

ELISEU FRANK DE ARAÚJO

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

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

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

São Paulo

2009

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

Pouco se conhece sobre os mecanismos de imunidade inata associados a estes padrões diversos de resposta imune ao *P.brasiliensis*. Sabe-se, porém, que macrófagos são células importantes na regulação do crescimento fúngico e que a ativação pelas citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ são fundamentais para o desenvolvimento de atividade fungicida (BRUMMER, 1994, 1998; CANO et al., 1994; GONZALEZ et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2002). Por outro lado, as prostaglandinas parecem regular negativamente a atividade protetora dos macrófagos humanos (SOARES et al., 2001).

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

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

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

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

mecanismos, o estrógeno pode interferir na patogenicidade do *P. brasiliensis* (LOOSE et al., 1983). Além disso, estudos recentes demonstraram que o 17- β estradiol pode induzir *in vitro* a produção de óxido nítrico (NO) e aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em macrófagos peritoneais (HONG e ZHU, 2004).

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

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

A resposta imune inata contra os fungos, por sua vez, baseia-se no reconhecimento de estruturas moleculares conservadas encontradas em inúmeros grupos de microrganismos, os PAMPS (“*pathogen-associated molecular patterns*”) (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002) que são reconhecidos pelos seus receptores, os PRR (“*pattern recognition receptors*”), sendo os TLR (“*toll like receptors*”) um dos grupos mais importantes. Os TLRs compreendem vários componentes designados de TLR1 a TLR9, que reconhecem diferentes estruturas moleculares nos patógenos, e estão presentes nas membranas celulares e endocelulares das células da imunidade inata; há ainda os receptores do tipo lectinas-c como os receptores para manose (MR), dectina 1 e 2 que reconhecem β -glucanas e os receptores tipo “*scavenger*” também presentes em células da imunidade inata, como neutrófilos (PMN), macrófagos (M ϕ) e células dendríticas (DC) possibilitando a fagocitose dos patógenos (GORDON, 2002; BROWN e GORDON, 2003; AKIRA et al., 2006). Os TLRs são importantes em inúmeros aspectos na eliminação de micro-organismos. Sua ativação leva à produção de inúmeras moléculas de adesão e estimuladoras, dentre elas as quimiocinas que participam do recrutamento de fagócitos para o foco da infecção. A ativação de DCs, via TLRs, tornam estas células imunogênicas e com habilidade de induzir a ativação de linfócitos T “helper” Th1, Th2, ou Th17 responsáveis pela resposta imune adaptativa. Por exemplo, os TLR4 de DCs

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

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

Além dos receptores responsáveis pelo reconhecimento de patógenos durante a resposta imune inata é importante lembrar que a síntese de quimiocinas favorece o recrutamento e direcionamento de fagócitos, além disso, a síntese de citocinas (IFN- γ e IL-12, produzidas por linfócitos T e células NK) aumenta o “burst” oxidativo de neutrófilos, com a produção de radicais de oxigênio, bem como potencializa a fagocitose de macrófagos. Os PMN são amplamente encontrados em lesões de pacientes com PCM (NEWORAL et al.,

2003) e participam das respostas inflamatórias ao *P. brasiliensis* através da liberação de radicais de oxigênio e nitrogênio; grânulos citoplasmáticos de peroxidase que são liberados durante a fagocitose e participam da morte de leveduras ingeridas ou extracelulares (MELONI-BRUNERI et al., 1996; GONZALEZ et al., 2000). Já a imunidade adaptativa caracteriza-se principalmente pela utilização do repertório heterogêneo de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que produzem citocinas, além de anticorpos que podem funcionar como opsoninas.

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

As formas polares do nosso modelo experimental são similares à paracoccidioidomicose humana que se apresenta em padrões distintos, desde aqueles benignos, localizados, com preservação da imunidade celular, e aqueles disseminados, associados à supressão da resposta imune mediada por linfócitos T (CALICH e BLOTTA, 2005). Dentre as citocinas, o IFN- γ parece ser a mais importante nos fenômenos de imunoproteção. A depleção de IFN- γ por anticorpos monoclonais agravou a doença, tanto em animais susceptíveis, como em animais resistentes ao fungo desencadeando exacerbada infecção pulmonar, disseminação para fígado e baço, diminuição da resposta imune celular

específica e aumento dos níveis de anticorpos específicos (CANO et al., 1998). Souto et al. (2000) ao estudarem o papel do IFN- γ (com animais KO, deficientes do gene funcional para IFN- γ) e do TNF- α (através de animais p55KO, deficientes para o componente de 55 kDa do receptor de TNF- α) na resistência à infecção ao Pb, demonstraram que ambas as citocinas atuam no mecanismo de resistência à doença, e cuja presença leva a infecção com menor carga fúngica nos pulmões, formação de granulomas bem organizados e maior sobrevivência aos animais. Além disso, o IFN- γ induz a produção de óxido nítrico que determina anergia de células T e diminui a proliferação celular.

