

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

**FERNANDA MESQUITA DE SOUZA**

**Papel de Blimp-1 na resposta imunológica ao  
*Paracoccidioides brasiliensis***

**RIBEIRÃO PRETO**

**2023**

**FERNANDA MESQUITA DE SOUZA**

**Versão corrigida**

**Papel de Blimp-1 na resposta imunológica ao  
*Paracoccidioides brasiliensis***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Imunologia

**Orientador:** Prof. Dr. João Santana da Silva

Ribeirão Preto

2023

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.

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Souza, Fernanda Mesquita

Papel de Blimp-1 na resposta imunológica ao *Paracoccidioides brasiliensis*, 2023. 92 p. : il. ; 30 cm

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

**Orientador:** Silva, João Santana

1. *Paracoccidioides brasiliensis* 2. Paracoccidioidomicose experimental 3. Fator de transcrição 4. Blimp-1 5. Infecção fúngica 6. Micose sistêmica.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoparasitologia, Plataforma Bi Institucional de Pesquisa em Medicina Translacional – Fiocruz/SP, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 16/23618-8, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (CNPq)

Nome: Fernanda Mesquita de Souza

Título: Papel de Blimp-1 na resposta imunológica ao *Paracoccidioides brasiliensis*

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. João Santana Silva

Instituição: Plataforma Bi Institucional de Pesquisa em Medicina Translacional –  
Fiocruz/SP

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. José Roberto Mineo

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

“Assim como o ramo não pode produzir frutos por si próprio se não tiver unido a videira, da mesma maneira vocês não podem se não estiverem unidos a mim. Eu sou a videira, vocês os ramos. Quem está em mim e eu nele, esse dá fruto abundante, porque sem mim nada podem fazer”. (João 15: 4-5)

“O meu mandamento é este: Que vocês amem uns aos outros, assim como eu amei vocês. Ninguém possui amor maior do que este, que alguém dê a sua vida pelos seus amigos. Vocês mostram que são meus amigos quando fazem o que eu mando. Não chamo a vocês de servos, porque os servos não sabem o que faz o seu senhor, mas eu chamo de amigos, porque tudo que ouvi de meu pai contei a vocês. Não foram vocês que me escolheram, mas eu vos escolhi, e os nomeei para que vão e deem fruto, e o seu fruto permaneça. (João 15:12-16)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todos os  
que me incentivaram e fizeram parte da minha trajetória até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. João Santana Silva, por ter me recebido em seu laboratório. Pela paciência, conhecimentos compartilhados e confiança no meu trabalho. Obrigada pela orientação e por acreditar no meu potencial.

À Dra. Luciana Benevides, por todo suporte oferecido que foram essenciais para o desenvolvimento dessa tese, incluindo as contribuições no racional dos experimentos, discussão dos resultados, correções e dicas. Muito obrigada por todo apoio e confiança, por acreditar em mim, no meu trabalho e potencial. Pela boa convivência, apoio, paciência, preocupação, imparcialidade, ensinamentos, conversas, compartilhamento de experiência e conhecimentos, por me passar confiança e estar sempre disponível.

À secretária do Programa de Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine S. Ferreira, uma pessoa muito especial e querida para mim, além de muito importante nessa jornada. Muito obrigada por toda ajuda do início ao término do doutorado, pela boa recepção, compreensão, preocupação, conversas, apoio, confiança, paciência, disponibilidade, pelo carinho, conselhos, momentos de distração, e por acreditar em mim.

Ao Osvaldo pela disposição de ensinar e ajudar sempre, por toda ajuda emocional, financeira, em experimentos. Obrigada por todo apoio, confiança, companhia, amizade, momentos de distração e paciência.

À Thaís Rigoni pela amizade, pelos conselhos, por acreditar no meu potencial, mudar meu conceito em relação ao ambiente acadêmico, ser um exemplo de profissionalismo, pelas discussões científicas e contribuições importantes para meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Maria Cláudia por acreditar no meu trabalho e potencial, por me passar confiança, pelas conversas, apoio e imparcialidade.

Ao Maykon Tavares pela ajuda na bancada, por acreditar no meu trabalho e potencial.

À Tamara Rodrigues pelas conversas, conselhos e discussões científicas.

À Franciele Pioto pela disponibilidade, boa convivência e pelas conversas.

À Rafaela Lúcia e Lívia Mendes pela disponibilidade de ajudar sempre nos experimentos e companheirismo.



À Bruna Rattis pela ajuda com a descrição das análises histológicas.

A todos os demais colegas que fazem parte do grupo do Laboratório de Imunoparasitologia: Stella Francy, Hellen Anastácia, Poliana Tosta, Nathália Pereira, Talita Fernandes e Andressa Barban, pela companhia, conversas e boa convivência.

Aos amigos: Itaciara Seixas, Julia Castro, Alexander Moraes, André Correa, Thales Galdino, Rodrigo Morelli, Rômulo Oliveira, Douglas Santos, Renan Bin, Joseana Oliveira, Paulo Prado e Jefferson Barbosa pela amizade, companheirismo, ajuda, força, conversas, momentos de distração.

Aos técnicos do biotério, Júlio, Adriana, Edir e Rubilan por contribuírem com criação e fornecimento de animais necessários para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do departamento de Bioquímica e Imunologia e da Plataforma Bi Institucional de Pesquisa em Medicina Translacional – Fiocruz/SP: Denise Ferraz, Gabriel Barretto, Laura Daniel, Keiko, Marcelo, Iasmin Silva e Washington.

As fontes financiadoras: FAPESP (processo nº 16/23618-8), CRID, CAPES e Pró-Reitoria de Pós-graduação, pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro que contribuíram para o desenvolvimento desse estudo.

### **Agradecimentos Especiais**

Ao meu pai Francisco Valberto (in memoriam) que sempre me deu todo suporte necessário. Pelos ensinamentos que sempre trago comigo, dentre eles sua característica mais forte, a honestidade. Além da seriedade e disponibilidade de ajudar ao próximo. Muito obrigada por sempre ter me proporcionado o melhor.

À minha mãe Eliane Mesquita que é meu alicerce, minha vida, que sempre acreditou e confiou em mim. Obrigada por sempre me apoiar, por sempre me fazer ver o melhor das pessoas e da vida. Pela sabedoria e discernimento nos momentos necessários, pelos conselhos de sempre seguir em frente e enfrentar os obstáculos.

À minha irmã Andressa Silvino, por ter cuidado da nossa família e da nossa mãe quando não pude estar perto. Pelo apoio, suporte, carinho, amor e ajuda com edição de imagens.

À minha tia Lucineide, que também é muito importante para mim. Muito obrigada por ter estado e estar presente nos meus momentos de maior fragilidade dando todo apoio e suporte as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por ter cuidado

da minha família e ter assumido o comando nos momentos em que eu não estava presente ou não tinha estrutura / preparo emocional. Obrigada por toda ajuda em todos os momentos, por todo suporte emocional, financeiro e disponibilidade de tempo. Pelo carinho, amor, preocupação, pelos momentos de alegria, diversão e felicidade. Sem você, dificilmente eu teria chegado até aqui.

À minha tia Ana Lúcia, por toda ajuda, apoio, amor, carinho, conselhos, cuidado. Obrigada pelos momentos de conversa, descontração, leveza, alegria, felicidade pelas comidinhas e por toda preocupação.

Aos meus tios: Vera, Carlos, Valdecy, Acélio e Neusa por todo suporte, ajuda, amor, carinho, acolhimento, apoio e confiança.

Aos meus avós: Neusa e João (paternos) e Jarina (in memoriam) e Luís (maternos) pelo amor, carinho, acolhimento, cuidado, suporte emocional, me fazer sentir especial.

À Rita Padilha e José Augusto, por me acolherem na sua casa e me fazer sentir como membro da família. Por toda ajuda durante todo esse processo, que não foi pouca. Muito obrigada por tudo, principalmente pelo cuidado, companhia, amor, carinho, ajuda em momentos delicados e difíceis, conselhos, momentos de descontração, alegrias e risadas, que fez toda essa trajetória muito mais leve e agradável. Obrigada pelas experiências, ensinamentos, por todos os aprendizados e empatia. Pela preocupação com meu bem-estar emocional, financeiro e físico. Em especial, a Rita por ter me dado total apoio nessa caminhada e dedicando bastante do seu tempo para me ouvir, aconselhar e ensinar valores.

Aos companheiros de moradia: Nara, Geovane e Joel, pela amizade, ajuda, apoio, companhia, e momentos de leveza.

À Luciana Martelli pelo carinho, preocupação, conselhos, conversas, ensinamentos e cuidado.

A todos os pastores da igreja Universal por todo amparo espiritual e emocional, em especial ao pastor Natanael, Rocha e Bispo Fernando pelos conselhos, ajuda, discernimento, palavras, ensinamentos, experiências, valores, sabedoria, cuidado, direção e disposição. Em especial, pela nova visão que tenho da vida. As obreiras Marjorie, Maria Eduarda e Elaine por toda confiança, amor, dedicação, carinho, preocupação, disposição, cuidado e apoio.

Ao pastor Pablo e a pastora Juliana da igreja Bola de Neve, pela ajuda, discernimento, sabedoria, cuidado.

## RESUMO

Souza, F.M. **Papel de Blimp-1 na resposta imunológica ao *Paracoccidioides brasiliensis***. 2023. 92 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

**Introdução:** Respostas Th2/Th9 estão associadas à susceptibilidade a PCM, enquanto respostas Th1/Th17 à resistência. Nos últimos anos muitos grupos de pesquisa, focaram no entendimento do papel de Blimp-1 em diferentes contextos, com intuito de promover esse fator de transcrição a potencial candidato a alvo terapêutico. Nosso grupo, com o mesmo interesse mostrou sua importância no controle da inflamação alérgica e na limitação de respostas Th1 no modelo de infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Pensando nisso, consideramos entender como é o controle exercido por esse fator de transcrição durante a PCM experimental. **Objetivo:** Determinar o papel do fator de transcrição Blimp-1 na regulação da resposta imune durante a infecção sistêmica pelo fungo *P. brasiliensis*. **Métodos e Resultados:** Os camundongos machos Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup> (Blimp-1CKO) e Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre-</sup> (WT) foram infectados por via intravenosa com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis da cepa virulenta de *P. brasiliensis* (Pb18). Durante a PCM experimental (7, 15 e 30 dias de infecção - pi), esses animais foram avaliados quanto a carga fúngica, desenvolvimento e aspectos da inflamação granulomatosa e fenotipagem de leucócitos nos pulmões. A ausência de Blimp-1 resultou na redução de Pb18 viáveis nos pulmões a partir da primeira semana de infecção, essa redução se manteve até a quarta semana de infecção. Após 30 p.i, corroborando com esse dado, observamos drástica redução da quantidade de estruturas fúngicas nas lâminas de pulmões provenientes de camundongos Blimp-1CKO, em especial do foco granulomatoso. Em relação a indução da resposta inflamatória, após 15 pi, detectamos que o grupo Blimp-1CKO apresentou um infiltrado de células mononucleares mais intenso, onde observou-se alterações na arquitetura pulmonar associadas a redução do espaço aéreo. Identificamos e mensuramos as populações celulares presentes nesse mesmo tempo de infecção, e comparado com os controles, camundongos Blimp-1CKO apresentaram acúmulo de células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> nos pulmões, células sabidamente implicadas no controle da replicação fúngica. Isso refletiu na redução do acúmulo e ativação de células

fagocíticas (cDCs2, MoDCs/ M $\phi$  intersticiais e M $\phi$  alveolares transicionais), células importantes para eliminação do fungo. Interessantemente, após 30 pi, a análise histopatológica revelou espaço aéreo preservado com a presença de leve infiltrado inflamatório misto e multifocal nas regiões peribronvasculares nos pulmões de animais Blimp-1CKO. Nesses animais houve ainda redução da intensidade da deposição de colágeno do tipo I e III.

**Conclusão:** Coletivamente, esses dados demonstram que Blimp-1 favorece a progressão da infecção fúngica causada pelo *P. brasiliensis* ao reduzir o acúmulo de células importantes para o controle da replicação fúngica no local da infecção.

**Apoio financeiro:** FAPESP, CRID, CNPQ e CAPES.

**Palavras-chave:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomicose experimental, Fator de transcrição, Blimp-1, Infecção fúngica, Micose sistêmica.

## ABSTRACT

Souza, F.M. **Role of Blimp-1 in the immunological response to *Paracoccidioides brasiliensis***. 2023. 92 p. Doctoral thesis. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

**Introduction:** Th2/Th9 responses are associated with susceptibility to PCM, while Th1/Th17 responses with resistance. In recent years, many research groups have focused on understanding the role of Blimp-1 in different contexts, with the aim of promoting this transcription factor as a potential candidate for therapeutic target. Our group, with the same interest, showed its importance in controlling allergic inflammation and limiting Th1 responses in the infection model caused by *Trypanosoma cruzi*. With this in mind, we consider understanding the control exerted by this transcription factor during experimental PCM.

**Aim:** To determine the role of the transcription factor Blimp-1 in regulating the immune response during systemic infection by the fungus *P. brasiliensis*. **Methods and Results:** Male Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup> (Blimp-1CKO) and Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre-</sup> (WT) mice were intravenously infected with 1x10<sup>6</sup> viable yeast of the virulent strain of *P. brasiliensis* (Pb18). During the experimental PCM (7, 15 and 30 days post-infection - pi), these animals were evaluated for fungal load, development and aspects of granulomatous inflammation and phenotyping of leukocytes in the lungs. The absence of Blimp-1 resulted in a reduction of viable Pb18 in the lungs from the first week of infection, this reduction remained until the fourth week of infection. After 30 p.i., corroborating this data, we observed a drastic reduction in the amount of fungal structures in lung slides from Blimp-1CKO mice, especially in the granulomatous focus. Regarding the induction of the inflammatory response, after 15 pi, we detected that the Blimp-1CKO group presented a more intense mononuclear cell infiltrate, where changes in lung architecture associated with a reduction in air space were observed. We identified and measured the cell populations present at the same time of infection, and compared to controls, Blimp-1CKO mice showed accumulation of CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T cells in the lungs, cells known to be involved in the control of fungal replication. This was reflected in the reduction in the accumulation and activation of phagocytic cells (cDCs2, interstitial MoDCs/ M $\phi$  and transitional alveolar M $\phi$ ),

important cells for eliminating the fungus. Interestingly, after 30 pi, histopathological analysis revealed preserved air space with the presence of mild mixed and multifocal inflammatory infiltrate in the peribronvascular regions in the lungs of Blimp-1CKO animals. In these animals, there was also a reduction in the intensity of the marking of type I and III collagen deposition.

**Conclusion:** Collectively, these data demonstrate that Blimp-1 favors the progression of fungal infection caused by *P. brasiliensis* by reducing the accumulation of cells important for controlling fungal replication at the site of infection.

**Financial support:** FAPESP, CRID, CNPQ e CAPES.

**Keywords:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Experimental paracoccidioidomycosis, Transcription factor, Blimp-1, Fungal infection, Systemic mycosis.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>VI</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>17</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>18</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1. Paracoccidiodomicose: dados epidemiológicos, transmissão, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento.....	21
1.2. Paracoccidiodomicose: resposta imunológica.....	29
1.3. Blimp-1: homeostase e ativação de linfócitos T .....	34
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 Objetivo geral .....	43
2.2. Objetivos específicos .....	43
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
3.1. Declarações Éticas.....	45
3.2. Animais experimentais .....	45
3.3. Cultura de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> , preparo de inóculo e infecção .....	45
3.4. Recuperação de fungos e contagem de unidades formadoras de colônia (CFU).....	46
3.5 Análise histopatológica das lesões.....	46
3.6 Isolamento de leucócitos do pulmão .....	47
3.7 Citometria de Fluxo .....	47
3.8 Imuno-histoquímica .....	48
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1. A sinalização via Blimp-1 promove susceptibilidade à infecção pelo Pb18.....	51

4.2. Blimp-1 modula a resposta inflamatória granulomatosa durante a PCM experimental .....	53
4.3. Blimp-1 atenua a expansão de linfócitos T durante a PCM experimental .....	57
4.4. Blimp-1 limita o acúmulo de linfócitos T $\gamma\delta$ + IL-17 + nos pulmões .....	59
4.5. A progressão da PCM experimental é associada a redução de respostas Th1 e Tc1.....	60
4.6. Blimp-1 promove alterações no perfil de células mieloides presentes nos pulmões .....	64
4.7. Blimp-1 atenua a indução de mecanismos microbicidas em subpopulações de células mieloides.....	67
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>6. SUMÁRIO .....</b>	<b>81</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>92</b>
9.1 Anexo 1: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal .....	92



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e <i>Paracoccidioides lutzii</i> . .....	22
Figura 2. <i>Paracoccidioides</i> spp.....	23
Figura 3. Paracoccidioidomicose: história natural e formas clínicas. ....	25
Figura 4. Pacientes com a forma aguda da PCM.....	27
Figura 5. Aspectos clínicos da PCM crônica. ....	27
Figura 6. A polarização da resposta imune adaptativa na PCM.....	30
Figura 7. Modelo proposto para explicar a resposta imunológica desenvolvida por indivíduos resistentes ou susceptíveis a PCM. ....	32
Figura 8. Mecanismos da regulação gênica mediados por Blimp-1. ....	34
Figura 9. Blimp-1 favorece a progressão da PCM experimental. ....	52
Figura 10. Cinética diferencial do influxo de leucócitos para o local da infecção na presença de Blimp-1. ....	56
Figura 11. Camundongos deficientes de Blimp-1 apresentam redução resposta granulomatosa durante a PCM experimental. ....	56
Figura 12. Blimp-1 atenua a expansão de linfócitos T durante a PCM experimental. ....	58
Figura 13. Análise das populações de linfócitos T com quatro semanas após infecção com Pb18. ....	59
Figura 14. Blimp-1 limita o acúmulo de linfócitos T $\gamma\delta^+$ IL-17 <sup>+</sup> nos pulmões durante a PCM experimental. ....	60
Figura 15. Blimp-1 reduz respostas Th1 15 dias p.i. ....	61
Figura 16. Blimp-1 não modula respostas de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> 15 dias p.i.....	62
Figura 17. Blimp-1 restringe a expansão de CD4 <sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ , CD4 <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$ 30 dias p.i. ....	63
Figura 18. Blimp-1 altera o perfil de populações de macrófagos nos pulmões após infecção fúngica. ....	65
Figura 19. Blimp-1 altera o perfil de eosinófilos e células dendríticas convencionais presentes no ambiente pulmonar após infecção fúngica. ....	66
Figura 20. Blimp-1 em linfócitos T modula a indução de mecanismos microbicidas em subpopulações de células mieloides. ....	68
Figura 21. O papel de Blimp-1 na PCM experimental. ....	83

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- AIM2: do inglês “Absent in melanoma 2”
- APC: Célula Apresentadora de Antígeno
- BMDMs: Macrófagos derivados de células da medula óssea
- Blimp-1: do inglês “B-lymphocyte-induced maturation protein 1”
- Bcl-6: do inglês “ B-cell lymphoma 6”
- BCR: Receptor de célula B
- CCR: Receptor de quimiocina, do inglês “ chemokine receptors”
- DC: Célula dendrítica
- DM-DCD: Doença coronariana associada a diabetes
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- EAE: Encefalomielite autoimune experimental
- EZH2: Methylates H3K27
- G9a: Lysine histone methyltransferase, H3K9 and H3K27
- HDAC2: Histone de-acetylase 2, de-acetylates H3
- IFN: Interferon
- IFN- $\gamma$ : Interferon-gama
- IRF: Fatores reguladores do interferon
- Ig: Imunoglobulina
- IL: Interleucina
- iNOS: Óxido nítrico-sintase induzida
- IRAK: Quinase associada ao receptor da IL-1
- LSD1 Histone lysine demethylase, H3K4 and H3K9
- LPS: Lipopolissacarídeo
- M1: perfil de macrófago ativado classicamente
- M2: perfil de macrófago ativado alternativamente
- MOI: do inglês, “Multiplicity of Infection”
- NLR: Receptor do tipo NOD
- NLRP: do inglês “NLR family, pyrin domain containing”
- NLRP3: do inglês “NLR family, pyrin domain containing 3”
- NLRC4: do inglês “NLR family, card domain containing 4”
- NOD: Domínio de oligomerização nuclear

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PAS: Ácido Periódico Schiff

PBS: Salina Tamponada com Fosfato

PD-1: Proteína de morte celular programada 1

PRRs: Receptores de Reconhecimento Padrão

PCM: Paracoccidiodomicose

RIG: do inglês "Retinoic acid-inducible gene I"

ROS: do inglês, "Oxygen Reactive Species"

RNA: Ácido Ribonucleico

MMP: Metaloproteinases

MR: Receptor de Manose

T-bet: do inglês "T-box expressed in T cells"

TCR: Receptor de linfócitos T

Tfh: do inglês, "T follicular helper"

TIGIT: do inglês, "T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains"

TGF- $\beta$ : Fator de Crescimento Transformador beta

TLR: Receptor do Tipo Toll

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa

Treg: Linfócito T regulador

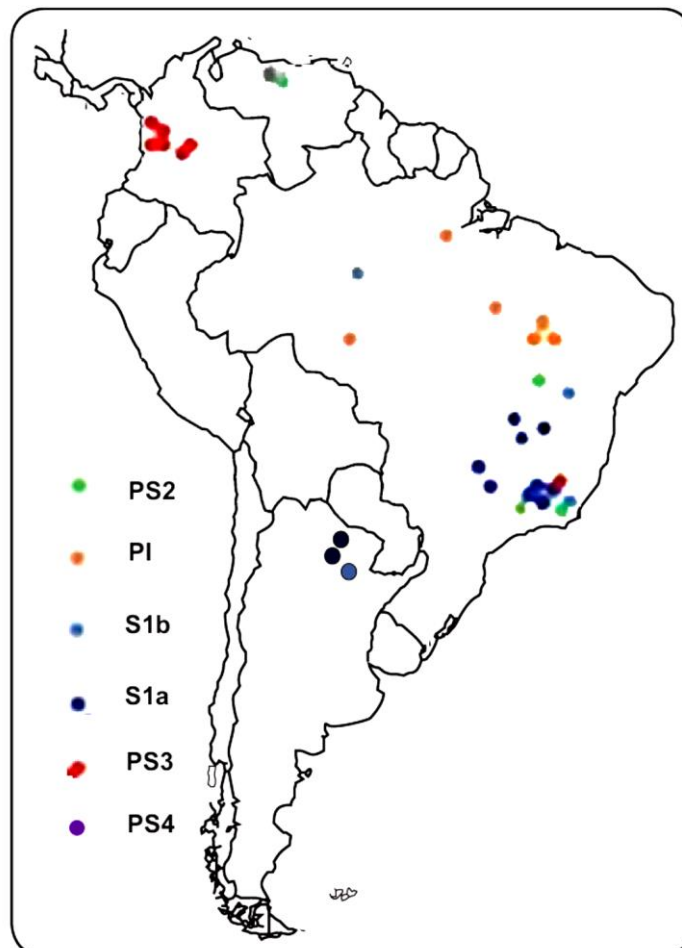
Prmt5: di methylates arginine residues, H2A and H4

# ***Introdução***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Paracoccidioidomicose: dados epidemiológicos, transmissão, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica granulomatosa, descrita inicialmente em 1908 no Brasil por Adolpho Lutz, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides* sp. O gênero *Paracoccidioides* engloba cinco espécies de fungos: *P. brasiliensis* sensu stricto S1a S1b (predominantemente isolado do Sudeste e Sul do Brasil, Argentina e Paraguai), *P. americana* ou PS2 (isolado do Brasil e Venezuela), *P. restrepiensis* ou PS3 (isolado da Colômbia) e *P. venezuelensis* ou PS4 (aparentemente restrito a Venezuela) - e a espécie *P. lutzii* que compreende uma única espécie, e é predominantemente distribuída nas regiões da Amazônia e Centro-Oeste do Brasil e Equador (**Figura 1**) (MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; TABORDA; TRAVASSOS; BENARD, 2021; BURGER, 2021).

