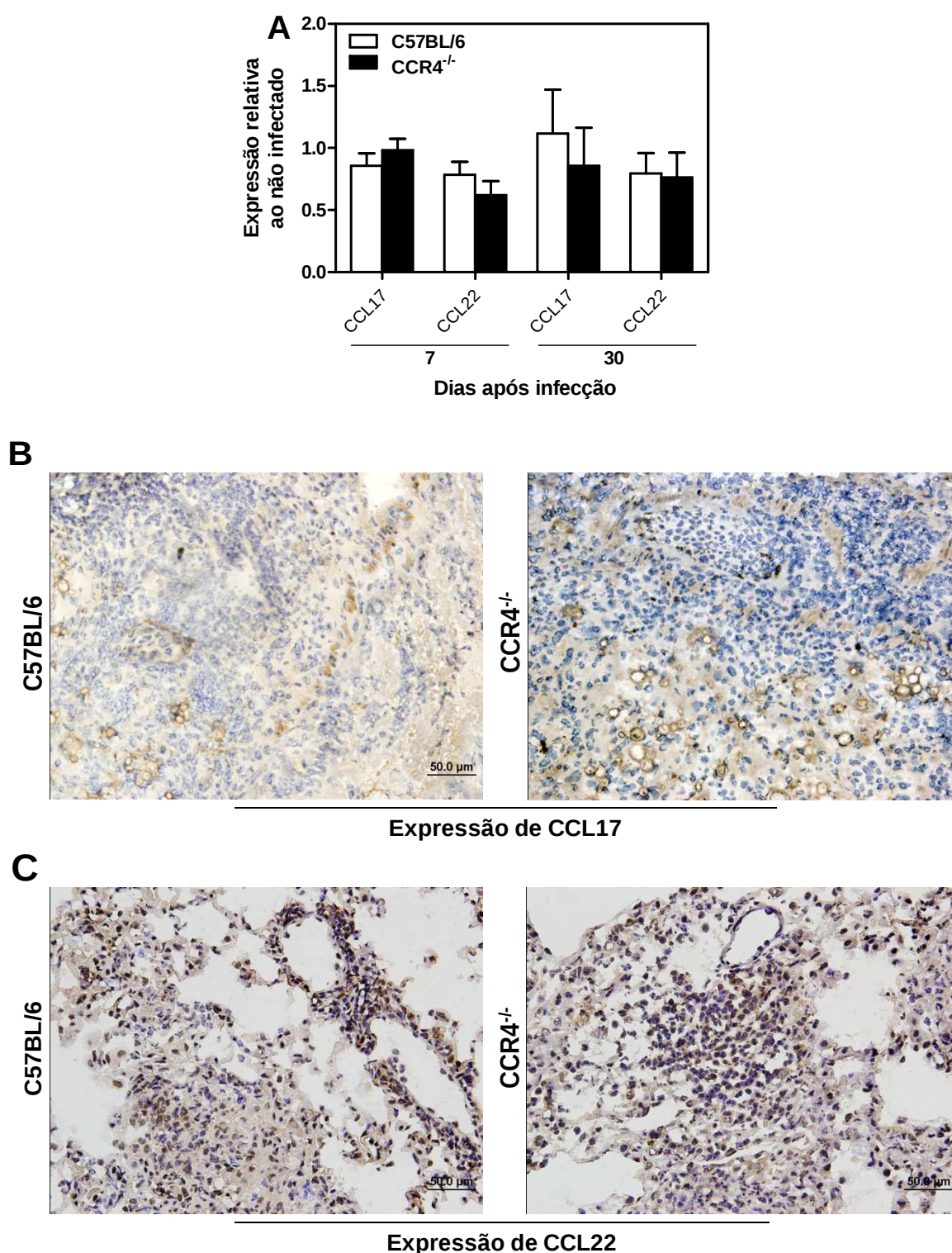


Figura 2. Expressão das quimiocinas e expressão relativa do mRNA de CCL17 e CCL22 no tecido pulmonar de camundongos infectados. Obteve-se o mRNA do pulmão de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} após 0, 7 e 30 dias após infecção endovenosa com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18 e avaliou-se a expressão relativa do mRNA das quimiocinas CCL17 e CCL22 por Real Time-PCR em relação aos animais não infectados do tipo selvagem (A). Secções de lóbulos pulmonares dos mesmos animais com 7 dias de infecção foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica para verificar a expressão de CCL17 (B) e CCL22 (C) em regiões inflamadas do tecido. (Barra 50 μ m).

3. Camundongos CCR4^{-/-} são mais susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis* durante a fase inicial da PCM

Para avaliar a susceptibilidade dos camundongos deficientes do receptor de quimiocinas CCR4 à infecção pelo fungo *P. brasiliensis*, inoculamos por via endovenosa os animais CCR4^{-/-} e CCR4^{+/+} (C57BL/6) com 1×10^6 leveduras da cepa Pb18, altamente virulenta. Os animais foram acompanhados, diariamente, durante 100 dias e a taxa de sobrevivência foi expressa. Verificamos que 55% dos camundongos CCR4^{-/-} morreram até a segunda semana de infecção, enquanto que 37% dos animais normais morreram a partir da sexta semana de infecção (**Figura 3**), sugerindo que o receptor CCR4 é importante para a sobrevivência de camundongos em uma etapa inicial da infecção por *P. brasiliensis*.

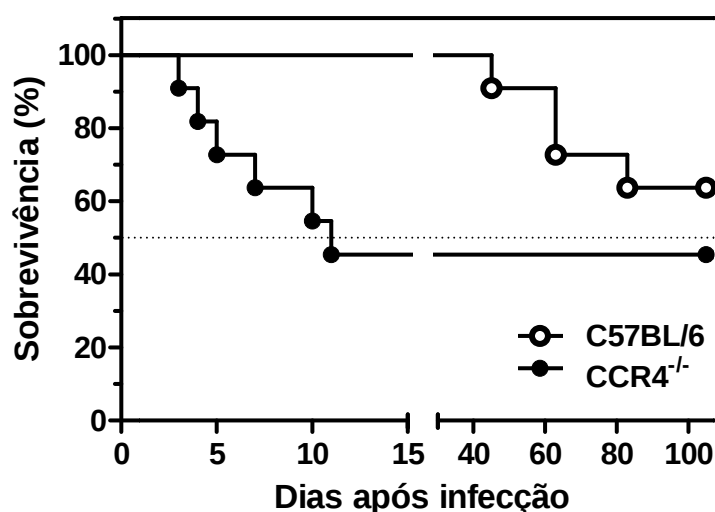


Figura 3. O receptor de quimiocinas CCR4 é necessário para a resistência contra a infecção experimental por *P. brasiliensis*. Camundongos selvagens (C57BL/6) e geneticamente deficientes de CCR4 (CCR4^{-/-}) foram infectados endovenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18. O tempo de sobrevivência dos animais foi avaliado por 100 dias.

4. Camundongos CCR4^{-/-} apresentam maior susceptibilidade à infecção por *P. brasiliensis*

Para determinar a proliferação de *P. brasiliensis*, infectamos endovenosamente camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} com 1×10^6 leveduras de *P. brasiliensis* e, após 3, 7, 30 e 60 dias, os camundongos foram sacrificados para a obtenção de fragmentos de pulmão, fígado e baço. A recuperação fúngica dos órgãos foi avaliada pela contagem do número de colônias de leveduras que cresceram sobre o meio de cultura BHI-água. Corroborando com os dados obtidos na avaliação da mortalidade dos animais infectados, observamos um maior número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas dos três órgãos CCR4^{-/-} avaliados ($p < 0,05$) até a primeira semana de infecção (**Figura 4**). Após esse período, a contagem de UFC foi semelhante entre ambos os grupos de animais, porém, o fígado dos animais CCR4^{-/-} apresentou menos UFC no dia 30 após a infecção. Aos 60 dias após a infecção, observamos uma considerável queda no número de leveduras recuperadas dos órgãos dos animais normais e dos deficientes de CCR4, indicando resolução da infecção.

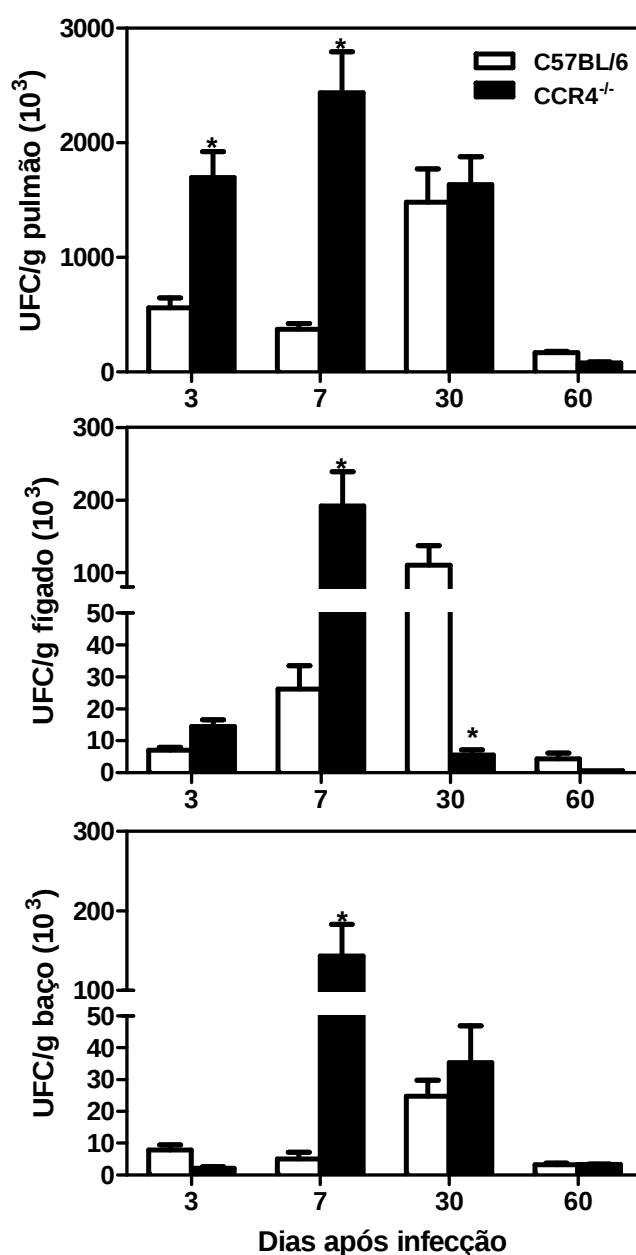


Figura 4. Camundongos CCR4^{-/-} apresentam maior susceptibilidade no início da infecção por *P. brasiliensis*. As unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas de fragmentos do pulmão, fígado e baço de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} foram determinadas nos dias 3, 7, 30 e 60 após a infecção por *P. brasiliensis*. As barras representam a média ± SEM de UFC de três a quatro camundongos. Resultados similares foram encontrados em dois experimentos independentes. *p<0,05 em comparação a UFC de camundongos selvagens no mesmo período de infecção.

5. CCR4 não é essencial para o desenvolvimento inflamatório durante a infecção por *P. brasiliensis*

Com o intuito de avaliar o processo inflamatório desenvolvido no pulmão dos animais infectados, assim como as lesões causadas nos tecidos, lóbulos pulmonares foram coletados de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} nos dias 3, 7 e 30 após a infecção por 1x10⁶ leveduras de *P. brasiliensis*, e obtivemos secções de 5 µm dos órgãos, as quais foram coradas com HE. Os pulmões de ambas as linhagens apresentaram, nos dias 3 e 7 após a infecção, abundante infiltrado celular (**Figura 5A, B, C e D**). Observamos lesões granulomatosas pulmonares, com limite definido, no dia 30 após a infecção (**Figura 4E e F**). Em ambas as linhagens houve evolução na organização celular e no tamanho do granuloma, com focos de consolidação do parênquima pulmonar conforme a progressão da doença.

A área inflamada dos pulmões foi mensurada por morfometria, comparada à área total da secção de tecido e, posteriormente, calculamos o índice de lesão (**Figura 5G**). Observamos que as linhagens de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} desenvolveram semelhante lesão inflamatória após infecção por *P. brasiliensis*.

