

# **Relação de Células T Regulatórias FoxP3+ com a Proliferação Fúngica em casos de Paracoccidioidomicose Cutânea e Bucal**

Rhanderson Miller Nascimento Cardoso<sup>1</sup>, Flávia Aparecida de Oliveira, Aílton Cabral Fraga Júnior, Elbio Candido de Paula, Eliza Carla Barroso Duarte Veríssimo<sup>2</sup>

Setor de Patologia Geral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge

Universidade Federal de Goiás, 74605050, Brasil

[rhandersonmiller@hotmail.com](mailto:rhandersonmiller@hotmail.com), [elizacbduarte@gmail.com](mailto:elizacbduarte@gmail.com)

**PALAVRAS-CHAVE:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomicose cutânea, células T regulatórias

## **1 INTRODUÇÃO**

A Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, endêmica na América Latina. O Brasil responde por aproximadamente 70% dos casos da doença, que predomina em adultos do sexo masculino e em trabalhadores rurais (Greer & Restrepo, 1977; Valle *et al*, 1992; Paniago *et al*, 2003; Santo, 2008). A mortalidade da Paracoccidioidomicose é a maior entre as micoses sistêmicas (Bittencourt *et al*, 2006).

Trata-se de uma doença granulomatosa crônica adquirida por meio da inalação de conídios ou fragmentos micelianos de *P. brasiliensis*. A infecção primária ocorre nos pulmões e a partir desses pode ocorrer a disseminação para vários órgãos e sistemas originando lesões secundárias nas mucosas, nos linfonodos, na pele e nas glândulas adrenais (Bisinelli & Ferreira, 2002).

Segundo Marques e colaboradores (2007), aproximadamente 60% dos pacientes com Paracoccidioidomicose apresentam a forma cutânea da doença. As lesões de pele são extremamente pleomórficas, podendo se apresentar como pápulas, placas ou nódulos. A secreção purulenta pode estar presente ou ausente (Ameen *et al.*, 2009; Marques *et al*, 2007; Sampaio, 2001).

Revisado pela orientadora.

1 – Orientando.

2 – Orientadora.

Células T regulatórias (Treg) podem ter papel importante na patogênese da Paracoccidiodomicose (Cavassani *et al.*, 2006). Essas células são uma subpopulação de linfócitos T CD4+ que atuam regulando a ativação de células da resposta imune, mantendo a tolerância periférica a auto-antígenos (Abbas *et al.*, 2000).

As células Treg expressam um grande número de marcadores fenotípicos, destacando-se CD4, CD25 e o FoxP3. Este é um membro da família de fatores de transcrição forkhead que desempenha um papel fundamental na diferenciação e atividade supressora de Treg e é considerado o marcador mais específico para células T regulatórias. (Chen *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003; Yamaguchi & Sakaguchi, 2006; Gavin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Zheng & Rudensky, 2007).

Essas células têm a capacidade de regular a ativação, a proliferação e a função efetora de células T convencionais ativadas em algumas doenças infecciosas, como leishmaniose, herpes simples e esquistossomose (Sakaguchi *et al.*, 2001; Shevach, 2002; Fehervari & Sakaguchi, 2004; Belkaid & Rouse, 2005). No entanto, foram encontrados poucos estudos na literatura sobre o papel das células Treg na Paracoccidiodomicose (Cavassani *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2008).

## **2 OBJETIVOS**

Correlacionar a densidade de células T regulatórias FoxP3+ com a densidade fúngica em lesões cutâneas de pacientes com Paracoccidiodomicose e, dessa forma, avaliar a influência das populações de células Treg na proliferação fúngica local da Paracoccidiodomicose cutânea.

Comparar a proliferação fúngica e a densidade de células Treg entre pacientes portadores de Paracoccidiodomicose cutânea e bucal.

## **3 METODOLOGIA**

As amostras utilizadas neste estudo foram selecionadas dos arquivos de laudos e blocos parafinizados do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, Goiânia-GO e do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás. Os casos selecionados e incluídos foram de Paracoccidiodomicose bucal e cutânea com

manifestação crônica/adulta e com confirmação do diagnóstico pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) e Grocott.