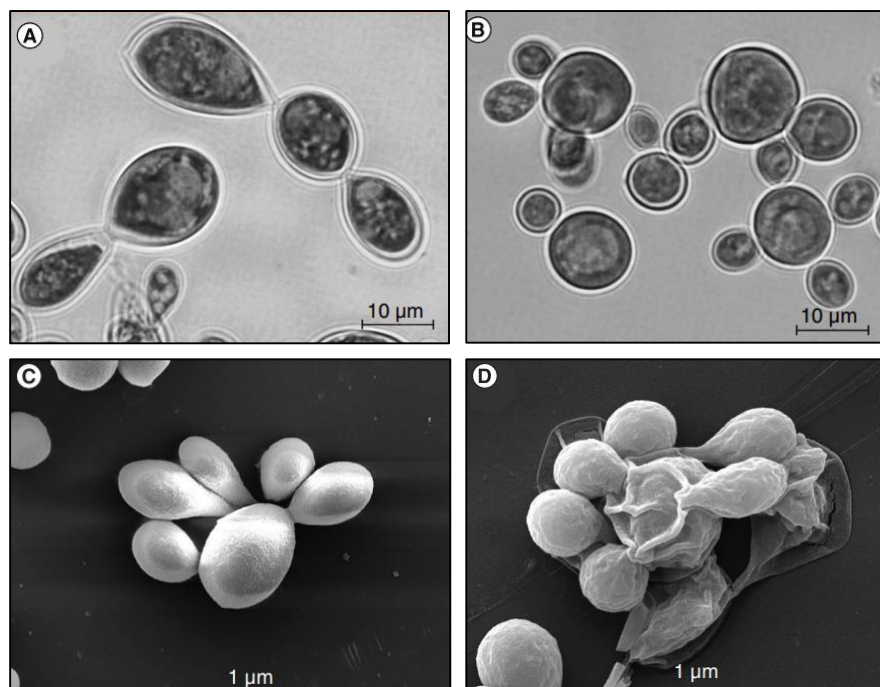


**Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*.** PS2; PS3; PS4; S1a e S1b: espécies filogenéticas de *Paracoccidioides brasiliensis*; Pl: *Paracoccidioides lutzii* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A PCM é uma doença negligenciada e a notificação de novos casos não é compulsória, o que prejudica o conhecimento dos dados exatos da incidência da doença. Os cálculos de prevalência dessa micose são estimados com base nos relatos de inquéritos epidemiológicos, série de casos, dados de internação e de mortalidade (MARTINEZ, 2017). Estima-se que há aproximadamente 10 milhões de pessoas na América Latina infectadas com o *P. brasiliensis*, que é endêmica em países como Venezuela, Colômbia, Equador, Argentina e Brasil, que abrange 80% dos casos (MARTINEZ, 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). No Brasil, entre os anos de 1996-2006, a PCM correspondeu aproximadamente 51% dos 3.583 óbitos ocasionados por micoses sistêmicas. Nesse período, os estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul registraram as maiores taxas de mortalidade (PRADO et al., 2009).

O dimorfismo térmico é uma das principais características do *Paracoccidioides* que apresenta a forma micelial de aspecto cotonoso esbranquiçado. Microscopicamente, observa-se filamentos hialinos, finos e septados, quando cultivado a temperatura de 25 - 27 °C. Os conídios de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* possuem forma de chapéu bicorne e barril, porém o *P. lutzii* produz conídios mais alongados. Nos tecidos do hospedeiro ou quando cultivado entre 35 - 37 °C, o *Paracoccidioides* cresce na forma de levedura. Em cultura, a fase leveduriforme macroscopicamente apresenta colônias moles, enrugadas e de cor creme. Essas colônias são compostas por células de diferentes tamanhos (4 a 30 µm) usualmente ovais, esféricas ou elípticas, com paredes duplas birrefringentes e citoplasma com gotículas lipídicas proeminentes. A esporulação dessas células resulta em múltiplos brotamentos cujo formato é irregular e o tamanho variável (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; SIQUEIRA et al., 2016; MENDES et al., 2017; BURGER, 2021). Não há diferenças significantes entre as células-mães da forma leveduriforme de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, porém os brotamentos de células-filhas de *P. lutzii* são homogêneos no aspecto morfométrico, globosos a cilindro-clavados, tornando-se posteriormente clavado/globoso com diâmetro 1 a 16 µm, enquanto as células-filhas de *P. brasiliensis* são heterogêneas sendo

semelhantes ao do *P. lutzii* ou elíptico-clavado, tornando-se posteriormente cilíndrica-elíptica com diâmetro 1 a 16  $\mu\text{m}$  (**Figura 2**) (SIQUEIRA et al., 2016).



**Figura 2.** *Paracoccidioides* ssp. Imagens obtidas por micrografia (A-B) e microscopia eletrônica de varredura (C-D) das formas leveduriformes de *P. brasiliensis* (A,C) e *P. lutzii* (B,D). Figura adaptada de BOCCA et al., 2013.

O principal fator de risco associado a aquisição da infecção pelo *Paracoccidioides* são atividades relacionadas a exposição contínua e intensa com o solo como por exemplo os trabalhadores ou ex-trabalhadores rurais (agricultura), preparo do solo, jardinagem e transporte de produtos vegetais (MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). O isolamento do *Paracoccidioides* em amostras de solo na Venezuela, Argentina e Brasil reforçam a hipótese de que o solo é o habitat natural desse patógeno (FRANCO et al., 2000) .

A complexa interação entre variáveis do hospedeiro, no qual o *background* genético do hospedeiro está diretamente ligado a natureza da resposta imunológica, virulência fúngica e condições ambientais dita se a infecção evolui para o desenvolvimento de sintomatologia (FRANCO, 1986).

Alguns fatores de risco associados a progressão da doença incluem o *background* genético do hospedeiro, consumo de álcool e fumo. Em crianças, ambos

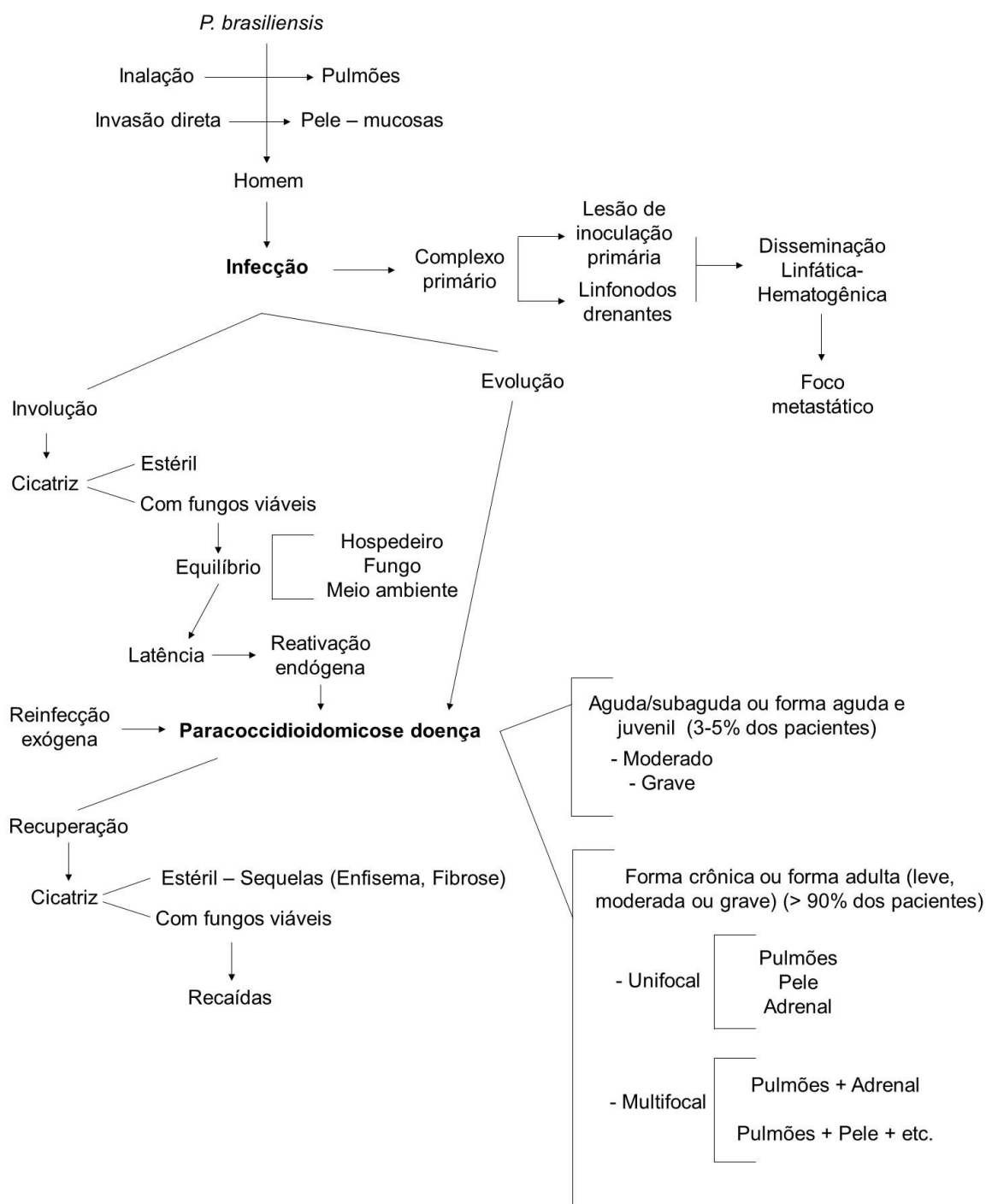
os sexos são igualmente afetados pela doença, porém após a puberdade, a doença predomina no sexo masculino (75-95% dos pacientes são homens), devido a proteção conferida pelo estrogênio que inibe ou dificulta a transformação de conídios e fragmentos de micélio na forma leveduriforme patogênica, com idade entre 30-60 anos. Nesses casos, a infecção acontece nas primeiras duas décadas de vida, 10-20 anos de idade e as manifestações clínicas são resultantes da reativação de um foco latente (FRANCO et al., 1987; MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A infecção causada pelo *P. brasiliensis* é adquirida usualmente por via respiratória após inalação de conídios fúngicos suspensos no ar. No parênquima pulmonar, esse patógeno pode ser eliminado por células fagocíticas ou se multiplicar desencadeando a *lesão de inoculação primária* ou *foco de infecção*. A partir do foco de infecção, o fungo se dissemina pelo sistema linfático para os linfonodos peritraqueais e peribrônquicos, localizado no hilo pulmonar, desencadeando uma *lesão linfática satélite* que juntamente com o foco de *lesão de inoculação primária* forma o *complexo primário*. Nesse momento, a disseminação hematogênica pode acontecer com o estabelecimento de lesões em diferentes órgãos ( como: baço, fígado, linfonodo e medula óssea) – *foco metastático*. (**Figura 3**) (FRANCO et al., 1987; MENDES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

O desenvolvimento de respostas imunes protetoras (que será especificada mais adiante) impede a evolução da infecção a nível de *complexo primário* e eventuais metástases (**Figura 3**). Nesse caso, há formação de estruturas granulomatosas estéreis ou contendo poucos fungos viáveis (foco latente). Nesses indivíduos, o desenvolvimento de respostas imunes específicas é detectado por meio do teste intradérmico com paracoccidiodina (FRANCO et al., 1987; MENDES et al., 2017).

A progressão para doença pode se manifestar: i) devido a reativação de um foco latente (a partir do *complexo primário*), processo denominado como reativação endógena, ii) quando há reinfecção exógena após uma infecção prévia, ou iii) imediatamente após infecção, sem período de latência, devido a falhas na resposta imunológica do hospedeiro. Nesse último caso, o fungo se multiplica e ocorre disseminação por via linfática e hematogênica para múltiplos órgãos e sistemas (**Figura 3**) (FRANCO et al., 1987; MENDES et al., 2017).





**Figura 3. Paracoccidioidomicose: história natural e formas clínicas.** Adaptada de FRANCO et al., 1987).

As manifestações clínicas clássicas da PCM são enquadradas na forma aguda ou crônica. A forma aguda representa 3-5% dos casos, sendo a maioria crianças e adultos jovens de ambos os sexos. A apresentação clínica é caracterizada por curto período de incubação (semanas a meses) sendo a doença frequentemente disseminada e progressiva incluindo sintomas como febre, linfo-, hepato- e esplenomegalia além de comprometimento da pele, ossos e articulações (**Figura 4**).

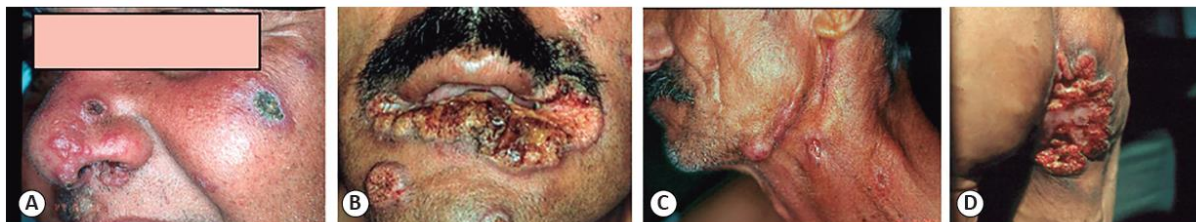
O comprometimento de mucosas e das vias respiratórias são incomuns. Esses pacientes apresentam altos títulos de anticorpos específicos e anergia ao teste intradérmico com paracoccidiodina. Histologicamente, a lesão granulomatosa desses pacientes apresentam inflamação não específica com perda do padrão granulomatoso. Há presença de muitas leveduras na lesão, com a presença de múltiplos brotamentos (FRANCO, 1986; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; MARTINEZ, 2017; MENDES et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A forma crônica ou forma adulta abrange mais de 90% dos pacientes, sendo na maioria homens. A forma crônica progride a partir de um foco latente, esse processo pode levar meses a anos, e acomete principalmente os pulmões, ocasionando dispneia e tosse produtiva. Lesões nas mucosas do trato digestivo e a pele também são reportadas (**Figura 5**). A reativação das lesões latentes ou quiescentes pode ser ocorrer devido alguns fatores como: idade, casos de imunossupressão ou comorbidades. Nesses pacientes há baixos níveis de títulos de anticorpos específicos e reação positiva ao teste intradérmico com paracoccidiodina. Histologicamente, o granuloma desses pacientes é compacto, composto por células epitelióides e gigantócitos contendo poucas leveduras vivas que estão cercadas por um halo espesso de linfócitos (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; MARTINEZ, 2017; MENDES et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A doença pode progredir para cura ou morte. O processo de cura é associado com a formação de cicatrizes nos órgãos afetados que tem como sequela o enfisema e a fibrose (MENDES et al., 2017).



**Figura 4. Pacientes com a forma aguda da PCM.** (A) Abscessos na região frontal e clavicular. (B) Lesão linfática abscedada. (C) Linfadenomegalia inguinal. (D) Acometimento linfático-abdominal com ascite e hepato-esplenomegalia. PCM: Paracoccidiodomicose. *Adaptado de SHIKANAI-YASUDA et al., 2005.*



**Figura 5. Aspectos clínicos da PCM crônica.** (A) Lesões ulcerativas papulonodulares na face. (B) Comprometimento perioral e mentoniano. (C) Linfonodos cervicais e submandibulares fistulizados. (D) Lesão vegetante com bordas irregulares em região peri-anal. PCM: Paracoccidiodomicose. *Adaptado de SHIKANAI-YASUDA et al., 2005.*

A resposta inflamatória granulomatosa é um processo característico da PCM e é marcada pela presença de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos. Em biópsias humanas, essa lesão é caracterizada por reações supurativas e granulomatosas (inflamação granulomatosa mista). Nas reações supurativas há focos de infiltrado inflamatório polimórfico, em grande parte constituída por neutrófilos que circundam o parasita, formando microabscessos bem delimitados (zonas supurativas). Já as estruturas granulomatosas são constituídas por células mononucleares fagocíticas que cercam os microabscessos (zona granulomatosa). Nesse processo, há ainda tecido de granulação rico em vasos sanguíneos, e intenso infiltrado de linfócitos, histiócitos e plasmócitos. Nessa lesão, o *P.brasiliensis* encontra-se livre nos tecidos (soltos ou agrupados) ou no citoplasma de células gigantes, alguns com brotamentos múltiplos ou em fileiras (URIBE et al., 1987).

A sequência desse processo se dispõe conforme os seguintes estágios: i) estágio neutrofílico ou monócito- neutrofílico, resposta inicial (2-3 dias) com predomínio de neutrófilos e a presença de linfócitos e macrófagos, ii) fase pré-granulomatosa (7-10 dias), nesta fase ocorre aumento no fluxo de linfócitos e macrófagos, iii) período granulomatoso, com formação de granulomas epitelióides compactos. Presença de células gigantes e epitelióides, e fibroblastos e fibras colágenas do tipo I e III e, iv) estágio crônico com aumento de granulomas compactos, poucos fungos e aumento do grau de fibrose (MONTENEGRO E FRANCO, 1994).

A formação do granuloma é uma reação inflamatória que configura a tentativa de bloquear e restringir a multiplicação do *Paracoccidioides sp.*, e assim sua disseminação para os órgãos e tecidos adjacentes. A evolução do granuloma está intimamente relacionada a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (FRANCO, 1986).

O diagnóstico da PCM é baseado na detecção da estrutura fúngica em fluídos biológicos ou cortes histológicos corados pela técnica de Gomori-Grocott ou ácido periódico Schiff (PAS). O cultivo de amostras clínicas em meio de cultura apropriado para crescimento fúngico (Sabourand, Mycosel, Difco) também permite a identificação do *Paracoccidioides* através da visualização do crescimento fúngico (hifas) à temperatura ambiente após 20 a 30 dias ou (leveduras) à 37 °C após 10 a 12 dias de incubação. Testes sorológicos como métodos de imunoprecipitação, imunodifusão dupla, contraímunoeletroforese, imunofluorescência indireta, ELISA e Imunoblot também são ferramentas importantes para o diagnóstico e tratamento da doença. Embora os anticorpos não possuam efeito protetor contra a PCM, a análise de detecção dos níveis séricos dessas proteínas é um parâmetro associado a melhora clínica do paciente, já que com o decorrer do tratamento farmacológico ocorre redução dos seus níveis circulantes (FERREIRA, 2009).

O *Paracoccidioides ssp* é sensível à maioria dos antifúngicos, como anfotericina B, azóis (cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol), sulfonamidas e terbinafina. Doses de 200 mg diárias de itraconazol por 6 a 12 meses ou cotrimoxazol (160 mg de trimetoprima e 800 mg de sulfametoxazol) por 12 a 24 meses são usados para o tratamento de pacientes com forma crônica da doença. O voriconazol, posaconazol e isavuconazol também são alternativas ao itraconazol. Pacientes com a forma aguda/subaguda (juvenil) são tratados com desoxicolato (0.5-0.7 mg/kg/dia ou formulação lipídica de anfotericina B (3-5 mg/kg/dia), seguida de manutenção com itraconazol (por 6-12 meses) ou cotrimoxazol (por 12-24 meses). A duração da terapia deve persistir até o estabelecimento dos critérios de cura que são baseados em parâmetros clínicos, no qual baseia-se na ausência ou regressão dos sinais e sintomas da doença, e radiológicos, no qual inclui a redução de edema, nódulos e inflamação dos pulmões. Além de exames sorológicos e micológicos negativos (MENDES et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017; SANTOS et al., 2020).

## 1.2. Paracoccidiodomicose: resposta imunológica

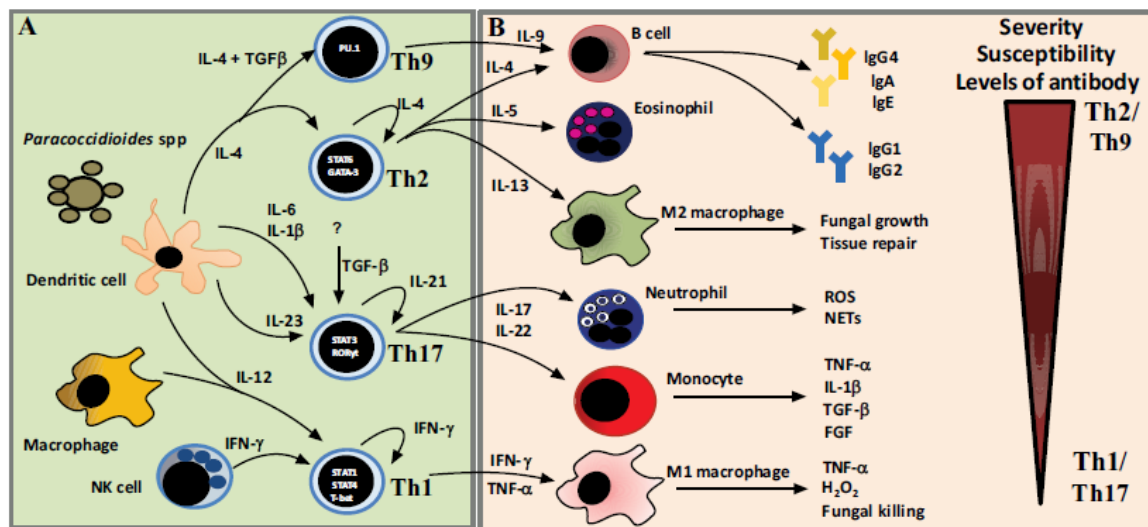
A resposta imune ao *Paracoccidioides sp.* se inicia após a inalação de conídios suspensos no ambiente, que ao chegar nos alvéolos sofre transição dimórfica para levedura. Na forma leveduriforme, o fungo é reconhecido pelas células epiteliais alveolares e células imunes residentes como macrófagos alveolares e células dendríticas por meio de seus receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como: Dectina-1, Galectina-3, receptores do tipo Toll (TLR2, TLR4, TLR3 e TLR9), receptor de manose (MR) e inflamassomas (NLRP3 e NLRC4) (LOURES et al., 2009; MENINO et al., 2013; TAVARES et al., 2013; LOURES et al., 2014; LOURES et al., 2015; KETELUT-CARNEIRO et al., 2015; KETELUT-CARNEIRO et al., 2019; JANNUZZI et al., 2019; HATANAKA et al., 2019; GIUSIANO, 2021; SOUZA et al., 2021).

Os macrófagos, neutrófilos e eosinófilos são as células da imunidade inata que se destacam na resposta imune ao *P. brasiliensis*. A importância dos macrófagos durante a PCM experimental é ilustrada em experimentos de depleção, no qual a ausência dessa população leva a redução da sobrevivência, perda do controle da replicação fúngica e intensa inflamação granulomatosa nos modelos murinos de suscetibilidade e resistência a PCM. (KASHINO et al., 1995). Sabe-se que essas células quando ativadas na presença de IFN- $\gamma$ , têm participação primordial na eliminação do patógeno mediante a produção de enzimas líticas e espécies reativas, das quais destaca-se o óxido nítrico (**Figura 6**) (GONZALEZ et al., 2000; MENDES et al., 2017).

Além dos macrófagos, os neutrófilos são também são células fundamentais durante a resposta imune ao *P. brasiliensis*. É descrito que essas células exercem sua função efetora através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), liberação de armadilhas extracelulares (NETs) (**Figura 6**) (MENDES et al., 2017). A deleção dessa população em camundongos da linhagem BALB/c durante a fase aguda de infecção por *P. brasiliensis* (48 e 96 horas pós infecção) leva a redução da sobrevivência desses animais associada com elevação do número de eosinófilos e da carga fúngica (PINO-TAMAYO et al., 2016). Por sua vez, a depleção dessas células durante a fase crônica de infecção (4 ou 8 semanas após infecção) favorece a

redução da resposta inflamatória granulomatosa e da carga fúngica além da redução de parâmetros associados a fibrose pulmonar na décima segunda semana de infecção (PUERTA-ARIAS et al., 2016).

O reconhecimento e a migração de células dendríticas para os linfonodos promove a ativação e diferenciação de linfócitos T *naïves*. A resposta imune adaptativa a PCM envolve a diferenciação de distintos subtipos de linfócitos T auxiliares (Th1, Th2, Th9, Th17 e Th22) (MENDES et al., 2017) (**Figura 6**).