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

O óxido nítrico (NO) é gerado pela oxidação de um dos nitrogênios do aminoácido L-arginina e é um dos principais responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos (HIBBS et al., 1987; HIBBS et al., 1988). A enzima óxido-nítrico-sintetase induzida (iNOS ou NOS2) é produzida durante a ativação dos macrófagos pelos microrganismos ou produtos bacterianos como LPS, bem como por citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ , TNF- α e IL-12 (CORRALIZA et al., 1995; MACMICKING et al., 1997). Em um modelo de infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos por conídeos de *P. brasiliensis*, Gonzalez et al. (2000) demonstraram que o óxido nítrico (NO) induzido pela ativação de macrófagos por IFN- γ participa da inibição da transformação dos esporos em células leveduriformes e da estimulação da atividade fungicida. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Bocca et al. (1998) que demonstraram que o tratamento *in vivo* com um inibidor de óxido nítrico agrava a doença de camundongos (C57BL/6) infectados pelo *P. brasiliensis*. Entretanto, no curso da doença o NO também induz imunossupressão que se manifesta por

diminuição da expressão de antígenos Ia (MHC de classe II) em macrófagos, prejudicando desta forma a apresentação antigênica para os linfócitos T e conseqüente redução da linfoproliferação (BOCCA et al., 1998, 1999). Nesta mesma linha, nosso laboratório demonstrou que macrófagos de animais resistentes produzem baixos níveis de NO e altos de TNF- α , enquanto que macrófagos de camundongos susceptíveis estimulados por leveduras vivas do fungo produzem níveis elevados de NO e baixos de TNF- α (NASCIMENTO et al., 2002).

A IL-4, a mais típica citocina Th2, tem uma função dupla na PCM: dependendo do padrão genético do hospedeiro pode ser protetora ou exacerbadora da doença pulmonar (ARRUDA et al., 2004; PINA et al., 2004). Os leucócitos polimorfonucleares (PMN) atuam na da imunidade inata e parecem proteger camundongos susceptíveis ao *P. brasiliensis*, enquanto que nos camundongos resistentes, a proteção ocorre somente no início da infecção. Em um trabalho recente realizado por Pina et al. (2006), foi observado que a depleção de PMN induzia doença muito grave nos camundongos susceptíveis, associada a elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias. Assim, a ativação excessiva do sistema imune pode ser deletéria ao hospedeiro. Diferentemente do que se supunha na doença humana, experimentos de depleção in vivo e com camundongos nocaute (KO) para genes de subpopulações linfocitárias (CD4 e CD8) têm demonstrado que os linfócitos T CD8 são fundamentais para o controle da PCM pulmonar e podem se apresentar sob os padrões do tipo 1 (secretor de IFN- γ) ou tipo 2 (secretor de IL-4) de ativação. Além disso, estes linfócitos parecem ser fundamentais para o controle da carga fúngica pulmonar (CANO et al., 2000; CHIARELLA, 2003; CALICH e BLOTTA, 2005). Os linfócitos T CD4 do tipo 1 são ativados ao início da resposta imune de camundongos resistentes que mais tardiamente ativam subpopulações Th2. Esta ativação parece contribuir para o padrão resistente, talvez regulando negativamente processo inflamatório lesivo para tecidos do hospedeiro. A subpopulação T CD4 de camundongos susceptíveis é completamente anérgica e a doença destes animais não se altera pela depleção seletiva de linfócitos T CD4. Assim, em camundongos susceptíveis outros mecanismos imunorregulatórios parecem estar associados à susceptibilidade genética à doença. Neste aspecto, recentes trabalhos realizados com pacientes têm demonstrado que a imunossupressão na PCM está associada à expressão aumentada de moléculas CTLA-4 por linfócitos de pacientes (CAMPANELLI et al., 2003), à apoptose de células T (CACERE et al., 2002) e à ação de células T reguladoras de fenótipo T CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ (CAVASSANI, 2006).