Os blocos selecionados, incluídos em parafina, foram seccionados em micrótomo (Leica RM2165), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5µm. Os cortes histológicos foram corados pelo Grocott com a finalidade de identificação do *P. brasiliensis*

Alguns cortes consecutivos foram de 3µm, sendo estendidos sobre lâminas silanizadas (A3648-EsyPath) (DAKO, S3003, Glostrup-Denmark) para a realização da técnica de imunistoquímica. As células Treg foram identificadas pelos anticorpos anti-FoxP3. Para a identificação das proteínas utilizou-se os métodos da streptavidina-biotina-peroxidase .

A contagem das células fúngicas Grocott+ e de células Treg FoxP3+ foi feita com o auxílio de um microscópio binocular AXIOLAB-ZEISS associado à ocular com retículo de integração quadrado em forma de rede. Todas as amostras foram examinadas sob o aumento de 40x (objetiva). Foram analisados dez campos, com área individual de 0,09614 mm<sup>2</sup>.

O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Goiás e da Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Hospital Araújo Jorge. A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaStat 2.03. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r) para testar a existência de correlação entre a densidade de células fúngicas e de células Treg. Para comparar a densidade de células fúngicas e Treg entre casos de Paracoccidiodomicose cutânea e bucal foi utilizado o teste *t* de Student. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

#### **4 RESULTADOS**

Foram analisados cinco casos de Paracoccidiodomicose cutânea, todos com manifestação crônica da doença e diagnóstico confirmado pela Hematoxilina - Eosina e Grocott.

A média da densidade de fungos foi de  $104,06 \pm 104,02$  /mm<sup>2</sup> (Figura 1). A densidade média de células T regulatórias marcadas pelo FoxP3 foi 52,24 /mm<sup>2</sup>, com variações entre zero e 152,9 /mm<sup>2</sup> (Figura 2).

A correlação entre a densidade de fungos e células T regulatórias FoxP3+ em casos cutâneos foi negativa, porém sem significância estatística ( $r = -0,654$ ;  $p > 0,05$ ; Gráfico 1). Em casos de mucosa bucal, a correlação foi positiva, mas também sem significância estatística ( $r = 0,184$ ;  $p > 0,05$ ; Gráfico 2).

Comparando-se os casos de Paracoccidioidomicose cutânea e bucal, foi encontrada uma maior densidade fúngica naqueles (média de  $104,06 \pm 104,02$  /mm<sup>2</sup>) em relação a esses (média de  $58,9 \pm 53,7$  /mm<sup>2</sup>). Porém não houve significância estatística pelo teste *t* de Student ( $p=0,263$ ), conforme se observa no Gráfico 3.

Quanto à densidade de células T regulatórias foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre casos cutâneos e bucais ( $p<0,001$ ), fato observado no Gráfico 4. Isto é, a densidade de células Treg FoxP3+ foi significativamente maior em casos de Paracoccidioidomicose bucal (média de  $697,3 \pm 328,3$  /mm<sup>2</sup>) em relação a casos cutâneos (média de  $52,24 \pm 60,93$  /mm<sup>2</sup>).

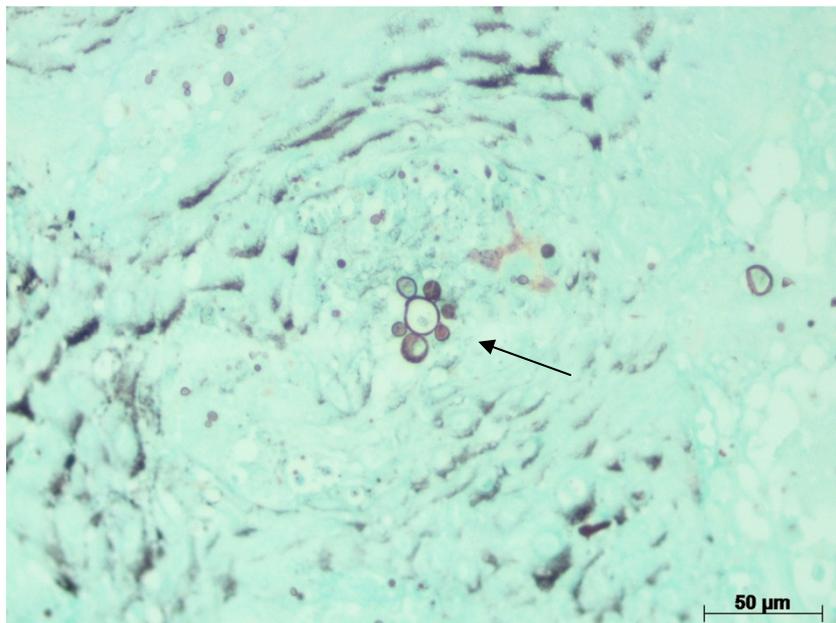


Figura 1- Corte histológico onde se observa levedura de *P. brasiliensis* em processo de brotamento, com aspecto semelhante a "roda de leme" (seta, Grocott).