**Figura 6. A polarização da resposta imune adaptativa na PCM.** Na PCM, linfócitos T auxiliares *naïves* se diferenciam em linfócitos efetores do subtipo Th1, Th2, Th9 e Th17) (A). Linfócitos Th1 secretam grandes quantidades de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que classicamente ativam macrófagos (M1) resultando da eliminação fúngica. A resposta Th17 secreta IL-17 e IL-22 que recruta neutrófilos e monócitos. Respostas Th2 através da secreção de IL-4 desencadeiam ativação de células B, seguida da produção de imunoglobulinas. A IL-5 promove o recrutamento de eosinófilos e a IL-13 é envolvida na indução de macrófagos alternativos (M2), que resulta em crescimento fúngico e reparo tecidual. A resposta Th9 leva a produção de IL-9 e IL21, que atuam de modo sinérgico com respostas Th2 para produção de anticorpos (B). *Adaptado de MENDES et al., 2017.*

A relevância de linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante a PCM pode ser destacada em pacientes com PCM associada com a infecção causada pelo HIV, dos quais 80% apresentam baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que desenvolvem pior prognóstico e apresentam maior taxa de mortalidade (aproximadamente 50%) (DE ALMEIDA; PEÇANHA; COLOMBO, 2019).

No leque de respostas mediadas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> que são protetoras a PCM, o subtipo Th1 secreta IFN- $\gamma$ , que juntamente com TNF- $\alpha$ , são de suma importância para indução de mecanismos microbicidas em macrófagos clássicos (M1), processo que resulta na eliminação do fungo. Camundongos deficientes de

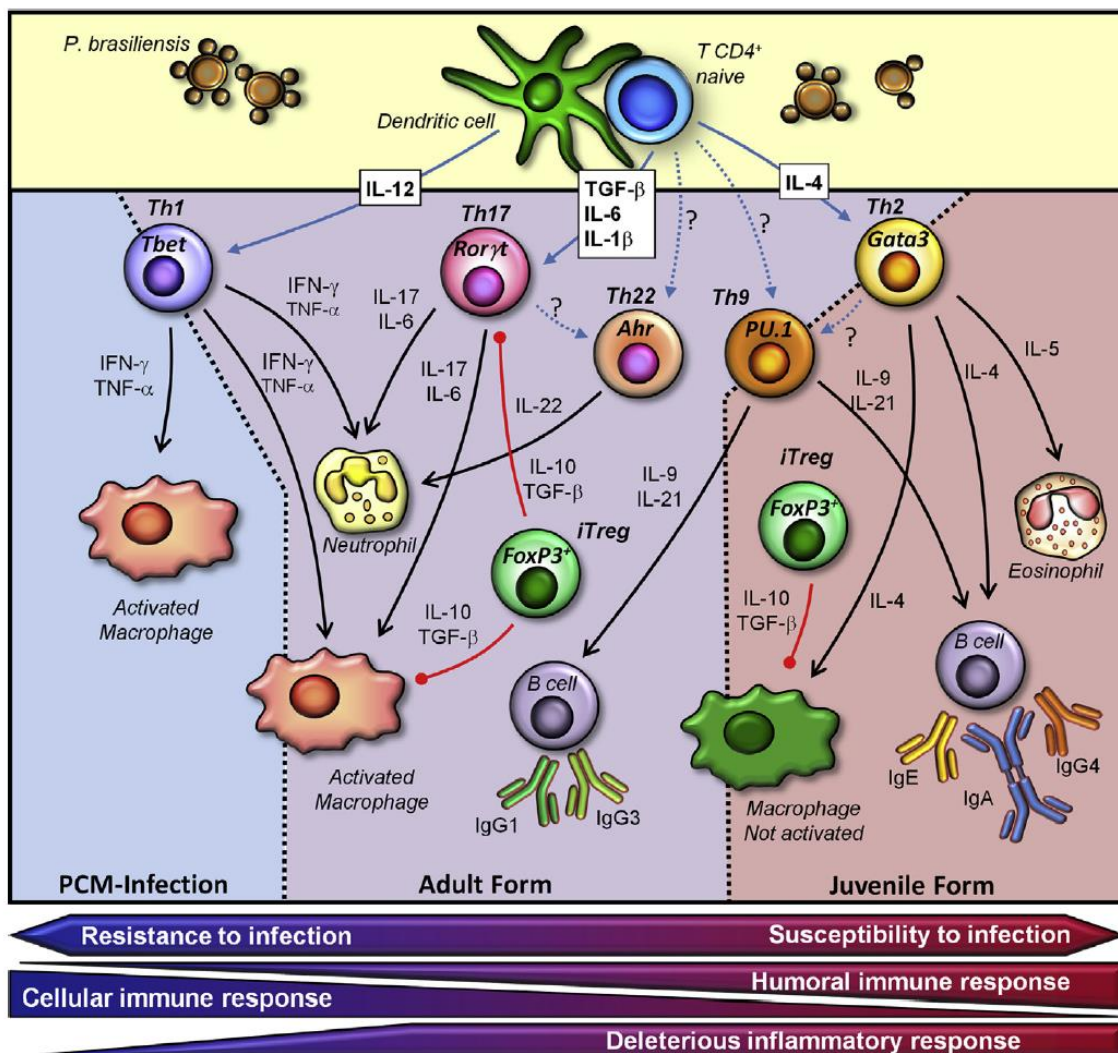
IFN- $\gamma$  são extremamente suscetíveis a infecção por *P. brasiliensis* com sobrevivência inferior a 20 dias. Esses animais, assim como em casos em que há ausência de TNF- $\alpha$ , produzem quantidades baixas de óxido nítrico, fator determinante para o controle do parasita (SOUTO et al., 2000; LIVONESI et al., 2009).

Outro subtipo de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que também desempenha papel crucial na proteção do hospedeiro contra o *P. brasiliensis* é o subtipo Th17. Na ausência da sinalização dessa citocina, camundongos geneticamente deficientes (IL-17RA<sup>-/-</sup>) desenvolvem resposta inflamatória difusa com granulomas imaturos com poucos linfócitos, além da elevação da carga fúngica quando comparados com controles (KETELUT-CARNEIRO et al., 2015; TRISTÃO et al., 2017).

Na categoria de respostas T CD4<sup>+</sup> que resultam na progressão da PCM, a indução de respostas do padrão Th2, com alta produção de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13. Nessa resposta, a IL-13 favorece a indução de macrófagos denominados alternativos (M2), a IL-5 desencadeia o recrutamento de eosinófilos, e a IL-4 a ativação e a produção de imunoglobulinas por células B. A indução de células Th9 é outro fator associado com a gravidade da PCM, essa resposta atua de modo sinérgico com respostas Th2, e são responsáveis pela indução de anticorpos (IgG4, IgA, IgE, IgG1 e IgG2) por células B (MENDES et al., 2017; CASTRO et al., 2013).

Além dos subtipos de linfócitos T auxiliares, as células T reguladoras (Tregs) estão presentes no infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com a forma aguda da PCM. Em camundongos susceptíveis a PCM, a depleção de Tregs proporciona aumento da sobrevivência desses animais. A ausência de Tregs contribui ainda, o controle da carga fúngica e a redução das áreas de lesão nos pulmões em modelos de susceptibilidade e resistência a PCM experimental (CASTRO et al., 2013; FELONATO et al., 2012).

Somada as respostas de células T CD4<sup>+</sup>, as células T CD8<sup>+</sup> também compõem o quadro da resposta imune a PCM. Pacientes com a forma ativa de PCM apresentam aumento da frequência dos subtipos CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Tc1) e CD8<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> (Tc10) na circulação quando comparados com indivíduos saudáveis (COSER et al., 2021). Nosso grupo mostrou a importância dessas células no controle da replicação fúngica em contextos em que há redução de respostas mediadas por células T CD8<sup>+</sup> (SOUZA et al., 2021).



**Figura 7. Modelo proposto para explicar a resposta imunológica desenvolvida por indivíduos resistentes ou suscetíveis a PCM.** A resistência a PCM pode ser caracterizada pelo predomínio de respostas Th1 e produção de IFN- $\gamma$ , que é imprescindível para a ativação de macrófagos e eliminação fúngica. A forma aguda/juvenil apresenta predomínio de respostas humorais, ativação do padrão Th2 (IL-4 e IL-5) e Th9 (IL-9). A IL-4 e a IL-9 são responsáveis pela indução de anticorpos IgG4 e IgE. A IL-5 leva a indução e ativação de eosinófilos. A IL-4 pode contribuir com a inibição da função de macrófagos. A fase crônica/adulta da doença apresenta predominância de respostas Th17 e Th22 com contribuição de respostas Th1, Th2 e Th9. Nesse grupo, células iTregs podem favorecer o controle da resposta inflamatória exacerbada e ao mesmo tempo inibir a ativação de macrófagos. O conjunto dessas respostas pode promover resistência parcial a infecção ou promover respostas inflamatórias exacerbadas, com a ativação de neutrófilos que podem desencadear dano tecidual e fibrose que são sequelas características desses pacientes. *Adaptado de CASTRO et al., 2013.*

No que diz respeito a resposta imunológica desenvolvida por indivíduos que não desenvolvem as manifestações clínicas da doença ou a forma leve da doença, sabe-se que essa resposta depende do predomínio da indução de respostas imunes do padrão Th1 em relação aos outros subtipos (**Figura 7**) (GIUSIANO, 2021).

Pacientes que desenvolvem a forma aguda/subaguda são não-reativos ao teste paracoccidiodina e desenvolvem respostas Th2 intensas, que suprimem



respostas Th1 e Th17. Nesses pacientes há predominância de respostas humorais (IgA, IgG4 e IgE) associadas com a presença de eosinófilos, células T reguladoras (Tregs) e auxiliares dos subtipos Th2 e Th9, com produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e TGF- $\beta$ . O conjunto dessas respostas não leva a indução de óxido nítrico e outros intermediários associados a eliminação do parasita, enquanto desencadeia ativação de macrófagos alternativos mediadas pela IL-4 e IL13, que são relacionados a persistência do parasita e patologia (**Figura 6 e 7**). (FRANCO, 1986; CASTRO et al., 2013; BERNARD et al., 2008; MENDES et al., 2017; BURGER et al., 2021; GIUSIANO, 2021).

O desenvolvimento da forma crônica da PCM é resultante de reativação de um foco latente decorrente da quebra de equilíbrio entre o fungo e o hospedeiro. A maioria desses pacientes apresentam reatividade para o teste de paracoccidiodina indicando que a resposta Th1 é mais preservada nesses pacientes. Esses pacientes desenvolvem respostas associadas com a resistência e a susceptibilidade a PCM. A literatura descreve que há predominância de repostas do padrão Th17 e Th22 associada a presença de respostas Th2, Th9 e Tregs, e de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- $\beta$  (**Figura 6 e 7**). É descrito que o conjunto dessas respostas contribui com resistência parcial a infecção. Outra característica proeminente de pacientes com a forma crônica é a presença de dano tecidual e fibrose com áreas extensas de deposição de colágeno na região do hilo além da deposição de fibras de reticulina no septo alveolar (CASTRO et al., 2013; MENDES et al., 2017; BURGER et al., 2021).

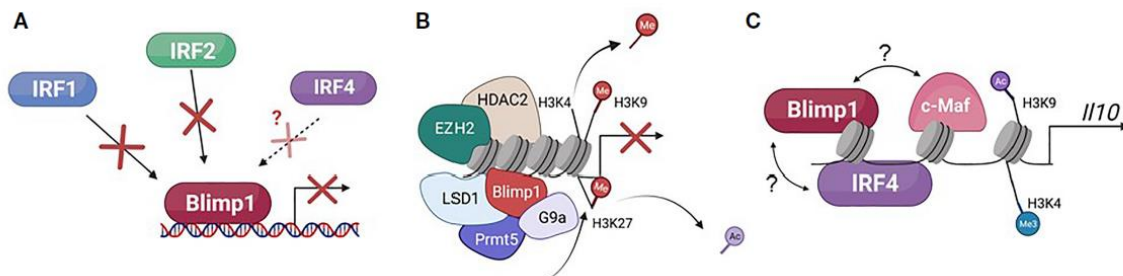
Dada o impacto dos distintos subtipos de linfócitos no desfecho da PCM, salientamos a importância da compreensão dos mecanismos que são primordiais para o desenvolvimento, diferenciação e função das células T. Dentre eles, vale a pena ressaltar o papel do fator de transcrição Blimp-1, que é altamente expresso em células T ativadas, regulando funções como: proliferação, exaustão, sobrevivência, migração e a diferenciação dessas células (FU et al., 2017). No tópico seguinte, abordaremos de modo mais detalhado acerca desse fator de transcrição.

### 1.3. Blimp-1: homeostase e ativação de linfócitos T

A proteína de maturação induzida em linfócitos B (Blimp-1) é um regulador transcricional e epigenético de genes alvo codificado pelo gene *Prdm1*. Foi inicialmente descrito em linfócitos B, no qual atua na regulação do desenvolvimento de plasmócitos e secreção de imunoglobulinas em respostas dependentes ou não de linfócitos T (**Figura 8**) (NADEAU; MARTINS, 2022).

Além da importância em linfócitos B, atualmente sabe-se que Blimp-1 também é expresso em linfócitos T, granulócitos, macrófagos, células epiteliais, neurônios da retina, células musculares e células germinais (FU et al., 2017).

De modo geral, os mecanismos de regulação mediados por Blimp-1 incluem: a competição e repressão de fatores de transcrição como IRF1, IRF2 e IRF4; recrutamento de cofatores que causam inibição da transcrição gênica após modificações na cromatina; e ativação da transcrição de IL-10 (**Figura 8**) (NADEAU; MARTINS, 2022).



**Figura 8. Mecanismos da regulação gênica mediados por Blimp-1.** (A) Blimp-1 pode reprimir a transcrição de genes alvos ao competir com ativadores transcricionais como IRF1, IRF2 e IRF4 pela ligação em diferentes genes-alvo. (B) Blimp-1 pode reprimir a transcrição de genes alvo através do recrutamento de co-fatores modificantes de cromatina que promovem modificações repressivas de cromatina como: HDAC2 (*histone de-acetylase 2, de-acetylates H3*), G9a (*lysine histone methyltransferase, H3K9 and H3K27*), EZH2 (*methylates H3K27*), LSD1 (*histone lysine demethylase, H3K4 and H3K9*) e Prmt5 (*di methylates arginine residues, H2A and H4*) (C) Ao se ligar diretamente ao seu locus gênico, Blimp-1 coopera com IRF4 ou c-Maf para ativar a transcrição de IL-10 em linfócitos T (NADEAU; MARTINS, 2022).

Em linfócitos T, a indução da transcrição gênica de Blimp-1 ocorre mediante:

- i) a ativação de receptores de reconhecimento de padrões como TLRs (mais precisamente TLR-4 e TLR-9), RIG-I e NOD, ii) estímulo do receptor de linfócitos T - TCR, e iii) sinalização das citocinas como IL-2 e IL-4 (MARTINS; CALAME, 2008).

Martins e colaboradores demonstraram que Blimp-1 é detectado em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> *naives* – CD44<sup>lo</sup>CD62L<sup>hi</sup>, e sua expressão gênica é regulada positivamente em células T: reguladoras, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetoras (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>lo</sup>) e de memória (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup>) (MARTINS et al., 2006). Kallies e colaboradores complementaram esses dados usando técnica de fenotipagem demonstrando que Blimp-1 é expresso em células T: reguladoras, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> efetoras e de memória (KALLIES et al., 2006).

Uma das primeiras abordagens com foco no entendimento do papel de Blimp-1 em linfócitos T *in vivo*, usou camundongos Rag1<sup>-/-</sup> letalmente irradiados reconstituídos com células progenitoras derivadas de fígado fetal provenientes de embriões deficientes de Blimp-1 (*Prdm1*<sup>gfp/gfp</sup>). Esse estudo mostrou que, em relação aos controles, camundongos *Prdm1*<sup>gfp/gfp</sup> apresentam expansão de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> com um fenótipo ativado ou de memória no baço. Além disso, esses animais desenvolvem síndrome hiper-proliferativa de linfócitos de forma letal, que é identificada pela presença de intensa resposta inflamatória, contendo extensivo infiltrado linfocitário (de células produtoras IFN- $\gamma$ ) e dano tecidual em múltiplos órgãos, incluindo pulmões, fígado e intestino (KALLIES et al., 2006).

Em estudo semelhante, Martins e colaboradores mostraram que camundongos deficientes de Blimp-1 especificamente em linfócitos T (CKO) desenvolvem colite espontânea, contendo infiltrado de linfócitos. Uma análise mais detalhada das populações celulares demonstrou que camundongos CKO e controles não apresentam diferenças em relação ao número total de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> esplênicas, mas que em comparação aos controles camundongos CKO apresentam: i) redução da frequência de células *naives* CD62L<sup>hi</sup> CD44<sup>lo</sup> e, ii) maior frequência e número total de células efetoras CD62L<sup>lo</sup> CD44<sup>hi</sup> em órgãos linfoides periféricos revelando que esses animais manifestam fenótipo de ativação anormal. Não há diferenças entre os grupos em relação ao número de células de memória CD62L<sup>hi</sup> CD44<sup>hi</sup> (MARTINS et al., 2006).

Ensaio conduzido por Kallies e colaboradores explicitaram que o aumento no número de células com fenótipo ativado observado em populações de células T policlonais também é notado em células T CD8<sup>+</sup> de memória antígeno específicas, ou seja, em relação aos controles, camundongos *Prdm1*<sup>gfp/gfp</sup> infectados com HSV

- Herpes-Vírus Simples – apresentam número elevado de células de memória específicas ao HSV (KALLIES et al., 2006).

Usando camundongos  $Rag^{-/-}$  reconstituídos com uma mistura de células hematopoiéticas  $Prdm1^{gfp/gfp}$  : C57BL/6, - proporção 1:1, Kallies e colaboradores evidenciaram através da avaliação dessas células no baço de animais  $Rag^{-/-}$  que, mesmo submetidos a condições semelhantes, a proporção de linfócitos T  $CD4^{+} Prdm1^{gfp/gfp} CD62L^{lo}$  (efetores/memória) é 3.8 vezes superior que a proporção de células de T  $CD4^{+} C57BL/6 CD62L^{lo}$ , enquanto a proporção de células T  $CD8^{+} Prdm1^{gfp/gfp}$  ativadas é 2.9 vezes superior à de células controles ativadas. Usando esse mesmo delineamento experimental, observou-se elevação na frequência de células de memória específicas após infecção desses animais quiméricos com HSV, salientando que a expansão do *pool* de células ativadas característica das células  $Prdm1^{gfp/gfp}$  é uma propriedade intrínseca da célula T (KALLIES et al., 2006).

Em outro experimento adicional, o mesmo grupo expôs que a expansão de células  $Prdm1^{gfp/gfp}$  ativadas não é devido a resposta aberrante em decorrência de estimulação antigênica, mas em virtude de alterações na regulação da homeostase dessas células. Nesse ensaio, baço de camundongos  $Rag^{-/-}$  foram avaliados quanto ao número de células T esplênicas após a transferência adotiva de linfócitos T  $CD4^{+}$  ou  $CD8^{+} Prdm1^{gfp/gfp}$  ou C57BL/6. Após 3-4 semanas, observou-se que células  $CD4^{+}$  ou  $CD8^{+} C57BL/6$  responderam a esse ambiente linfopênico com capacidade de expansão homeostática limitada (menor número absoluto) em relação a capacidade de expansão observada pelas células  $CD4^{+}$  ou  $CD8^{+} Prdm1^{gfp/gfp}$ , que apresentaram fenótipo ativado. Esses dados indicam que células T deficientes de Blimp-1 apresentam um processo expansivo desregulado o que resulta no acúmulo dessas células na periferia (KALLIES et al., 2006).

Alguns dos mecanismos associados a expansão de células T efetoras *in vivo* foram explorados: i) por Martins e colaboradores que demonstraram por meio de ensaios envolvendo o estímulo de linfócitos T  $CD4^{+}$  *naives* com  $\alpha$ - CD3,  $\alpha$ - CD28 e IL-2 (na presença de baixa densidade celular) ou apenas  $\alpha$ - CD3, que células CKO possuem vantagem proliferativa em relação as células de controles (MARTINS et al., 2006). Corroborando com esses dados, usando esplenócitos provenientes de camundongos Blimp-1 transgênicos, Lin e colaboradores salientaram o envolvimento de Blimp-1 na regulação negativa da capacidade proliferativa de esplenócitos. Esses

autores também mostraram que células CD4<sup>+</sup> CKO secretam mais IL-2 e expressam mais CD69<sup>+</sup> (marcador de ativação celular) (LIN et al., 2013); ii) e por Kallies e colaboradores que também revelaram que células *Prdm1*<sup>gfp/gfp</sup> estimuladas  $\alpha$ - CD3,  $\alpha$ - CD28 são menos susceptíveis a morte celular por apoptose que células controles, indicando que células *Prdm1*<sup>gfp/gfp</sup> possuem defeitos na indução de mecanismos de morte celular (KALLIES et al., 2006). Esses dados sugerem que Blimp-1 afeta a ativação, proliferação e sobrevivência de células T, e que esses são possíveis mecanismos associados com a expansão de células T deficientes de Blimp-1.

Em resumo, os estudos desenvolvidos por Kallies e Martins et al., demonstram que a ausência desse fator de transcrição nas células T promove a expansão dessas células com um fenótipo ativado, o que cursa com o desenvolvimento de patologia mediada por células T em murinos.

Na interface Blimp-1- Tregs, Cretney e colaboradores mostram que 8-12% das células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> presentes no baço de camundongos *naives* expressam Blimp-1. Essa proporção sobe para 20% em camundongos idosos. Nessas células a expressão de CD62L é baixa, o que indica que Tregs que expressam Blimp-1 compõem o quadro de células Tregs efetoras. Outra informação interessante desse estudo expôs que a expressão de IL-10 é confinada a células Tregs que expressam Blimp-1 (CRETNEY et al., 2011).

Martins e colaboradores mostraram que não há diferenças em relação a frequência e número absoluto de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> no timo, baço ou linfonodos entre animais CKO e WT (MARTINS et al., 2006). Adicionalmente, ao comparar a população de células esplênicas CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> *Prdm1*<sup>gfp/gfp</sup> e CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> WT, Kallies e colaboradores demonstraram que Blimp-1 é dispensável para formação de células CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (KALLIES et al., 2006).

Em adição, através da análise de compartimentos de linfócitos de camundongos reconstituídos com mistura de células hematopoiéticas deficientes (*Blimp1*<sup>GFP/GFP</sup>) ou não de Blimp-1 (WT), Cretney e colaboradores salientam que: i) Blimp-1 não é requerido para geração de células Tregs efetoras (ICOS<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>); ii) células Tregs *Blimp1*<sup>GFP/GFP</sup> não possuem habilidade de secretar IL-10; iii) camundongos quiméricos apresentam a mesma quantidade de células Tregs WT e *Blimp1*<sup>GFP/GFP</sup> nos linfonodos, o que indica que Blimp-1 não afeta a homeostase de células Tregs *naives*; iv) camundongos quiméricos apresentam abundância de Tregs

*Blimp1*<sup>GFP/GFP</sup> em comparação a Tregs WT no baço e placa de Peyer, além do aumento da frequência de células Foxp3<sup>+</sup> no epitélio gastrointestinal e lavado broncoalveolar, o que sugere que Blimp-1 afeta a homeostase de células Tregs efectoras (CRETNEY et al., 2011).

No quesito funcional de células Tregs, ensaios *in vitro* consentem que Blimp-1 é dispensável em Tregs para execução de sua função supressora na proliferação de linfócitos efetores (KALLIES et al., 2006; MARTINS et al., 2006).

No ensaio de avaliação da função de Tregs em modelo *in vivo* publicado por Martins e colaboradores, esses autores expuseram que, divergente da proteção conferida por células Tregs selvagens, a transferência de células Tregs CKO não impede o desenvolvimento de colite aguda experimental desencadeada em animais selvagens após administração oral de Dextran Sulfato de Sódio – DSS. Esse dado indica que função das células Tregs CKO *in vivo* é defeituosa (MARTINS et al., 2006).