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

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

Células Treg atuam através da inibição da produção de IL-2 bloqueando o ciclo celular de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, além de suprimir a atividade proliferativa de linfócitos CD4⁺CD25⁻ (NAKAMURA et al., 2001). O possível mecanismo da ação supressora dessas Treg se dá pelo contato direto célula-célula, envolvendo sinais inibidores através da sinalização mediada por CTLA-4, GITR e TGF- β de membrana (READ, et al.,2000; SHIMIZU et al., 2002; NAKAMURA et al.,2001), ou pela produção, mas não exclusivamente

dessas células, das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β (ASSEMAN et al., 1999). Muitos trabalhos relatam a importância dessas células reguladoras em casos crônicos de infecção onde, devido à persistência do patógeno, essas células estariam controlando as respostas imunes que poderiam causar quadros inflamatórios exacerbados na tentativa de erradicar o agente infeccioso. Além disso, por impedirem a cura asséptica, as células Treg controlariam a manutenção da memória imunológica.

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

Sabe-se ainda que um dos mecanismos inibitórios das células T-reg utiliza a molécula co-estimulatória CTLA-4 através da sua interação com moléculas B7 presentes nas células apresentadoras de antígenos, em especial as células dendríticas. Essa interação induz a expressão da enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima citosólica que catalisa a etapa inicial do aminoácido essencial triptofano na via das quinureninas que, por sua vez, inibem a imunidade mediada por linfócitos T (FALLARINO et al., 2003; MUNN et al., 1999). Estas descobertas fornecem uma nova visão da imunoregulação mediada por IDO que

combina a função regulatória das células Tregs com a ação das DCs atuando como mediadores finais de respostas tolerogênicas (BEISSERT et al., 2006).

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

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

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

Frumento et al. (2002) relataram que a atividade de IDO é efetiva em reduzir a proliferação de células CD4+ e CD8+, bem como de células NK, mas não de células B. Este trabalho sugere também que tanto a depleção de triptofano bem como o excesso de quinurenina são necessários para que os efeitos antiproliferativos de IDO sejam completos (MULLEY et al., 2008).

A expressão de IDO é induzida principalmente por IFN- γ , que controla a ativação transcrricional de *INDO*; entretanto, outros fatores como IL1 β , IL-10, TNF- α , TNF- β , LPS e

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

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

O composto 1-metil-triptofano (1MT) que compete pela enzima, inibe o efeito da ação da IDO, levando a um aumento de células Th1 e uma diminuição de células Th2 e Tregs. Mais ainda, por bloquear IDO, 1MT inibe a produção de catabólitos do triptofano como as quinureninas, que têm sido mostradas como capazes de reduzir tanto a proliferação de células T como NK. Este mecanismo regulador dependente de células dendríticas pode auxiliar no entendimento de como as células T regulatórias podem inibir outras células T sem contato celular. A expressão de IDO em células apresentadoras de antígenos (APCs) se correlaciona com fraca proliferação de células T, aumento de apoptose e fracas respostas imunológicas in vivo (MUNN et al., 1999; MUNN et al., 2002; HWU et al., 2000; ROMANI et al., 2005; MELLOR et al., 2002; FALLARINO et al., 2002; MUNN et al., 1996). O inibidor 1MT, restaura a proliferação de células T, aumenta as respostas destas células durante a gestação, e abole processos regulatórios que suprimem as respostas a antígenos tumorais, a auto-antígenos em doenças auto-imunes e a rejeição de aloenxertos (MELLOR et al., 2002; ALEXANDER et al., 2002; MIKI et al., 2001).

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

Justificativa

Na PCM os fenômenos imunoregulatórios são pouco conhecidos. Sabe-se, porém, que animais suscetíveis ao início da doença secretam quantidades apreciáveis de IFN- γ e NO (CANO, 2000; NASCIMENTO, 2002) e apresentam intensa anergia de células T-CD4 que não é regulada por IL-4 e nem por IL-12 (ARRUDA, 2002, 2004). É ainda digno de nota o fato de que linfócitos T CD4+ não regulam a gravidade da doença, eliminando um papel preponderante das células T, principalmente as Th2 que produzem citocinas desativadoras de macrófagos (CHIARELLA, 2003). Além disso, várias evidências têm demonstrado que a síntese aumentada de mediadores pró-inflamatórios por células da imunidade inata associa-se a padrões mais graves da doença (CALICH et al., 2005). Assim, a síntese de leucotrienos no

curso da PCM pulmonar, ao contrário de outras patologias infecciosas e parasitárias (FACCIOLI, 2005), leva ao aumento da carga fúngica no sítio da infecção. Este fato foi associado à ativação de células fagocíticas, à síntese aumentada de IL-12 e NO e possivelmente à maior expressão de receptores de membrana que levam à maior endocitose e crescimento fúngico (RIBEIRO et al., 2005).