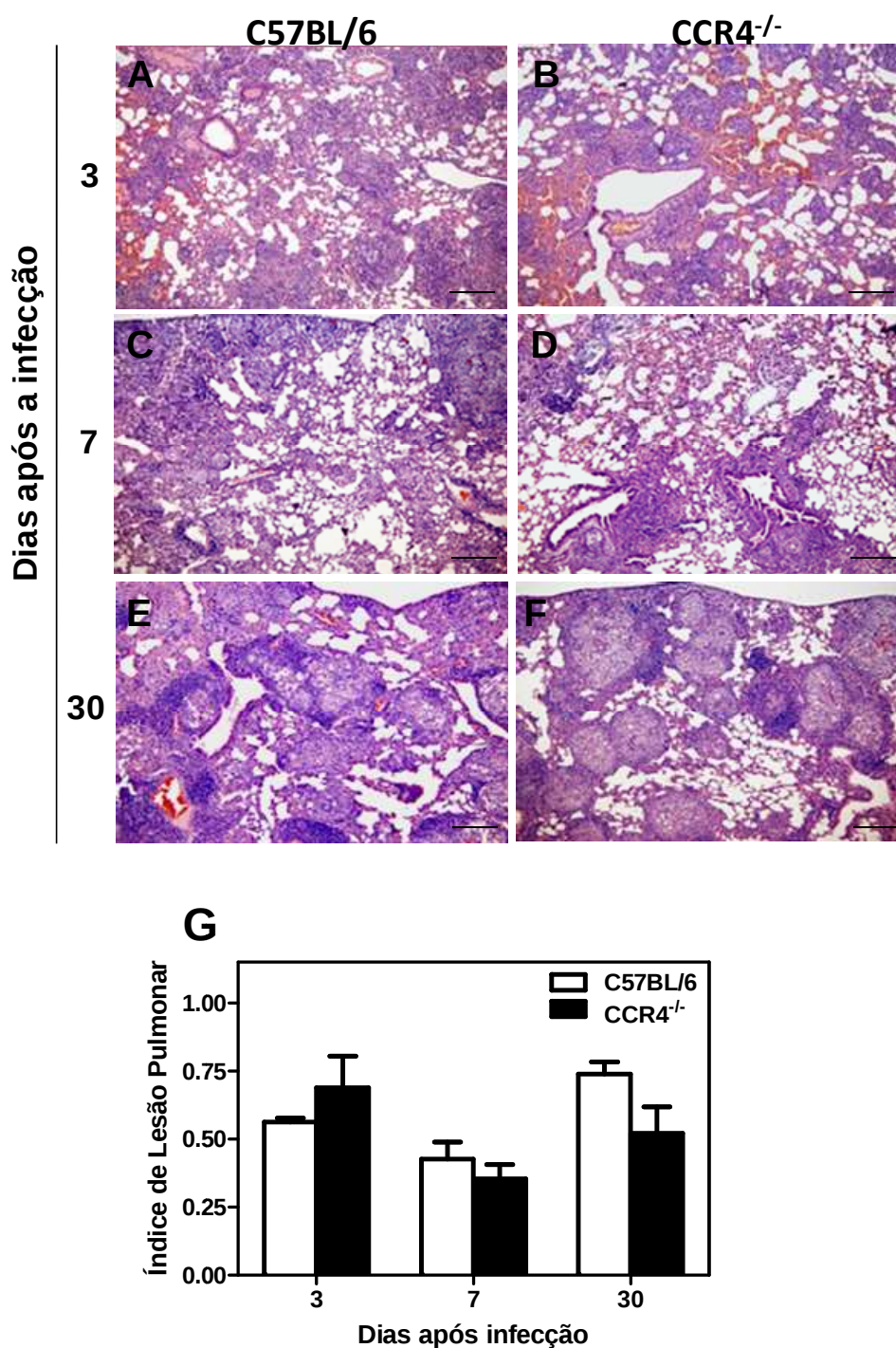


Figura 5. Fotomicrografias e morfometria do desenvolvimento de lesão pulmonar induzida por *P. brasiliensis*. Fragmentos de pulmão de camundongos C57BL/6 (A, C e E) e CCR4^{-/-} (B, D e F) foram obtidos aos 3 (A, B), 7 (C, D) e 30 (E, F) dias após a infecção, fixados em formalina, parafinados e secções de 5 µm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise do processo inflamatório e evolução da formação do granuloma. Média das áreas inflamadas medidas por análise morfométrica em secções de tecido coradas com HE (Barra 50 µm) (G).

6. A ausência de CCR4 induz menor expressão do fator de transcrição Foxp3 no pulmão de camundongos infectados com *P. brasiliensis*

Para verificar se a deficiência de CCR4 influenciaria na expressão gênica de fatores de transcrição após a infecção por *P. brasiliensis*, obtivemos, após 0, 7 e 30 dias, os menores lóbulos pulmonares de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} infectados endovenosamente com 1×10^6 leveduras viáveis de Pb18. Os lóbulos foram mantidos congelados em Trizol® até a extração do RNA que foi realizada utilizando-se RNeasy Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare Bio-Sciences).

Ao compararmos a quantificação de mRNA obtidas dos lóbulos pulmonares de camundongos infectados e não infectados, notamos semelhante expressão relativa de mRNA de GATA3, Tbet e RORγT entre ambos os grupos de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} infectados. Contudo, camundongos deficientes de CCR4 apresentaram menor expressão relativa de mRNA de Foxp3 após 7 dias de infecção, comparados ao grupo de camundongos do tipo selvagem no mesmo período de infecção. Aos 30 dias após a infecção, a expressão de Foxp3 foi diminuída em ambas as linhagens de camundongos, não havendo diferença estatística entre os grupos. Dentre os fatores de transcrição analisados, podemos observar, graficamente, que o Foxp3 teve um aumento superior aos demais fatores, quando comparados aos animais não infectados do tipo selvagem (**Figura 6**).

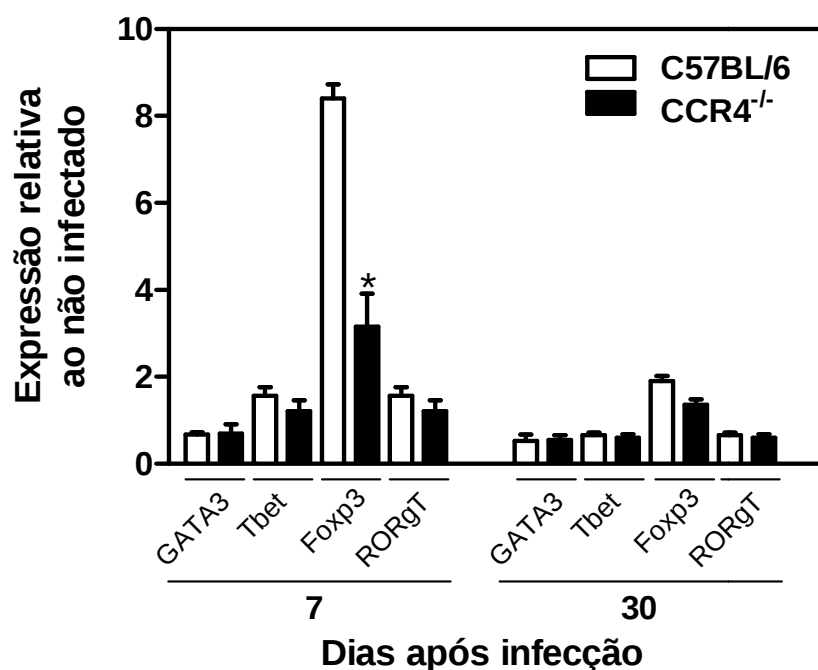


Figura 6. Diferencial expressão de mRNA de Foxp3 no pulmão de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} infectados por *P. brasiliensis*. A expressão de GATA3, Tbet, Foxp3 e RORγT foi avaliada por Real Time-PCR a partir de fragmentos de pulmão de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} obtidos aos 0, 7 e 30 dias após a infecção com Pb18. Os resultados apresentam a expressão dos fatores de transcrição nos períodos após a infecção em relação ao grupo controle de animais C57BL/6 não infectados. *p<0.05 em relação aos camundongos do tipo selvagem.

7. CCR4, no dia 3 após a infecção, modula negativamente a migração celular durante a resposta imune inata contra *P. brasiliensis*

Para caracterizar o perfil celular da imunidade inata encontrado no pulmão de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-}, analisamos, por citometria de fluxo, o fenótipo das células recuperadas do pulmão desses animais nos períodos de 0, 3, 7 e 30 dias após a infecção. As populações foram primeiramente selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), para determinar a população de monócitos, e, posteriormente, analisadas quanto à expressão das moléculas de superfície CD11b⁺, para caracterizar macrófagos; CD11c⁺ CD11b⁺, para caracterizar a presença de células dendríticas; NK⁺ para células *natural killer* (NK), e GR1⁺, para neutrófilos.

Os resultados mostram que os camundongos CCR4^{-/-} apresentam uma maior migração ($p < 0,05$) de macrófagos e células dendríticas (**Figura 7A**), no dia 3 após a infecção. Porém, esse aumento não é significativo no dia 7 após a infecção. Nota-se, que há um aumento de macrófagos de 3 para 7 dias após a infecção em ambos os grupos infectados, e, no mesmo período, há uma considerável diminuição de células CD11c⁺CD11b⁺CCR4⁻ em relação às CD11c⁺CD11b⁺CCR4⁺, cuja quantidade não é alterada de 3 para 7 dias após a infecção. Aos 30 dias, todas as populações de macrófagos e células dendríticas avaliadas retornam aos níveis basais, não apresentando diferença entre os grupos.

A migração de células Gr1⁺ e NK⁺ foi semelhante entre ambas as linhagens de camundongos após a infecção, sendo consideravelmente aumentada uma semana após a infecção (**Figura 7B**). Em conjunto, os resultados sugerem que, na paracoccidiodomicose, CCR4 participa da modulação negativa da migração de macrófagos e células dendríticas no início da infecção.

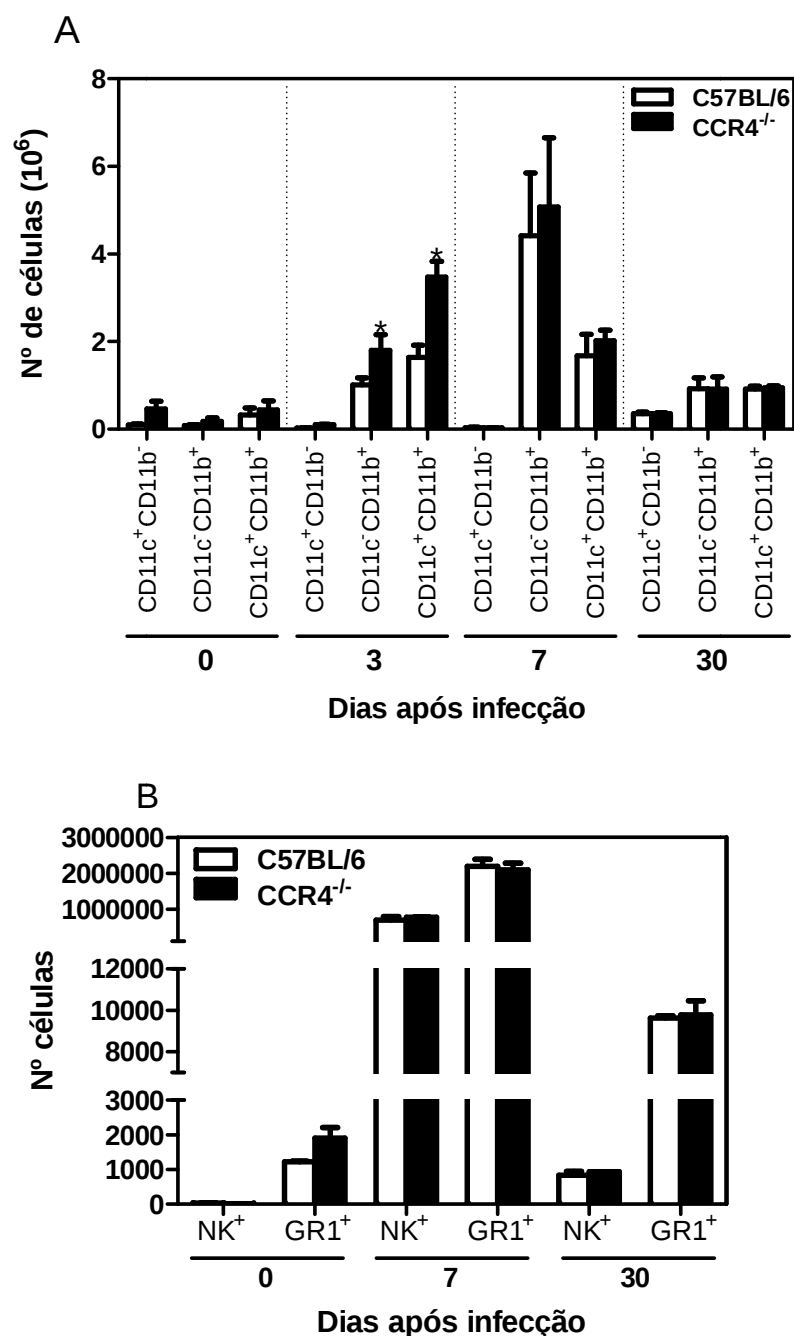


Figura 7. CCR4 modula negativamente a migração de macrófagos e células dendríticas contra *P. brasiliensis* aos 3 dias após a infecção. O número de células CD11b⁺, CD11c⁺ e CD11b⁺CD11c⁺ (A) foram determinadas por citometria de fluxo nos dias 0, 3, 7 e 30 após a infecção, e células NK⁺ e GR1⁺ (B) nos dias 0, 7 e 30 pela mesma técnica. As barras representam a média $\pm$ SEM da porcentagem de células recuperadas de três animais. Resultados similares foram obtidos em dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em comparação aos camundongos selvagens.

8. Papel do CCR4 na síntese de óxido nítrico na infecção por *P. brasiliensis*

Uma vez que a enzima óxido nítrico sintase (NOS2) é um importante componente produzido pelos leucócitos na indução da morte das leveduras, verificamos, por imuno-histoquímica, a presença dessa enzima no tecido pulmonar dos camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} nos períodos de 3, 7 e 30 dias após a infecção. De forma interessante, os resultados mostraram que NOS2 é induzida em grande quantidade no tecido de camundongos C57BL/6 no início da infecção (**Figura 8A e B**) enquanto que, na ausência de CCR4, poucas marcações positivas foram observadas (**Figura 8D e F**). Em período mais tardio (30 dias), não se observa diferença na expressão de NOS2 no pulmão de ambas as linhagens avaliadas.

Assim, podemos concluir que, embora a migração celular durante o período inicial de infecção por *P. brasiliensis* seja independente de CCR4, a ativação integral dessas células no sítio de infecção, medida através da expressão de NOS2, é dependente da presença desse receptor.