Em ensaio similar, conduzido por Kallies e colaboradores, a proteção mediada por células Tregs foi avaliada através da transferência de células Tregs *Prdm1*<sup>gfp/gfp</sup> ou controles para camundongos Rag<sup>-/-</sup> submetidos a modelo de colite desencadeada pela transferência de células efectoras (T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>). Nesse ensaio, ambas as transferências foram igualmente protetoras frente ao desenvolvimento da colite experimental, sugerindo nesse estudo, que Blimp-1 é dispensável função adequada de células Tregs *in vivo* (KALLIES et al., 2006). Sendo assim, o papel de Blimp-1 em Tregs *in vivo* ainda não é claro.

Além de requerido para produção de IL-10 em células T reguladoras, Blimp-1 também é essencial para produção dessa citocina em células Tr1 e Th1 (KALLIES et al., 2006; CRETNEY et al., 2011; OCA et al., 2016; NEUMANN et al., 2014; PARISH et al., 2014).

Em relação a importância de Blimp-1 na diferenciação e função linfócitos T auxiliares, *in vitro*, estudos publicados demonstram Blimp-1 atenua a diferenciação de células Th9 e Th17, mas não afeta a capacidade de diferenciação de células Th1 e Th2, de linfócitos T *naives* estimulados em condições polarizantes para cada subtipo (KALLIES et al., 2006; CIMMINO et al., 2008; LIN et al., 2013; BENEVIDES et al., 2019).

No que se refere a expressão de Blimp-1 em subtipos de linfócitos T auxiliares, Cimmino e colaboradores mostram através de ensaios *in vitro* com células T *naives* submetidas a condições de diferenciação Th1 e Th2, que esse fator de transcrição é mais expresso em células Th2 que em células Th1 (CIMMINO et al., 2008). Através de ensaios envolvendo o estímulo de células T CD4<sup>+</sup> *naives* com  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD28 e IL-2, Kallies e Cimmino et al., demonstraram que após reestímulo, células CKO apresentam maior frequência de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> que células WT (MARTINS et al., 2006; CIMMINO et al., 2008). Nessas mesmas condições foi demonstrado por meio da análise de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) que Blimp-1 reprime os genes *ifng* e *tbx21*, que são fatores de transcrição críticos para a diferenciação Th1. Outro achado interessante desse estudo foi que o estímulo de células T CD4<sup>+</sup> *naives* em condições neutras ( $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD28 e IL-2) desencadeia a expressão gênica de Blimp-1, que é intensificada na presença de IL-4 e atenuada da presença de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (CIMMINO et al., 2008).

*In vivo*, Lin e colaboradores demonstraram através da análise transcricional de células T CD4<sup>+</sup> esplênicas que há regulação positiva da transcrição gênica de *Tbx21* e *Ifng* em células CKO, ao passo que esses transcritos são regulados negativamente em células esplênicas que apresentam ganho de função de Blimp-1 (Tg), quando comparados aos controles. Corroborando com esses dados, células Tg esplênicas estimuladas possuem proporção limitada de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, e produção diminuída de IFN- $\gamma$  em relação as células controles (LIN et al., 2013). Em resumo, esses ensaios mostram que Blimp-1 atenua respostas Th1.

No que diz respeito ao papel de Blimp-1 nas células Th2, em outro estudo recente, usando camundongos deficientes de Blimp-1 em células CD4<sup>+</sup> (Blimp-1<sup>CD4Cre</sup>) e controles *wild type* submetidos ao modelo de asma desencadeada por antígenos de ácaro da poeira doméstica (*house dust mite* - HDM), He e colaboradores demonstraram que animais Blimp-1<sup>CD4Cre</sup> apresentam redução drástica da frequência de células Th2 tanto nos pulmões como no linfonodo mediastino (menos de 1% de todas as células T CD4<sup>+</sup>). Para avaliar se Blimp-1 era requerido para diferenciação de células Th2, He e colaboradores desenvolveram um experimento elegante, que envolveu indução da inflamação alérgica em camundongos Rag<sup>-/-</sup> letalmente irradiados reconstituídos com mistura de células hematopoiéticas (Blimp-1<sup>CD4Cre</sup> : C57BL/6, - proporção 1:1). Esse ensaio revelou

redução da frequência de células Th2 Blimp-1<sup>CD4Cre</sup> em comparação a frequência de células Th2 C57BL/6 nos pulmões. Em experimento similar, não houve alterações na frequência de células Th2 nos pulmões de camundongos Rag<sup>-/-</sup> reconstituídos com mistura de células hematopoiéticas *wild type* Thy 1.1 e Thy 1.2. Coletivamente, esses ensaios salientam que Blimp-1 é intrinsecamente requerido em células T para diferenciação de células Th2 *in vivo* (HE et al., 2020).

Interessantemente, usando distintos modelos experimentais *in vivo* que cursam com a indução de células Th2, He et al., constataram que a função de Blimp-1 na diferenciação e função de células T varia de acordo com a rota de imunização e o local de apresentação para células T. De modo mais detalhado, He et al., descreveram que o contato de camundongos deficientes de Blimp-1 em células CD4<sup>+</sup> (Blimp-1<sup>CD4CRE</sup>) com antígenos por via intranasal, como acontece no modelo de asma alérgica que envolve repetidas administrações por via intranasal de antígenos de ácaro da poeira doméstica (*house dust mite* - HDM), inibe o desenvolvimento da inflamação característica da asma alérgica, devido à redução drástica da presença de células Th2 nos pulmões e linfonodos mediastinais em relação aos controles. Resposta semelhante foi observada em camundongos Blimp-1<sup>CD4CRE</sup> imunizados por essa mesma via com antígeno de ovo solúvel (SEA) de *Schistosoma mansoni*. Por sua vez, a administração de HDM por via subcutânea na pata de camundongos Blimp-1<sup>CD4CRE</sup> desencadeia elevação da frequência de células Th2 no linfonodo popliteal em relação aos controles. Coletivamente esses ensaios mostram que intrinsecamente em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, Blimp-1 pode resultar em atenuação ou exacerbação de respostas Th2 (HE et al., 2020)

Aspectos relacionados a inibição da expansão de populações Th9 por Blimp-1 foram reportadas por Benevides e colaboradores em uma série de ensaios que demonstraram que : i) células esplênicas WT estimuladas possuem percentual diminuído de células CD4<sup>+</sup> IL-9<sup>+</sup> e de produção de IL-9 em comparação a células CKO; ii) quando células *naïves* são submetidas a condições polarizantes para Th9, células CKO mostram maior expressão gênica e proteica de IL-9 que células WT; iii) não há indução da expressão de Blimp-1 durante a diferenciação Th9; iv) Blimp-1 atenua a gravidade da asma alérgica desencadeada por OVA; v) a neutralização de IL-9 no grupo CKO reflete em redução da patogenicidade dessa doença; v)



células de pacientes asmáticos Tg expressam menos IL-9 que as respectivas controles (BENEVIDES et al., 2019).

Em relação a resposta Th17, após investigação da transcrição de genes associados com a resposta Th17, Lin e colaboradores expuseram que a expressão de *Rora*, *Rorc*, *Il17a*, *Il17f*, *Il22* e *Il23r* é modulada positivamente em células CKO (independentemente da idade do animal ou da presença de estímulo *in vitro*) em relação as células controles, em contrapartida, a expressão desses genes sofre modulação negativa em células Tg. Em outro dado adicional, Lin et al., demonstraram que células Tg *naïves* submetidas a condições polarizantes para Th17, são menos aptas a se diferenciarem para esse subtipo celular (examinadas pela % células Th17, expressão por célula e secreção de IL-17) que células controles *naïves*. Divergentemente, células CKO *naïves* são mais propensas a diferenciação Th17 que células controles *naïves*. Coletivamente, esses dados mostram que Blimp-1 possui função inibitória na diferenciação de células Th17 (LIN et al., 2013).

Nos últimos anos muitos grupos de pesquisa, focaram no entendimento do papel de Blimp-1 em diferentes contextos, com intuito de promover esse fator de transcrição a potencial candidato a alvo terapêutico. Nosso grupo, com o mesmo interesse mostrou sua importância no controle da inflamação alérgica e na limitação de respostas Th1 no modelo de infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi* (BENEVIDES et al., 2009; BENEVIDES et al., 2023). Visando novas abordagens terapêuticas para o tratamento da PCM experimental, nossa proposta nesse estudo é compreender o papel de Blimp-1 na regulação da resposta imune durante a PCM experimental com o intuito de, em abordagens futuras, ao modular positivamente ou negativamente esse fator de transcrição, garantir a indução de respostas protetoras a PCM experimental. Nossa hipótese é que a infecção por *P. brasiliensis* modula positivamente a expressão de Blimp-1 em linfócitos T desencadeando a inibição de respostas imunes protetoras a PCM experimental.

# ***Objetivos***

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar o papel do fator de transcrição Blimp-1 na regulação da resposta imune durante a infecção sistêmica pelo fungo *P. brasiliensis*.

### **2.2. Objetivos específicos**

Determinar o papel de Blimp-1 em linfócitos T no controle da infecção induzida pelo fungo *P. brasiliensis*;

Determinar o papel de Blimp-1 em linfócitos T no desenvolvimento da resposta inflamatória granulomatosa ao *P. brasiliensis* no tecido pulmonar;

Determinar se a ausência de Blimp-1 em linfócitos T altera o perfil de leucócitos presentes no tecido pulmonar de animais infectados;

Investigar a participação de Blimp-1 em linfócitos T na atividade funcional das populações celulares presentes nos pulmões após infecção;

# ***Material e Métodos***

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Declarações Éticas

Todos os procedimentos envolvendo o uso de camundongos nessa pesquisa estão de acordo com os preceitos da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e aprovados pela Comissão de Ética No Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP (Protocolo número 1164/2023) (Anexo 1).

#### 3.2. Animais experimentais

Os camundongos machos *Blimp-1<sup>ff</sup> CD4<sup>Cre+</sup>* e *Blimp-1<sup>ff</sup> CD4<sup>Cre-</sup>* foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP) em caixas com dimensões 30 x 20 x 13 cm contendo maravalha, ração e água sem restrição, em ambiente controlado quanto a temperatura (20 – 26 °C), umidade (40 e 60%) e ciclo de 12h de claro e 12h de escuro.

#### 3.3. Cultura de leveduras de *P. brasiliensis*, preparo de inóculo e infecção

O *P. brasiliensis* cepa 18 foi cultivado em meio BHI (Brain Heart Infusion)-ágar suplementado com 5% de soro fetal bovino e glicose em estufa à 37°C. Para infecção, as colônias de fungo foram transferidas das placas de BHI-ágar para 100 mL de meio F12 suplementado com 10% de SFB (pH 7,2) e mantidas à 37°C, sob agitação de 150 rpm, por 24h. No dia seguinte, o meio de cultura foi descartado após centrifugação (1500 rpm por 5 minutos) e as leveduras ressuspendidas em tampão fosfato estéril - PBS 1X, pH 7,2. Para avaliação da viabilidade das leveduras, uma alíquota de 100 µL da suspensão fúngica foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, 37°C, por 10 minutos com 100 µL diacetato de fluoresceína (DAF) (2 µg/mL) e 100 µL brometo de etídeo (50 mg/ mL). A visualização de 90% de leveduras DAF positivas (ou seja, viáveis) foi considerável aceitável para infecção. As células fúngicas tem a

propriedade de acumular fluoresceína (fluocromasia) enquanto o brometo de etídeo penetra rapidamente em células danificadas. Outra alíquota de suspensão fúngica foi retirada para contagem das formas leveduriformes presentes na suspensão fúngica em câmara de Neubauer, que foi ajustada a concentração final de  $1 \times 10^7$  leveduras/ mL. Para infecção, camundongos machos, com 8 semanas de idade previamente anestesiados, foram infectados por via intravenosa, pelo plexo retro-orbital (agulha 8 mm comprimento, calibre 0,3mm) com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18 suspensas em 100 $\mu$ L de PBS1X.

#### **3.4. Recuperação de fungos e contagem de unidades formadoras de colônia (CFU)**

Para a recuperação de fungos viáveis, o lóbulo direito inferior do pulmão de animais infectados com Pb18 foi pesado e homogeneizado em 1 mL de solução inibidora de protease (Complete®, Rocher, Mannheim, Alemanha). Em seguida, 50  $\mu$ L do homogenato obtido foram diluídos em 450  $\mu$ L de PBS 1X e, 100  $\mu$ L dessa diluição semeadas em placas de Petri estéreis descartáveis (90x15mm, Corning, NY, EUA) contendo meio BHI-ágar enriquecido com 48  $\mu$ g/mL de gentamicina, 5% de soro fetal bovino e 5g de D(+) Glicose Anidra (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Merk). As placas foram mantidas por 15 dias em estufa 37°C e a recuperação de fungos viáveis determinada através da contagem de unidades formadoras de colônia. Os resultados foram expressos como CFU/ grama de tecido.

#### **3.5 Análise histopatológica das lesões**

O lóbulo esquerdo de pulmão de camundongos infectados ou não com Pb18 foram coletados e fixados em formol tamponado por 48 horas. Após esse período, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70-100%) e clarificados em xilol. Após inclusão em parafina, cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram dispostos em lâminas e incubadas a 60°C para fixação. Em seguida, as lâminas contendo o corte foram lavadas com xilol, concentrações decrescentes de álcool (absoluto a 80%) e coradas com os seguintes corantes: hematoxilina e eosina (H&E) (para análise do infiltrado inflamatório e resposta granulomatosa), coloração de Grocott (

para identificação das estruturas fúngicas), corante para marcação das fibras reticulares e deposição de colágeno (para identificação da formação e estrutura granulomatosa). Uma vez desidratadas com concentrações crescentes de álcool (de 80% ao absoluto) e lavadas com xilol, as lâminas foram montadas com Entellan (Merk). Os fragmentos de tecidos depositados em lâminas histológicas foram analisados com auxílio de microscópio ótico comum acoplado à câmera digital (Olympus DP74 Color Microscope Camera).

### **3.6 Isolamento de leucócitos do pulmão**

Para digestão do tecido pulmonar, pulmões fragmentados por ação mecânica foram incubados durante 30 minutos a 37°C em meio RPMI-1640 contendo 500 mg/mL de Colagenase do tipo II (Gibco). Após esse período, a ação da Colagenase do tipo II foi suspensa pela adição de RPMI-1640 contendo 5% de soro fetal bovino - SFB (Gibco). Em seguida, os fragmentos após digestão foram filtrados através de poros de 100 µm e a suspensão obtida centrifugada e ressuspendida em 1 mL de tampão de lise de hemácias. Após 1 minuto, a reação foi suspensa com PBS 1X e após centrifugação e adição de 1 mL de RPMI-1640 contendo 5% de SFB, as células foram contadas com auxílio de câmera de Neubauer.

### **3.7 Citometria de Fluxo**

Para a marcação de moléculas de superfície,  $2 \times 10^6$  células foram separadas. Para marcação de moléculas intracelulares,  $2,5 \times 10^6$  células foram previamente colocadas em cultura contendo RPMI-1640, 5% SFB, 1% penicilina/estreptomicina, 1% piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% L-glutamina, 0.1% de 2-mercaptoetanol, 50 ng/mL de PMA (acetato de formol miristato), 500 ng/mL de ionomicina e 1 µL/mL de brefeldina por 4 horas em estufa 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para ambos os protocolos, as células foram lavadas com PBS 1X e marcadas com sonda de viabilidade (Zombie Aqua Fixable, Biolegend), 20 minutos a temperatura ambiente. Para marcação de moléculas de superfície, as amostras foram lavadas e após bloqueio de ligações inespecíficas com 40 µL de anticorpo anti-mouse CD16/32 (BioLegend) por 20 minutos a 4°C, foram adicionados 20 µL dos anticorpos diluídos

em PBS1X. Para marcação de moléculas intracelulares, as amostras foram lavadas com tampão de permeabilização (PBS1 X contendo 0,5% de saponina), seguida de bloqueio de ligações inespecíficas com 40 µL de anticorpo anti-mouse CD16/32 (BioLegend) por 20 minutos a 4°C, e adição de 20 µL dos anticorpos diluídos em tampão de permeabilização. O citômetro BD FACS Symphony™ A1 foi usado para aquisição de 200.000-400.000 eventos totais. O programa *FlowJo* foi usado para análise dos dados obtidos após aquisição. Para esses ensaios foram usados anticorpos para os seguintes marcadores: CD11c (clone N418), CD11b (clone M1/70), MHC-II (clone M5/114.15.2), CD64 (clone X54-5/7.1), Ly6G (clone 1A8), Siglec F (clone E50-2440), CD3 (clone 145-2C11), TCR  $\gamma\delta$  (clone GL3), CD8 (clone 53-6.7), CD4 (clone RM4-5), iNOS (clone W16030C), IFN- $\gamma$  (clone XMG1.2), IL-17 (clone TC11-18H10.1), IL-4 (clone 11B11), perforina (clone S16009A) e granzima (clone GB11). Todos os anticorpos usados foram da BD Bioscience ou Biolegend conjugados com diferentes fluorocromos: FITC, PE, APC, BV421, BV605, APC-CY7, AF700, AF488, PE-CY7, PE-CY5, PE-DAZZLE 594, BV650, BV711, PACIFIC-BLUE, BV786 e PERCP-CY5.5.

### 3.8 Imuno-histoquímica

Para reação de imuno-histoquímica, o lóbulo esquerdo do pulmão fresco foi incorporado em meio Tissue-Tek® O.C.T, e congelado com auxílio de nitrogênio líquido. Cortes de 5 µm foram dispostos em lâminas (StarFrost®, Knittel glass) e fixadas com acetona 100%, -20°C durante 10 minutos. Após secagem completa do corte em temperatura ambiente (TA), as lâminas foram lavadas com PBS 1X e tratadas com peróxido de hidrogênio 3%, por 30 minutos, TA. As etapas seguintes foram executadas com auxílio do kit MACH1™. O bloqueio da avidina e biotina endógena foi realizada com uso de avidina/biotina (MACH1™) por 15 minutos, seguida de incubação com anticorpo primário para marcação de iNOS (M-19, Santa Cruz Biotechnology - Cat# sc-650 ) diluído em PBS1X, por 1h e 30 min à temperatura ambiente. Após adição do complexo avidina-biotina peroxidase (MACH1™), por 30 minutos, TA, foi adicionado diaminobenzidina (DAB) (MACH1™) até a revelação da reação. Após lavagem com água, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e desidratadas com concentrações decrescentes de álcool (80%-álcool



absoluto) e tratadas com xilol. Uma vez montadas com Entellan (Merk) foram analisadas com auxílio de microscópio ótico comum acoplado à câmera digital (Olympus DP74 Color Microscope Camera).

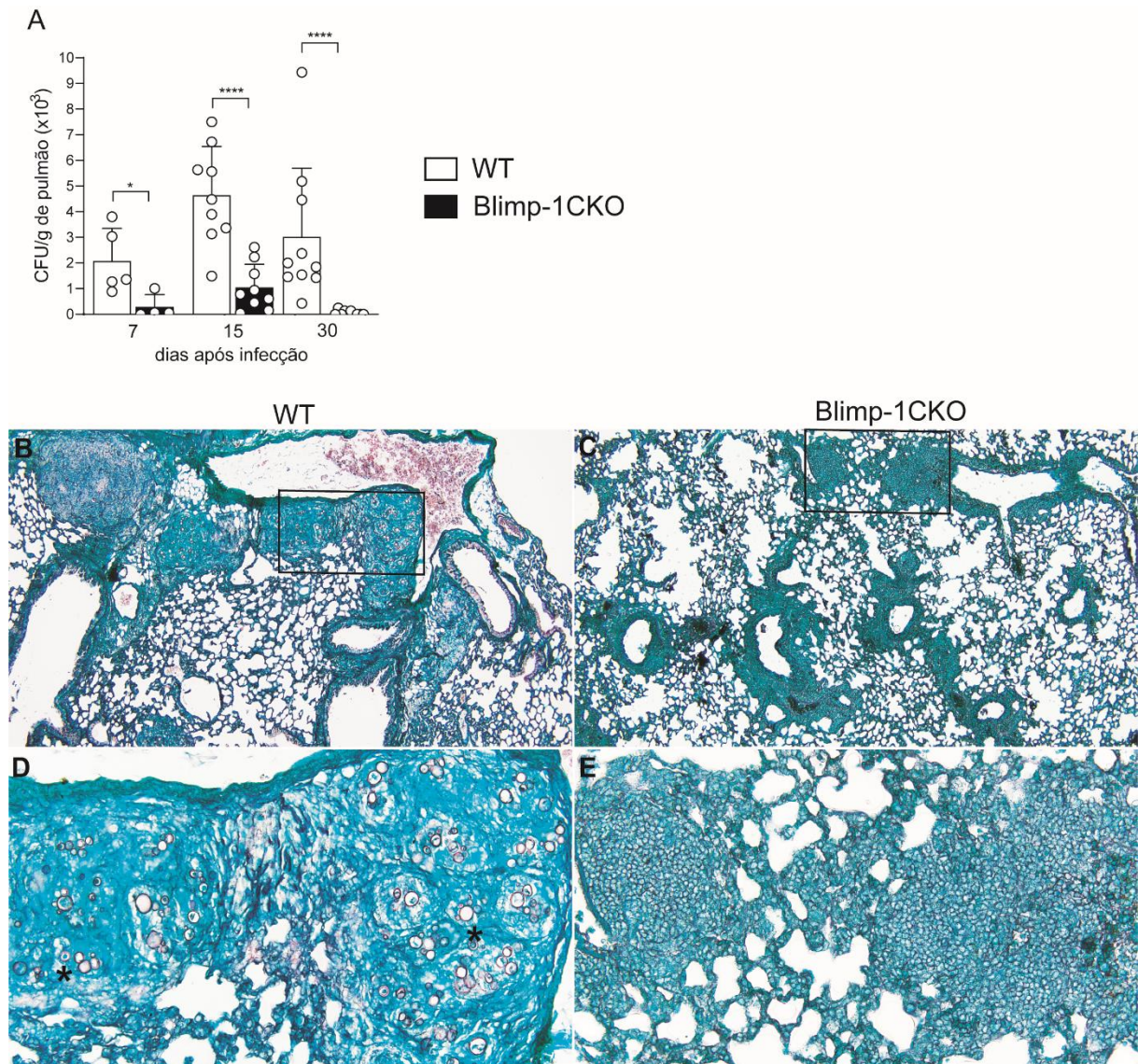
# ***Resultados***

## 4. RESULTADOS

### 4.1. A sinalização via Blimp-1 está associada ao aumento da carga fúngica na PCM experimental

Para determinar o papel de Blimp-1 no controle da infecção por *P. brasiliensis* (Pb18), camundongos deficientes de Blimp-1 em linfócitos T (Blimp-1CKO) e controles selvagens saudáveis (WT) foram infectados por via intravenosa com Pb18. Nos dias 7, 15 e 30 pós-infecção (p.i), o tecido pulmonar desses animais foi coletado e a recuperação de leveduras viáveis foi determinada pelo ensaio da contagem de unidades formadoras de colônias (CFU). Durante o curso da infecção fúngica, observamos que os animais Blimp-1CKO apresentaram uma redução significativa de CFU no tecido pulmonar quando comparados com os animais controles nos diferentes tempos avaliados (**Fig. 9 A**).

Em seguida, a partir de cortes histológicos confeccionados a partir do lóbulo esquerdo dos pulmões submetidos a coloração por impregnação por prata - técnica de Grocott analisamos a presença de estruturas fúngicas no interior dos granulomas. No 30 dia p.i., no tecido pulmonar dos animais WT observamos granulomas compactos, e no interior dos mesmos é possível observar grande número de fungos em agrupamentos ou cachos, alguns com brotamentos simples ou múltiplos “em roda de leme” (processo de reprodução fúngica) (**Fig. 9 B e D**). No entanto, no tecido pulmonar dos animais Blimp-1CKO, na maioria das regiões do granuloma não foi possível detectar as estruturas fúngicas (**Fig. 9 C e E**), corroborando com os dados da contagem de unidades formadoras de colônias. Esses dados em conjunto indicam que a sinalização de Blimp-1 em linfócitos T impede o controle da replicação fúngica, conferindo susceptibilidade a PCM experimental.