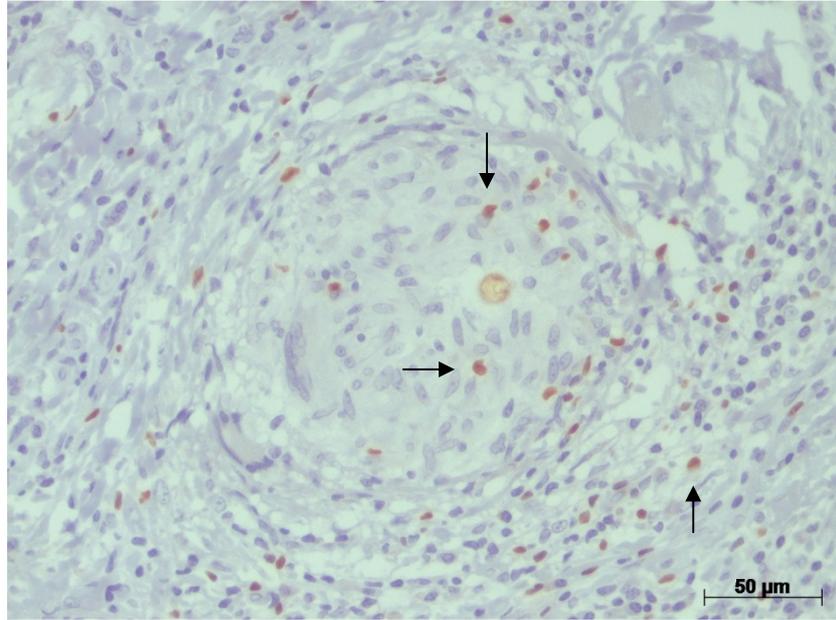


Figura 2 - Expressão imunoistoquímica do FoxP3 na Paracoccidioidomicose (setas).

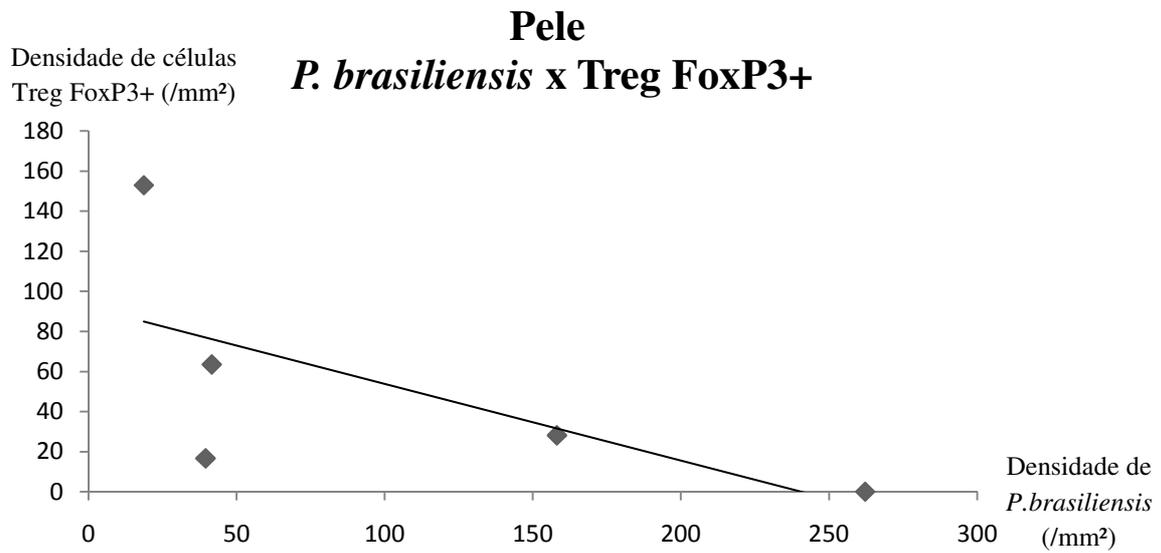


Gráfico 1 - Correlação entre as densidades de *P. brasiliensis* e de células Treg FoxP3+ em casos de Paracoccidioidomicose cutânea ( $r = -0,654$ ;  $p > 0,05$ ).

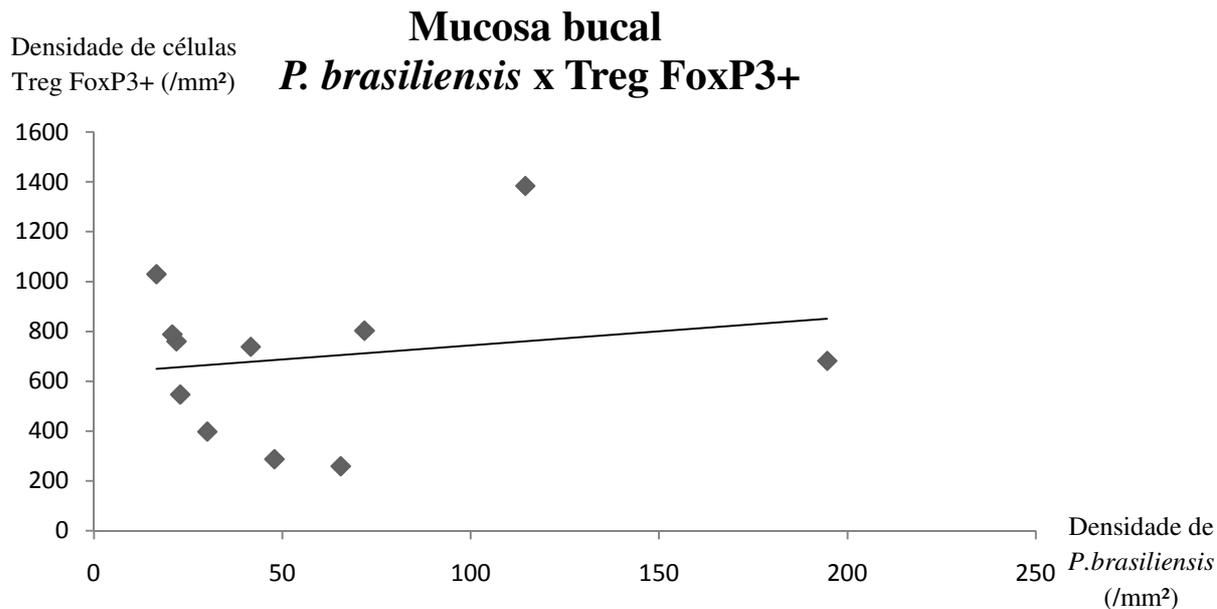


Gráfico 2 - Correlação entre as densidades de *P. brasiliensis* e de células Treg FoxP3+ em casos de Paracoccidiodomicose bucal ( $r=0,184$ ;  $p>0,05$ ).

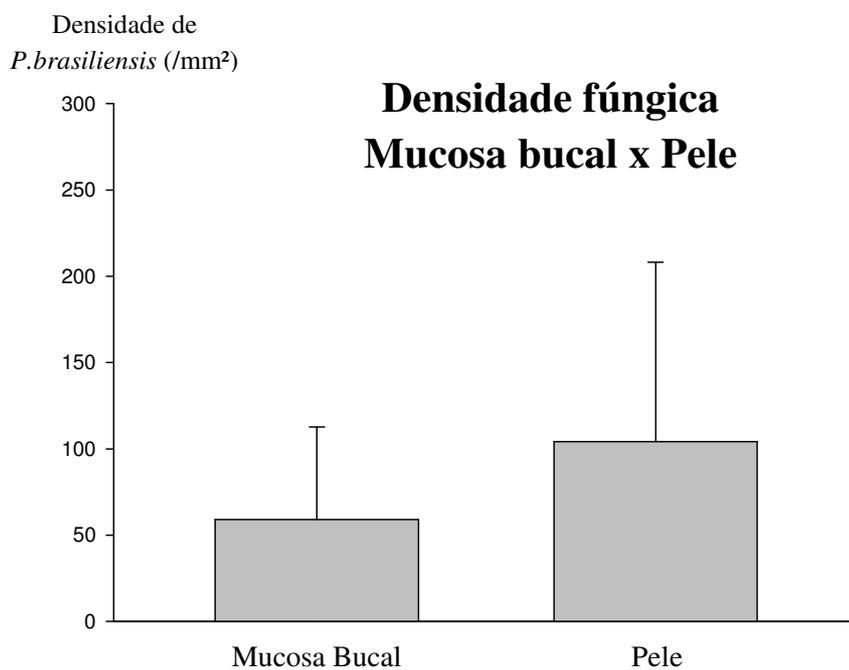


Gráfico 3 – Comparação entre densidade fúngica em casos de Paracoccidiodomicose bucal e cutânea. Conforme se observa, não houve diferença estatisticamente significativa.

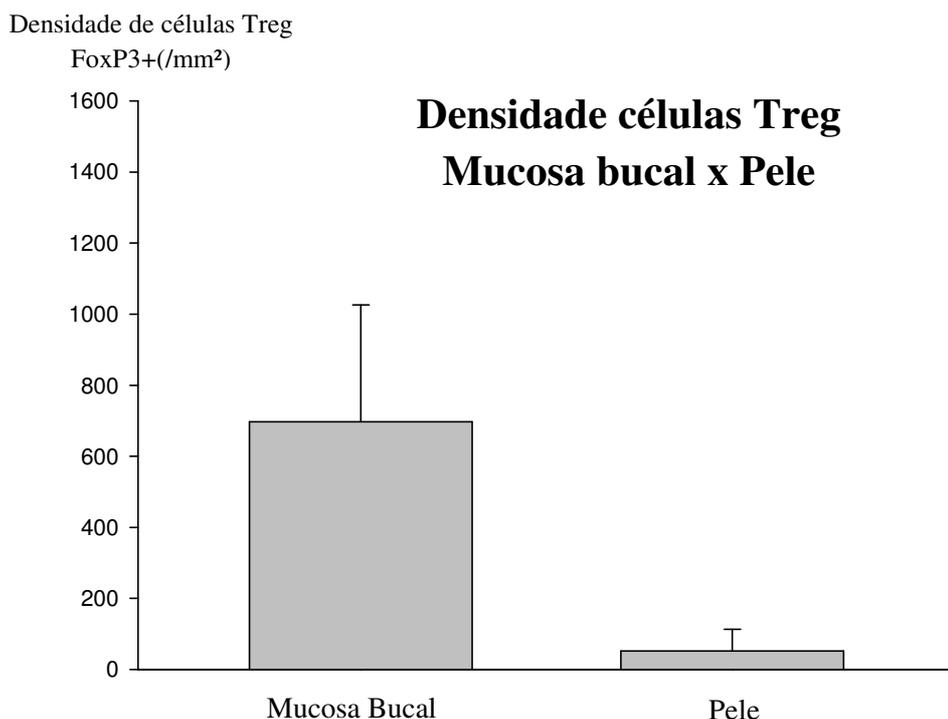


Gráfico 4 – Comparação entre densidade de células Treg FoxP3+ em casos de Paracoccidioidomicose bucal e cutânea. Conforme se observa, houve diferença estatisticamente significativa.

## 5 DISCUSSÃO

Foi observada uma correlação negativa não significativa entre a densidade fúngica e a densidade de células T regulatórias (Treg) FoxP3+ em casos de Paracoccidioidomicose cutânea. Sendo assim, o aumento no número de células Treg associa-se à diminuição da densidade fúngica. Esse dado é destoante da literatura, visto que existem numerosos trabalhos demonstrando o papel imunossupressor das células Treg FoxP3+, mesmo que não especificamente em casos de Paracoccidioidomicose cutânea.

Cavassani e colaboradores (2006) demonstraram que as células Treg estão aumentadas em relação ao grupo controle no sangue periférico e em lesões cutâneo-mucosas de pacientes com a forma crônica de Paracoccidioidomicose.

A transferência de células Treg de camundongos selvagens para animais com deficiência de células Treg aumenta significativamente o número de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* nos pulmões comparado ao grupo que não recebeu transfusão de Treg. Além disso, camundongos tipo selvagem que receberam anticorpos monoclonais anti-CD25, diminuindo assim a população de células Treg, tiveram uma diminuição importante e

significativa no número de partículas fúngicas viáveis (Moreira *et al*, 2008). Dessa maneira, esses estudos demonstram que as células Treg FoxP3+ favorecem o crescimento fúngico nas lesões. Essa função imunossupressora não está de acordo com o presente estudo.

Fontenot e colaboradores (2003) demonstraram que camundongos deficientes de células FoxP3+ morreram com uma síndrome linfoproliferativa auto-imune fatal e rápida (com 3-4 semanas de vida), sendo esta síndrome relacionada à incapacidade destes animais em gerar células T regulatórias.

Em outro estudo, a transferência de uma população de células Treg para camundongos deficientes de células T suprimiu a resposta inflamatória induzida por bactérias do trato gastrointestinal (Kullberg e colaboradores, 2002).

Estudos semelhantes, demonstrando o papel imunossupressor das células Treg, também foram realizados com *Candida albicans* (Montagnoli *et al.*, 2002), *Leishmania major* (Aseffa *et al*, 2002; Yurchenko *et al.*, 2006) e *Schistosoma mansoni* (McKee & Pearce, 2004).

Os resultados em Paracoccidiodomicose cutânea podem ser comparados com resultados prévios em Paracoccidiodomicose bucal (Cardoso & Veríssimo, 2010). Constata-se maior densidade fúngica em casos cutâneos (média de 104,06 /mm<sup>2</sup>) em relação a casos de mucosa bucal (média de 58,93 /mm<sup>2</sup>), sem significância estatística. Por outro lado, houve predomínio de células Treg FoxP3+ em mucosa bucal (média de 697,3 /mm<sup>2</sup>) em relação aos casos de pele (média de 52,24 /mm<sup>2</sup>). Faltam estudos na literatura para comparação com esses resultados.

Cabe ressaltar que a correlação positiva entre a densidade fúngica e a densidade de células Treg encontrada em Paracoccidiodomicose bucal ( $r=0,184$ ;  $p>0,05$ ) está de acordo com a literatura, ou seja, sugere a existência de papel imunossupressor das células Treg em Paracoccidiodomicose bucal.

Diante de vários trabalhos que levantam fortes evidências sobre o papel imunossupressor das células Treg FoxP3+, inclusive em casos de Paracoccidiodomicose, levanta-se a hipótese de que o número pequeno de casos de pele no estudo atual seja responsável pela divergência dos resultados com a literatura. Todavia, estudos como este têm sempre esta limitação, devido à dificuldade em se encontrar casos de Paracoccidiodomicose cutânea.

## 6 CONCLUSÃO

As lesões cutâneas e bucais são de grande valor na Paracoccidioidomicose, pela importância clínica dessas lesões e também porque em muitos casos são as primeiras e as principais manifestações dessa micose.

O presente estudo encontrou uma correlação negativa entre a densidade dessas células e a densidade fúngica em lesões cutâneas pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Esse resultado vai de encontro às evidências científicas sobre o papel imunossupressor das células T regulatórias. Contudo, o número limitado de casos dificulta a avaliação dos resultados aqui encontrados. Conclui-se que o papel das células T regulatórias FoxP3+ na patogênese da Paracoccidioidomicose cutânea ainda merece outras investigações.

Foi encontrado ainda um predomínio de células T regulatórias FoxP3+ em casos de Paracoccidioidomicose bucal em relação às lesões em pele. A significância clínico-patológica desse achado também depende da realização de outros estudos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A.K.; LICHTMAN A.H.; POBER J.S. Effector mechanisms of immune responses. *In*: ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. **Cellular and Molecular Immunology**, 4.ed. Philadelphia: W.B. SAUNDERS COMPANY, 2000. p.235-339.

AMEEN, M.; TALHARI, C.; TALHARI, S. Advances in paracoccidioidomycosis. **Clin Exp Dermatol**, Out, 2009.

ASEFFA, A.; GUMY, A.; LAUNOIS, P.; MACDONALD, H.R.; LOUIS, J.A.; TACCHINI-COTTIER, F. The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. **J Immunol**, v. 169, n. 6, p. 3232-41, sep, 2002.

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

BISINELLI J.C.; FERREIRA M.L.S. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose( blastomicose sul-americana) *In*: Tommasi AF. **Diagnóstico em patologia bucal**. 3ªed. São Paulo; PANCAST, 2002, p. 202-9.

BITTENCOURT, J.I. OLIVEIRA, R.M. COUTINHO, Z.F. Paracoccidioidomycosis mortality in the state of Paraná, Brazil, 1980-1998. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 6, p. 1856-64, jan, 2006.

CARDOSO, R.M.N.; VERÍSSIMO, E.C.B. **Avaliação das populações de células T CD4+ e de células T regulatórias FoxP3+ na Paracoccidioidomicose bucal**. Relatório (Iniciação Científica) – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

CAVASSANI, K.A.; CAMPANELLI, A.P., MOREIRA, A.P. et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **J Immunol**, v.177, n.9, p. 5811-5818, Nov, 2006.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N. et al. Conversion of peripheral CD4+ CD25 naive T cells to CD4+ CD25+ regulatory T cells by TGF-b induction of transcription factor FoxP3. **J Exp Med**, v.198, p. 1875-1886, Dec, 2003.

FEHERVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. CD4\_Tregs and immune control. **J. Clin. Invest**, v.14, p.1209–1217, 2004.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**, v.4, n.4, p. 330-6, apr, 2003.

GAVIN, M.A.; RASMUSSEN, J.P.; FONTENOT, J.D.; VASTA, V.; MANGANIELLO, V.C.; BEAVO, J.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 dependent programme of regulatory T cell differentiation. **Nature**, v. 445, n. 7129, p. 771-5, feb, 2007.

GREER, D.L.; RESTREPO A. La epidemiologia de La paracoccidioidomicosis. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 82, n. 5, p. 428-445, may, 1977.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of Regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-61, feb, 2003.

KULLBERG, M.C. et al. Bacteria-triggered CD4+ T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. **J Exp Med**, v. 196, n. 4, p. 505-15, aug, 2002.

MARQUES, S.A.; BARROS, C.D.; CARLOS, L.J. et al. Paracoccidioidomicose: *frequência, morfologia e patogênese* de lesões tegumentares. **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 5, p. 411-417, Out, 2007.

MCKEE, A.S.; PEARCE, E.J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol**, v. 173, n. 2, p. 1224-31, jul, 2004.

MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; MOSCI, P.; SHARPE, A.H.; ROMANI, L. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **J Immunol**, v. 169, n. 11, p. 6298-308, dec, 2002.

MOREIRA, A.P.; CAVASSANI, K.A.; TRISTÃO, F.S.M.; CAMPANELLI, A.P.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. CCR5 dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. **J Immunol**, v. 180, n. 5, p. 3049-56, mar, 2008.

PANIAGO, A.M.M.; AGUIAR, J.I.A.; AGUIAR, E.S. et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 4, p. 455-9, jul-ago, 2003.

SAKAGUCHI, S.; N. SAKAGUCHI, J.; SHIMIZU, S. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25\_CD4\_ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol Rev**, v.182, p.18–32, 2001.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Micoses Profundas. In:\_\_\_\_. Dermatologia. 2ª Ed. **Artes Medicas**. São Paulo, Cap. 43, 2001.

SANTO, A.H. Paracoccidioidomycosis-related mortality trend, state of São Paulo, Brazil: a study using multiple causes of death. **Rev Panam Salud Publica**, v. 23, n. 5, p. 313-24, may, 2008.

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

VALLE, A.C.F.; WANKE, B.; PEIXOTO, T.C. *et al.* Tratamento da paracoccidioidomicose: estudo retrospectiva de 500 casos. **An Bras Dermatol**, v. 67, n. 5, p. 251-4, set-out, 1992.

WANG J.; IOAN-FACSINAY, A.; VAN DER VOORT, E.I. *et al.* Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. **Eur J Immunol**, v.37, p.129–138, 2007.

YAMAGUCHI, T.; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. **Semin Cancer Biol**, v.16, p.2, p.115-123, 2006.

YURCHENKO, E.; TRITT, M.; HAY, V.; SHEVACH, E.M.; BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C.A. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. **J Exp Med**, v. 203, n. 11, p. 2451–60, oct, 2006.

ZHENG, Y; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. **Nat Immunol**, v. 8, n. 5, p. 457-62, may, 2007.