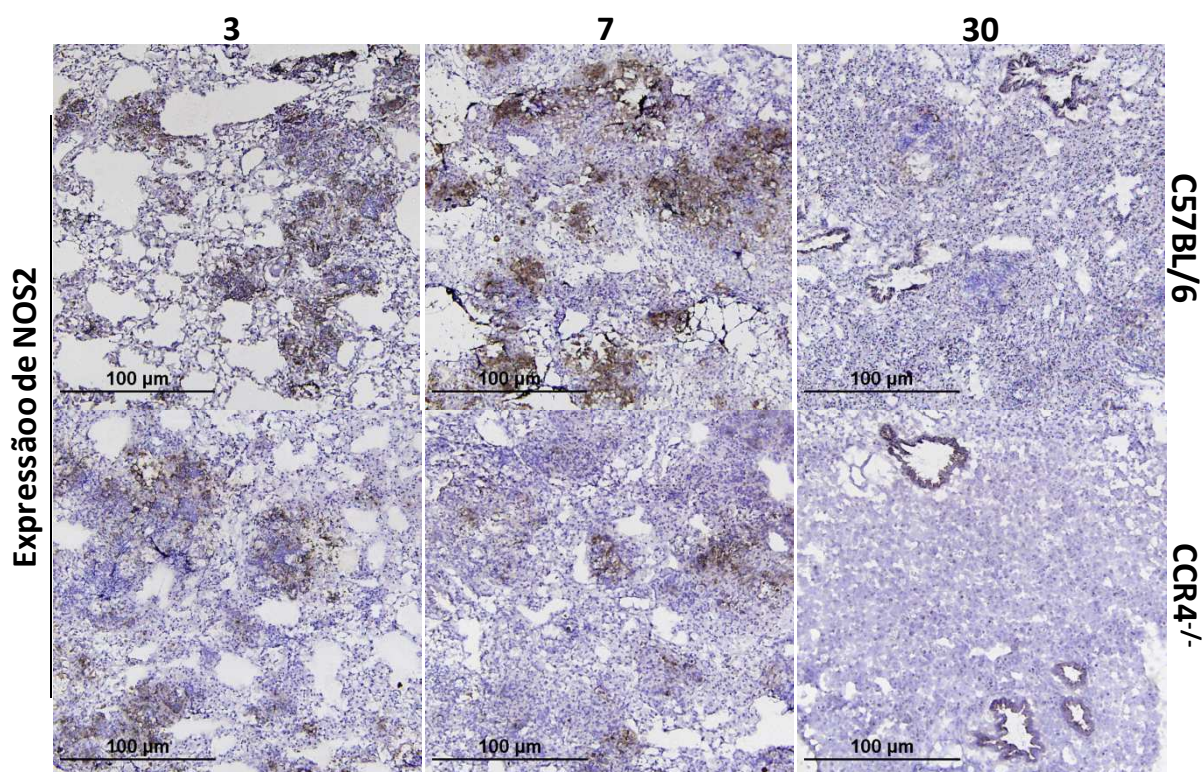


Figura 8. Papel do CCR4 na síntese de óxido nítrico na infecção por *P. brasiliensis*. Lóbulos pulmonares de camundongos C57BL/6 (A, B e C) e CCR4^{-/-} (D, E e F) infectados por *P. brasiliensis* foram obtidos nos dias 3 (A e D), 7 (B e E) e 30 (C e F) após a inoculação do fungo. Os lóbulos foram congelados e secções de 5 μm do tecido foram obtidos de ambos os camundongos e analisadas por imuno-histoquímica para a detecção da presença de NOS2. Nota-se imunoreatividade positiva em marrom. Método de detecção: Avidina Biotina-Peroxidase. Revelação: diaminobenzidina (DAB). (Barra 100 μm).

9. CCR4 controla positivamente a migração de linfócitos T durante a infecção por *P. brasiliensis*

No sentido de compreender os mecanismos celulares envolvidos com a menor capacidade dos camundongos CCR4^{-/-} de induzir a morte de leveduras de *P. brasiliensis*, avaliamos o desenvolvimento da resposta imune celular em camundongos selvagens e geneticamente deficientes de CCR4. Uma vez que os camundongos CCR4^{-/-} apresentam maior número de leveduras viáveis nas lesões, em hipótese, a presença de células CCR4⁺ deve contribuir para o controle da doença e impedir a sobrevivência do fungo no tecido do hospedeiro no início da infecção. Sabendo que o receptor de quimiocinas CCR4 está envolvido com a migração de diversos subtipos celulares, tanto da imunidade inata, quanto da adaptativa, dentre eles células T, principalmente Th2 e T reguladoras, resolvemos avaliar o perfil de linfócitos nos camundongos deficientes de CCR4.

As células pulmonares de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} infectados ou não por *P. brasiliensis* foram analisadas, por citometria de fluxo, quanto ao fenótipo relacionado à população de linfócitos B e linfócitos T nos dias 0, 7 e 30 após a infecção. As populações foram selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e analisadas quanto à expressão das moléculas de superfície CD19, CD3, CD4 e CD8. Os resultados demonstram que camundongos CCR4^{-/-} apresentam maior número de células T CD3⁺, T CD3⁺ CD4⁺ e T CD3⁺ CD8⁺ (p<0,05), em relação ao grupo selvagem não infectado. Após a infecção, os camundongos deficientes de CCR4 apresentam significativamente menor quantidade de células T CD3⁺ CD4⁺ e T CD3⁺ CD8⁺ no sítio inflamatório aos 7 dias (**Figura 9A**). Porém, aos 30 dias após a infecção, há similar migração de células T CD3⁺ CD4⁺ e T CD3⁺ CD8⁺ entre os grupos. Quanto às células B (CD19⁺),

nota-se um considerável e similar aumento dessas células no dia 30 após a infecção em ambos os grupos de camundongos **(Figura 9B)**.

Para comprovar a participação de CCR4 na migração de células T CD4⁺ para as lesões granulomatosas, foram analisadas a presença dessas células no pulmão de camundongos selvagens e CCR4^{-/-} nos dias 7 e 30 de infecção através de imunohistoquímica. Confirmando os resultados observados por citometria de fluxo, pode-se observar menor recrutamento das células T CD4⁺ para as lesões granulomatosas dos camundongos CCR4^{-/-} em relação aos C57BL/6 **(Figura 9C e D)** no dia 7 após a infecção, enquanto similar expressão desse marcador foi observada no tecido pulmonar de ambos os grupos analisados após 30 dias de infecção **(Figura 9E e F)**.

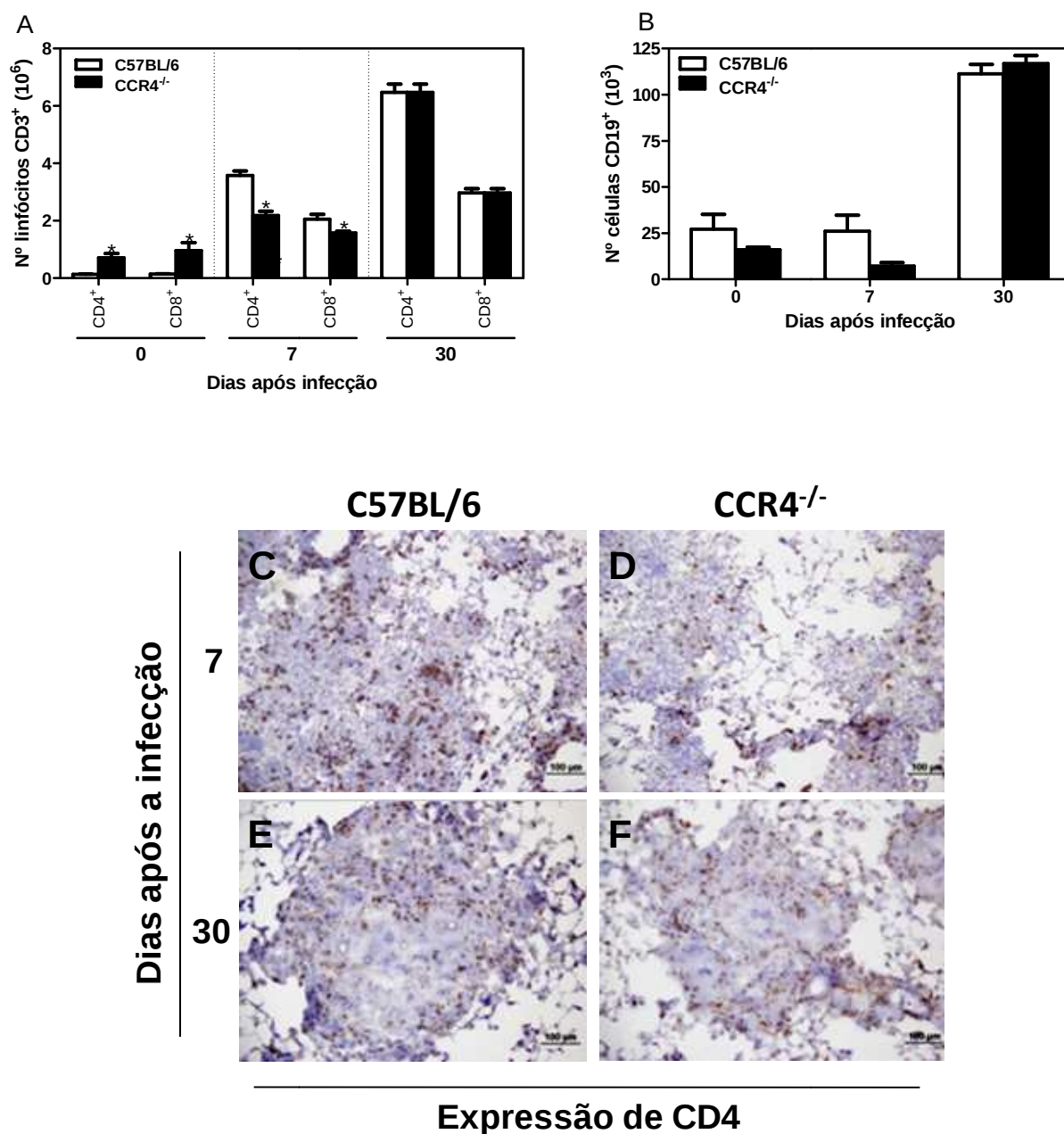


Figura 9. CCR4 medeia a migração de linfócitos T para o tecido pulmonar no início da infecção por *P. brasiliensis*. O número de células B CD19⁺ e T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ (A) foi determinado por citometria de fluxo nos dias 0, 7 e 30 após a infecção. As barras representam a média $\pm$ SEM da porcentagem de células recuperadas de três animais. Resultados similares foram obtidos em dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em comparação aos camundongos selvagens. Secções pulmonares dos mesmos camundongos foram fixadas em acetona e a expressão de CD4 aos 7 (A e B) e 30 (C e D) após a infecção foi determinada por imuno-histoquímica. A diaminobenzidina (DAB) foi usada como o substrato peroxidase para gerar uma marcação marrom e o tecido foi contra-corado com hematoxilina. (Barra 50 μ m).

10. Caracterização fenotípica das células T CD4⁺CD25⁺ presentes no pulmão de camundongos infectados por *P. brasiliensis*

Sabendo-se que a expressão de CD4⁺CD25⁺ não se limita à população de células Tregs e não exclui a possibilidade de pertencerem à população de células T ativadas, avaliamos a expressão de moléculas características de células Tregs naturais. Analisamos, então, a presença de células T CD4⁺CD25⁺ com perfil regulador, que co-expressam as moléculas GITR, CTLA-4 e CD103 na superfície celular, e o fator de transcrição Foxp3 intracelularmente, no pulmão de animais C57BL/6 e CCR4^{-/-} não infectados e com 7 e 30 dias de infecção. Observamos, também, um número significativamente menor de células T CD4⁺CD25⁺ com perfil de células T reguladoras no pulmão de camundongos CCR4^{-/-} nos dias 7 e 30 após a infecção por *P. brasiliensis* (**Figura 10A**).

Embora a expressão de Foxp3 não se restrinja à população de Tregs CD4⁺CD25⁺ naturais, sua expressão é alta quando comparada com a observada nas células T CD4⁺CD25⁻ (FOTENOTE; RUDENSKY, 2005). Uma vez tendo detectado a presença de células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nas lesões pulmonares dos camundongos, avaliamos *in situ* a presença desse fator de transcrição no pulmão pelo método de imuno-histoquímica (**Figura 10B e C**). Detectamos, então, células inflamatórias que expressam Foxp3 no pulmão de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-}, ambos com 7 dias de infecção, porém, corroborando com os dados de citometria de fluxo acima descritos, observamos menor quantidade de células Foxp3⁺ no tecido pulmonar dos animais que apresentam deficiência da molécula CCR4.

As células Tregs que apresentam funções supressoras, além de apresentarem perfil fenotípico distinto das demais populações de células T, diferem na produção de citocinas como a IL-10 que, além de possuir um papel supressor nas

células T, exerce um efeito inibitório nos monócitos e macrófagos ativados (DE WAAL et al., 1991). Embora essa citocina seja produzida por outros subtipos celulares, sua produção pelas células Tregs é essencial na modulação da resposta imune por essas células. Desse modo, avaliamos a expressão da citocina IL-10 no pulmão dos camundongos supracitados. Observamos, contudo, uma semelhante expressão de IL-10 no sítio de infecção de ambas as linhagens (**Figura 10D e E**).

Esses resultados reforçam nossa suposição de que o receptor de quimiocinas, CCR4, participa do recrutamento e retenção de células T CD4⁺CD25⁺, com características fenotípicas e funcionais de células T reguladoras, para o sítio de infecção por *P. brasiliensis*.