**Figura 9. Blimp-1 favorece a progressão da PCM experimental.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Nos dias 7, 15 e 30 dias p.i. o lóbulo inferior direito do pulmão foi coletado, macerado e plaqueado em meio de cultura BHI : ágar e (A) o número de unidades formadoras de colônias (CFU) foi determinado de acordo com a diluição e o peso dos animais. (B) No dia 30 p.i., o Pb18 foi identificado no pulmão dos respectivos animais após a coloração do tecido pelo método de Grocott no (B e C) aumento de 100x e (D e E) de 400x. Os dados representam a média  $\pm$  SEM (or SD) de 3-6 animais por grupo experimental de três experimentos independentes. \* $p < 0,05$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , conforme determinado pelo teste t de Student. WT = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre-</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.

#### 4.2. Blimp-1 modula a resposta inflamatória granulomatosa durante a PCM experimental

Na perspectiva de compreender o papel da expressão de Blimp-1 em linfócitos T na resposta inflamatória granulomatosa durante a PCM experimental, nesta etapa, confeccionamos cortes parafinados de 5 µm de espessura de pulmões provenientes de ambos os grupos experimentais infectados e coramos com hematoxilina e eosina.

Na primeira semana de infecção, não observamos diferenças significativas na análise histopatológica nos pulmões dos animais WT e Blimp-1CKO infectados nos grupos analisados (**Fig. 10 A-D**). Porém, na segunda semana de infecção, notamos que o grupo Blimp-1CKO apresentou um infiltrado de células mononucleares mais intenso, onde observou-se alterações na arquitetura pulmonar associadas a redução do espaço aéreo (**Fig. 10 F e H**). No parênquima, há regiões de colapso alveolar difusas pelo tecido, associado a intenso infiltrado inflamatório misto difuso. Por sua vez, o grupo controle mostrou espaço aéreo com comprometimento leve e focal, somado a presença de infiltrado inflamatório misto (associado a presença do *P. brasiliensis*) com predominância de células mononucleares (**Fig. 10 E e G**). Esse dado sugere que na segunda semana de infecção, a expressão de Blimp-1 limita o acúmulo de leucócitos nos pulmões de camundongos infectados com Pb18.

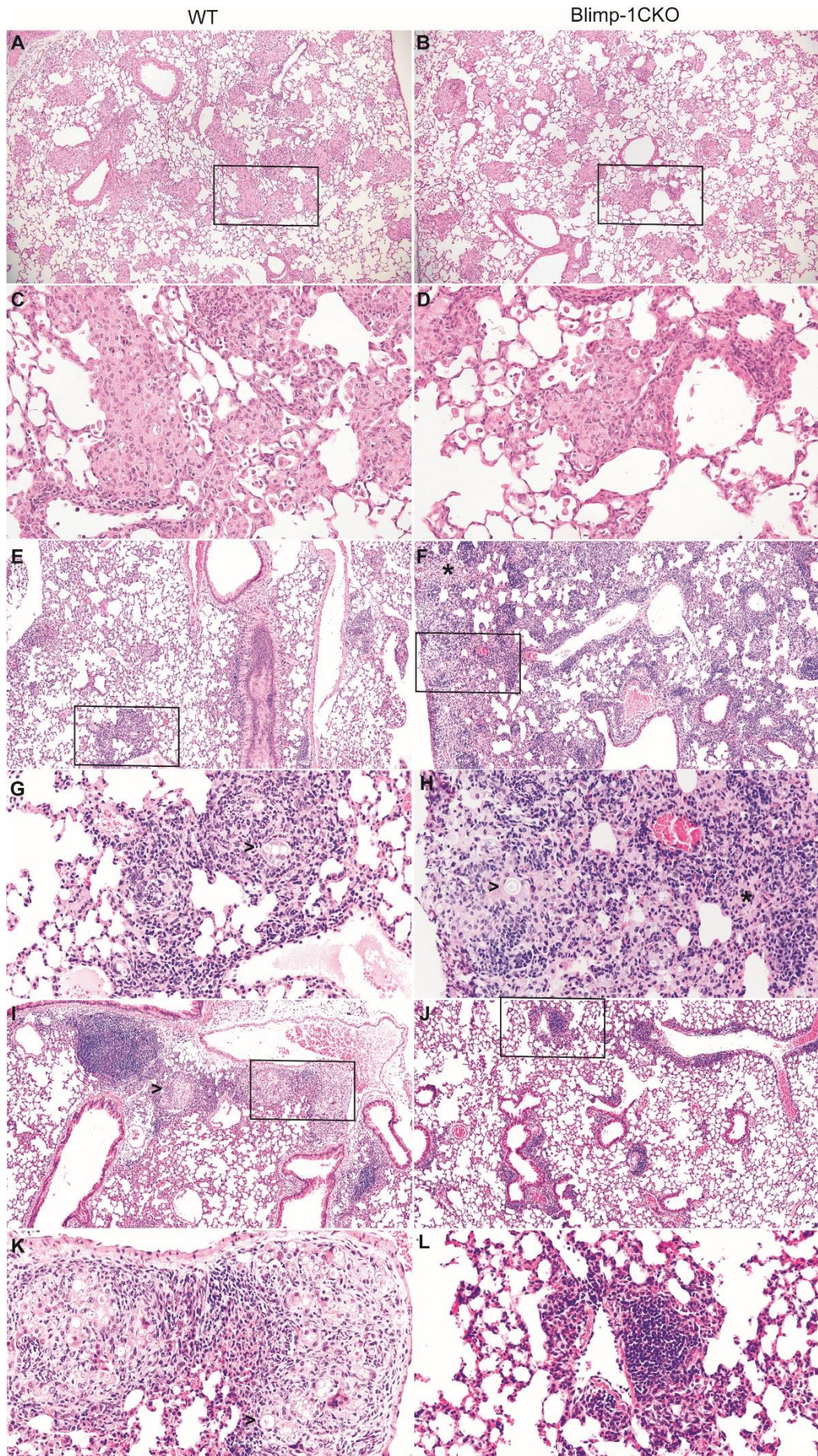
Quatro semanas após infecção, a análise histopatológica dos pulmões dos camundongos controles revelou comprometimento leve e focal no espaço aéreo associado a presença de infiltrado inflamatório misto com predominância de células mononucleares. Nesse infiltrado inflamatório detectamos a presença de granulomas (com muitas formas leveduriformes do *P. brasiliensis*) grandes e maduros contendo células epitelióides e gigantócitos cercados por células mononucleares (**Fig. 10 I e K**). Interessantemente, a análise dos pulmões do grupo Blimp-1CKO evidenciou preservação do espaço aéreo com leve infiltrado inflamatório misto e multifocal nas regiões peribronvasculares. Nesse infiltrado, detectamos a presença de granulomas pequenos com poucas ou nenhuma forma leveduriforme, muito semelhante ao observado com 7 dias p.i. (**Fig. 10 J e L**).

Para uma análise mais minuciosa das alterações teciduais entre os grupos de animais infectados, usamos colorações seletivas para demonstração da deposição e

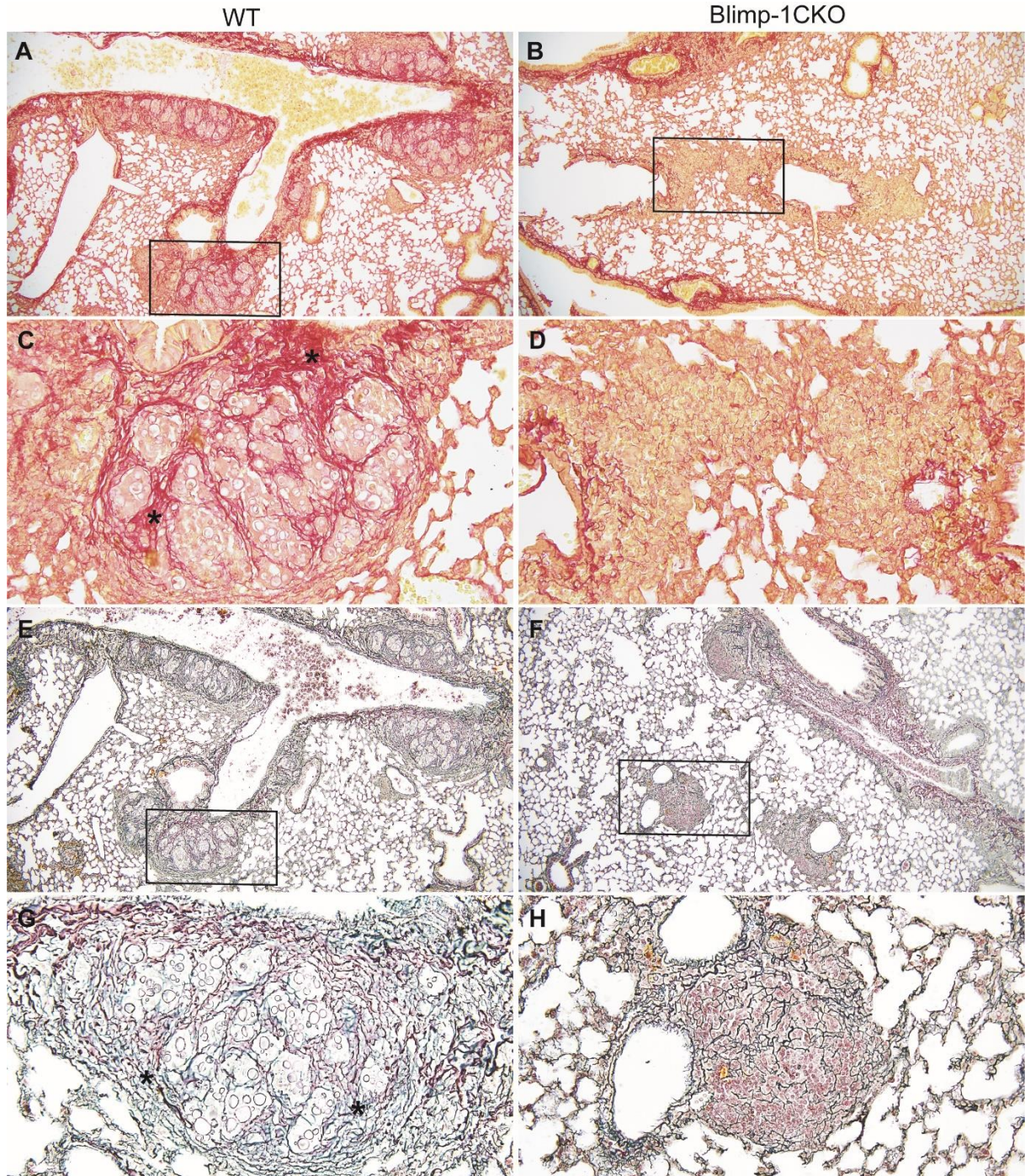
distribuição das fibras de colágeno e reticulina nas estruturas granulomatosas na quarta semana de infecção.

Nos camundongos controles, observamos intensa deposição de colágeno do tipo I, evidenciado pela densa coloração vermelha, (**Fig. 11 A e C**) e de fibras reticulares (colágeno do tipo III) evidenciada pela densa coloração preta, (**Fig. 11 E e G**), delimitando a área com a presença de estruturas fúngicas leveduriformes e a zona periférica dos granulomas. No grupo Blimp-1CKO, em contrapartida, há redução da intensidade de marcação para ambas as colorações (**Fig. 11 B e D; F e H**).

Em resumo, esses dados mostram que no início da fase crônica da doença, a ausência de Blimp-1 reduz os parâmetros associados com a progressão da resposta inflamatória e da formação do granuloma.



**Figura 10. Cinética diferencial do influxo de leucócitos para o local da infecção na presença de Blimp-1.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Fotomicrografias de seções do tecido pulmonar coradas com hematoxilina e eosina foram avaliados após 7 (A-D), 15 (E-H) e 30 (I-L) dias p.i. As setas indicam o Pb18 associado a presença de inflamação mista com predominância de células mononucleares. Os asteriscos mostram regiões de colapso alveolar difusas. As imagens A, B, E, F, I e J mostram aumento de 100x ou barra de escala de 200  $\mu\text{m}$ . As imagens C, D, G, H, K e L são ampliações (aumento de 400x ou barra de escala de 50  $\mu\text{m}$ ) da área indicada pelo retângulo destacado na imagem que antecede o respectivo grupo. Dados representativos de três experimentos independentes. WT = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.



**Figura 11. Camundongos deficientes de Blimp-1 apresentam redução resposta granulomatosa durante a PCM experimental.** (A) Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados



intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18 e avaliados 30 dias p.i. Imagens representativas de cortes histológicos do lóbulo esquerdo do pulmão submetidos a coloração de (A-D) Picrosirius Red, (os asteriscos mostram áreas de deposição de colágeno tipo I, indicadas pela intensa coloração avermelhada, e de (E-H) Reticulina (os asteriscos destacam a deposição de colágeno tipo III, coradas de preto adjacentes as estruturas fúngicas), analisadas por microscopia de luz. Imagens A, B, E e F mostram aumento de 100x ou barra de escala de 200  $\mu\text{m}$ . Imagens C, D, G e H são ampliações (aumento de 400x ou barra de escala de 50  $\mu\text{m}$ ) da área indicada pelo retângulo destacado na imagem que antecede o respectivo grupo. Dados representativos de três experimentos independentes. WT = Blimp-1<sup>ff</sup> CD4<sup>Cre-</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>ff</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.

### 4.3. Blimp-1 atenua a expansão de linfócitos T durante a PCM experimental

A fim de entendermos os mecanismos associados com o controle da replicação fúngica e a cinética de migração celular nos pulmões dos camundongos Blimp-1CKO, determinamos e mensuramos o perfil de células imunes presentes no compartimento pulmonar.

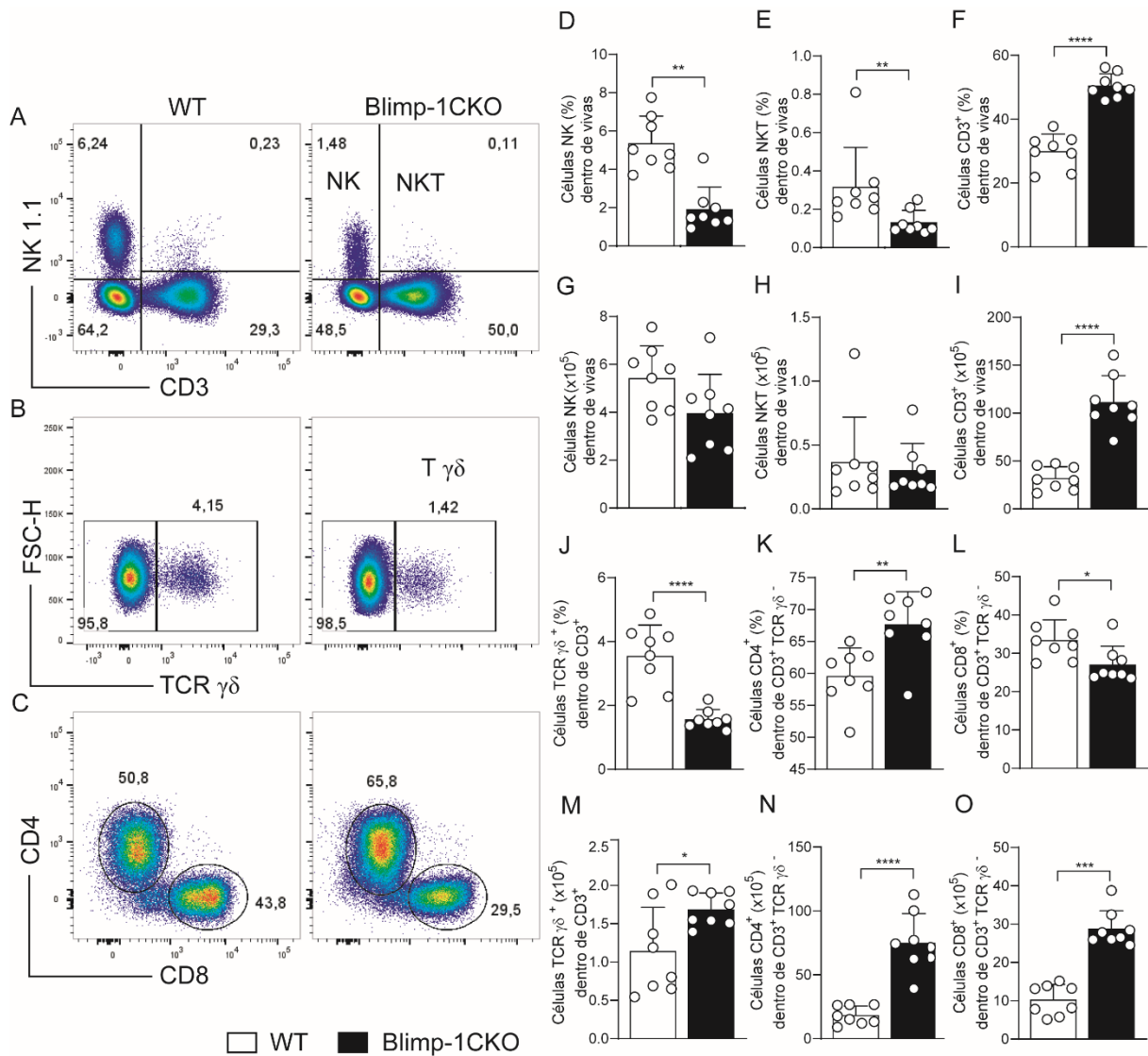
Na fase mais precoce da infecção fúngica (duas semanas após infecção), ponto em que detectamos diferenças na carga fúngica e intenso acúmulo de células no local da infecção, usamos marcadores para identificação das seguintes subpopulações de linfócitos: NK (NK 1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>), NKT (NK 1.1<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>), T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (NK 1.1<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>, TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

Nossos dados representativos das populações de células T, NK, NKT, T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> estão representados na **Fig. 12 A-C**. Analisando isoladamente cada um dos grupos, nossos dados mostraram uma redução da frequência de populações de células NK (**Fig. 12 D e G**) e NKT (**Fig. 12 E e H**) nos animais Blimp-1CKO em relação ao grupo controle, no entanto não observamos alterações no número absoluto dessas populações. Observamos também, elevação tanto do percentual como do número absoluto de linfócitos T (**Fig. 12 F e I**) nos pulmões de camundongos Blimp-1CKO infectados. Analisando as populações dentro da *gate* de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) negativos para TCR  $\gamma\delta$ , observamos, aumento do percentual e do número absoluto dos subtipos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (**Fig. 12 K e N**), no entanto as células CD8<sup>+</sup> (**Fig. 12 L e O**) apresentaram uma redução do percentual, porém aumento do número absoluto. Este mesmo resultado foi observado para os linfócitos T  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (**Fig. 12 J e M**).

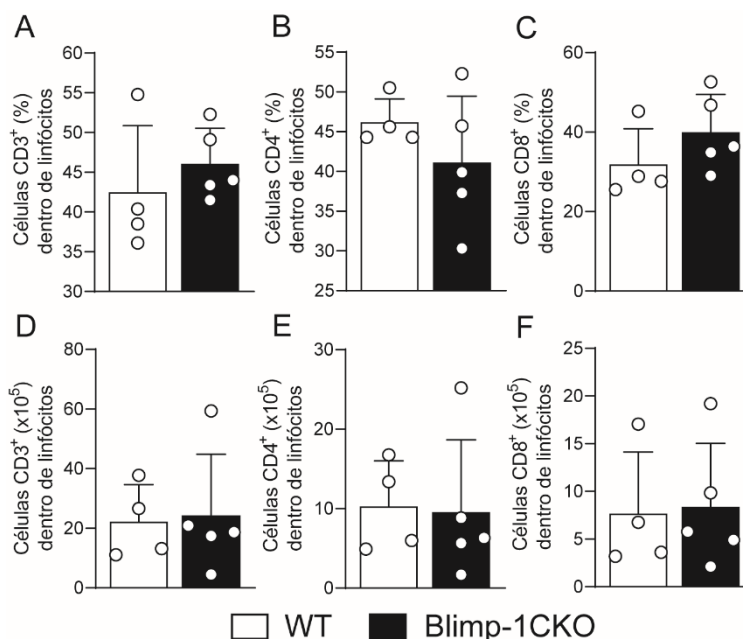
Na fase mais tardia da infecção fúngica (quatro semanas após infecção) avaliamos as populações de linfócitos T CD3<sup>+</sup> mas, diferente da segunda semana não detectamos diferenças quanto a frequência ou número absoluto dessa população

(Fig. 13 A e D) ou de células T CD4<sup>+</sup> (Fig. 13 B e E) ou CD8<sup>+</sup> (Fig. 13 C e F) entre os grupos analisados.

Em resumo, esses dados mostram que Blimp-1 atenua a expansão de células T  $\gamma\delta^+$ , CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> no local da infecção nas fases iniciais da PCM experimental.



**Figura 12. Blimp-1 atenua a expansão de linfócitos T durante a PCM experimental.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 15 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a identificação de subtipos de linfócitos por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. Itens (A, B e C) mostram imagens representativas das populações de células T, NK, NKT, T CD4<sup>+</sup>, T  $\gamma\delta^+$  e T CD8<sup>+</sup>, selecionadas com base na média dos dados obtidos de acordo com o especificado nos gráficos da frequência de cada população (D-F e J-L). (G-I e M-O) indicam o número absoluto das mesmas populações. Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP (n = 7-8). \* Refere-se ao valor de  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , conforme determinado pelo teste t de Student. Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.

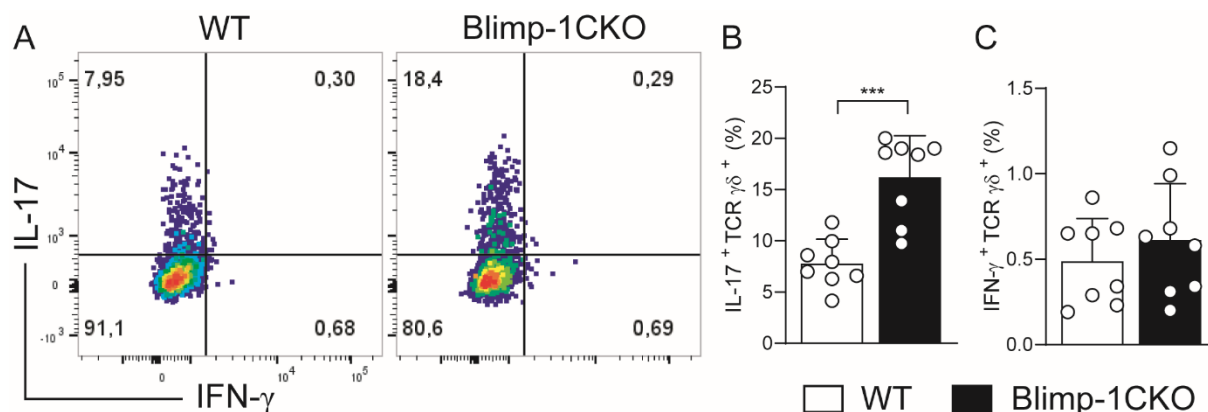


**Figura 13. Análise das populações de linfócitos T com quatro semanas após infecção com Pb18.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 30 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a identificação de subtipos de linfócitos por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. Porcentagem (A-C) e número absoluto (D-F) de linfócitos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP (n = 4-5). Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre-</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.

#### 4.4. Blimp-1 reduz a presença de linfócitos T $\gamma\delta^+$ IL-17<sup>+</sup> na fase inicial da infecção nos pulmões

Em acordo com os dados anteriores, exploramos a atividade funcional de subpopulações de linfócitos T através da marcação de citocinas intracelulares que são classicamente associadas com a susceptibilidade ou resistência a infecção fúngica causada pelo *P. brasiliensis*.