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

Em trabalhos recentes realizados em nosso laboratório, foi estudado envolvimento do receptor TLR2 e da proteína adaptadora de sinalização intracelular MyD88 no reconhecimento do *P. brasiliensis* na paracoccidiodomicose pulmonar, através da utilização de camundongos nocautes de TLR2 da linhagem C57Bl/6 (TLR2^{-/-}) (LOURES et al., 2009; CALICH et al., 2008). Foi observada a diminuição da recuperação de fungos viáveis dos animais deficientes no ensaio fungicida utilizando macrófagos peritoneais (*in vitro*), bem como dos homogenatos de pulmão (*in vivo*). Observou-se também menor fagocitose ou aderência de *P. brasiliensis* à macrófagos TLR2 KO, concomitante à menor produção de NO. Estes dados sugerem que os TLR2 participam ativamente no reconhecimento de leveduras de *P. brasiliensis*. Observou-se também, nos animais TLR2 KO, *in vivo*, uma diminuição da síntese de IL-10 com concomitante diminuição de IL-12 e MCP-1 e aumento da produção de IL-23 e IL-17 indicando a ativação predominante de uma resposta do tipo Th17. Ao analisar os infiltrados inflamatórios de pulmão, observou-se também a diminuição da frequência de células T regulatórias (Treg) (LOURES et al., 2009).

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

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

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

6. CONCLUSÃO

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

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

* De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CALICH, V.L.; KIPNIS, T.L.; MARIANO, M.; NETO, C.F.; DIAS DA SILVA, W.D. The activation of the complement system by *Paracoccidioides brasiliensis* in vitro: its opsonic

effect and possible significance for an in vivo model of infection. **Clin. Immunol. Immunophatol.**, v.12, p. 21-30, 1979.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CORRALIZA, M. I.; SOLER, G.; EICHMANN K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE₂) in murine bone-marrow-derived macrophages. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, v. 206, p. 667-673, 1995.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FUJIGAKI, S.; SAITO, K.; TAKEMURA, M.; MAEKAWA, N.; YAMADA, Y.; WADA, H.; SEISHIMA, M. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient-mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine 2,3-dioxygenase. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 779-786, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

HERRING, A.C.; FALKOWSKI, N.R.; CHEN, G.H.; MCDONALD, R.A.; TOEWS, G.B.; HUFFNAGLE, G.B. Transient neutralization of tumor necrosis factor alpha can produce a chronic fungal infection in an immunocompetent host: potential role of immature dendritic cells. **Infect. Immun.**, v. 2005, 73, p. 39-49, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MONTAGNOLI, C. B7/CD28-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 6298-6308, 2002.

MOREIRA, A.P.; DIAS-MELICIO, L.A.; PERAÇOLI, M.T.S.; CALVI, S.A.; SOARES, A.M.V.C. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeasts cells by IFN- γ and TNF- α activated murine peritoneal macrophages: evidence of H₂O₂ and NO effector mechanisms: **Mycopathology**, v. 166, p. 17-23, 2008.

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

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

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

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

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

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

MUNN, D. H.; SHARMA, M.D.; LEE, J.R.; JHAVER, K.G.; JOHNSON,T.S.; KESKIN, D. B.; MARSHALL, B.; CHANDLER,P.; ANTONIA, S.J.; BURGESS,R. Potential regulatory

function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, 297, p. 1867, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

ORABONA, C.; BELLADONNA, M.L.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; FALLARINO, F.; VOLPI, C.; GIZZI, S.; FIORETTI, M.C.; GROHMANN, U.; PUC CETTI, P. Cutting edge: silencing suppressor of cytokine signaling 3 expression in dendritic cells turns cd28-ig from immune adjuvant to suppressant. **J. Immunol.**, v. 174, p. 6582-6586, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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