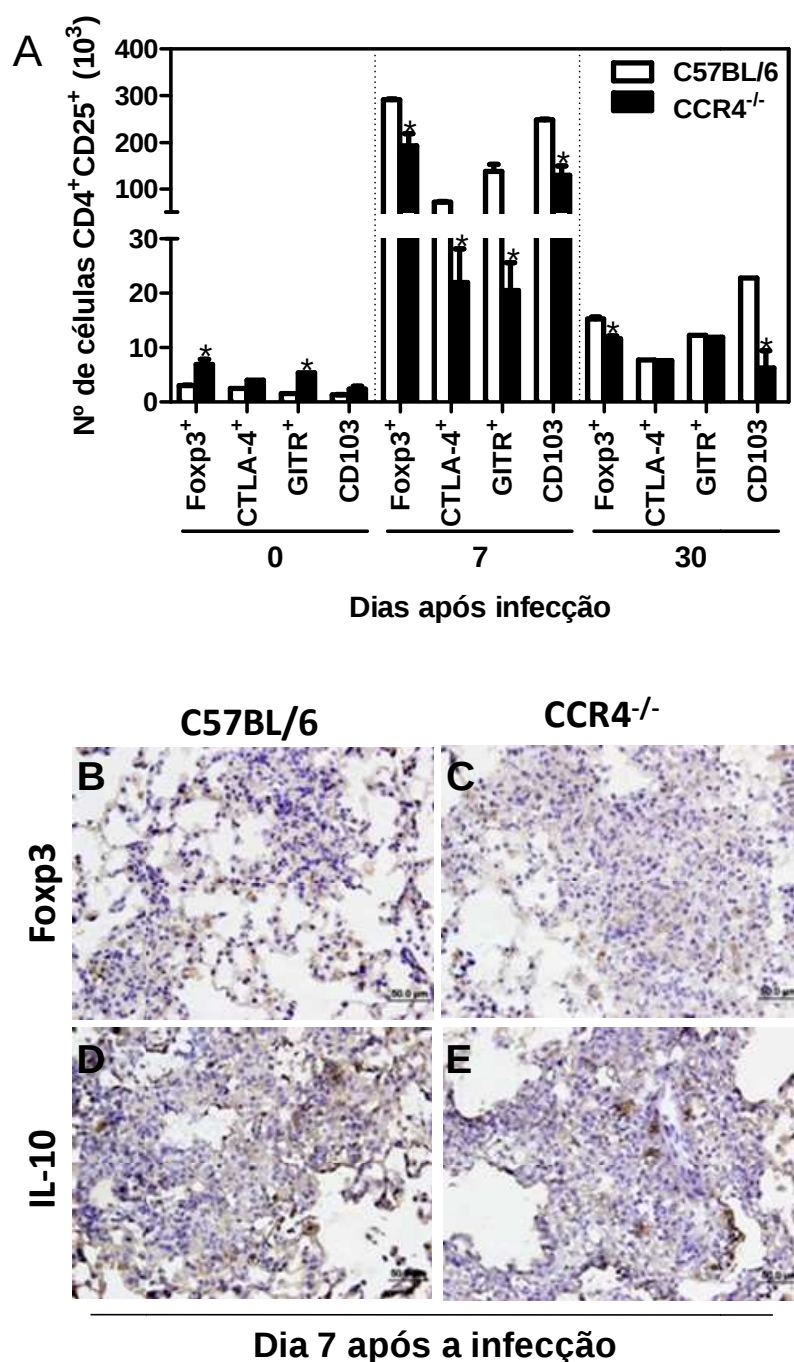


Figura 10. Camundongos CCR4^{-/-} apresentam menor migração de células T reguladoras para o pulmão. A quantidade de células T CD4⁺CD25⁺ com perfil regulador (A) foi determinada por citometria de fluxo nos dias 0, 7 e 30 após a infecção. As barras representam a média $\pm$ SEM da porcentagem de células recuperadas de três animais. Resultados similares foram obtidos em dois experimentos independentes. * $p < 0,05$ em comparação aos camundongos selvagens. Secções pulmonares dos mesmos camundongos com 7 dias de infecção foram fixadas em acetona e a expressão de Foxp3 (B e C) e de IL-10 (D e E) foi determinada por imuno-histoquímica. A diaminobenzidina (DAB) foi usada como o substrato peroxidase para gerar uma marcação marrom e o tecido foi contra-corado com hematoxilina. (Barra 50 μ m).

11. Quantificação de citocinas em lisado pulmonar de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} infectados por *P. brasiliensis*

Animais da linhagem C57BL/6 apresentam grau intermediário de resistência à infecção por *P. brasiliensis* e desenvolvem uma resposta de padrão misto Th1/Th2 (Arruda et al., 2004). Para determinar a influência do receptor de quimiocinas CCR4 no perfil de citocinas produzidas durante o processo inflamatório experimental, infectamos camundongos C57BL/6 e deficientes de CCR4 com 1×10^6 leveduras da cepa Pb18. Nos dias 0, 3, 7 e 30 após a infecção, lóbulos pulmonares de ambas as linhagens foram coletados, homogeneizados separadamente e o sobrenadante da mistura tecidual foi obtido. Com esse sobrenadante realizamos a técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) para quantificar citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17.

Os resultados demonstram semelhante produção de IFN- γ em ambas as linhagens de camundongos, com pico de produção no dia 3 após a infecção (**Figura 11A**). A produção de TNF- α detectada no pulmão dos animais deficientes de CCR4 foi inferior ($p < 0,05$) à observada nos animais selvagens no dia 3 após a infecção (**Figura 11B**). Dentre as citocinas de perfil Th2, observamos que a produção de IL-10 (**Figura 11F**) e IL-4 (**Figura 11D**) foi semelhante entre os camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-}. A produção de IL-12 pelo animal geneticamente modificado foi menor em todos os períodos analisados, porém, foi considerada significativamente inferior à observada no animal normal ($p < 0,05$) nos dias 3 e 7 após a infecção (**Figura 11E**). A produção de IL-17 foi menor ($p < 0,05$) 7 dias após a infecção no pulmão dos animais CCR4^{-/-} quando comparada à dos animais C57BL/6 (**Figura 11C**).

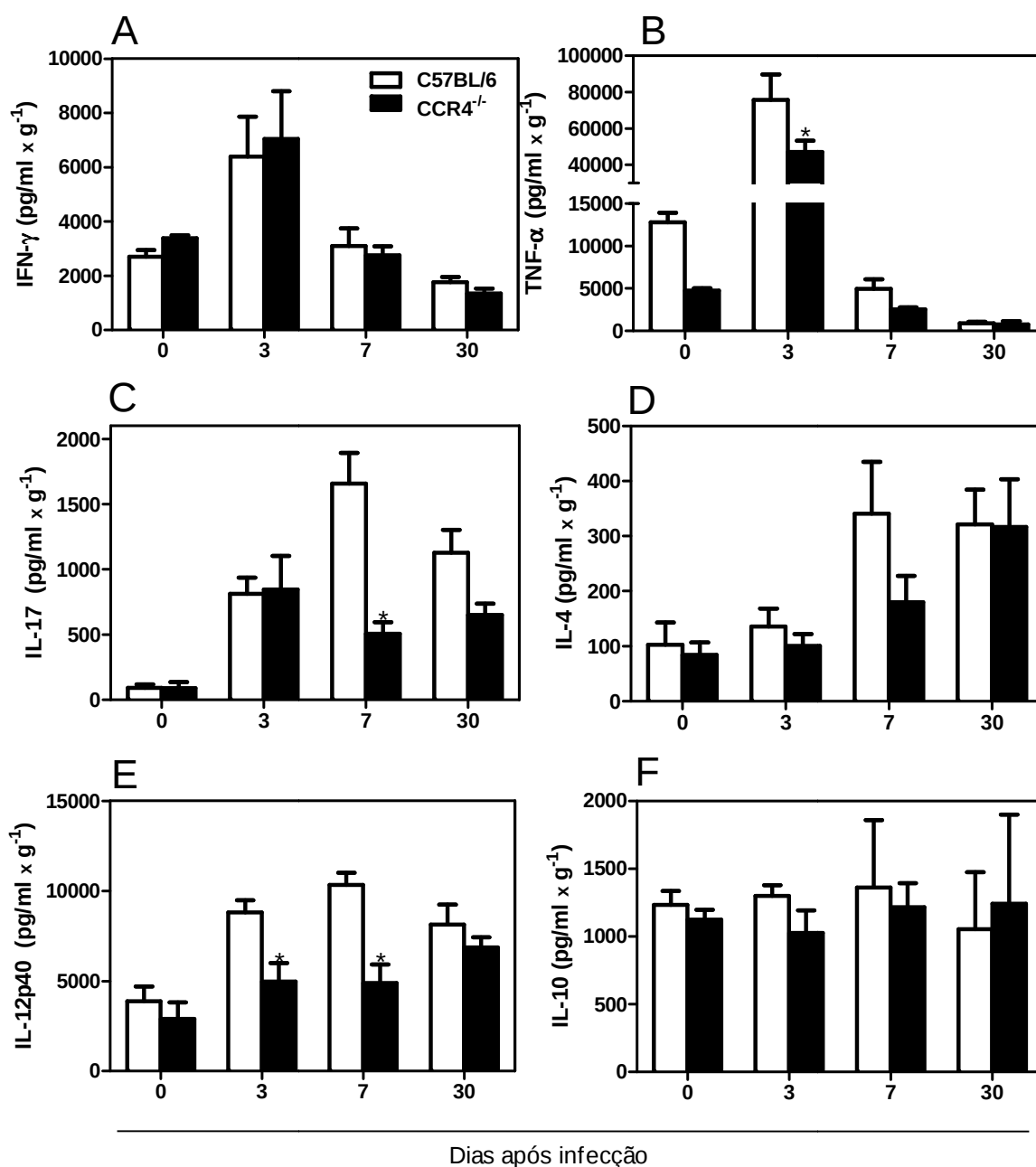


Figura 11. Detecção de citocinas Th1 (A, B, E), Th2 (D e F) e Th17 (C) nos pulmões de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} durante a infecção por *P. brasiliensis*. Os camundongos foram infectados endovenosamente com 1×10^6 formas leveduriformes de Pb18 e, 0, 3, 7 e 30 dias após infecção, lóbulos dos pulmões foram retirados e homogeneizados. O sobrenadante foi coletado e a dosagem de IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-10 (C), IL-4 (D), IL-12 (E) e IL-17 (F) foi realizada por ELISA. Pulmões de camundongos não infectados (0dpi) foram utilizados como controle. Cada ponto representa a média $\pm$ SD de órgãos de 5 camundongos. * $p < 0,05$, C57BL/6 versus CCR4^{-/-} no mesmo período de infecção.

12. Participação das células T CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ na viabilidade fúngica nos pulmões dos animais CCR4^{-/-}

Recentemente, em nosso laboratório, foi demonstrado que, após a transferência adotiva de células T CD4⁺ CD25⁺ provenientes de camundongos selvagens para CCR5^{-/-} ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da quantidade de fungos nos pulmões, enquanto que a transferência de células CD4⁺CD25⁻ promoveu um maior controle do crescimento das leveduras. Em conjunto, os resultados revelaram que CCR5 modula a migração e a função supressora das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ favorecendo a sobrevivência do fungo dentro dos granulomas (MOREIRA et al., 2008). Do mesmo modo, investigamos o papel das células T CD4⁺CD25⁺ na resposta imune e na susceptibilidade dos camundongos CCR4^{-/-} no início da infecção por *P. brasiliensis*.

Obtivemos, então, 1×10^5 células CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25⁺ do baço de camundongos após 10 dias de infecção por *P. brasiliensis*, isoladas por separação magnéticas. Essas células foram transferidas, de forma adotiva, para grupos separados de camundongos CCR4^{-/-} e C57BL/6 previamente infectados por 1×10^6 leveduras viáveis de Pb18. Após 5 dias, analisamos a quantidade de UFC recuperada do pulmão desses animais e comparamos àquelas observadas em camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} apenas infectados.

Com relação ao número de leveduras viáveis, os resultados mostram que, após a transferência das células CD4⁺CD25⁻, a quantidade de UFC foi diminuída nos animais CCR4^{-/-}, porém não de modo significativo, quando comparada ao número de leveduras recuperadas de camundongos CCR4^{-/-} apenas infectados. Observamos também que os camundongos que receberam tais células apresentaram um número de leveduras superior ao adquirido dos camundongos do tipo selvagem (**Figura 12**).

Por outro lado, a transferência de células $CD4^+CD25^+$ resultou em uma redução significativa ($p<0,05$) da quantidade de UFC quando comparados aos camundongos $CCR4^{-/-}$ apenas infectados (**Figura 12**). Esses dados revelam que essa população celular apresenta função importante durante a PCM, favorecendo a eliminação das leveduras de modo semelhante ao observado nos animais C57BL/6.

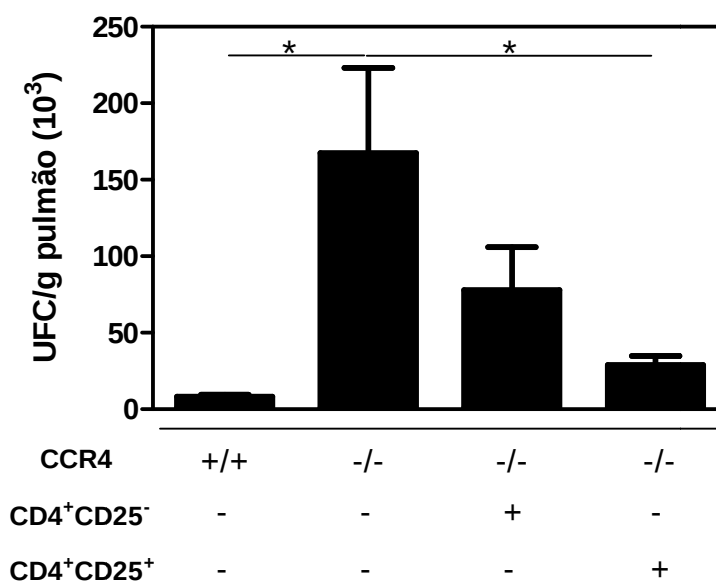


Figura 12. A transferência células T $CD4^+CD25^+CCR4^+$ promove melhor controle do crescimento fúngico nos pulmões de camundongos $CCR4^{-/-}$. As unidades formadoras de colônia (UFC) recuperadas de lóbulo pulmonar de camundongos C57BL/6 e $CCR4^{-/-}$ foram determinadas no dia 5 após a infecção por *P. brasiliensis* e transferência adotiva de células T $CD4^+$ obtidas de animais do tipo selvagem. As barras representam a média $\pm$ SEM de UFC de três a quatro camundongos. Resultados similares foram encontrados em dois experimentos independentes. * $p<0,05$ em comparação a UFC de camundongos selvagens no mesmo período de infecção.

Discussão

A paracoccidioidomicose é uma doença crônica, caracterizada pela presença de lesões granulomatosas e a persistência do fungo no tecido do hospedeiro em focos quiescentes (BRUMMER et al., 1993). Os granulomas paracoccidióidicos maduros são compostos por macrófagos, células epitelióides, células gigantes, geralmente circundados por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, e alguns linfócitos B (BRUMMER et al., 1993; BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

A migração das células do sistema imune é dependente de uma série de moléculas quimioatraentes, cujos receptores encontram-se na membrana plasmática dessas células. Durante o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios e de infecção, atuam processos de migração organizados e regulados que envolvem citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (ABBAS; LICHTMAN, 2003). Os mecanismos que direcionam a migração das células que formam e mantêm granulomas ao redor do fungo *P. brasiliensis* não são totalmente conhecidos.

O receptor CCR4, cujos ligantes são as quimiocinas CCL17 e CCL22, está presente em diversos subtipos celulares. Cavassani e colaboradores (2006) demonstraram, em nosso laboratório, que as quimiocinas CCL17 e CCL22 são encontradas em lesões de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM). Essas moléculas de citocinas quimioatraentes auxiliam no recrutamento de células que expressam CCR4, tais como T $CD4^+$ do tipo Th2 (LLOYD, RANKIN, 2003), Tregs (BAATAR et al., 2007; IELLEM et al., 2001; PUREVDORJ et al., 2009), T $CD8^+$ (KONDO; TAKIGUCHI, 2009), Th17 (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007), algumas células NK ativadas por IL-2 (INNGJERDINGEN et al., 2000), iNKT (MEYER et al., 2007), DC (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1999), macrófagos (NESS et al., 2006; BELPERIO et al., 2004) e plaquetas (BOEHLLEN; CLEMETSON, 2001).

Ishii e colaboradores (2008) afirmam que a deficiência de CCR4 não resulta necessariamente na inibição da bioatividade de seus ligantes. Através da técnica de imuno-histoquímica, nós demonstramos *in situ* que os animais CCR4^{-/-}, apesar de não expressarem esse receptor, não falham em produzir ou secretar CCL17 e CCL22. As fontes celulares desses ligantes de CCR4 podem ser células epiteliais, DC, células T e macrófagos estimulados com IL-4 ou alérgeno em humanos (SEKIYA et al., 2000; BERIN et al., 2001; IMAI et al., 1999; PERROS et al., 2009). A produção dessas quimiocinas se mantém ao longo da infecção (7 e 30 dias) e trabalhos já reportaram que ambas (CCL17 e CCL22) podem ligar-se a diferentes receptores de quimiocinas além do CCR4 (STRUYF et al., 1998; BERNARDINI et al., 1998), podendo essas quimiocinas manterem-se atuantes no recrutamento celular durante o processo inflamatório, mesmo na ausência do receptor CCR4.

Avaliando-se a fenotipagem de células polimorfonucleares presentes no infiltrado inflamatório induzido por *P. brasiliensis* no pulmão de camundongos deficientes de CCR4, observamos um considerável aumento de células CD11b⁺CD11c⁻ e CD11b⁺CD11c⁺ no 3º dia de infecção. Porém, a expressão de NOS2 e a síntese de IL-12p40 e TNF- α no tecido pulmonar desses animais foram prejudicadas, embora a produção de IFN- γ tenha sido semelhante entre os camundongos C57BL/6 e o CCR4^{-/-}.

A administração da citocina IL-12 protege camundongos contra a infecção disseminada causada pelo fungo *P. brasiliensis*, mas aumenta a inflamação pulmonar (ARRUDA, 2002). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a subunidade IL-12p40 medeia a resistência do hospedeiro na paracoccidioidomicose, induzindo a produção de IFN- γ e uma resposta imune Th1 (LIVONESI et al., 2008). Nossos resultados demonstram uma menor produção de IL-12p40 no pulmão de

animais deficientes de CCR4 em relação aos do tipo selvagem, o que provavelmente favoreceu a susceptibilidade dos camundongos CCR4^{-/-} à infecção nesse período.

Esses dados sugerem que macrófagos e DCs, embora abundantes no início da inflamação, não estão sendo ativadas eficientemente, o que provavelmente diminuiu o potencial de eliminação do fungo por esses subtipos celulares. É importante destacar que TNF- α medeia a maturação fenotípica de DCs por regular um aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras (PICCIOLI et al., 2002). Os nossos dados mostram que a produção pulmonar de TNF- α foi reduzida nos camundongos CCR4^{-/-} no início da infecção, o que deve culminar em ineficiente maturação das DCs.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que camundongos deficientes de NOS2 infectados por *P. brasiliensis* apresentam um exacerbado processo inflamatório, com alta produção de citocinas tanto de perfil Th1 quanto Th2 no 30º dia de infecção (LIVONESI, 2009), sugerindo que o NO derivado da NOS2 possua uma função anti-inflamatória durante a PCM. Ainda que o óxido nítrico, em altas concentrações, esteja associado com a susceptibilidade (NASCIMENTO et al., 2002), e com a modulação do granuloma e disseminação fúngica durante a infecção de camundongos por *P. brasiliensis* (NISHIKAKO et al., 2009) este metabólito tem importante função microbicida como inibição da síntese de DNA, da respiração mitocondrial nas células, é capaz de inibir o transporte ativo na membrana de fungos e bactérias e inativar enzimas que contenham ferro-enxofre, levando a falhas metabólicas e morte celular (DING et al., 1988; ROSEN; KLEBANOFF, 1985).

Pina e colaboradores (2009) demonstram que macrófagos provindos de camundongos susceptíveis ao *P. brasiliensis* possuem maior capacidade fungicida que os macrófagos de animais resistentes à infecção. Uma resposta inata deficiente,

portanto, poderia favorecer o desenvolvimento de um perfil resistente à infecção por *P. brasiliensis*. Esses dados corroboram com nossos resultados, já que observamos uma semelhante recuperação fúngica no pulmão de camundongos C57BL/6 e CCR4^{-/-} nos períodos mais tardios da infecção.

Assim, possivelmente, a baixa expressão de NOS2 em camundongos CCR4^{-/-} resulte em um menor controle do crescimento das leveduras de *P. brasiliensis*. Portanto, tomados em conjunto, esses dados indicam que os camundongos CCR4^{-/-} apresentam, durante a fase inicial da infecção por *P. brasiliensis*, um grande prejuízo na ativação das células componentes do infiltrado inflamatório pulmonar, resultando em lesões disseminadas por todo o tecido.

Utilizando um modelo humanizado de asma, o camundongo *Severe Combined Immunodeficiency* (SCID), Perros e colaboradores (2009) sugerem que as DC são importantes células pró-inflamatórias por controlarem o recrutamento de células Th2 através da produção de CCL17 e CCL22, sendo consideradas as principais fontes dessas quimiocinas. Os mecanismos envolvidos na resistência à infecção por *P. brasiliensis* são pobremente compreendidos, mas é provável que as DC possuam um papel essencial na indução das células T que controlam a infecção por *P. brasiliensis*. DC agem como sentinelas nos tecidos periféricos, apresentando constantemente antígenos do microambiente. Já foi descrito que *P. brasiliensis* inibe a maturação de DC derivadas da medula óssea, mas pouco tem sido demonstrado sobre o papel desempenhado por essas células na interação inicial do fungo nos pulmões (FERREIRA et al., 2004). Esse mesmo grupo de pesquisadores (FERREIRA et al., 2007) sugere que *P. brasiliensis* induz DC reguladoras em camundongos susceptíveis, auxiliando na secreção de IL-10 em abundância, mas de pouca ou nenhuma produção de IL-12. Tais DC reguladoras parecem ser induzidas

via *Toll Like Receptor* (TLR)-2 e receptores de dectina-1, o que promove a produção de IL-10 para modular negativamente a atividade microbida do hospedeiro, contribuindo assim para a susceptibilidade do camundongo contra a infecção por *P. brasiliensis*.

As células Th1, Th2, Treg e Th17 estão associadas aos fatores de transcrição Tbet, GATA3, Foxp3 e ROR γ T, respectivamente, essenciais em regular a diferenciação desses subtipos celulares (SZABO et al, 2000; ZHENG; FLAVELL, 1997; YAGI et al., 2004; IVANOV et al., 2006). A infecção de camundongos deficientes de CCR4 com *P. brasiliensis* induziu uma similar expressão de todos os fatores de transcrição em relação aos animais C57BL/6, porém, desenvolveu uma prejudicada expressão de Foxp3 no tecido pulmonar, sítio da infecção, no 7º de infecção. Nesse mesmo período observamos uma menor quantidade de células T CD4⁺CD25⁺ com perfil de células T reguladoras (Foxp3⁺, CTLA-4⁺, CD103⁺) no pulmão dos animais CCR4^{-/-}. Cavassani et al. (2006) sugerem que células T CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ têm o potencial de migrar para lesões induzidas por *P. brasiliensis* em pacientes. Em nosso modelo experimental, demonstramos que, de fato, as células com esse perfil têm realmente essa capacidade de migração, porém, a presença prejudicada do subtipo celular T CD4⁺CD25⁺ no sítio de infecção, devido à ausência de CCR4, não auxiliou na eliminação do fungo, visto que esse foi o período com maior proliferação das leveduras em relação ao grupo controle. Ao contrário da produção pulmonar de IL-17, expressão do mRNA ROR γ T não foi prejudicada com a ausência de CCR4, sugerindo que as células Th17, embora presentes, não estejam suficientemente ativadas.

Os linfócitos são essenciais para a patogênese da doença, logo, é crucial compreender como essas células são atraídas para o tecido pulmonar inflamado.

Tem sido demonstrado que CCR4 é requerido para a eficiente entrada de células T CD4⁺ antígeno-específicas nos pulmões e vias aéreas em um modelo murino de inflamação pulmonar alérgica (MIKHAK et al., 2009) e pacientes com asma (PANINA-BORDIGNON et al., 2001). Corroborando com esses dados, nossos ensaios de citometria de fluxo confirmaram a prejudicada migração de células T CD4⁺ para o pulmão dos animais deficientes de CCR4. De modo interessante, foi visto que a migração de células T CD8⁺ também foi menor, comparada aos animais do tipo selvagem. Pouco se sabe sobre a influência do CCR4 nessas células, porém, recentemente foi descrito que as células T CD8⁺CCR4⁺ são um subtipo de células imaturas de memória que têm a habilidade de migração para sítios de infecção, em resposta a CCL17 e CCL22, e produzem diferentes subtipos de citocinas Th1 e Th2, porém não expressam nem perforina, nem granzima (KONDO; TAKIGUCHI, 2009).

A resistência à infecção pelo fungo *P. brasiliensis* é relacionada preferencialmente a uma resposta Th1, enquanto a susceptibilidade é associada com a ausência da produção de IFN- γ (KASHINO et al., 2000). As citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 foram detectados no pulmão de animais susceptíveis à infecção por *P. brasiliensis* durante a fase crônica da doença (CALISH, KASHINO, 1998). Além disso, Arruda e colaboradores (2004) demonstraram que IL-4 endógeno pode induzir proteção ou exacerbação da doença dependendo do perfil genético do hospedeiro. Nossos resultados demonstraram similar detecção das citocinas IL-4 e IL-10 no pulmão de ambas as linhagens de camundongos.

Foi também demonstrado, em nosso laboratório, que TNF- α e IFN- γ mediaram resistência à infecção por *P. brasiliensis* (SOUTO et al., 2000). A produção de TNF- α observada nos animais CCR4^{-/-} foi menor no dia 3 após a infecção em relação aos camundongos C57BL/6. Em adição, IFN- γ modulou a

expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas, bem como os tipos celulares que infiltram os pulmões de camundongos infectados pelo fungo (SOUTO et al., 2003). Nossos resultados, porém, demonstraram similar detecção de IFN- γ no pulmão de ambas as linhagens de camundongos.

As alterações da resposta imune na PCM são caracterizadas por depressão da resposta proliferativa de linfócitos frente a estímulos mitogênicos e antígenos de *P. brasiliensis*, distúrbios na produção de citocinas, aumento da apoptose celular, agravando os casos da doença e contribuindo para a manutenção dos reservatórios de infecção (BENARD et al,1996; MUSATTI et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2002). Camundongos CCR4^{-/-} apresentam uma resposta inflamatória mais controlada, com menor migração de linfócitos para o pulmão após o inóculo do fungo quando comparado aos animais selvagens. Essa prejudicada migração provavelmente é a causa da maior susceptibilidade desses animais ao fungo *P. brasiliensis* no início da infecção.

A inflamação granulomatosa é uma forma de reação de hipersensibilidade do tipo tardio envolvida com a proteção contra infecções crônicas (CO et al., 2004). Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ têm um papel proeminente durante a formação dos granulomas uma vez que essas células produzem citocinas e quimiocinas importantes para o recrutamento e organização das células no sítio de infecção (KRAHENBUHL; ADAMS, 2000; LADEL et al., 1994; UEDA et al., 1977; 1982). Na tuberculose, a eliminação de linfócitos T CD4⁺ resulta na formação de granulomas frouxos e na reativação e disseminação da doença (SCANGA et al., 2000). Na infecção por *P. brasiliensis*, camundongos geneticamente deficientes de linfócitos T CD4⁺ apresentam baixa produção de IFN- γ no pulmão e sucumbem à doença antes do 60º dia após a inoculação do fungo (PEREIRA, 2006). De acordo com essas

evidências, verificamos que camundongos CCR4^{-/-} infectados por *P. brasiliensis* apresentam porcentagem menor de linfócitos T nos lóbulos pulmonares após 3 e 7 dias de infecção em relação ao camundongo C57BL/6, demonstrando que, na ausência de CCR4, as células presentes no infiltrado inflamatório pulmonar não controlam o crescimento do fungo. Esse controle ocorre em períodos mais tardios (a partir do 30º dia após a infecção), evoluindo para a cura dos animais, de modo semelhante ao que ocorre nos animais do tipo selvagem.

Linfócitos Th1 expressam, preferencialmente, CCR5 e CXCR3, enquanto que células Th2 apresentam expressão predominante de CCR3, CCR4 e CCR8 (BONECCHI et al., 1998; QIN et al., 1998; KIM et al., 2001; SALLUSTO et al., 1997; SALLUSTO et al., 1998; CAMPBELL et al., 2001). Em nosso laboratório, foi demonstrado por Campanelli e colaboradores (2003) que pacientes com PCM apresentam um padrão misto de resposta Th1/Th2 com prevalência e maior intensidade de expressão de CCL5, CCR5 e também IFN- γ , bem como de MCP-3, CCR3, CCL17 e CCR4, além de IL-10. Este perfil de produção de quimiocinas e citocinas *in situ* estaria modulando a migração celular e, conseqüentemente, contribuiria para a resistência a esta infecção fúngica. Também em nosso laboratório, Moreira e colaboradores (2008) demonstraram em modelo experimental que CCR5 modula a migração e a função supressora das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ favorecendo a sobrevivência do fungo dentro dos granulomas. No entanto, nós demonstramos que células T CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ participam de uma resposta que confere resistência à infecção por *P. brasiliensis*, contribuindo para a eliminação fúngica.

De fato, a migração das Tregs foi descrita ser dependente da produção das quimiocinas CCL22 e/ou CCL17 (IELLEN et al., 2001; CURIEL et al., 2004; LEE et

al., 2005) e a presença dessas nas lesões induzidas por *P. brasiliensis* sugere seu envolvimento na migração das células T $CD4^+CD25^+CCR4^+$ em direção às lesões causadas pelo fungo (CAVASSANI et al., 2006). Tais observações permitem inferir que a secreção de tais ligantes seria proveniente de macrófagos e DC presentes no infiltrado das lesões granulomatosas assim como ocorre no microambiente tumoral (CURIEL et al., 2004).

Tregs exercem sua capacidade supressora nos tecidos periféricos do organismo, mas também nos órgãos linfóides secundários. O tráfego homeostático de Tregs não ativadas para o linfonodo depende principalmente da expressão do receptor de quimiocinas CCR7 e a molécula de adesão CD62L. Esse processo também pode ser influenciado pela quimiocina CCL22 produzida pelas DC presentes nos linfonodos. Uma alta proporção de células Tregs (ainda não ativadas por antígeno) na periferia expressam o receptor para CCL22 (CCR4) que pode suportar a migração das células Tregs para as DC do linfonodo periférico. Em contraste, células T $CD4^+$ *naïve* convencionais não expressam CCR4, desse modo, as interações Treg-DC nos linfonodos periféricos, provavelmente, ocorrem com maior frequência do que as interações entre as DC e as células T $CD4^+CD25^-$ (IELLEM et al., 2001).

Nos linfonodos ou em tecidos periféricos, as células Tregs podem interagir tanto com células T efectoras quanto DC. Essa interação pode ocorrer de forma direta, através do contato célula-célula quanto pela secreção de IL-10 e TGF- β . Em adição, células Tregs são capazes de prevenir a maturação de DC por reduzir a expressão do complexo MHC-II, ou por converter as DCs a um fenótipo supressor, que regula positivamente a produção de IL-10 e suprime a molécula co-estimuladora B7. Sugere-se, então, que essas ações aumentam a atividade supressora das

Tregs, já que suprimem a ativação de células T efetoras mantendo as DCs em estado imaturo (MAHNKE et al., 2007).

Alguns dados mostram claramente que DC estão envolvidas, de modo crucial, na indução de células Tregs. Contudo, esta interação não é restrita às Tregs, já que resultados revelam que essas células têm importante influência no desenvolvimento de DCs (MAHNKE et al., 2007). Recentes resultados de Onodera e colaboradores (2009) indicam que as interações recíprocas entre DCs e Tregs via B7/CTLA-4 e CCL22/CCR4 levam à indução da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) nas DCs dos linfonodos mesentéricos, e essa indução ocorre possivelmente pela via de ação do IFN- γ . A transferência de células T CD4⁺CD25⁺CCR4^{+/+} para camundongos deficientes de CCR4 resultou em uma maior resistência desses animais durante a infecção pelo fungo *P. brasiliensis*. Provavelmente a interação entre as DC e as células T CD4⁺CD25⁺ via CCL22/CCR4, de alguma maneira, esteja induzindo uma melhor ativação dessas células apresentadoras de antígeno, permitindo o desenvolvimento de uma resposta imune mais efetiva contra o fungo.

Moreira e colaboradores (2008) demonstraram que a transferência adotiva de células CD4⁺CD25⁺ para camundongos CCR5^{-/-} resultou em aumento significativo da quantidade de leveduras viáveis, enquanto que a população CD25⁻ induziu a morte das leveduras no pulmão. Assim, células reguladoras e efetoras estão, de fato, presentes nas lesões pulmonares, promovendo um delicado balanço da reposta imune durante a infecção por *P. brasiliensis*. Na ausência de CCR5 a menor migração e função supressora das células reguladoras resulta em uma resposta imune mais efetiva, favorecendo maior controle do crescimento do fungo, lesões compactas, menos disseminadas e maior preservação do tecido do hospedeiro.

Camundongos CCR4^{-/-} apresentam uma resposta contrária à observada nos animais deficientes de CCR5.

Camundongos deficientes dos receptores CCR4 e CCR5 apresentam menor migração de células T reguladoras para o sítio de infecção. Contudo, a menor migração de Treg para o pulmão de camundongos CCR4^{-/-} não induziu uma resposta imune mais efetiva. Além disso, não se pode descartar o fato de que, nesses animais, a migração de linfócitos T efetores e citotóxicos também é prejudicada. Do mesmo modo como foi realizado por Moreira e colaboradores (2008), a transferência de células T CD4⁺CD25⁺ de camundongos C57BL/6 para os CCR4^{-/-}, ao contrário do que foi observado nos animais CCR5^{-/-} receptores de células T CD4⁺CD25⁺, induziu maior resistência ao *P. brasiliensis* nos animais CCR4^{-/-} que receberam essas células, sugerindo que, em nosso modelo experimental, a ausência de células T CD4⁺CD25⁺ colabora com a permanência do fungo no tecido pulmonar.

Conclusão

Em conjunto, nossos dados demonstram que o receptor CCR4 é importante para a migração de diversos subtipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além das células TCD4⁺CD25⁺. Dessa forma, a ausência de mecanismos reguladores e efetores eficientes favorece a sobrevivência de *P. brasiliensis* nas lesões pulmonares de camundongos CCR4^{-/-}. Concluimos então que o receptor CCR4 pode ser um fator importante para a eliminação do fungo no tecido do hospedeiro.

Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K. ; LICHTMAN, A. H. 2003. **Cellular and Molecular Immunology**. 5^a Edição, Saunders.

ACORCI MJ, DIAS-MELICIO LA, GOLIM MA, BORDON-GRACIANI AP, PERAÇOLI MT, SOARES AM. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. **Scand J Immunol**. v. 69(2), p. 73-79, 2009.

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V., L. RIVINO, J. GEGINAT, D. JARROSSAY, M. GATTORNO, A. LANZAVECCHIA, F. SALLUSTO, G. NAPOLITANI. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nat. Immunol**. v. 8, p. 639-646, 2007.

ALGOOD, H. M., LIN P. L., YANKURA D., JONES A., CHAN J., FLYNN J. L. CCR5-deficient mice control Mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. **J. Immunol.**, v. 173, p. 3287-3296, 2004.

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

ALMEIDA O.P., JACKS J. JR., SCULLY C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Crit Rev Oral Biol Med** v. 14(5), p. 377–383, 2003.

ANDERSON, C. F., OUKKA M., KUCHROO V. J., SACKS D. CD4(+)CD25(-) Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 285-297, 2007.

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

ANDREW DP, RUFFING N, KIM CH, MIAO W, HEATH H, LI Y, MURPHY K, CAMPBELL JJ, BUTCHER EC, WU L. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. **J Immunol**. v. 166(1), p. 103-111, 2001.

ANTOV, A., YANG L., VIG M., BALTIMORE D., VAN PARIJS L. Essential role for STAT5 signaling in CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. **J. Immunol.**, v.171, p. 3435-3441, 2003.

APPAY, V., ROWLAND-JONES S. L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 83-87, 2001.

BAGAEVA, L. V., WILLIAMS L. P., SEGAL B. M. IL-12 dependent/IFN gamma independent expression of CCR5 by myelin-reactive T cells correlates with encephalitogenicity. **J. Neuroimmunol.**, v. 137, p.109-116, 2003.

BAIDA, H., BISELLI P. J., JUVENALE M., DEL NEGRO G. M., MENDES-GIANNINI M. J., DUARTE A. J, et al. Differential antibody isotype expression to the major

Paracoccidioides brasiliensis antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 273-278, 1999.

BALASHOV, K. E., ROTTMAN J. B., WEINER H. L., HANCOCK W. W. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 96, p. 6873-6878, 1999.

BARRAL-NETTO, M., BARRAL A., BROWNELL C. E., SKEIKY Y. A., ELLINGSWORTH L. R., TWARDZIK D. R., REED S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**. v. 24, p. 545-548, 1992.

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

BELKAID, Y., PICCIRILLO C. A., MENDEZ S., SHEVACH E. M., SACKS D. L. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502-507, 2002.

BELPERIO, J. A., DY M., MURRAY L., BURDICK M. D., XUE Y. Y., STRIETER R. M. and KEANE M. P. The role of the Th2 CC chemokine receptor ligand CCL17 in pulmonary fibrosis. **J. Immunol.**, v. 173, p. 4692-4698, 2004.

BENARD G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**. v. 165(4-5), p. 209-221, 2008.

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

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

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

BERIN MC, ECKMANN L, BROIDE DH, KAGNOFF MF. Regulated production of the T helper 2-type T-cell chemoattractant TARC by human bronchial epithelial cells in vitro and in human lung xenografts. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 24(4), p. 382-389, 2001.

BETTELLI, E., DASTRANGE M., OUKKA M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 102, p. 5138-43, 2005.

BIREBENT, B., LORHO R., LECHARTIER H., DE GUIBERT S., ALIZADEH M., VU N., BEAUPLÉ A., ROBILLARD N., SEMANA G. Suppressive properties of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 3485-3496, 2004.

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

BOEHLEN, F. and CLEMETSON K. J. Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice? **Transfus. Med.**, v. 11: 403-417, 2001.

BONECCHI, R., BIANCHI G., BORDIGNON P. P., D'AMBROSIO D., LANG R., BORSATTI A., SOZZANI S., ALLAVENA P., GRAY P. A., MANTOVANI A., SINIGAGLIA F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. **J. Exp. Med.** v. 187 (1), p.129-134, 1998.

BORGES-WALMSLEY, M. I., CHEN D., SHU X., WALMSLEY A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 80-87, 2002.

BOUTARD, V., HAVOUIIS R., FOUQUERAY B., PHILIPPE C., MOULINOX J. P., BAUD L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. **J. Immunol.**, v. 15, p. 2077-2084, 1995.

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

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

BRUNKOW, M. E., JEFFERY E. W., HJERRILD K. A., PAEPER B., CLARK L. B., YASAYKO S. A., WILKINSON J. E., GALAS D., ZIEGLER S. F., RAMSDELL F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nat. Genet.**, v. 27, p. 68-73, 2001.

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

BURCHILL, M. A., YANG J., VOGTENHUBER C., BLAZAR B. R., FARRAR M. A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 178, p. 280-290, 2007.

BYSTRY, R. S., ALUVIHARE V., WELCH K. A., KALLIKOURDIS M., BETZ A. G. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 1126-1132, 2001.

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

CALICH VL, DA COSTA TA, FELONATO M, ARRUDA C, BERNARDINO S, LOURES FV, RIBEIRO LR, DE CÁSSIA VALENTE-FERREIRA R, PINA A. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**. v. 165(4-5), p. 223-236, 2008.

CALICH VL, SINGER-VERMES LM, SIQUEIRA AM, BURGER E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br J Exp Pathol**. v. 66(5), p. 585-594, 1985.

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

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

CAMPANELLI, A. P., ROSELINO A. M, CAVASSANI K. A., PEREIRA M. S. F., MORTARA R. A., BRODSKYN C. I., GONÇALVES H. S., BELKAID Y., BARRAL-NETTO M., BARRAL A., SILVA J. S. The CD4⁺CD25⁺ T cells of skin lesions from cutaneous leishmaniasis patients exhibit phenotypic and functional properties of regulatory T cells. **J. Infect. Dis.**, v. 193, p. 1313-1322, 2006.

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

CAMPBELL JD, STINSON MJ, SIMONS FE, RECTOR ES, HAYGLASS KT. In vivo stability of human chemokine and chemokine receptor expression. **Hum. Immunol.**, v. 62(7), p. 668-678, 2001.

CAMPBELL JJ, HARALDSEN G, PAN J, ROTTMAN J, QIN S, PONATH P, ANDREW DP, WARNKE R, RUFFING N, KASSAM N, WU L, BUTCHER EC. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. **Nature**. v. 400(6746), p. 776-780, 1999.

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

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

CAVASSANI, KA. **Participação de células T reguladoras no controle da resposta durante a paracoccidioidomicose humana.** Tese PhD, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil, 2006.

CEDERBOM L, HALL H, IVARS F. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. **Eur J Immunol.** v. 30(6), p. 1538-1543, 2000.

CHEN Y, KUCHROO VK, INOBE J, HAFLER DA, WEINER HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science**, v. 265, p. 1237–1240, 1994.

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

CHVATCHKO Y, HOOGEWERF AJ, MEYER A, ALOUANI S, JUILLARD P, BUSER R, CONQUET F, PROUDFOOT AE, WELLS TN, POWER CA. A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. **J Exp Med.** v. 191(10), p. 1755-1764, 2000.

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

COLANTONIO, L., IELLEM A., SINIGAGLIA F., D'AMBROSIO D. Skin-homing CLA⁺ T cells and regulatory CD25⁺ T cells represent major subsets of human peripheral blood memory T cells migrating in response to CCL1/I-309. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 3506-3514, 2002.

COUTINHO, Z.F., SILVA D., LAZERA M., PETRI V., OLIVEIRA R.M., SABROZA P.C., WANKE B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno Saúde Pública**, v. 18, p. 1441-1254, 2002.

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

CURIEL, T. J., COUKOS G., ZOU L., ALVAREZ X., CHENG P., MOTTRAM P., EVDEMON-HOGAN M., CONEJO-GARCIA J. R., ZHANG L., BUROW M., ZHU Y., WEI S., KRYCZEK I., DANIEL B., GORDON A., MYERS L., LACKNER A., DISIS M. L., KNUTSON K. L., CHEN L., ZOU W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat. Med.**, v.10 (9), p.942-949, 2004.

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

DAL SECCO, D., MOREIRA A. P., FREITAS A., SILVA J. S., ROSSI M. A., FERREIRA S. H., CUNHA F. Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide**, v. 15, p.77-86, 2006.

DAL SECCO, D., PARON J. A., DE OLIVEIRA S. H., FERREIRA S. H., SILVA J. S., CUNHA F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, p. 153-164, 2003.

D'AMBROSIO D, IELLEM A, BONECCHI R, MAZZEO D, SOZZANI S, MANTOVANI A, SINIGAGLIA F. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. **J Immunol.** v. 161(10), p. 5111-5115, 1998.

DEFAVERI, J., MARTIN L. C., FRANCO M. Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in mice. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 105, p. 93-104, 1989.

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

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

DING, A. C., NOHAN F. STEWERHR D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2411, 1988.

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

EBATA K, SHIMIZU Y, NAKAYAMA Y, MINEMURA M, MURAKAMI J, KATO T, YASUMURA S, TAKAHARA T, SUGIYAMA T, SAITO S. Immature NK cells suppress dendritic cell functions during the development of leukemia in a mouse model. **J Immunol** v. 176, p. 4113–4124, 2006.

FANTINI, M. C., BECKER C., MONTELEONE G., PALLONE F., GALLE P. R., NEURATH M. F. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5149-5153, 2004.

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

FELIPE MS, TORRES FA, MARANHÃO AQ, SILVA-PEREIRA I, POÇAS-FONSECA MJ, CAMPOS EG, MORAES LM, ARRAES FB, CARVALHO MJ, ANDRADE RV, NICOLA AM, TEIXEIRA MM, JESUÍNO RS, PEREIRA M, SOARES CM, BRÍGIDO MM. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **FEMS Immunol Med Microbiol** v. 45(3), p. 369–81, 2005.

FERREIRA KS, LOPES JD, ALMEIDA SR. Down-regulation of dendritic cell activation induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunol Lett.** v. 94(1-2), p. 107-114, 2004.

FONTENOT, J. D., GAVIN M. A., RUDENSKY A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 330-336, 2003.

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

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

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

FREEMAN CM, STOLBERG VR, CHIU BC, LUKACS NW, KUNKEL SL, CHENSUE SW. CCR4 participation in Th type 1 (mycobacterial) and Th type 2 (schistosomal) anamnestic pulmonary granulomatous responses. **J Immunol.** v. 177(6), p. 4149-4158, 2006.

GAMBINERI, E., TORGERSON T. R., OCHS H. D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 15, p. 430-435, 2003.

GAVIN M. A., TORGERSON T. R., HOUSTON E., DEROOS P., HO W. Y., STRAY-PEDERSEN A., OCHELTREE E. L., GREENBERG P. D., OCHS H. D., RUDENSKY A. Y. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 103, p. 6659-6664, 2006.

GAZZINELLI, R. T., OSWALD I. P., HIENY S., JAMES S. L., SHER A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 2501-2506, 1992.

EGINAT, J., SALLUSTO F., LANZAVECCHIA A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1711-1719, 2001

GODISKA R, CHANTRY D, RAPORT CJ, SOZZANI S, ALLAVENA P, LEVITEN D, MANTOVANI A, GRAY PW. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. **J Exp Med.** v. 185(9), p. 1595-1604, 1997.

GONDEK, D. C., LU L. F., QUEZADA S. A., SAKAGUCHI S., NOELLE R. J. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. **J. Immunol.**, v.15, p. 1783-1786, 2005.

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

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

GROSSMAN, W. J., VERBSKY J. W., BARCHET W., COLONNA M., ATKINSON J. P., LEY T. J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. **Immunity**, v. 21, p. 589-601, 2004.

GROUX H, O'GARRA A, BIGLER M, ROULEAU M, ANTONENKO S, DE VRIES JE, RONCAROLO MG. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**. v. 389(6652), p. 737-742, 1997.

GUYOT-REVOL, V., INNES J. A., HACKFORTH S., HINKS T., LALVANI A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 173, p. 803-810, 2006.

H. PARK, Z. LI, X.O. YANG, S.H. CHANG, R. NURIEVA, Y.H. WANG, Y. WANG, L. HOOD, Z. ZHU, Q. TIAN, C. DONG. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17, **Nat. Immunol.** v. 6, p. 1133-1141, 2005.

HESSE, M., PICCIRILLO C. A., BELKAID Y., PRUFER J., MENTINK-KANE M., LEUSINK M., CHEEVER A.W., SHEVACH E. M., WYNN T A. The pathogenesis of Schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 3157-3166, 2004.

HIRAHARA K, LIU L, CLARK RA, YAMANAKA K, FUHLBRIGGE RC, KUPPER TS. The majority of human peripheral blood CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells bear functional skin-homing receptors. **J Immunol.** v. 177(7), p. 4488-4494, 2006.

HISAEDA H, MAEKAWA Y, IWAKAWA D, OKADA H, HIMENO K, KISHIHARA K, TSUKUMO S, YASUTOMO K. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat. Med.**, v.10, p. 29-30, 2004

HO, A. S., MOORE K. Interleukin-10 and its receptor. **Ther. Immunol.**, v. 1, p. 173-185, 1994.

HONTSU, S., YONEYAMA H., UEHA S., TERASHIMA Y., KITABATAKE M., NAKANO A., ITO T., KIMURA H., MATSUSHIMA K. Visualization of naturally occurring Foxp3⁺ regulatory T cells in normal and tumor-bearing mice. **Int Immunopharmacol.**, v. 20, p. 1785-93, 2004.

HORAK, I., LOHLER J., MA A., SMITH K. A. Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 148, p. 35-44, 1995.

HORI, S., HAURY M., LAFAILLE J. J., DEMENGEOT J., COUTINHO A. Peripheral expansion of thymus-derived regulatory cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 32, p. 3729-3735, 2002.

HORI, S., NOMURA T., SAKAGUCHI S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, p. 1057-1061, 2003.

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

HORIGUCHI, K., KITAGAWA-SAKAKIDA S., SAWA Y., LI Z. Z., FUKUSHIMA N., SHIRAKURA R., MATSUDA H. Selective chemokine and receptor gene expressions in allografts that develop transplant vasculopathy. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 2, p. 1090-1100, 2002.

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

IMAI T, NAGIRA M, TAKAGI S, KAKIZAKI M, NISHIMURA M, WANG J, GRAY PW, MATSUSHIMA K, YOSHIE O. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. **Int Immunol.** v. 11(1), p. 81-88, 1999.

INOUE, T., S. FUJISHIMA, E. IKEDA, O. YOSHIE, N. TSUKAMOTO, S. AISO, N. AIKAWA, A. KUBO, K. MATSUSHIMA, K. YAMAGUCHI. CCL22 and CCL17 in rat radiation pneumonitis and in human idiopathic pulmonary fibrosis. **Eur. Respir. J.** v. 24, p. 49-56, 2004.

ISHIDA T, ISHII T, INAGAKI A, YANO H, KOMATSU H, IIDA S, INAGAKI H, UEDA R. Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. **Cancer Res.** v. 66(11), p. 5716-5722. 2006.

ISHIDA T, UEDA R. CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer. **Cancer Sci.** v. 97(11), p. 1139-1146, 2006.

ITOH, M., TAKAHASHI, T., SAKAGUCHI, N., KUNIYASU, Y., SHIMIZU, J., OTSUKA, F., SAKAGUCHI, S. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺

naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **J. Immunol.**, v. 162, p. 5317-5326, 1999.

IVANOV, I. I., MCKENZIE B. S., ZHOU L., TADOKORO C. E., LEPELLEY A, LAFAILLE J. J., CUA D. J., LITTMAN D. R. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**. v. 126(6), p. 1121–1133, 2006.

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

JANKOVIC, D., KULLBERG M. C., FENG C. G., GOLDSZMID R. S., COLLAZO C. M., WILSON M., WYNN T. A., KAMANAKA M., FLAVELL R. A., SHER A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 273-283, 2007.

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

JIMENEZ, B. E., MURPHY J. W. In vitro effects of natural killer cells against *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase. *Infect. Immun.*, v. 46, p. 552-558, 1984.

JIMENEZ-FINKEL, B. E., MURPHY J. W. Characterization of efferent T suppressor cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis*-specific afferent T suppressor cells. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 744-750, 1988.

JONULEIT, H., SCHMITT E., KAKIRMAN H., STASSEN M., KNOP J., ENK A. H. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. **J. Exp. Med.**, v. 15, p. 255-260, 2002.

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

KALLIKOURDIS, M., ANDERSEN K. G., WELCH K. A., BETZ A. G. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5⁺ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 104, p. 594-599, 2007.

KATOH, S., K. FUKUSHIMA, N. MATSUMOTO, K. MATSUMOTO, K. ABE, N. ONAI, K. MATSUSHIMA, S. MATSUKURA. Accumulation of CCR4-expressing CD4⁺ T cells and high concentration of its ligands (TARC and MDC) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with eosinophilic pneumonia. **Allergy** v. 58, p.518-523, 2003.

KERR, I. B., ARARIPE J. R., OLIVEIRA P. C., LENZI H. L. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 30, p.336-350, 1988.

KHAN, I. A., THOMAS S. Y., MORETTO M. M., LEE F. S., ISLAM S. A., COMBE C., SCHWARTZMAN J. D., LUSTER A. D. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. **PLoS Pathog.**, v. 2, p. e49, 2006.

KHATTRI, R., COX T., YASAYKO S. A., RAMSDELL F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 337-342, 2003.

KIM, C. H., ROTT L., KUNKEL E. J., GENOVESE M. C., ANDREW D. P., WU L., BUTCHER E. C. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. **J. Clin. Invest.**, v. 108(9), p. 1331-1339.

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

KIM, S. H., M. M. CLEARY, H. S. FOX, D. CHANTRY, N. SARVETNICK. CCR4-bearing T cells participate in autoimmune diabetes. **J. Clin. Invest.** 110: 1675-1686, 2002.

KONDO T, TAKIGUCHI M. Human memory CCR4⁺CD8⁺ T cell subset has the ability to produce multiple cytokines. **Int Immunol.** v. 21(5), p. 523-532, 2009.

KRAHENBUHL, J. L., ADAMS L. B. The role of the macrophage in resistance to the leprosy bacillus. **Immunol. Ser.**, v. 60, p. 281-302, 1994.

KURITA N, OARADA M, MIYAJI M, ITO E. Effect of cytokines on antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.** v. 38(2), p. 177-182, 2000.

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

LADEL C. H., FLESCHE I. E., ARNOLDI J., KAUFMANN S. H. Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immunol.**, v. 153, p. 3116-3122, 1994.

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

LEVITZ, S. M. Interactions of Toll-like receptors with fungi. **Microbes Infect.**, v. 6, p. 1351-1355, 2004.

LIEBERMAN I, FÖRSTER I. The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4⁺ T cells. **Eur J Immunol.** v. 29(9), p. 2684-2694, 1999.

LIM, H. W., HILLSAMER P., KIM C. H. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. **J. Clin. Invest.**, v. 114, p. 1640-1649, 2004.

LIVONESI MC, ROSSI MA, DE SOUTO JT, CAMPANELLI AP, DE SOUSA RL, MAFFEI CM, FERREIRA BR, MARTINEZ R, DA SILVA JS. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.** v. 11(1), p. 123-132, 2009.

LIVONESI MC, SOUTO JT, CAMPANELLI AP, MAFFEI CM, MARTINEZ R, ROSSI MA, DA SILVA JS. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. **Med Mycol.** v. 46(7), p. 637-646, 2008.

LOETSCHER, P., UGUCCIONI M., BORDOLI L., BAGGIOLINI M., MOSER B., CHIZZOLINI C., DAYER J. M. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. **Nature**, v. 391, p. 344-5, 1998.

LUANGSAY, S., KASPER L. H., RACHINEL N., MINNS L. A., MENNECHET F. J., VANDEWALLE A., BUZONI-GATEL D. CCR5 mediates specific migration of *Toxoplasma gondii*-primed CD8 lymphocytes to inflammatory intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 125, p. 491-500, 2003

MACHADO, F. S., KOYAMA N. S., CARREGARO V., FERREIRA B. R., MILANEZI C. M., TEIXEIRA M. M., ROSSI M. A., SILVA J. S. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.** v. 191, p. 627-636, 2005.

MAHNKE K, BEDKE T, ENK AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. **Cell Immunol.** v. 250(1-2), p.1-13, 2008.

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

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

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

MARQUES S. A. Paracoccidioidomycose. **An Bras Dermatol** v. 73(5), p. 455–469, 1998.

MAY, K. F. Jr, CHANG X., ZHANG H., LUTE K. D., ZHOU P., KOCAK E., ZHENG P., LIU Y. B7-Deficient Autoreactive T Cells Are Highly Susceptible to Suppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells. **J. Immunol.**, v. 1, p. 1542-1552, 2007.

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

MELONI-BRUNERI, L. H., CAMPA A., ABDALLA D. S., CALICH V. L., 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.

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

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

MENDES-GIANNINI MJ, MONTEIRO DA SILVA JL, DE FÁTIMA DA SILVA J, DONOFRIO FC, MIRANDA ET, ANDREOTTI PF, SOARES CP. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: recent advances. **Mycopathologia.** v. 165(4-5), p. 237-248, 2008.

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

MIN WP, ZHOU D, ICHIM TE, STREJAN GH, XIA X, YANG J, HUANG X, GARCIA B, WHITE D, DUTARTRE P, JEVNIKAR AM, ZHONG R. Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance. **J Immunol.** v. 170(3), p. 1304-1312, 2003.

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

MONTENEGRO, M.R.G., FRANCO M. **Pathology.** In: FRANCO, M.F., LACAZ C.S., RESTREPO A., DEL NEGRO G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida: CRC Press, Cap. 9 e 11, p. 131-150; 175-184, 1994.