Após o cultivo da suspensão de células separadas após a digestão dos pulmões com estímulo inespecífico, notamos aumento significativo da frequência linfócitos T  $\gamma\delta^+$  produtores de IL-17 nos camundongos Blimp-1CKO com 15 dias de infecção em comparação aos controles, ao passo que, não observamos diferenças quanto a frequência de células T  $\gamma\delta^+$  produtoras de IFN- $\gamma$  nessa população entre os grupos analisados (Fig. 14 A-B). Esse resultado indica que a ausência de Blimp-1 está relacionada com o aumento das células T  $\gamma\delta^+$  produtoras de IL-17<sup>+</sup> nos pulmões.



**Figura 14. Blimp-1 limita o acúmulo de linfócitos T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> nos pulmões durante a PCM experimental.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 15 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a avaliação da atividade funcional de subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. A imagem (A) é representativa da frequência de IL-17 e IFN- $\gamma$  analisada dentro da população T  $\gamma\delta^+$ . (B) Porcentagem de células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> e (C) T  $\gamma\delta^+$  IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP (n = 8). \*\*\* Refere-se ao valor de  $p < 0,001$ , conforme determinado pelo teste t de Student. Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre-</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.

#### 4.5. A progressão da PCM experimental está associada a redução de respostas Th1 e Tc1

Concomitantemente, avaliamos a produção dessas mesmas citocinas pelos linfócitos T do subtipo CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Interessantemente, verificamos na segunda semana de infecção, que a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> é elevada no grupo Blimp-1CKO em comparação ao grupo controle (**Fig. 15 A e B**). Em adição, investigamos a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>, que por sua vez, não diferiu entre os grupos analisados (**Fig. 15 A e C**).

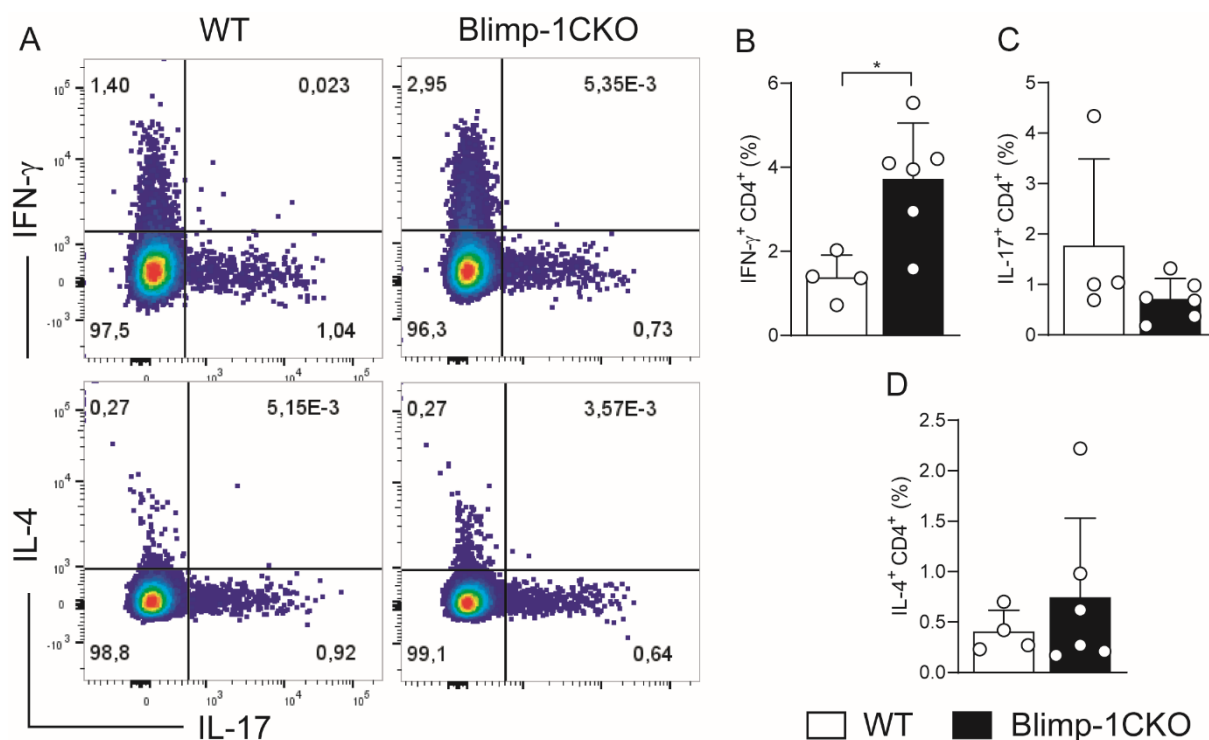
Além das citocinas associadas com a resistência a infecção, também averiguamos a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup>, que é associada com susceptibilidade a infecção, mas não identificamos diferenças na frequência dessa população quando comparamos os grupos Blimp-1CKO e controles (**Fig. 15 A e D**).

Nos linfócitos T do subtipo CD8<sup>+</sup> não observamos alterações na porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> (**Fig. 16 A-C**). Também, avaliamos a população de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de perforina (*Perforin*<sup>+</sup>) ou

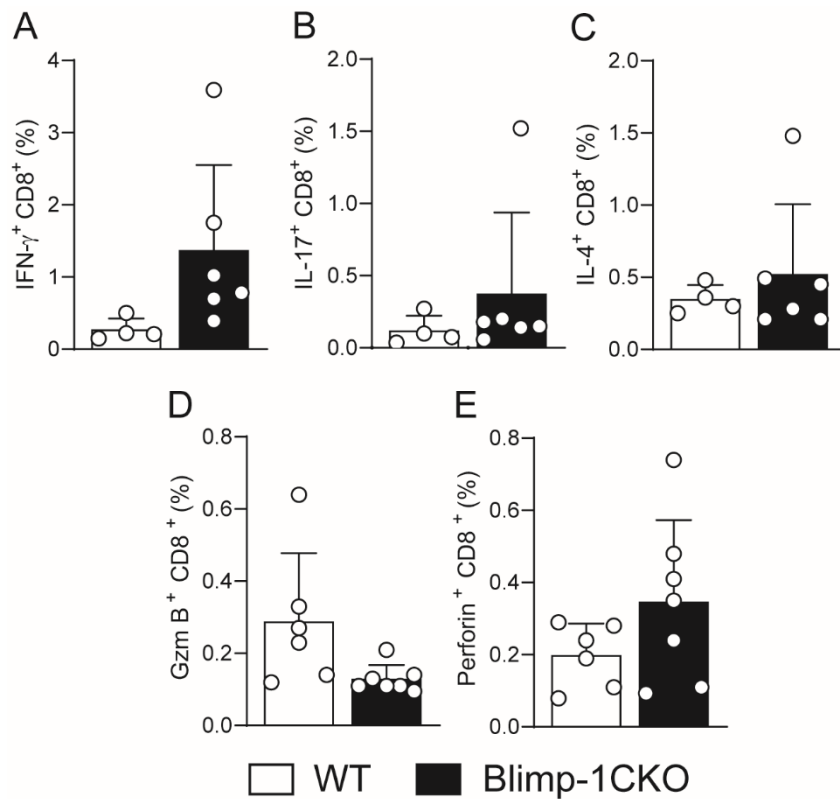
granzima ( $Gzm B^+$ ), mas não observamos diferenças na frequência dessas células nos pulmões dos grupos analisados (**Fig. 16 D e E**).

Ao avaliarmos a atividade funcional dos linfócitos T na quarta semana, detectamos elevação da frequência de células  $CD4^+IL-4^+$ ,  $CD4^+IFN-\gamma^+$  e  $CD8^+IFN-\gamma^+$  no grupo Blimp-1CKO em relação aos controles (**Fig. 17 A-C**).

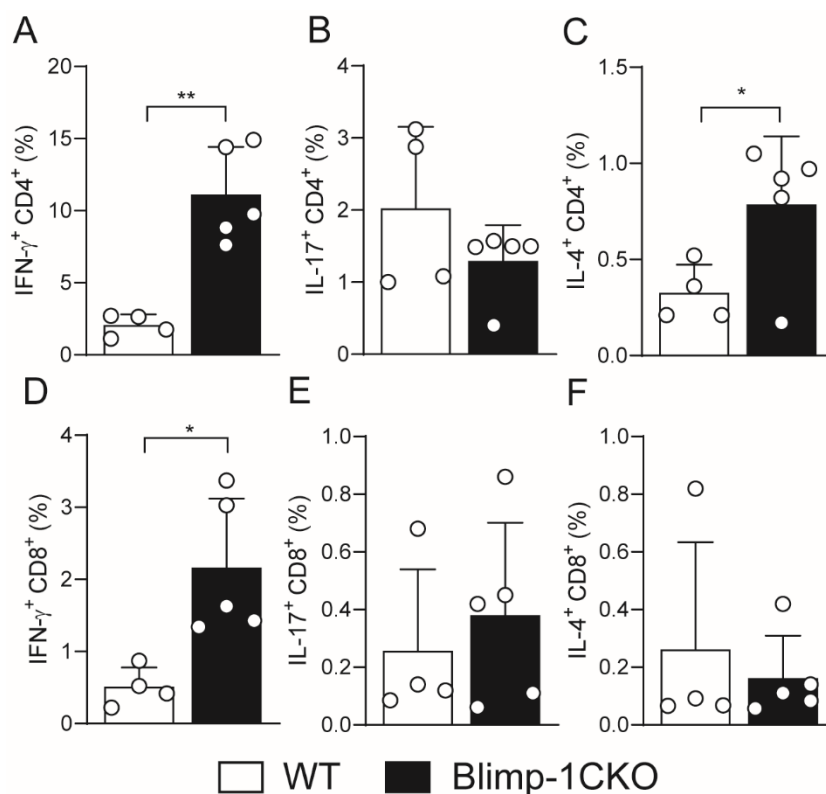
Coletivamente, esses resultados sugerem que a expressão de Blimp-1 limita a produção de  $IFN-\gamma$  pelas células T  $CD4^+$  desde o início da infecção, e também pelas células T  $CD8^+$  na fase mais tardia.



**Figura 15. Blimp-1 reduz respostas Th1 15 dias p.i.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 15 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a avaliação da atividade funcional de subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. A imagem (A) é representativa da frequência de IL-17, IL-4 e  $IFN-\gamma$ , analisados dentro das populações de linfócitos T  $CD4^+$ . Porcentagem de células T  $CD4^+$   $IFN-\gamma^+$ , (C)  $CD4^+$  IL-17 $^+$ , (D)  $CD4^+$  IL-4 $^+$ . Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP ( $n = 4-6$ ). \* Refere-se ao valor de  $p < 0,05$ , conforme determinado pelo teste t de Student. Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1 $^{fl/fl}$  CD4 $^{Cre+}$ ; Blimp-1CKO = Blimp-1 $^{fl/fl}$  CD4 $^{Cre+}$ .



**Figura 16. Blimp-1 não modula respostas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> 15 dias p.i.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 15 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a avaliação da atividade funcional de subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. Porcentagem de células T (A) CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, (B) CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>, (C) CD8<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup>, e (D) CD8<sup>+</sup> GzmB<sup>+</sup> (E) CD8<sup>+</sup> Perforin<sup>+</sup>. Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP (n = 4-7). Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1<sup>ff</sup> CD4<sup>Cre-</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>ff</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.



**Figura 17. Blimp-1 restringe a expansão de CD4 $^+$  IFN- $\gamma^+$ , CD4 $^+$  IL-4 $^+$  e CD8 $^+$  IFN- $\gamma^+$  30 dias p.i.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 30 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a avaliação da atividade funcional de subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos. Porcentagem de células T (A) CD4 $^+$  IFN- $\gamma^+$ , (B) CD4 $^+$  IL-17 $^+$ , (C) CD4 $^+$  IL-4 $^+$ , (D) CD8 $^+$  IFN- $\gamma^+$ , (E) CD8 $^+$  IL-17 $^+$  e (F) CD8 $^+$  IL-4 $^+$ . Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP (n = 4-5). \* Refere-se ao valor de  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , conforme determinado pelo teste t de Student. Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1 $^{fl/fl}$  CD4 $^{Cre-}$ ; Blimp-1CKO = Blimp-1 $^{fl/fl}$  CD4 $^{Cre+}$ .

#### 4.6. Blimp-1 promove alterações no perfil de células mieloides presentes nos pulmões

Para complementar os resultados obtidos da caracterização dos linfócitos, também determinamos e mensuramos a população mioide presentes nos pulmões, já que são células que fazem parte do granuloma.

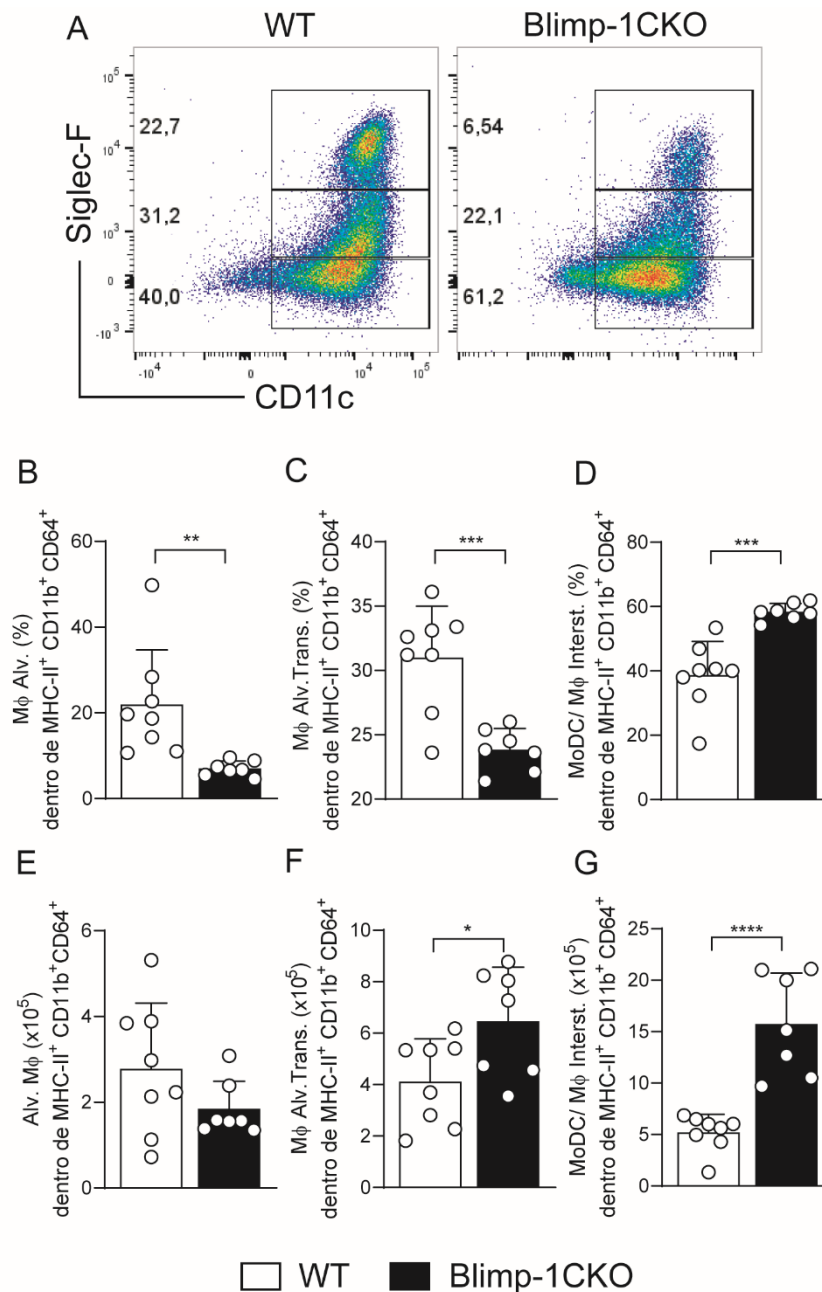
Usamos marcadores para a identificação de macrófagos (M $\phi$ ) alveolares (MHC-II<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, Siglec F<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>), macrófagos alveolares transitórios (MHC-II<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, Siglec F<sup>int</sup>, CD11c<sup>+</sup>), células dendríticas derivadas de medula óssea – MoDCs ou macrófagos intersticiais (MHC-II<sup>+</sup>, CD64<sup>+</sup>, Siglec F<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>) (**Fig. 18 A**), neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>), eosinófilos (Siglec F<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) (**Fig. 19 A**), células dendríticas convencionais (cDCs) do tipo 1 (MHC-II<sup>+</sup>, CD64<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>) e do tipo 2, (MHC-II<sup>+</sup>, CD64<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) (**Fig. 19 F**), comparando tanto a frequência como o número absoluto dessas subpopulações, entre os grupos experimentais.

Nos camundongos Blimp-1CKO após 15 dias de infecção, houve redução da frequência das populações de macrófagos alveolares residentes (**Fig. 18 B**), transitórios derivados de medula óssea (**Fig. 18 C**), eosinófilos (**Fig. 19 C**), e de células dendríticas convencionais do tipo 1 (**Fig. 19 G**). Por sua vez, houve elevação da frequência da população de células identificadas como dendríticas derivadas de monócitos/ macrófagos intersticiais (**Fig. 18 D**) e de células dendríticas convencionais do tipo 2 (**Fig. 19 H**). A expressão de Blimp-1, porém não afetou a frequência de neutrófilos (**Fig. 19 B**).

Em relação ao número absoluto de células mieloides, verificamos aumento na quantidade de macrófagos alveolares transitórios (**Fig. 18 F**), células dendríticas derivadas de monócitos/ macrófagos intersticiais (**Fig. 18 G**), e de células dendríticas convencionais do tipo I e II (**Fig. 19 I-J**) nos camundongos Blimp-1CKO. Em contrapartida, houve elevação do número absoluto de eosinófilos (**Fig. 19 E**) nos camundongos controles. Adicionalmente, não encontramos alterações no número absoluto da população de macrófagos alveolares residentes (**Fig. 18 E**) e neutrófilos (**Fig. 19 D**) entre os grupos analisados.

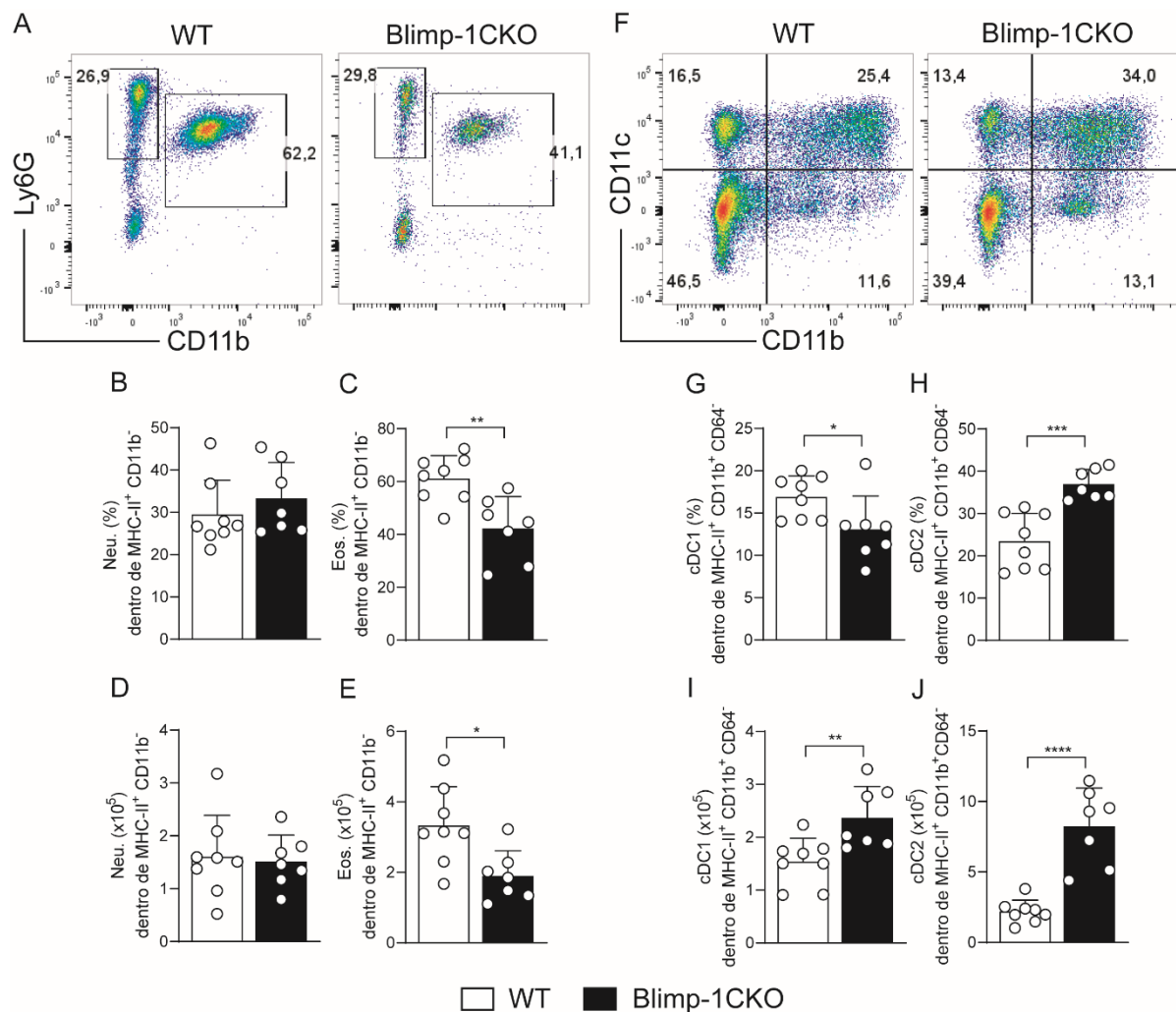


Em resumo, esses dados mostram que a expressão de Blimp-1 está relacionada com um perfil específico de células mieloides no foco inflamatório com 15 dias de infecção na PCM experimental.



**Figura 18. Blimp-1 altera o perfil de populações de macrófagos nos pulmões após infecção fúngica.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 15 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a avaliação das populações mieloides por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. (A) mostra imagem representativa

das populações de macrófagos alveolares, macrófagos alveolares transicionais e MoDC/ macrófagos intersticiais. (B-D) Porcentagem e (E-G) número absoluto de macrófagos alveolares, transicionais, MoDC/ macrófagos intersticiais. Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP (n = 7-8). \* Refere-se ao valor de  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , conforme determinado pelo teste t de Student. Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.



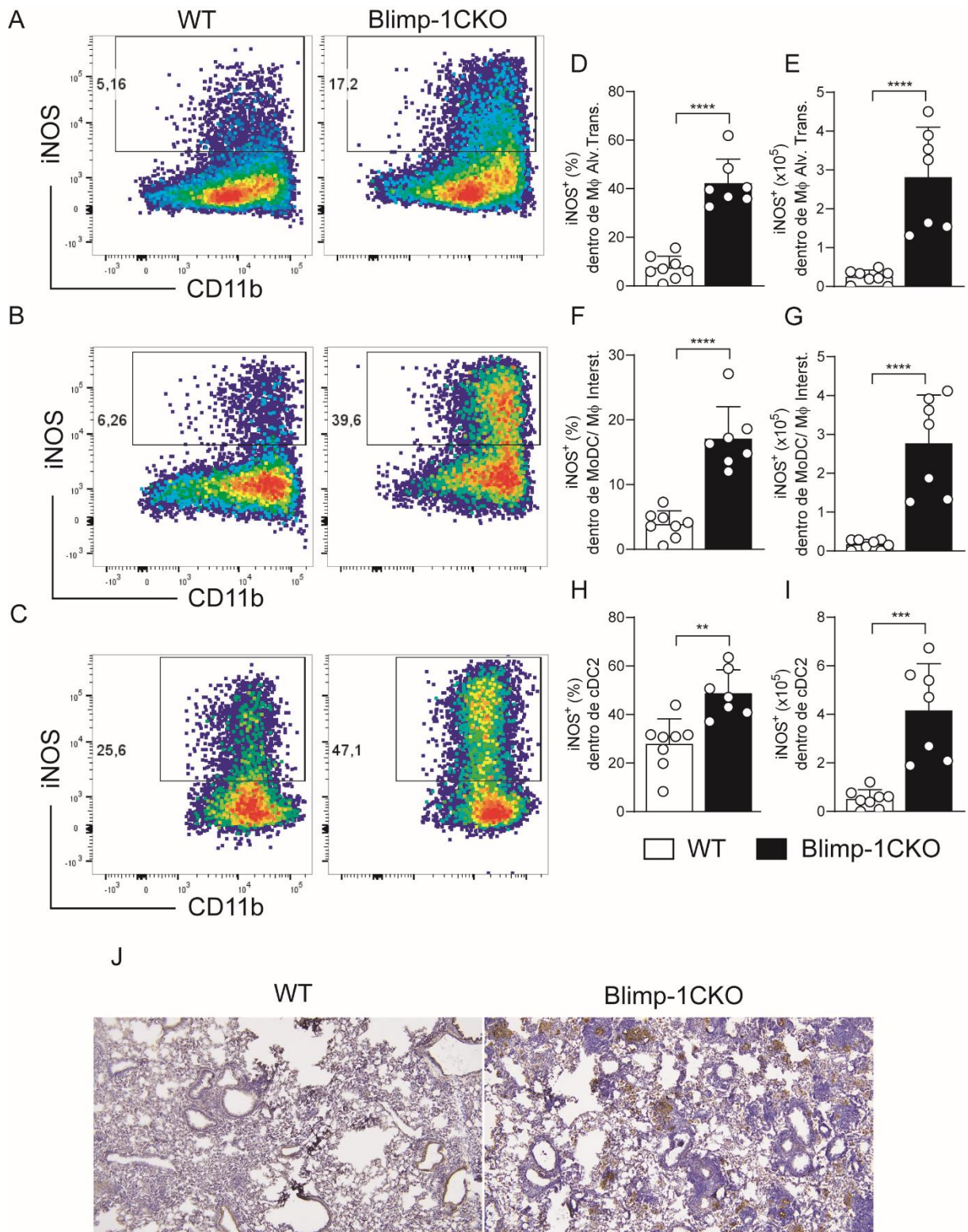
**Figura 19. Blimp-1 altera o perfil de eosinófilos e células dendríticas convencionais presentes no ambiente pulmonar após infecção fúngica.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 15 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a avaliação das populações mieloides por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. (A e F) mostram imagens representativas das populações de neutrófilos, eosinófilos, cDC1 e cDC2. (B-C) Porcentagem e (D-E) número absoluto de neutrófilos e eosinófilos. (G-H) Porcentagem e (I-J) número absoluto de cDC1 e cDC2. Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP (n = 7-8). \* Refere-se ao valor de  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , conforme determinado pelo teste t de Student. Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.

#### 4.7. Blimp-1 atenua a indução de mecanismos microbicidas em subpopulações de células mieloides

Considerando o perfil distinto das populações mieloides, verificamos a expressão da enzima relacionada com a produção de óxido nítrico, a óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), envolvido com a atividade microbicida a patógenos intracelulares. Averiguamos a expressão de iNOS em todas as populações celulares mieloides identificadas neste trabalho após 15 dias de infecção, e observamos aumento da frequência e do número absoluto de macrófagos alveolares transicionais (**Fig. 20 A, D-E**), MoDCs ou macrófagos intersticiais (**Fig. 20 B, F-G**), e cDCs do tipo 2 (**Fig. 20 C,H-I**) iNOS<sup>+</sup>.

Para confirmar esses dados, avaliamos a expressão de iNOS em cortes histológicos confeccionados de pulmões de ambos os grupos experimentais pela técnica de imuno-histoquímica, e observamos intensa expressão de iNOS nos cortes provenientes de animais Blimp-1CKO em comparação aos cortes histológicos provenientes de animais WT (**Fig. 20 J**).

Em síntese, esses resultados sugerem que Blimp-1 está relacionado a indução de mecanismos microbicidas em macrófagos alveolares transicionais, MoDCs ou macrófagos intersticiais e cDCs do tipo 2, modulando a expressão de iNOS.



**Figura 20. Blimp-1 em linfócitos T modula a indução de mecanismos microbicidas em subpopulações de células mieloides.** Camundongos WT e Blimp-1CKO foram infectados intravenosamente com  $1 \times 10^6$  leveduras viáveis de Pb18. Após 15 dias de infecção, os pulmões foram coletados, submetidos a digestão e a suspensão de células obtida foi analisada para a avaliação da atividade funcional das populações mieloides por citometria de fluxo. De cada amostra, adquiriu-se 400.000 eventos analisados. (A, B e C) Imagens representativas das populações de macrófagos alveolares, transicionais, MoDC/ macrófagos intersticiais, e cDC2 que expressam iNOS. Porcentagem

e número absoluto de (D e E) macrófagos alveolares transicionais iNOS<sup>+</sup>, (F e G) MoDC/ macrófagos intersticiais iNOS<sup>+</sup>, e (H e I) cDC2 iNOS<sup>+</sup> (J) Marcação da expressão de iNOS usando imunohistoquímica em cortes histológicos confeccionados dos pulmões de camundongos Blimp-1CKO e WT. Dados representativos de três experimentos independentes. Resultados representados pela média dos valores coletados individualmente  $\pm$  DP (n = 7-8). \*\* Refere-se ao valor de  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , conforme determinado pelo teste t de Student. Barras horizontais mostram diferença estatística significativa entre os grupos analisados. WT = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre-</sup>; Blimp-1CKO = Blimp-1<sup>fl/fl</sup> CD4<sup>Cre+</sup>.

# ***Discussão***

## 5. DISCUSSÃO

A regulação da resposta imune, em qualquer doença inflamatória, é um aspecto importante a ser investigado. Recentemente, nosso grupo mostrou que a expressão de Blimp-1 em linfócitos T é essencial para resistência à infecção causada pelo protozoário *T. cruzi*. Nesse estudo, camundongos deficientes de Blimp-1 desenvolvem respostas Th1 exacerbadas, associadas a secreção excessiva de TNF- $\alpha$  e NO, e a ausência de IL-10, que reflete na perda do controle da replicação do parasita e na redução da sobrevivência dos camundongos CKO (BENEVIDES et al., 2023).

A susceptibilidade a PCM é atribuída a respostas Th2/Th9, enquanto a resistência a respostas Th1/Th17, que em excesso, é deletéria pois pode causar inflamação exacerbada seguida da formação de fibrose (DE CASTRO et al., 2013; MENDES et al., 2017). Pensando nisso, avaliamos qual o papel desse fator de transcrição durante a PCM experimental.

No presente estudo, demonstramos que a sinalização via Blimp-1 atenua a indução de respostas imunes protetoras para o controle da replicação fúngica. Tal conclusão baseia-se em resultados que mostram que os animais deficientes de Blimp-1, quando infectados, são mais eficientes na eliminação do Pb18, esse dado foi associado a redução da resposta granulomatosa. De modo mais detalhado, esse fator de transcrição limita o acúmulo de leucócitos no sítio de infecção no início do processo infeccioso. Dentre os quais, das populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>, o que reflete na redução da expansão de células fagocíticas MHC-II<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> produtoras de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no parênquima pulmonar.

A ausência da regulação de Blimp-1 em linfócitos T é relacionada ao controle da replicação do Pb18 nas fases iniciais da PCM experimental (na primeira semana após a infecção). Surpreendentemente, após quatro semanas de infecção, não detectamos a presença de leveduras na maioria dos locais de foco granulomatoso no tecido pulmonar. Em adição, diferentemente dos controles, que apresentaram intensa deposição de colágeno do tipo I e III dispostas em torno das estruturas fúngicas, o grupo Blimp-1CKO mostrou distribuição aleatória de colágeno do tipo III (fibra de reticulina), e redução da deposição de colágeno do tipo I, aspectos que evidenciam redução da formação do granuloma em virtude da eliminação do patógeno. Nossos resultados corroboram com os dados publicados por Oca e colaboradores, que

usando modelos de infecção com *Plasmodium sp.* e *Leishmania sp.*, ressaltam que a expressão de Blimp-1 propicia a progressão da parasitemia e do parasitismo durante a malária e leishmaniose visceral experimental, respectivamente (OCA et al., 2016).

Há que se notar que nos nossos experimentos que a redução da recuperação de fungos viáveis nos pulmões no grupo Blimp-1CKO, não foi associada a redução da sobrevivência desses animais, apesar da carga fúngica ter sido detectável já na primeira semana de infecção, e ligada à indução de resposta inflamatória aguda na segunda semana de infecção. Interessantemente, esse padrão de resposta inflamatória, modificou-se na quarta semana de infecção, na qual detectamos a presença de leve infiltrado inflamatório nas regiões peribronvasculares.

Em modelos experimentais infectados com protozoários foi demonstrado que a ausência de Blimp-1 está relacionada com a indução de respostas inflamatórias exacerbadas, refletindo no desenvolvimento de patologia tecidual, porém a carga parasitária e sobrevivência desses animais apresentam correlações diferentes.

Esses estudos ressaltam que o desenvolvimento do dano tecidual é decorrente da produção elevada de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em um ambiente ausente da secreção IL-10 (NEUMANN et al., 2014; OCA et al., 2016; BENEVIDES et al., 2023). Na evolução da infecção fúngica com Pb18 os camundongos Blimp-1CKO apresentaram respostas inflamatórias intensas, porém restrita ao início do curso da infecção e não houve o estabelecimento de uma doença crônica e conseqüentemente, o desenvolvimento de lesão tecidual. Pressupomos que a presença da resposta inflamatória mediada pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> na fase mais precoce da PCM experimental está associada à presença de mecanismos que modulam negativamente as respostas associadas ao dano tecidual e positivamente aos mecanismos de eliminação do fungo.

Em relação ao impacto da resposta inflamatória no controle ou progressão da infecção, notou-se diferentes desfechos entre os modelos de infecção usados. No caso da infecção causada pela *Leishmania donovani*, a expressão de Blimp-1 promove aumento do parasitismo tecidual (OCA et al., 2016). Esse mesmo desfecho foi observado na resposta fúngica descrita nesse trabalho, no qual a expressão de Blimp-1 promove aumento da carga fúngica. Divergente do resultado do presente estudo, a expressão de Blimp-1 não afeta o controle do parasitismo tecidual na infecção causada pelo *Toxoplasma gondii*, e promove o controle do parasitismo tecidual após infecção com *Trypanosoma cruzi* (NEUMANN et al., 2014; OCA et al., 2016; BENEVIDES et al., 2023). Acreditamos que no presente estudo, a característica



de crescimento lento do Pb18 somado a presença de respostas inflamatórias robustas nas fases iniciais da infecção contendo células ( $CD4^+IFN-\gamma^+$  e  $\gamma\delta^+IL-17^+$ ) associadas a proteção ao Pb18 foram fatores determinantes para esse desfecho (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; MENDES et al., 2017).

A resposta inflamatória intensa desencadeada como consequência da ausência da sinalização de Blimp-1 também não apresenta uma associação direta com a sobrevida, uma vez que não afeta a sobrevida de animais submetidos ao modelo de leishmaniose experimental, mas diminui a mortalidade de animais submetidos ao modelo de toxoplasmose e da doença de chagas experimental (NEUMANN et al., 2014; OCA et al., 2016; BENEVIDES et al., 2023). No nosso estudo, a sobrevida dos animais infectados experimentalmente com o Pb18 não foi avaliada, porém pelas análises dos pulmões com 30 dias p.i. acreditamos que expressão de Blimp-1 possa ser relacionada com a mortalidade dos animais. Somado a esse fator, acreditamos que a eliminação lenta do patógeno, associada a indução de resposta inflamatória aguda (na segunda semana de infecção) seguida de uma resposta inflamatória crônica (na quarta semana de infecção) contribuiu para esse desfecho.

Esses dados são interessantes, pois revelam que há particularidades em relação ao papel de Blimp-1 na resposta desencadeada por diferentes protozoários e em relação ao papel de Blimp-1 a infecção fúngica causada pelo Pb18.

A constatação que Blimp-1 modula o desenvolvimento de respostas inflamatórias também se aplica a modelos de inflamação estéril. Nosso grupo já demonstrou no modelo de asma alérgica que Blimp-1 limita respostas inflamatórias exacerbadas no parênquima pulmonar (BENEVIDES et al., 2019). Outros estudos mostram esse que Blimp-1 limita: i) a insulite e o desenvolvimento de diabetes em camundongos NOD (modelo de diabetes autoimune); ii) a gravidade da encefalomielite autoimune experimental (EAE) e da doença coronariana associada a diabetes (DM-DCD) (LIN et al., 2013; LIN et al., 2014; CHEN et al., 2021).

A redução da carga fúngica na ausência do Blimp-1 durante as fases iniciais da infecção aguda nos levou a busca pela identificação das células presentes nos pulmões com intuito de associá-las com a proteção a PCM experimental. A caracterização dos linfócitos presentes nos pulmões revelou que duas semanas após infecção houve acúmulo de linfócitos T dos subtipos  $\gamma\delta^+$ ,  $CD4^+$  e  $CD8^+$  no compartimento pulmonar de camundongos Blimp-1CKO quando comparado aos controles. Sabe-se que mediante ativação, linfócitos T deficientes de Blimp-1

apresentam maior capacidade de expansão que controles. Esse dado foi demonstrado por Kallies et al., após a quantificação de células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas em camundongos *Prdm1<sup>gfp/gfp</sup>* e controles infectados com HSV. A propriedade expansiva dessas células é decorrente de desregulação da sua homeostase, que confere as células T *Prdm1<sup>gfp/gfp</sup>* vantagem proliferativa e resistência a indução de mecanismos de morte celular (KALLIES et al., 2006).

No que diz respeito a atividade funcional, nessa mesma fase, observamos proporção elevada em animais Blimp-1CKO de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>. Nosso grupo já demonstrou que respostas Th1 são protetoras frente a PCM experimental. Tais células não só aumentam a capacidade de ativação de macrófagos infectados, como também a secreção de CCL2, CCL5, CXCL9 e CXCL10, e a expressão de CCR5 e CXCR3, importantes para o recrutamento de células mononucleares, que além da atividade microbicida desempenham papel fundamental na formação da estrutura granulomatosa, que é outro mecanismo de proteção contra a disseminação fúngica (SOUTO et al., 2000; SOUTO et al., 2003). Acreditamos que o acúmulo dessas células nos pulmões compõe um dos mecanismos de proteção associados ao controle da replicação fúngica observada nos camundongos Blimp-1CKO.

É consensual que embora Blimp-1 não afete a capacidade de diferenciação inicial de células Th1 *in vitro*, quando essas células são diferenciadas em condições apropriadas para esse subtipo, a síntese de IFN- $\gamma$ , citocina importante para manutenção dessas células, leva a repressão desse fator de transcrição, que é sabidamente repressor dos genes *tbx21* e *ifng*, associados a diferenciação terminal Th1 (KALLIES et al., 2006; CIMMINO et al., 2008). Mediante a exposição a estímulo policlonal, células efectoras ou células T *naïves* (estimuladas previamente em condições neutras com  $\alpha$ -CD3,  $\alpha$ -CD28 e IL-2) provenientes de camundongos CKO apresentam elevação da secreção de IFN- $\gamma$  em relação as respectivas células controles (MARTINS et al., 2006; CIMMINO et al., 2008).

*In vivo*, animais deficientes de Blimp-1 em linfócitos T submetidos a afecções de espectro inflamatório estéril (modelo de diabetes autoimune e encefalomielite autoimune experimental (EAE)), desenvolvem respostas Th1 mais robustas que animais controles (LIN et al., 2013; LIN et al., 2014). Assim como nesses estudos, acreditamos que no presente estudo Blimp-1 modula a resposta Th1 na PCM experimental, e reforça nossa proposta de que Blimp-1 é um potencial candidato a

alvo terapêutico na PCM experimental. Assim nosso dado abre perspectivas para ensaios futuros com enfoque na modulação negativa desse fator de transcrição em linfócitos T para promoção de respostas Th1, favoráveis no tratamento da PCM.

Dando continuidade na caracterização da atividade funcional, adicionalmente houve também aumento da frequência da população de células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> no grupo Blimp-1CKO. Diferentemente das células Th17 que se diferenciam nos órgãos linfoides periféricos, as células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> murinas (que representa os subtipos de células se T  $\gamma\delta^+$  V $\gamma$ 4<sup>+</sup> e V $\gamma$ 6<sup>+</sup>) se diferenciam no timo embrionário (antes do nascimento), e após seu desenvolvimento, se distribuem para diferentes tecidos periféricos incluindo tecidos linfoides, derme, fígado e pulmões, onde persistem como células teciduais residentes com capacidade de autorrenovação e vida longa (HAAS, 2012; PAPOTTO et al., 2017).

Haas et al., após experimentos de transplante de medula de camundongos WT para animais deficientes de IL-17A e IL-17F (*IL-17af<sup>-/-</sup>*) descreveram que células  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> não são geradas na periferia em condições de homeostase, devido à ausência dessa população no baço ou linfonodos de animais quiméricos (HAAS, 2012). No entanto, Papotto e colaboradores demonstraram que a diferenciação de tais células nos linfonodos drenantes a partir de células progenitoras da medula era possível em condições inflamatórias. Nesse ensaio, camundongos TCR $\delta^{\text{-/-}}$  (Thy 1.2) reconstituídos com células hematopoiéticas de camundongos WT (Thy 1.1), e posteriormente submetidos ao modelo de EAE, apresentaram aumento da proporção de células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> no baço, cérebro e linfonodos, no pico da doença. A avaliação dessa população em diferentes órgãos antes do início dos sinais clínicos da doença, revelou acúmulo dessas células nos linfonodos expressando marcador de proliferação Ki67. Nesse local, essas células se diferenciaram mediante a sinalização via receptor de IL-23 (PAPOTTO et al., 2017).

A importância da presença de células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> residentes pré-existentes nos pulmões foi abordada no estudo desenvolvido por Dejima e colaboradores que usando modelo de infecção causada pela *C. albicans* demonstraram que 12 horas após infecção, há produção de IL-23 e IL-17, que atinge seu pico de produção 24 horas após infecção. Em camundongos IL-17<sup>-/-</sup>, após 24 horas de infecção, é constatada redução do número absoluto de neutrófilos e elevação da carga fúngica confirmando a importância destas células residentes (DEJIMA et al., 2011).

Além da pré-existência das células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> nos pulmões, há casos em que adicionalmente essas células são recrutadas para o sítio de infecção, como acontece no modelo de inflamação causada por sepse grave, em que há significativo aumento de células T  $\gamma\delta^+$  V $\gamma$ 4<sup>+</sup> em diferentes pontos após infecção (1, 3 e 10 dias) nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de sepse (CLP) em comparação a controles. Paralelamente, no terceiro dia após a indução da sepse, houve redução significativa dessa população do baço em comparação aos controles. Somado a esse dado, ensaios quimiotáticos demonstraram que há migração mais intensa de células T  $\gamma\delta^+$  em direção ao homogenato pulmonar de camundongos com sepse em comparação aos controles, que é inibida mediante a neutralização de CCL2, CCL3 e CCL5 (COSTA et al., 2015).

Há casos ainda, que a expansão de células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> no compartimento pulmonar além do recrutamento da circulação, é resultante da proliferação local (avaliado através da expressão de Ki67 na população  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup>) dessas células, mediante a sinalização desencadeada pelas citocinas IL-1 $\beta$  e IL-23 (JIN et al., 2019).

Em relação a expressão de Blimp-1, não há relatos acerca da função desse fator de transcrição nas células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup>. Porém, sabe-se que Blimp-1 é constitutivamente expresso por essas células, e que sua expressão é regulada positivamente após exposição das células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-23 (CORPUZ et al., 2017).

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que as células T  $\gamma\delta$  produtoras de IL-17 também compõem o repertório de células que participam da resposta a PCM experimental. Nosso grupo mostrou o papel de proteção mediada pela IL-23 na fase precoce da PCM experimental através da secreção de IL-17, que é primordial para controle da replicação fúngica (TRISTÃO et al., 2017).

Não sabemos exatamente o mecanismo exato que levou a elevação da proporção de células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> nos pulmões de animais Blimp-1CKO na fase inicial da PCM experimental, porém como salientado anteriormente Blimp-1 pode ter papel negativo na regulação: i) da diferenciação das células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> no timo embrionário ou na periferia (após exposição ao insulto); ii) da expressão dos receptores de quimiocinas, que favorecem o recrutamento dessas células para o sítio de inflamação; iii) da proliferação local dessas células. Mais ensaios são necessários para esclarecer o mecanismo responsável por esses fenômenos. Acreditamos que essas células atuam sinergicamente com as CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no controle da replicação

fúngica de camundongos Blimp-1CKO. Para isso, prevemos o desencadeamento de um ensaio de depleção de IL-17 nesses animais. Nesse ensaio nossa hipótese é que a depleção de IL-17 nos animais Blimp-1CKO promove elevação da replicação fúngica em relação aos animais Blimp-1CKO não tratados. Se nossa hipótese estiver correta, salientará ainda mais a necessidade de futuros estudos com enfoque na modulação negativa desse fator de transcrição nos linfócitos T (experimento em andamento).

A população de linfócitos T também foi avaliada na quarta semana após infecção, e constatamos que nesse tempo de infecção não houve diferenças na frequência e no número absoluto de linfócitos T. Mediante a estimulação policlonal, houve elevação da proporção de células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> nos pulmões de animais Blimp-1CKO. Adicionalmente observamos elevação da proporção de células T CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup>. A indução de respostas T CD8<sup>+</sup> são importantes para eliminação do *P.brasiliensis* nos tecidos (CANO et al., 2000). Nosso grupo mostrou importância da indução de células CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no controle da carga fúngica (SOUZA et al., 2021).

No contexto de doença, respostas mediadas por células T CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> são deletérias pois coordenam a indução de inflamação eosinofílica e a inibição de mecanismos microbicidas como óxido nítrico e de outras espécies reativas, em macrófagos, o que contribui com a progressão da PCM (GIUSIANO, 2020). Porém, após a eliminação do insulto, a indução dessas respostas é primordial para progressão do processo de reparo tecidual e/ ou inibição de vias pró-inflamatórias (ALLEN, 2023). Acreditamos que na quarta semana de infecção, tempo no qual observamos redução mais intensa da carga fúngica nos animais Blimp-1CKO, essas células estejam participando do processo de reparo tecidual.

Em experimentos futuros, investigaremos a participação das células T reguladoras durante a PCM experimental. É possível que somado ao intenso infiltrado de células pró-inflamatórias observado na segunda semana nos animais Blimp-1CKO, há presença de células que mantém o equilíbrio entre a eliminação do patógeno e a imunopatologia tecidual. Após a eliminação ou contenção das poucas formas leveduriformes restantes nos granulomas, acreditamos que essas células estão envolvidas no processo de resolução da inflamação (ROJAS et al., 2017). Assim é válido ressaltar que investigaremos a participação das células T reguladoras durante a PCM experimental. A redução drástica do infiltrado inflamatório na quarta semana em relação a segunda semana corrobora com nossa hipótese.

Por fim analisamos as consequências da deleção de Blimp-1 em linfócitos T no compartimento mieloide na segunda semana de infecção já que nesse ponto observamos intenso recrutamento de células associado ao controle da replicação fúngica. Após identificação das populações celulares presentes nos pulmões, identificamos que os animais Blimp-1CKO desenvolvem acúmulo de células fagocíticas MHC-II<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> (macrófagos transicionais alveolares, células dendríticas convencionais do tipo 2, e de células com marcadores expressos em comum por MoDCs e macrófagos intersticiais). Nosso grupo mostrou que a indução de respostas Th1 são primordiais para produção de quimiocinas essenciais para o recrutamento de células mononucleares para o local da infecção, onde se diferenciam em macrófagos ou células dendríticas (SOUTO et al., 2003; YANG et al., 2014). No presente estudo, o acúmulo dessas células fagocíticas nos pulmões reflete justamente a abundância de IFN- $\gamma$  no foco inflamatório. Além do recrutamento de células mononucleares, pressupomos que a presença de IFN- $\gamma$  também estaria atrelada a indução de mecanismos microbicidas nessas células, já que nosso grupo também já mostrou a importância dessa citocina nesse processo (SOUTO et al., 2000). A partir disso, na etapa seguinte, avaliamos o estado de ativação dessas células.