MOORE, K. W., O'GARRA A., DE WAAL MALEFYT R., VIEIRA P., MOSMANN T. R. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol.**, v. 11, p. 165-190, 1993.

MOREIRA AP, CAVASSANI KA, MASSAFERA TRISTÃO FS, CAMPANELLI AP, MARTINEZ R, ROSSI MA, SILVA JS. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. **J Immunol.** v. 180(5), p. 3049-3056, 2008.

MOREIRA, A. P., CAMPANELLI A. P., CAVASSANI K. A., SOUTO J. T., FERREIRA B. R., MARTINEZ R., ROSSI M. A., SILVA J. S. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of

mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Am. J. Pathol.**, v. 169, p.1270-1281, 2006.

MOSCARDI-BACCHI, M., FRANCO M. Experimental paracoccidioidomycosis in the mouse. III. Histopathological and immunological findings after intravenous infection in the presence or absence of previous immunization. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 18, p. 101–108, 1985.

MOSER B, LOETSCHER P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nat. Immunol.**, v. 2, p.123-128, 2001.

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

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

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

MUSHA, H., OHTANI H., MIZOI T., KINOUCHI M., NAKAYAMA T., SHIIBA K., MIYAGAWA K., NAGURA H., YOSHIE O., SASAKI I. Selective infiltration of CCR5(+)CXCR3(+) T lymphocytes in human colorectal carcinoma. **Int. J. Câncer.**, v. 116, p. 949-956, 2005.

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

NAGATA K, TANAKA K, OGAWA K, KEMMOTSU K, IMAI T, YOSHIE O, ABE H, TADA K, NAKAMURA M, SUGAMURA K, TAKANO S. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. **J Immunol.** v. 162(3), p. 1278-1286, 1999.

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

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

NESS, T. L., EWING J. L., HOGABOAM C. M. and KUNKEL S. L. CCR4 is a key modulator of innate immune responses. **J. Immunol.**, v. 177, p. 7531-7539, 2006.

NEWORAL EP, ALTEMANI A, MAMONI RL, NORONHA IL, BLOTTA MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymphonodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v. 21, p. 234-241, 2003.

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

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

NISHIKAKU, AS, BURGER E. Immunohistochemical demonstration of TGF-beta and decorin in paracoccidioid granulomas. **Braz J Med Biol Res.**, v. 36, p. 1073-1078, 2003.

NOURI-ARIA KT, WILSON D, FRANCIS JN, JOPLING LA, JACOBSON MR, HODGE MR, ANDREW DP, TILL SJ, VARGA EM, WILLIAMS TJ, PEASE JE, LLOYD CM, SABROE I, DURHAM SR. CCR4 in human allergen-induced late responses in the skin and lung. **Eur J Immunol.** v. 32(7), p. 1933-1938, 2002.

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

ONODERA T, JANG MH, GUO Z, YAMASAKI M, HIRATA T, BAI Z, TSUJI NM, NAGAKUBO D, YOSHIE O, SAKAGUCHI S, TAKIKAWA O, MIYASAKA M. Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. **J Immunol.** v. 183(9), p. 5608-5614, 2009.

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

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

PANINA-BORDIGNON P, PAPI A, MARIANI M, DI LUCIA P, CASONI G, BELLETTATO C, BUONSANTI C, MIOTTO D, MAPP C, VILLA A, ARRIGONI G, FABBRI LM, SINIGAGLIA F. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. **J Clin Invest.** v. 107(11), p. 1357-1364, 2001.

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

PARISE-FORTES, M. R., MARQUES S. A., SOARES A. M. V. C., KUOKAWA C. S., MARQUES M. E. A., PERAÇOLI M. T. S. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesion of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfametoxazole treatment. **Brit. J. Dermatol.**, v. 154, p. 643-650, 2006.

PERAÇOLI, M. T., FORTES M. R., DA SILVA M. F., MONTENEGRO M. R. Natural killer cell activity in experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**. v. 37, p. 129-136, 1995.

PERAÇOLI, M. T., KUOKAWA C. S., CALVI S. A., MENDES R. P., PEREIRA P. C., MARQUES S. A., SOARES A. M. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 413-418, 2003.

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

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

PERREIRA, M. S.F. **O papel das células T CD4+ e CD8+ no mecanismo de indução e manutenção da proteção a *Paracoccidioides brasiliensis***. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2006.

PERROS, F., HOOGSTEDEN H. C., COYLE A. J., LAMBRECHT B. N., HAMMAD H. Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. **Allergy**, v. 64, p. 995-1002, 2009.

PICCIRILLO, C. A., LETTERIO J. J., THORNTON A. M., MCHUGH R. S., MAMURA M., MIZUHARA H., SHEVACH E. M. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. **J. Exp. Med.**, v. 15, p. 237-246, 2002.

PINA A, BERNARDINO S, CALICH VL. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **J Leukoc Biol**. v. 83(5), p. 1088-1099, 2008.

PINA, A., SALDIVA P. H., RESTREPO L. E., CALICH V. L. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. **J. Leukoc. Biol.**, v. 7, p. 1202-1213, 2006.

POMIÉ C, MÉNAGER-MARCQ I, VAN MEERWIJK JP. Murine CD8⁺ regulatory T lymphocytes: the new era. **Hum Immunol.** v. 69(11), p. 708-714, 2008.

QIN, S., ROTTMAN J. B., MYERS P., KASSAM N., WEINBLATT M., LOETSCHER M., KOCH A. E., MOSER B., MACKAY C. R. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. **J Clin Invest.**, v. 101(4), p. 746-754, 1998.

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

RAMOS-E-SILVA M, SARAIVA L.E.S. Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin.** v. 26(2), p. 257-269, 2008.

RAMOS-E-SILVA M. Facial and oral aspects of some venereal and tropical diseases. **Acta Dermatovenereol Croat**, v. 12(3), p. 173–180, 2004.

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.

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

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

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

ROSEN, H., KLEBANOFF S. J. Oxidation of microbial iron-sulfur centers by the myeloperoxidase-H₂O₂-halide antimicrobial system. **Infect. Immun.**, v. 47, p. 613-618, 1985.

RUDENSKY, A. Y., GAVIN M., ZHENG Y. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. **Cell**, v. 126, p. 253-256, 2006.

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

SAKAGUCHI, S., SAKAGUCHI N., SHIMIZU J., YAMAZAKI S., SAKIHAMA, T., ITOH M., KUNIYASU Y., NOMURA T., TODA M., TAKAHASHI T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling

autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 18-32, 2001.

SALAZAR, M.E., RESTREPO, A. and STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.** v. 56, p. 711–713, 1988.

SALLUSTO F, LENIG D, MACKAY CR, LANZAVECCHIA A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. **J Exp Med.** v. 187(6), p. 875-883, 1998.

SALLUSTO, F. and LANZAVECCHIA, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 611-614, 1999.

SALLUSTO, F., LENIG D., FORSTER R., LIPP M., LANZAVECCHIA A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, p. 708-712, 1999.

SALLUSTO, F., MACKAY CR, LANZAVECCHIA A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. **Science.**, v. 277(5334), p. 2005-2007, 1997.

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

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

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

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

SATHER BD, TREUTING P, PERDUE N, MIAZGOWICZ M, FONTENOT JD, RUDENSKY AY, CAMPBELL DJ. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. **J Exp Med.** v. 204(6), p. 1335-1347, 2007.

SCANGA, CA, MOHAN VP, YU K, JOSEPH H, TANAKA K, CHAN J, FLYNN JL. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 347-358, 2000.

SCHALL, T.J. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. **Cytokine**, v. 3 p. 165-183, 1991.

SCHANIEL C, SALLUSTO F, RUEDL C, SIDERAS P, MELCHERS F, ROLINK AG. Three chemokines with potential functions in T lymphocyte-independent and -dependent B lymphocyte stimulation. **Eur J Immunol.** v. 29(9), p. 2934-2947, 1999.

SEKIYA T, MIYAMASU M, IMANISHI M, YAMADA H, NAKAJIMA T, YAMAGUCHI M, FUJISAWA T, PAWANKAR R, SANO Y, OHTA K, ISHII A, MORITA Y, YAMAMOTO K, MATSUSHIMA K, YOSHIE O, HIRAI K. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. **J Immunol.** v. 165(4), p. 2205-2213, 2000.

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

SHEVACH, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. **Immunity**, v. 25, p. 195-201, 2006.

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

SHIKANAI-YASUDA M.A., TELLES FILHO F. DE Q, MENDES R.P, COLOMBO A.L., MORETTI M.L. Consenso em Paracoccidiodomicose. **Rev Soc Bras Med Trop** v. 39(3), p. 297–310, 2006.

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

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

SOARES AM, CALVI SA, PERAÇOLI MT, FERNANDEZ AC, DIAS LA, DOS ANJOS AR. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology.** v. 102(4), p. 480-485, 2001.

SOLER D, CHAPMAN TR, POISSON LR, WANG L, COTE-SIERRA J, RYAN M, MCDONALD A, BADOLA S, FEDYK E, COYLE AJ, HODGE MR, KOLBECK R. CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3⁺ regulatory and Th2 effector lymphocytes. **J Immunol.** v. 177(10), p. 6940-6951, 2006.

SOUTO, J. T., ALIBERTI J. C., CAMPANELLI A. P., LIVONESI M. C., MAFFEI C. M., FERREIRA B. R., TRAVASSOS L. R., MARTINEZ R., ROSSI M. A., SILVA J. S. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. **Am. J. Pathol.**, v.163, p. 583-590, 2003.

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

STEPHENS, G. L., MCHUGH R. S., WHITTERS M. J., YOUNG D. A., LUXENBERG D., CARRENO B. M., COLLINS M., SHEVACH E. M. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates

resistance to suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells. **J. Immunol.**, v. 173, p. 5008-5020. 2004.

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

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

SZABO, S. T., S.T. KIM, G.L. COSTA, X. ZHANG, C.G. FATHMAN AND L.H. GLIMCHER, A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment, **Cell**. v. 100, p. 655–669, 2000.

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

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

TAKEDA, K, KAISHO T., AKIRA S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335–376, 2003.

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

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

TODA A, PICCIRILLO CA. Development and function of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **J Leukoc Biol**. v. 80(3), p. 458-470, 2006.

TSUNAWAKI, S, SPORN M, DING A, NATHAN C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. **Nature**, v. 21, p. 260-262, 1988.

UEDA, K., YAMAZAKI S., SAEGUSA J., SOMEYA S. Septicemic infection in nude mice caused by a virulent strain of *Mycobacterium bovis*. **Jpn. J. Exp. Med.**, v. 47, p. 467-474, 1977.

UEDA, K., YAMAZAKI S., YAMAMOTO S., SOMEYA S. Spleen cell transfer induces T cell-dependent granulomas in tuberculous nude mice. **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 31, p. 469-478, 1982.

WALKER, M. R., KASPROWICZ D. J., GERSUK V. H., BENARD A., VAN LANDEGHEN M., BUCKNER J. H., ZIEGLER S. F. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 1437-1443, 2003.

WALTHER, M., TONGREN J. E., ANDREWS L., KORBEL D., KING E., FLETCHER H., ANDERSEN R. F., BEJON P., THOMPSON F., DUNACHIE S. J., EDELE F., DE SOUZA J. B, SINDEN R. E., GILBERT S. C., RILEY E. M., HILL A. V. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. **Immunity**, v. 23, p. 287-296, 2005.

WAN, S., XIA C., MOREL L. IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4⁺CD25⁺ T cell regulatory functions. **J. Immunol.**, v. 178, p. 271-279, 2007.

WANG, C. R., LIU M. F. Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4⁺ T cells from patients with rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 132, p. 371-378, 2003.

WILLERFORD, D. M., CHEN J., FERRY J. A., DAVIDSON L., MA A., ALT F. W. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. **Immunity**, v. 3, p. 521-530, 1995.

WILLIAMS, L. M., RUDENSKY A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 277-284 2007.

WILSON M. W., GROSSNIKLAUS H. E., HEATHCOTE J. G. Hepatic Granulomas in Murine Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania chagasi* **Methods**, v. 9, p. 248-254, 1996.

WU Y, BORDE M, HEISSMEYER V, FEUERER M, LAPAN AD, STROUD JC, BATES DL, GUO L, HAN A, ZIEGLER SF, MATHIS D, BENOIST C, CHEN L, RAO A. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. **Cell**, v. 126, p. 375-387, 2006.

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

YAGI, H., NOMURA T., NAKAMURA K., YAMAZAKI S., KITAWAKI T., HORI S., MAEDA M., ONODERA M., UCHIYAMA T., FUJII S., SAKAGUCHI S. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. **Int Immunol.** v. 16(11), p. 1643-1656, 2004.

YAMAZAKI, S., IYODA T., TARBELL K., OLSON K., VELINZON K., INABA K., STEINMAN R. M. Direct expansion of functional CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 235-247, 2003.

YONEYAMA, H., A. HARADA, T. IMAI, M. BABA, O. YOSHIE, Y. ZHANG, H. HIGASHI, M. MURAI, H. ASAKURA, K. MATSUSHIMA. Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice. **J. Clin. Invest.** 102: 1933-1941, 1998.

YURCHENKO, E., TRITT M., HAY V., SHEVACH E. M., BELKAID Y., PICCIRILLO C. A. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 2451-2460, 2006.

ZHANG P, SANDLAND GJ, FENG Z, XU D, MINCHELLA DJ. Evolutionary implications for interactions between multiple strains of host and parasite. **J Theor Biol.** v. 248(2), p. 225-240, 2007.

ZHAO, D. M., THORNTON A. M., DIPAOLO R. J., SHEVACH E. M. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. **Blood**, v. 107, p. 3925-3932. 2006.

ZHENG, W. AND FLAVELL R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells, **Cell.** v. 89, p. 587–596, 1997.

ZHONG, M. X., KUZIEL W. A., PAMER E. G., SERBINA N. V. Chemokine receptor 5 is dispensable for innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes* infection. **Infect Immun.**, v. 72, p. 1057-1064, 2004.

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](#)