A análise do estado de ativação das células fagocíticas MHC-II<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> revelou que todas essas células demonstraram elevação da expressão de iNOS, o que é compatível com o dado da elevação da frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$ , nesse mesmo tempo de infecção, indicando a participação dessas células nesse processo (SOUTO et al., 2003). Sabe-se que a IL-17 pode cooperar com o IFN- $\gamma$  no processo de ativação de macrófagos (MILLS, 2023). Assim, acreditamos que a presença de células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> nesse ambiente, pode de modo sinérgico com as células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma^+$  também favorecer a ativação das células fagocíticas identificadas. O experimento de depleção de IL-17 em camundongos Blimp-1CKO anteriormente citado contribuirá para melhor compreensão dessa hipótese.

Em relação a população de granulócitos, não houve elevação da proporção ou do número absoluto de neutrófilos nos pulmões apesar da elevação da frequência de células  $\gamma\delta$  produtoras de IL-17. Prevemos a realização de ensaios adicionais para avaliação da produção de CXCL1 e de CXCL2, e da ativação de neutrófilos através da análise de produção de mieloperoxidase no homogenato pulmonar, para compreender mais a fundo o papel dessa população no mecanismo de proteção relacionado aos camundongos Blimp-1CKO. Em relação a população de eosinófilos,

houve acúmulo dessas células nos camundongos WT em relação aos camundongos Blimp-1CKO. Esse dado é bem interessante pois a forma aguda da PCM, que é a mais grave, é marcada pela presença de eosinófilos (CASTRO et al., 2013; MENDES et al., 2017; BURGER, 2021). Apesar de não termos observado diferença na frequência de células CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> nos pulmões nesse tempo de infecção, em experimentos futuros dosaremos a quantidade de IL-5 no homogenato pulmonar desses animais.

Em resumo, demonstramos o papel deletério de Blimp-1 na PCM experimental através da atenuação respostas conhecidamente protetoras frente a PCM experimental, o que compromete o controle da carga fúngica. Futuramente, investigaremos mais detalhadamente o papel das células T  $\gamma\delta^+$  IL-17<sup>+</sup> no mecanismo de proteção associado ao controle da replicação fúngica de camundongos Blimp-1CKO. Esse ensaio contribuirá para melhor compreensão do papel dessas células durante a PCM experimental.

# ***Sumário***



## **6. SUMÁRIO**

**6.1.** Há aumento da susceptibilidade ao Pb18 em animais que expressam Blimp-1 em linfócitos T.

**6.2.** A sinalização via Blimp-1 limita o acúmulo de leucócitos na segunda semana de infecção nos pulmões de camundongos infectados com Pb18.

**6.3.** A expressão de Blimp-1 restringe a expansão de linfócitos T e o acúmulo das células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>.

**6.4.** Blimp-1 altera o perfil de células mieloides nos pulmões e resulta na redução da indução de mecanismos microbicidas em células fagocíticas associadas com a eliminação do fungo.

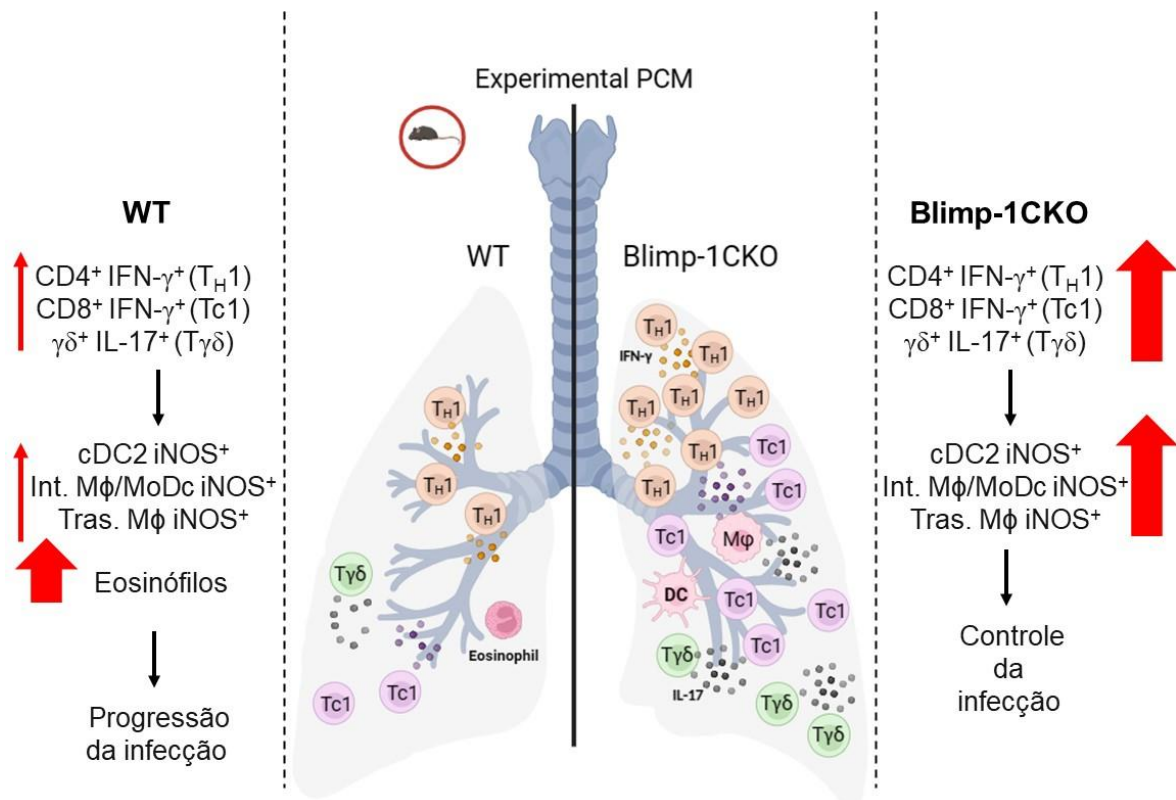
**6.5.** Há ausência ou poucas formas leveduriformes contidas nos locais de foco granulomatoso nos pulmões de camundongos Blimp-1CKO na quarta semana após infecção, o que cursa com a redução da resposta inflamatória e granulomatosa.

**6.6.** A deleção genética de Blimp-1 na PCM experimental não é associada com imunopatologia tecidual ou redução de sobrevivência.

***Conclusão***

## 7. CONCLUSÃO

No modelo de PCM experimental, a expressão de Blimp-1 em linfócitos T, limita o acúmulo e ativação de células sabidamente importantes para eliminação do Pb18 no local da infecção, esse desfecho favorece a progressão da infecção fúngica causada pelo *P. brasiliensis*.



**Figura 21. O papel de Blimp-1 na PCM experimental.** Na PCM experimental, Blimp-1 atenua o acúmulo de células T CD4<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup> e γδ<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> nos pulmões. A diminuição dessas células nesse local, resulta na redução do acúmulo e da ativação de células fagocíticas CD11b<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup> (Mφ transicionais alveolares, cDCs 2, e de células com marcadores expressos em comum por MoDCs e Mφ intersticiais) nesse local. Essa cascata de resposta é associada a progressão da infecção fúngica. A presença de eosinófilos nessa resposta é outro indicador de susceptibilidade.

# ***Referências Bibliográficas***

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. Vol. 165, *Mycopathologia*. 2008. p. 209–21.
2. Benevides L, Costa RS, Tavares LA, Russo M, Martins GA, da Silva LLP, et al. B lymphocyte–induced maturation protein 1 controls T H 9 cell development, IL-9 production, and allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2019 mar 1;143(3):1119-1130.e3.
3. Benevides, Luciana; Sacramento, Lais A.; Pioto, Franciele; Barretto, Gabriel Dessotti; Carregaro, Vanessa; Silva, João S. (2023). Blimp-1 signaling pathways in T lymphocytes is essential to control the *Trypanosoma cruzi* infection-induced inflammation. *Frontiers*. Collection. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1268196>
4. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an Update. Vol. 6, *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 1993.
5. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol*. 2013 Sep;8(9):1177-91. doi: 10.2217/fmb.13.68. Erratum in: *Future Microbiol*. 2013 Dec;8(12):1636. Sato, Paula [corrected to Sato, Paula Keiko]. PMID: 24020744.
6. Burger E. Paracoccidioidomycosis protective immunity. *Journal of Fungi*. 2021 fev 1;7(2):1–26.
7. Cano LE, Lu´ L, Singer-Vermes LM, Costa TA, Mengel JO, Xidieh CF, et al. Depletion of CD8 T Cells In Vivo Impairs Host Defense of Mice Resistant and Susceptible to Pulmonary Paracoccidioidomycosis [Internet]. Vol. 68, *Infection and Immunity*. 2000.
8. Campanelli AP, Martins GA, Souto JT, Pereira MS, Livonesi MC, Martinez R, Silva JS. Fas-Fas ligand (CD95-CD95L) and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 engagement mediate T cell unresponsiveness in patients with paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis*. 2003 May 1;187(9):1496-505. doi: 10.1086/374646. Epub 2003 Apr 15. PMID: 12717632.
9. Chen H, Gao F, Bao Y, Zheng J, Sun L, Tang W, et al. Blimp-1 inhibits Th9 cell differentiation and attenuates diabetic coronary heart disease. *Int Immunopharmacol*. 2021 jun 1;95.
10. Cimmino L, Martins GA, Liao J, Magnusdottir E, Grunig G, Perez RK, et al. Blimp-1 Attenuates Th1 Differentiation by Repression of *ifng*, *tbx21*, and *bcl6* Gene Expression. *The Journal of Immunology*. 2008 ago 15;181(4):2338–47.
11. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011 Nov;49(8):785-98. doi: 10.3109/13693786.2011.577821. Epub 2011 May 4. PMID: 21539506.
12. Coser LDO, Genaro LM, Justo-Junior AS, Trabasso P, Pereira RM, Ruas LP, et al. Evaluation of CD8+T cell subpopulations in paracoccidioidomycosis. *Future Microbiol*. 2021 set 1;16(13):977–85.
13. Cretney E, Xin A, Shi W, Minnich M, Masson F, Miasari M, Belz GT, Smyth GK, Busslinger M, Nutt SL, Kallies A. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2011 Apr;12(4):304-11. doi: 10.1038/ni.2006. Epub 2011 Mar 6. PMID: 21378976.

14. de Almeida JN, Peçanha PM, Colombo AL. Paracoccidioidomycosis in immunocompromised patients: A literature review. Vol. 5, Journal of Fungi. MDPI AG; 2019.
15. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LNA, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. Journal of Infection. 2013 nov;67(5):470–85.
16. Ferreira MS. Paracoccidioidomycosis. Vol. 10, Paediatric Respiratory Reviews. 2009. p. 161–5.
17. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. 25: 5–18, 1986.
18. Franco, M., et al., 1987. Paracoccidioidomycosis: A recently proposed classification of its clinical forms. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 20 (2), 129–132. doi:10.1590/S0037-86821987000200012.
19. Franco, M., et al., 2000. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. Medical Mycology 38 (3), 185–191. doi:10.1080/714030941.
20. Fu SH, Yeh LT, Chu CC, Yen BLJ, Sytwu HK. New insights into Blimp-1 in T lymphocytes: A divergent regulator of cell destiny and effector function. Vol. 24, Journal of Biomedical Science. BioMed Central Ltd.; 2017.
21. Giusiano G. The Trojan Horse Model in *Paracoccidioides*: A Fantastic Pathway to Survive Infecting Human Cells. Vol. 10, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2021.
22. Gonzalez A, de Gregori W, Velez D, Restrepo A, Cano LE. Nitric Oxide Participation in the Fungicidal Mechanism of Gamma Interferon-Activated Murine Macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* Conidia. Vol. 68, Infection and Immunity. 2000.
23. Hatanaka O, Rezende CP, Moreno P, Freitas Fernandes F, Oliveira Brito PKM, Martinez R, Coelho C, Roque-Barreira MC, Casadevall A, Almeida F. Galectin-3 Inhibits *Paracoccidioides brasiliensis* Growth and Impacts Paracoccidioidomycosis through Multiple Mechanisms. mSphere. 2019 Apr 24;4(2):e00209-19. doi: 10.1128/mSphere.00209-19. PMID: 31019001; PMCID: PMC6483048.
24. He K, Hettinga A, Kale SL, Hu S, Xie MM, Dent AL, Ray A, Poholek AC. Blimp-1 is essential for allergen-induced asthma and Th2 cell development in the lung. J Exp Med. 2020 Jul 6;217(7):e20190742. doi: 10.1084/jem.20190742. PMID: 32399548; PMCID: PMC7336314.
25. Jannuzzi GP, de Almeida JRF, Amarante-Mendes GP, Romera LMD, Kaihami GH, Vasconcelos JR, Ferreira CP, de Almeida SR, Ferreira KS. TLR3 Is a Negative Regulator of Immune Responses Against *Paracoccidioides brasiliensis*. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Jan 10;8:426. doi: 10.3389/fcimb.2018.00426. PMID: 30687643; PMCID: PMC6335947.
26. Kallies A, Hawkins ED, Belz GT, Metcalf D, Hommel M, Corcoran LM, Hodgkin PD, Nutt SL. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. Nat Immunol. 2006 May;7(5):466-74. doi: 10.1038/ni1321. Epub 2006 Mar 26. PMID: 16565720.
27. Kashino SS, Fazioli Rdos A, Moscardi-Bacchi M, Franco M, Singer-Vermes LM, Burger E, Calich VL. Effect of macrophage blockade on the resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia. 1995 Jun;130(3):131-40.

28. Ketelut-Carneiro N, Grace Kelly Silva, Fernanda Agostini Rocha, Cristiane Maria Milanezi, Florêncio Figueiredo Cavalcanti-Neto, Dario Simões Zamboni, João Santana Silva; IL-18 Triggered by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *J Immunol* 1 May 2015; 194 (9): 4507–4517.
29. Ketelut-Carneiro N, Souza COS, Benevides L, Gardinassi LG, Silva MC, Tavares LA, Zamboni DS, Silva JS. Caspase-11-dependent IL-1 $\alpha$  release boosts Th17 immunity against *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS Pathog.* 2019 Aug 19;15(8):e1007990. doi: 10.1371/journal.ppat.1007990. PMID: 31425553; PMCID: PMC6715237.
30. Lin MH, Chou FC, Yeh LT, Fu SH, Chiou HY, Lin KI, Chang DM, Sytwu HK. B lymphocyte-induced maturation protein 1 (BLIMP-1) attenuates autoimmune diabetes in NOD mice by suppressing Th1 and Th17 cells. *Diabetologia.* 2013 Jan;56(1):136-46. doi: 10.1007/s00125-012-2722-y. Epub 2012 Oct 7. PMID: 23052053.
31. Lin MH, Yeh LT, Chen SJ, Chiou HYC, Chu CC, Yen LB, et al. T cell-specific Blimp-1 deficiency exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice by increasing Th1 and Th17 cells. *Clinical Immunology.* 2014;151(2):101–13.
32. Livonesi MC, Rossi MA, de Souto JT, Campanelli AP, de Sousa RLM, Maffei CML, et al. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2009 jan;11(1):123–32.
33. Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VL. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol* 2009; 183:1279–90.
34. Loures FV, Araújo EF, Feriotti C, Bazan SB, Costa TA, Brown GD, Calich VL. Dectin-1 induces M1 macrophages and prominent expansion of CD8+IL-17+ cells in pulmonary Paracoccidioidomycosis. *J Infect Dis.* 2014 Sep 1;210(5):762-73. doi: 10.1093/infdis/jiu136. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24604821.
35. Loures FV, Araújo EF, Feriotti C, Bazan SB, Calich VL. TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. *Front Microbiol.* 2015 Mar 31;6:261. doi: 10.3389/fmicb.2015.00261. PMID: 25873917; PMCID: PMC4379960.
36. Martins G, Calame K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. Vol. 26, *Annual Review of Immunology.* 2008. p. 133–69.
37. Martins G, Calame K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:133-69. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090241. PMID: 18370921.
38. Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, Szabolcs M, Herron A, Magnusdottir E, Calame K. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol.* 2006 May;7(5):457-65. doi: 10.1038/ni1320. Epub 2006 Mar 26. PMID: 16565721.
39. Martinez R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. Vol. 3, *Journal of Fungi.* MDPI AG; 2017.
40. Martinez, R. (2015). Epidemiology Of Paracoccidioidomycosis . *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 57(suppl.19), 11-20.

41. Mendes RP, Cavalcante R de S, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 2017 nov 2;11(1):224–82.
42. Menino JF, Saraiva M, Gomes-Alves AG, Lobo-Silva D, Sturme M, Gomes-Rezende J, Saraiva AL, Goldman GH, Cunha C, Carvalho A, Romani L. TLR9 activation dampens the early inflammatory response to *Paracoccidioides brasiliensis*, impacting host survival. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013 Jul 25;7(7):e2317.
43. Montenegro, M. R. & Franco, M., 1994. Pathology. In: *Paracoccidioidomycosis* (M. Franco, C. S. Lacaz, A. Restrepo-Moreno & G. Del Negro, ed.), pp. 131-150, Boca Raton: CRC Press.
44. Moreira AP, Campanelli AP, Cavassani KA, Souto JT, Ferreira BR, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. 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*. 2006 Oct;169(4):1270-81. doi: 10.2353/ajpath.2006.060271. PMID: 17003484; PMCID: PMC1698859.
45. Moreira AP, Campanelli AP, Cavassani KA, Souto JT, Ferreira BR, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. 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*. 2006 Oct;169(4):1270-81. doi: 10.2353/ajpath.2006.060271. PMID: 17003484; PMCID: PMC1698859.
46. 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*. 2008 Mar 1;180(5):3049-56. doi: 10.4049/jimmunol.180.5.3049. PMID: 18292527.
47. Nadeau S, Martins GA. Conserved and Unique Functions of Blimp1 in Immune Cells. Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
48. Neumann C, Heinrich F, Neumann K, Junghans V, Mashreghi MF, Ahlers J, et al. Role of Blimp-1 in programming th effector cells into IL-10 producers. *Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(9):1807–19.
49. Oca MM, Kumar R, de Labastida Rivera F, Amante FH, Sheel M, Faleiro RJ, et al. Blimp-1-Dependent IL-10 Production by Tr1 Cells Regulates TNF-Mediated Tissue Pathology. *PLoS Pathog*. 2016;12(1).
50. Parish IA, Marshall HD, Staron MM, Lang PA, Brüstle A, Chen JH, et al. Chronic viral infection promotes sustained Th1-derived immunoregulatory IL-10 via Blimp-1. *Journal of Clinical Investigation*. 2014 ago 1;124(8):3455–68.
51. Pina A, Saldiva PH, Restrepo LE, Calich VL. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol*. 2006 Jun;79(6):1202-13. doi: 10.1189/jlb.0106052. Epub 2006 Apr 7. PMID: 16603588.
52. Pino-Tamayo PA, Puerta-Arias JD, Lopera D, Urán-Jiménez ME, González Á. Depletion of Neutrophils Exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:3183285. doi: 10.1155/2016/3183285. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27642235; PMCID: PMC5015031.
53. Prado M, Barbosa Da Silva M, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with



- AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006 [Internet]. Vol. 104, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009.
54. Puerta-Arias J., Pino-Tamayo P., Arango J., Gonzalez A. Depletion of neutrophils promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis in mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One* 11, e0163985. doi:10.1371/journal.pone.0163985. 2016
  55. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. Vol. 17, *The Lancet Infectious Diseases*. Lancet Publishing Group; 2017. p. e367–77.
  56. Rosen Y. Pathology of Granulomatous Pulmonary Diseases. Vol. 146, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. College of American Pathologists; 2022. p. 233–51.
  57. Santos LA, Grisolia JC, Malaquias LCC, Paula FBA, Dias ALT, Burger E. Medication association and immunomodulation: An approach in fungal diseases and in particular in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Acta Trop*. 2020 Jun;206:105412. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105412. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32135141.
  58. Shikanai-Yasuda MA. Tratamento da paracoccidioidomicose. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015 set 1;57:31–7.
  59. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, Nathan A, Valle ACFD, Bagagli E, Benard G, Ferreira MS, Teixeira MM, Silva-Vergara ML, Pereira RM, Cavalcante RS, Hahn R, Durlacher RR, Houry Z, Camargo ZP, Moretti ML, Martinez R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017 Sep-Oct;50(5):715-740.
  60. Siqueira IM, Fraga CL, Amaral AC, Souza AC, Jerônimo MS, Correa JR, Magalhães KG, Inácio CA, Ribeiro AM, Burguel PH, Felipe MS, Tavares AH, Bocca AL. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). *Med Mycol*. 2016 Feb;54(2):177-88. doi: 10.1093/mmy/myv072. Epub 2015 Sep 17. PMID: 26384386.
  61. Souto JT, Florêncio Figueiredo, Alessandra Furlanetto, Klaus Pfeffer, Marcos A. Rossi, João S. Silva, Interferon- $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Determine Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Mice, *The American Journal of Pathology*, Volume 156, Issue 5, 2000, Pages 1811-1820, ISSN 0002-9440.
  62. Souza COS, Natália Ketelut-Carneiro, Cristiane M. Milanezi, Lúcia H. Faccioli, Luiz G. Gardinassi, João S. Silva, NLRC4 inhibits NLRP3 inflammasome and abrogates effective antifungal CD8+ T cell responses, *iScience*, Volume 24, Issue 6, 2021, 102548, ISSN 2589-0042.
  63. Tabora CP, Travassos LR, Bernard G. Paracoccidioidomycosis. *Encyclopedia of Mycology*. 2020. doi:10.1016/B978-0-12-819990-9.00001-9.
  64. Tavares AH, Derengowski LS, Ferreira KS, Silva SS, Macedo C, Bocca AL, Passos GA, Almeida SR, Silva-Pereira I. Murine dendritic cells transcriptional modulation upon *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jan;6(1):e1459. doi: 10.1371/journal.pntd.0001459. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22235359; PMCID: PMC3250510.
  65. Tristão FSM, Rocha FA, Carlos D, Ketelut-Carneiro N, Souza COS, Milanezi CM, et al. Th17-inducing cytokines il-6 and il-23 are crucial for granuloma

- Formation during experimental Paracoccidioidomycosis. *Front Immunol.* 2017 ago 21;8(AUG):949.
66. Uribe, F., et al., 1987. Histopathology of cutaneous and mucosal lesions in human paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 29 (2), 90–96. doi:10.1590/S0036-46651987000200005.
67. Yasuda MA. Pharmacological management of paracoccidioidomycosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2005 Mar;6(3):385-97. doi: 10.1517/14656566.6.3.385. PMID: 15794730.

***Anexos***

## 9. ANEXOS

### 9.1 Anexo 1: Aprovação do comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



São Paulo, 28 de Março de 2023

Ilmo(a)  
Dr(a). João Santana da Silva

Certificamos que a proposta intitulada "**Papel de Blimp-1 na regulação da resposta imune sistêmica ao Paracoccidioides brasiliensis**", registrada com o nº **1164/2023**, sob a responsabilidade de **João Santana da Silva**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do/a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em reunião realizada em 28 de Março de 2023.

Vigência da Autorização: 05/04/2023 a 05/04/2025						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo	Blimp f/f CD4 Cre -	8 semanas	25.0 g	135	0	135
Camundongo Knockout	Blimp f/f CD4 Cre +	8 semanas	25.0 g	135	0	135
Camundongo	Blimp f/f CD11c Cre -	8 semanas	25.0 g	150	0	150
Camundongo Knockout	Blimp f/f CD11c Cre +	8 semanas	25.0 g	150	0	150
<b>Origem:</b> biotério - Instalação Animal dos Departamentos de Bioquímica e Imunologia e Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos				<b>TOTAL</b>	570	

Vigência da Autorização: 05/04/2023 a 05/04/2025						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo	C57BL/6	8 semanas	25.0 g	90	0	90
<b>Origem:</b> biotério - Instalação Animal da Prefeitura da USP do Campus de Ribeirão Preto				<b>TOTAL</b>	90	

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes  
Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior  
Vice-Coodenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa