Camila Rodrigues Cacere

ASPECTOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA APOPTOSE DE CÉLULAS MONONUCLEARES EM PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas

da Universidade de São Paulo para obtenção do

Título de Doutor em Ciências (Microbiologia)

São Paulo

2008

Camila Rodrigues Cacere

ASPECTOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA APOPTOSE DE CÉLULAS MONONUCLEARES EM PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas

da Universidade de São Paulo para obtenção do

Título de Doutor em Ciências (Microbiologia)

São Paulo

2008

Camila Rodrigues Cacere

ASPECTOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA APOPTOSE DE CÉLULAS MONONUCLEARES EM PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas

da Universidade de São Paulo para obtenção do

Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2008

RESUMO

DEDICATÓRIA

A minha mãe Bilia (*in memorian*), que dedicou a mim durante toda sua vida seu verdadeiro amor, eu dedico esta minha conquista, pois sem você nada disso teria sido possível. Amo você pra sempre.

Ao meu pai Benito, pois você merece todo meu grande amor, gratidão e admiração. Você é guerreiro e vencedor desde sempre. Você é simplesmente demais!

A você Gil pelo apoio, paciência, confiança e principalmente por ter transformado meu futuro profissional em algo melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte, pelo apoio e oportunidade concedidos, para que fosse possível a realização deste projeto, mas principalmente de um sonho.

Ao Prof. Dr. Gil Benard, que teve comigo a mais nobre das virtudes: paciência. Serei sempre agradecida por toda sua compreensão.

A Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini pela brilhante ajuda profissional que durante o desenvolvimento do trabalho principalmente nas discussões de resultados e que gentilmente forneceu o antígeno fúngico utilizado em nosso trabalho.

Aos pacientes, que mesmo diante da aflição e incerteza de sua condição física, sentem-se orgulhosos em colaborar para o avanço nos estudos da Paracoccidioidomicose.

A Dra. Andréia Rangel Santos pela atenção e cuidado na correção do texto final.

Ao Dr. Dewton e Paula Rigato pela amizade e ajuda na formatação da tese.

A minha amiga Paula Rigato, Dona Penha e Sr. Renato, eu e minha família agradecemos imensamente todo o carinho, amizade e cuidados que me foram dados.

A Noemia Mie Orii, Rosangela Maria Araújo e Soraya Ogusuku, como resumir o que tenho a dizer para vocês! Companheirismo e paciência nas horas mais difíceis, meus sinceros agradecimentos não só meu como de toda minha família.

A Heide por sua amizade e seus conselhos sempre tão preciosos. Você é muito querida.

A Dra. Carla Cristina Romano, por ter partilhado comigo todo seu conhecimento e competência. A minha gratidão será para sempre.

A todos os pesquisadores e alunos do LIM-56, que em algum momento participaram da elaboração deste trabalho.

A todos os funcionários do LIM-56, os quais partilharam uma forte amizade. Muito obrigada por tudo.

A sempre amiga, irmã Vânia e toda sua família, você sabe o que fez por mim... não tenho palavras para agradecê-la!

Ao meu irmão Rafael, minha avó Ruth, tios, tias e primos sem vocês eu não teria tido forças para continuar, amo vocês!

Aos meus amigos, que participam de forma essencial, muitas vezes sem se dar conta de como são importantes para que nossos sonhos se realizem: Ana Elisa, Rosemeire Navickas, Adriana de Brito, Rafael Martins, Alexandre Correia, Douglas Soares e Marta Soares.

A FAPESP, pela concessão do auxílio.

“A mim mesmo pareço ser um menino que brinca à beira da praia, ora achando uma pedra mais polida ou uma concha mais formosa, enquanto o grande oceano da verdade se estende, ignoto, diante de mim.”

ISAAC NEWTON

CACERE C.R. **Aspectos moleculares envolvidos na apoptose de células mononucleares de pacientes com paracoccidioidmicose.** Tese. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A hiporreatividade das células T observada na resposta imune a antígenos de *P. brasiliensis* de pacientes com paracoccidioidomicose ativa deve contribuir para o não controle da doença, levando à disseminação do fungo. É, na maioria das vezes, reversível com tratamento antifúngico. Os mecanismos que levam a esta hiporreatividade não são bem conhecidos. No entanto, foram demonstrados em resultados prévios em nosso laboratório que células mononucleares de pacientes frente a gp43 apresentam níveis elevados de apoptose. Para tentarmos explicar esse mecanismo, nossa primeira hipótese foi de avaliar se a ativação celular desses pacientes estavam sendo prejudicada por uma ativação inadequada induzida pela expressão alterada de moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86, CD28, CD152, ICOS e PD-1. A expressão dessas moléculas foi avaliada em células T e monócitos de pacientes com doença ativa (n = 71) e controles curados (n = 24) de um episódio prévio de PCM, mantidas em cultura com antígeno metabólico de *Candida albicans* (CMA), gp43 ou sem estímulo após 4 dias em cultura. Os resultados obtidos demonstraram que a expressão do CD28 foi comparável entre doentes e controles, e que a expressão de CD152, PD-1 e ICOS, que preferencialmente exercem um papel negativo na sinalização celular, foi maior em células T de pacientes, estimuladas ou não, quando comparadas com células de indivíduos controles. Em paralelo, foram realizados experimentos com a adição dos respectivos anticorpos bloqueadores, que, no entanto, não restabeleceu a proliferação celular dos pacientes. A expressão das moléculas CD80 e CD86 na superfície dos monócitos foi similar em pacientes e controles. Já a expressão dessas moléculas na superfície de linfócitos foi maior nos pacientes tanto em células estimuladas como não estimuladas. O bloqueio com os respectivos anticorpos no dia 0 inibiu a resposta tanto com gp43 como com CMA, porém de forma diferenciada. Nos pacientes e controles a inibição da molécula CD86 diminuiu a resposta tanto para gp43 como para CMA e a inibição da molécula CD80 diminuiu a resposta proliferativa apenas para gp43, e somente no grupo controle, sugerindo que os diferentes antígenos exigem diferentes moléculas durante o processo de apresentação antigênica. A adição desses anticorpos no 4^{o} dia da cultura não modificou a resposta linfoproliferantiva dos pacientes e controles. Nossos dados favorecem a hipótese, derivada de outros modelos de exposição crônica a antígenos exógenos, de que a exposição repetida a antígenos de *P. brasiliensis* por um longo período *in vivo,* verificada nos pacientes com paracoccidioidomicose, levam as células T a um estado de tolerância adaptativa, que dificilmente é revertida *in vitro*. A partir desses resultados analisamos a participação da apoptose de células T nesse provável estado de tolerância nas células dos pacientes. Observamos que a expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 está diminuída nas células T de pacientes previamente estimuladas comparadas com as células dos controles, e mesmo após o reestímulo *in vitro* a diminuição da expressão dessa molécula persiste. Desta forma, a diminuição da expressão da molécula Bcl-2 *ex vivo* nas células T de pacientes sugere fortemente que essas células estão vulneráveis a apoptose. Para corroborar esta hipótese, analisamos a expressão das caspases 8 e 9 na forma ativa. Inicialmente, analisamos a expressão destas moléculas em células mononucleares de

pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias com e sem estímulo de CMA e gp43 e observamos que as células dos controles expressam maiores níveis de ambas moléculas em relação as células dos pacientes. Esses resultados foram surpreendentes uma vez que o aumento da expressão de moléculas que estariam direcionando as células para apoptose era esperado em células de pacientes e não de controles. Para explicar este resultado sugerimos a possibilidade *(hipótese já apareceu várias vezes)* de que as células dos pacientes poderiam estar entrando em apoptose num estágio mais inicial, antes do quarto dia. Por isso realizamos experimentos adicionais em que analisamos a expressão dessas caspases *ex vivo*. Com essa análise observamos que células TCD3+ de pacientes expressam altos níveis tanto de caspase 8 como caspase 9 comparadas às células de controles. Esses resultados podem ajudar a explicar porque nos ensaios para a análise da resposta proliferativa de pacientes com acréscimo de anticorpos bloqueadores de moléculas coestimulatórias, não houve reconstituição da resposta especifica a gp43: essas células estariam pré-ativadas e pré-programadas para entrarem apoptose, e, portanto, refratárias a tratamentos *in vitro*, como já descrito em células em estado de tolerância adaptativa.

Palavras chaves: Paracoccidioidomicose, Apoptose, moléculas coestimulatórias, tolerância adaptativa, *Paracoccidioides brasiliensis*, Imunologia

ABSTRACT

CACERE C.R. **Molecular aspects involved in the apoptosis of mononuclear cells of patients with paracoccidioidomycosis**. Thesis. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The T-cell hypoproliferative reactivity observed in the immune response to *P. brasiliensis* antigens of patients with active paracoccidioidomycosis probably contributes to the failure of the host in controlling the infection, leading to a disseminated disease. It is, however, largely reversible with treatment in most patients. The mechanisms leading to this hyporresponsiveness are not well known. We have previously demonstrated that patients' mononuclear cells in presence of gp43 exhibit enhanced apoptotic levels. I an attempt to explain such findings, we hypothethized that these cells were inadequately activated due to altered costimulatory molecules expression, such as CD80, CD86, CD28, CD152, ICOS e PD-1. Expression of these molecules were evaluated on T-cells and monocytes of the peripheral blood of patients with active, disseminated PCM (n = 7...), and healthy individuals with a past history of treated and cured PCM (n = 2...). These cells were cultured in presence of a *Candida albicans* metabolic antigen (CMA), gp43, or kept without exogenous stimuli for 4 days. Our results show tgat the expression of CD28 was comparable between patients an controls' cells, and that CD152, PD-1 e ICOS, all of which known to deliver negative costimulatory signaling and to arrest cell cycle entry, were overexpressed in patients' T-cells. In parallel, we performed additional experiments where the respective costimulatory signalings were blocked by addition of blocking antibodies specific to each of these molecules. Whatever the blocking antibody used, there was no reversal of the hypoproliferative state of patients' T-cells. However, while the expression of the CD80 and CD86 molecules on monocytes was similar between controls and patients, their expression on T-cells was significantly higher in patients. Adding the respective blocking antibodies at day zero of the culture, we could observe that both the gp43 and the CMA responses were inhibited, but differentially according to the antibody employed. In both patients and controls the blocking CD86 signaling decreased the response to gp43 and CMA of patients and controls, while blocking of CD80 signaling decreased only the response to gp43, and only in the control group. These data suggest that different antigens may have different costimulatory requirements for antigen presentation. Addition of the antibodies at the ay 4 of culture did not restore the lymphoproliferative response or modified the response of the controls. Our results suggest that the hypothesis, raised from other models of prolonged foreign antigen exposure, that repetitive and persistent *in vivo* exposure to fungal antigens, which is described in patients with PCM, lead the T-cells to a adaptive tolerant state, which is hardly reverted *in vitro*. We then investigated the fate of such putatively tolerized patients' cells, by analyzing the role that apoptosis may have in this tolerant state. We observed that expression of the antiapoptotic molecule Bcl-2 was lower in patients' cells, even when the cells were *in vitro* reestimulated with CMA and gp43, suggesting that the cells are more susceptible to undergo apoptosis. When then analyzed the expression of the active form of the caspase 8 and 9 molecules. We first analyzed their expression on cells kept in cultures for 4 days with or without stimuli. Unexpectedly, we observed that controls' cells, and not patients' cells, exhibited higher levels of expression of both molecules. To explore further these data, we tested the hypothesis that the patients' cells were already undergoing apoptosis at an earlier than 4

days stage. Caspases expression were therefore analyzed *ex vivo*. In fact, we observed that TCD3+ cells exhibited markedly enhanced caspase 8 and expression as compared to controls' cells. These findings may help to explain why we failed to redress the proliferative responses to gp43 in the experiments where blocking antibodies were added: these cells would be committed to apoptotic death, thus refractory to in vitro manipulations, as described for adaptively tolerant T-cells.

Key words: Paracoccidioidomycosis, Apoptosis, co-stimulatory molecules, adaptative tolerance, *Paracoccidioides brasiliensis*, Immunology

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Pacientes	18
3.2	Ensaio de cultura de linfócitos	19
3.3	Análise da expressão das moléculas coestimulatórias por citometria de fluxo	20
3.4	Análise da expressão da molécula Bcl-2 por citometria de fluxo	21
3.5	Análise da expressão das caspases 8 e 9 por citometria de fluxo	21
3.6	Análise estatística	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Análise da resposta linfoproliferativa de pacientes e controles	23
4.2	Análise da expressão (%) e média da intensidade de fluorescência (MFI) na superfície de células T CD3+, CD28+ e CTLA4+ de pacientes e controles mantidos em cultura com ou sem estímulo antigênica	24
4.3	Análise da resposta linfoproliferativa de pacientes e controles com adição de anticorpo anti-CTLA4	29
4.4	Análise da expressão (%) das moléculas co-estimulatórias PD-1 e ICOS na superfície de células T CD3+, de pacientes e controles mantidos em cultura com ou sem estímulo antigênica	30
4.5	Análise da resposta linfoproliferativa de pacientes e controles com adição de anticorpo anti-PD-1, anti-ICOS-L, anti-PDL-1 e anti PDL-2	34
4.6	Análise da expressão (%) das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 na superfície de células CD14+, de pacientes e controles	38
4.7	Análise da expressão (%) e média da intensidade de fluorescência (MFI) na superfície de células T CD3+, CD80+ e CD86+ de pacientes e controles mantidos em cultura com ou sem estímulo antigênica	44
4.8	Análise da resposta linfoproliferativa de pacientes e controles com adição de anticorpo anti-CD80 ou anti-CD86	48

4.9 Análise da expressão da molécula Bcl-2 por citometria de fluxo 51
4.10 Análise da expressão das caspases 8 e 9 por citometria de fluxo 56
5 DISCUSSÃO 60
6 CONCLUSÃO 76
7 REFERÊNCIA 77

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). É uma doença endêmica em várias regiões da América Latina, sendo o Brasil é atualmente o país que contribui com maior número de casos, principalmente através das regiões Sul-Sudeste e Centro-Oeste

O *P. brasiliensis* apresenta forma assexuada (ou imperfeita) sendo desconhecida a forma sexuada ou perfeita (LACAZ, 1994). É um organismo pleomórfico, que depende da temperatura para a expressão de sua morfologia.

Devido seu dimorfismo térmico, pode se apresentar sob a forma miceliana (M) ou leveduriforme (L). A forma L constitui a forma parasitária do fungo que pode ser reproduzida em cultivo a 35-37 °C, apresentando então, células arredondadas de parede dupla e brotamento múltiplo ou único. Esta múltipla gemulação dá origem a uma característica morfológica peculiar do fungo denominada "roda de leme".

A forma M constitui a forma saprofítica do fungo e ocorre quando este é cultivado em temperatura de 25-27 °C. Nesta fase o *P. brasiliensis* apresenta colônias de aspectos cotonoso, esbranquiçado e microscopicamente, a presença de filamentos hialinos, finos e septados. Os conídios exibem dimorfismo termo-dependente transformando-se em forma M ou L, se expostos à temperatura de 25 ou 37 °C, respectivamente (RESTREPO et al., 1986; SALAZAR et al., 1988). Foi demonstrado que os conídios exibem também capacidade infectante quando administrado intranasalmente em camundongos, levando à forma progressiva crônica da doença (McEWEN et al., 1987). Este fato é de especial relevância, uma vez que os conídios têm sido postulados como uma provável forma infectante do *P. brasiliensis*.

O principal exoantígeno do *P. brasiliensis* a glicoproteína de 43 KDa é, sendo secretado ativamente pelo fungo. Anticorpos específicos a gp43 são detectados no soro da maioria dos pacientes portadores da PCM sendo utilizada então no sorodiagnóstico.

No entanto, não se sabe a importância dos mesmos na doença ativa (CAMARGO et al., 1994). Souza et al., 1998, demonstraram que em alguns casos o estímulo da cascata idiotípica pode ser responsável pelos altos níveis de anticorpos anti-gp43 observados em alguns pacientes.

No estudo da virulência de *P. brasiliensis* (MENDES-GIANNINI et al., 1994), utilizando culturas de células epitelioides da linhagem Vero (rim de macaco verde da África), demonstraram que este agente apresenta mecanismos de adesão e invasão. A correlação entre aderência e virulência para animais foi demonstrada, desde que a amostra mais virulenta (Pb 18) foi também mais aderente em comparação com a menos virulenta (Pb 265). A glicoproteína de 43 KDa pode ser uma provável adesina de acordo com alguns trabalhos (VICENTINI et al., 1994; HANNA et al., 2000) que verificaram inibição do processo de adesão utilizando anticorpo anti-gp43. A aderência aos tecidos do hospedeiro é considerada uma etapa crucial para o estabelecimento da doença e parece ser mediada pelo reconhecimento de alguns componentes da matriz extracelular. Várias proteínas da matriz podem ser receptores potenciais para os microrganismos. A laminina foi o primeiro destes componentes a estar envolvida na patogênese da paracoccidioidomicose (GESZTESI et al., 1996).

São desconhecidos o reservatório natural e as condições de vida saprofítica do *P. brasiliensis*. Acredita-se que ele viva naturalmente no meio ambiente em áreas endêmicas, onde provavelmente estariam sob a forma filamentosa, liberando esporos para a natureza (RESTREPO et al., 1985), e infectando indivíduos pela via inalatória. Apesar do nicho ecológico do fungo não ter sido ainda definitivamente estabelecido, há relatos de seu isolamento a partir do solo. No Brasil (SHONE e BATISTA et al., 1963), na Argentina (NEGRONI et al., 1966) e Venezuela (ALBORNOZ et al., 1971); estes resultados não foram reproduzidos. O fungo foi também isolado em fezes de pingüim da Antártica (GEZUELE et al., 1989) e de tatus capturados na região do Pará, e apesar de ter sido constatada infecção natural os animais não apresentavam a doença sintomática (NAIF et al., 1986).

Em 2002 Ono et al., realizaram estudo sorológico com cães de zona rural do Norte do Estado do Paraná (Londrina, Cambé e Rolândia), onde através do método de

ELISA e imunodifusão, utilizando gp43 e exoantígeno de *P. brasiliensis*, detectaram positividade na maioria dos cães. Entretanto, não encontraram paracoccidioidomicose-doença em 6 dos animais que apresentavam altos títulos. Ricci et al. (2002) reportaram o caso de um cão da raça Doberman que desenvolveu doença caracterizada por vários nódulos cervicais diagnosticado por análise histopatológica do gânglio biopsiado. O animal foi tratado com ketoconazol, observando-se então o desaparecimento dos nódulos.

A doença comporta uma vasta gama de apresentações clínicas, correlacionadas com a fisiopatogenia da infecção, exigindo técnicas diagnósticas específicas que possam avaliar as alterações dos diversos sistemas comprometidos. Várias apresentações clínicas da PCM já foram descritas, sendo que a última proposta de classificação leva em conta tanto manifestações clínicas como parâmetros imunológicos (FRANCO et al., 1989).

A classificação das formas clínicas da micose se baseia, fundamentalmente, na relação agente-hospedeiro e na história natural da paracoccidioidomicose. Nesta classificação, a forma aguda ou subaguda corresponde aquela antes denominada forma ganglionar ou tipo juvenil. Têm evolução rápida manifestando-se predominantemente em jovens de ambos os sexos e compromete preferencialmente o sistema fagocítico mononuclear presente no baço, fígado, linfonodo e medula óssea. A forma crônica típica do adulto, de evolução lenta, tem duração prolongada e afeta principalmente indivíduos do sexo masculino acima de 30 anos de idade. Essa forma clínica parece ser conseqüência na maioria dos casos, da reativação de foco infeccioso quiescente. As lesões podem permanecer localizadas ou envolver mais de um órgão ou sistema. Nos tecidos desses pacientes observa-se uma tendência à formação de um granuloma organizado (FRANCO et al., 1993; MENDES et al., 1994).

A PCM tem importante implicação sócio-econômica. É, primeiramente, uma doença que acomete, de regra, indivíduos de condição social baixa, geralmente trabalhadores agrícolas em idade produtiva, quase sempre afastando - os de suas atividades profissionais devido à alta morbidade. Segundo, por ser uma doença crônica granulomatosa que exige tratamento prolongado, são freqüentes os abandonos de

tratamento e as recidivas. E, finalmente, mesmo na presença de tratamento regular e eficaz, podem ocorrer seqüelas importantes, algumas delas incapacitantes, como má absorção intestinal, insuficiência respiratória e insuficiência supra-renal (SHIKANAI-YASUDA et al., 1992; BENARD *et al.*, 1996).

Há grande variabilidade de acometimento clínico na PCM, podendo ocorrer envolvimento de vários órgãos como sistema nervoso central, linfático, pulmões, adrenais, ossos, mucosa respiratória alta, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. Desta forma, há necessidade de técnicas diagnósticas específicas que possam avaliar as alterações dos diversos sistemas comprometidos.

Do ponto de vista do sistema imune, a PCM é descrita como uma micose que geralmente cursa com graus variados de imunossupressão. Vários estudos observaram nítida correlação entre a gravidade da apresentação clínica e a intensidade das alterações da imunidade celular (MENDES et al., 1971; MOK; GREER, 1977; ARANGO; YARZÁBAL, 1982; MOTA et al., 1985; MUSATTI et al., 1985; CHEQUER-BOU-HABIB et al., 1989; BENARD et al., 1996). A imunossupressão parece estar relacionada à doença na forma ativa, entretanto, até o momento o termo imunossupressão tem sido usado sem que se conheçam os mecanismos envolvidos principalmente na patologia humana. Em modelos animais, pode-se caracterizar com maior rigor alguns dos fenômenos responsáveis por esta imunossupressão, tais quais células imunossupressoras antígeno-específicas (JIMENEZ-FINKEL; MURPHY, 1988; FAZIOLI, 1990).

Almeida et al. (1998) demonstraram que a fagocitose do *P. brasiliensis* pelos macrófagos peritoniais de camundongos murinos *in vitro* foi inibida quando a D-manose e a D-frucose foram adicionadas no meio de cultura. Esses dados indicaram que a endocitose do fungo pelos macrófagos é mediada pelo receptor de manose. Também demonstraram que anticorpos policlonais direcionados aos epítopos da gp43 induzem uma diminuição da fagocitose do *P. brasiliensis* pelo macrófago. No entanto, o anticorpo monoclonal que reconhece o peptídeo de um epítopo da gp43 não interferiu com a interação macrófago-*P. brasiliensis*. Esses autores demonstraram também que a

gp43 acoplada à superfície de hemácias de carneiro era endocitada por macrófagos, e esta interação foi inibida pela adição da D-manose e D-frutose no meio de cultura.

Baseado nestas informações Popi et al. (2002), observaram que a gp43 induz uma diminuição dose dependente na fagocitose de macrófagos estimulados com *P. brasiliensis*. Esses dados sugerem uma possível interação *P. brasiliensis*-macrófago e gp43-macrófago mediada por alguns receptores, principalmente o receptor de manose. Essa hipótese foi reforçada pela observação de que a gp43 também bloqueia a endocitose de partículas de zymosan que são fagocitadas pelos macrófagos via receptor de manose.

Para especificar a diminuição da ingestão do *P. brasiliensis* e a interação macrófago-fungo foi realizada a inativação dessas células com a gp43, que inibe a liberação de reativos intermediários de oxigênio e nitrogênio que são mediadores envolvidos na atividade microbicida de macrófago. A liberação de H_2O_2 pelos macrófagos de camundongos A/Sn e B10.A, foi inibida pela gp43. No entanto, esta molécula não influenciou a liberação destes metabólitos quando a fagocitose foi estimulada com PMA (forbol miristil acetato). É possível que a interação da gp43 e do PMA com a membrana celular do macrófago leve a ativação celular por diferentes sinais de transdução (POPI et al., 2002).

Esses dados reforçaram a hipótese de que o fungo estimula os macrófagos a produzirem fatores que possam desativá-lo. Estes autores concluíram que a gp43 exerce um efeito inibitório na liberação de NO e H_2O_2 pelos macrófagos peritoneais de camundongos murinos estimulados pelo *P. brasiliensis* e na atividade microbicida dos macrófagos (POPI et al., 2002).

A dicotomia existente na PCM entre a imunodepressão celular (predominantemente antígeno-específica) e a exacerbação da resposta humoral, parece reproduzir um dos padrões de resposta imune descrito em modelos experimentais de várias doenças infecciosas. A partir destes modelos, descreveram-se dois perfis de secreção de várias citocinas, aparentemente excludentes, i.é., o predomínio de um perfil de citocinas inibiria a secreção do outro. Estes padrões secretórios, "T helper-1" (Th-1)

e "T helper-2" (Th-2), favoreceriam, respectivamente, a ativação de macrófagos e a formação de granulomas através de secreção das citocinas IL-2 e IFN-γ ("imunidade celular"), síntese de IgE, IgA e eosinofilia, através da secreção de IL-4, IL-5 e IL-10 ("imunidade humoral"). A baixa resposta imune celular a antígenos do *P. brasiliensis*, na vigência de resposta humoral exacerbada a estes mesmos antígenos, vem reforçar a sugestão inicial da presença de mecanismos imuno-reguladores, tipo Th-2 na PCM ativa, e tipo Th-1 na doença inativa. Esta hipótese foi então testada utilizando-se sobrenadantes de culturas de células mononucleares de pacientes, com diferentes formas clínicas (BENARD et al., 2001). O estudo da gp43 foi priorizado por induzir respostas antígeno-específicas (enquanto a gp70 induzia reatividade cruzada em indivíduos imunes ao *Histoplasma capsultatum*) e por ser considerado imunodominante (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991), sendo os resultados comparados aos das culturas não estimuladas (somente na presença de meio) ou estimuladas por PHA.

Verificamos que pacientes já tratados e considerados curados tinham a capacidade de secretar IL-2 e IFN-γ na presença de gp43, enquanto o mesmo não ocorria na maioria dos pacientes crônicos ou agudos, indicando um déficit da resposta tipo Th-1. Entretanto a capacidade de sintetizar estas citocinas se encontrava preservada nos pacientes, pois havia secreção normal na presença de PHA. Estes resultados também evidenciaram que células de alguns pacientes com a forma crônica eram capazes de secretar níveis significativos de IL-2 e de IFN-γ. Em relação à secreção de IL-10 induzida por gp43, tanto pacientes como controles secretavam quantidades comparáveis, indicando uma resposta Th-2 preservada. Dessa forma, evidenciou-se uma importante desregulação da resposta imune dos pacientes, caracterizada por níveis substanciais de IL-10, não contrabalanceados por IL-2 ou IFN-γ. Um dos possíveis mecanismos que poderiam explicar com bastante propriedade o déficit de resposta Th-1 na PCM humana seria a apoptose de linfócitos antígeno-específicos.

Com base em outros trabalhos realizados em nosso laboratório onde observamos em pacientes com PCM uma hiporreatividade de células T, baixos níveis de citocinas Th1, como a IL-2, importante na ativação e diferenciação celular, IFN-γ e IL-12, e altos níveis de IL-10 produzida principalmente pelos monócitos destes pacientes. Estes aspectos parecem ser relevantes na imunopatogenia da PCM, tendo em vista que

detectamos alterações na secreção destas citocinas na resposta à gp43 de pacientes. Outro mecanismo que poderia estar envolvido nesse desequilíbrio imunológico é a apoptose de linfócitos de pacientes com PCM sendo um tema de grande interesse que permanece, entretanto ainda inexplorado.

Apoptose, nome dado por analogia aos eventos responsáveis pela queda das folhas no outono (KERR et al., 1972), é um tipo de morte "programada" em relação a sua ocorrência no organismo. Três principais eventos foram descritos na célula em processo de morte: *Eventos morfológicos*, que inclui a condensação do citoplasma, do material nuclear e, em um estágio tardio, fragmentação celular maciça; *eventos moleculares*, com extensa fragmentação do DNA nuclear em unidades de 180 a 200 pares de bases, correspondentes ao tamanho do nucleossomo, e múltiplos desse valor, sugerindo o envolvimento precoce de nucleases; e *eventos metabólicos*, incluindo a síntese de macromoléculas. Este tipo de morte celular pode ser inibido (ou significativamente retardado) por inibidores da síntese de RNA como a actinomicina D, ou inibidores da síntese protéica como a cicloheximida (COHEN e DUKE, 1984; WYLLIE et al., 1984; SELLINS; COHEN, 1987; YAMADA; OHIAMA, 1988).

A relevância fisiológica da apoptose é evidente, sendo descrita em todos os tipos de eucariotas superiores, como plantas, animais multicelulares, além de provavelmente fungos e protozoários como o *Trypanosoma cruzi* (VAUX et al., 1984). Além disso, alterações determinadas geneticamente ou de forma adquirida nos processos apoptóticos causam importantes doenças. A expressão aumentada do proto-oncogene anti-apoptótico Bcl-2 leva a hiperplasia linfóide, linfomas e auto-agressão por linfócitos auto-reativos que normalmente seriam deletados via apoptose. Ao contrário células T periféricas e de linfonodos de pacientes infectados pelo HIV são deletadas por apoptose, sendo provavelmente um importante mecanismo para a queda de linfócitos T CD4 circulante e consequentemente pela imunossupressão existente nesses pacientes (MEYAARD et al., 1992; BADLEY et al., 1998).

O controle da apoptose em linfócitos T maduros tem sido objeto de grande interesse de estudo. É atualmente bem estabelecido que linfócitos podem apresentar morte por apoptose devido, ou a deficiências de fatores tróficos, ou como conseqüência

de estimulação repetida (COHEN; DUKE, 1992). A apoptose secundária à deficiência de fatores tróficos é uma propriedade universal de quase todas as células, dos organismos mais primitivos, aos mamíferos (MEYAARD et al., 1992).

Sabe-se que a estimulação dos linfócitos T via receptor específico para antígeno (TcR), levando a proliferação celular e à produção e liberação de citocinas é crítica para a resposta inicial das células T. Entretanto, tão logo o estímulo antigênico seja eliminado, a população expandida de linfócitos T deve diminuir para prevenir o acumulo de linfócitos. Nos últimos anos tornou-se evidente que um dos mecanismos regulatórios homeostáticos para as células T periféricas envolve a ativação de um maquinário intrínseco de morte celular mediado pelo TcR (ASHWELL et al., 1987; SHI et al., 1990; MUSCI et al., 1997). Deste modo, a estimulação dos linfócitos T pelo TcR é crítica para o controle tanto da proliferação e da diferenciação, quanto da apoptose, no caso denominada morte celular induzida pela ativação (AICD).

Estudos dirigidos a compreensão de quais moléculas são requeridas para a AICD, demonstraram que o engajamento do TcR leva ao aumento da transcrição de moléculas sabidamente envolvidas com a apoptose, como o Fas/APO-1 (atualmente denominado CD95) (BRUNNER et al., 1995; DHEIN et al., 1995; PARK et al., 1996). A deprivação de fatores tróficos de linfócitos, mais especificamente citocinas, parecem ser um elemento importante na AICD, destacando-se a IL-2 como preponderante na proteção da morte celular (apoptose) (RUSSEL et al., 1995).

Tem se verificado que células Th1 e Th2 apresentam diferença de susceptibilidade à morte induzida por ativação (AICD), mediada pela interação Fas-FasL quando estimuladas pelo complexo TCR/CD3. Oberg et al. (1997) realizaram experimentos com clones de células T humanas não transformadas resistentes ou sensíveis a AICD. Neste estudo, demonstrou-se que em clones de células resistentes e sensíveis, os níveis de expressão FasL mRNA foram comparáveis. Já os níveis da expressão de FasL na superfície das células dos clones resistentes foram diminuídos quando estimuladas com anticorpo anti-CD3 ou anti-TCR quando comparadas com os clones sensíveis nas mesmas condições. Os clones de células T estimulados com anti-CD3 foram diferentes quanto ao perfil de citocinas, onde os clones resistentes

secretaram altos níveis de citocinas padrão Th2, ao contrário dos sensíveis que demonstraram altos níveis de citocinas padrão Th1.

Na infecção pelo HIV, a AICD mediada pela interação Fas-FasL, leva à diminuição do número de células T CD4+, e diminuição progressiva dos níveis de citocinas de padrão Th1, permanecendo normais os níveis de citocinas Th2. Este desbalanço Th1 para Th2 poderia estar associado ao desenvolvimento de AIDS. Estaquier et al. (1995) sugerem estratégias para o controle de morte mediado via Fas das células T CD4+ nestes pacientes, como por exemplo a utilização de bloqueadores para receptor de Fas solúvel, inibidores da família das proteases ICE (Interleucina-1 conversora de enzimas) e adição de citocinas como IL-2 ou IL-12, para aumentar os clones de células secretoras de Th1, com objetivo de melhorar a resposta imune destes pacientes.

Por outro lado, Uehara et al. (1992) demonstraram que células T CD45RO+ tanto CD4+ como CD8+ de pacientes com mononucleose infecciosa aguda quando mantidas em cultura com meio apenas, ou com acréscimo de algumas citocinas específicas, morriam por apoptose. Observaram também que a apoptose dessas células diminuía com o acréscimo de IL-2, IL-5 e IL-6.

Taga et al. (1994), descreveram a IL-10 como uma citocina inibidora da apoptose de células mononucleares de paciente com mononucleose aguda. Esta atividade inibitória poderia estar relacionada, pelo menos em parte, com a linfocitose observada na fase aguda desta infecção, e, possivelmente, também com estabelecimento de memória imunológica após a resolução da infecção. Para demonstrar o papel de inibição da apoptose pela IL-10, foram realizados experimentos em culturas de células mononucleares desses pacientes com o acréscimo de IL-10 humana recombinante (hIL-10) e também com anticorpo anti-IL10. Observaram então que a adição da IL-10 diminuía o número de células em apoptose ao contrário do anticorpo anti-IL-10, que induziu um aumento da apoptose nessas células, enfatizando assim o papel inibitório dessa citocina (TAGA et al., 1993).

Finalmente, recentes estudos em nosso laboratório demonstraram que a apoptose ou morte celular programada (MCP) de células T antígeno-específicas é também um importante mecanismo envolvido na regulação da resposta imune. De acordo com Lenardo et al. (1999), dois mecanismos de morte celular por apoptose de linfócitos estão bem determinados: a morte induzida por ativação celular ("activation induced cell death", AICD) e a morte por deprivação de citocinas. Usherwood et al. (1999) mostraram que a proliferação *per se* origina células apoptóticas. Estes mecanismos de apoptose têm importância fisiológica no controle e regulação da resposta imune, como evidenciado por experimentos com camundongos nocauteados para o gene Fas, que codifica para uma molécula de superfície responsável por uma das principais vias de indução de apoptose, nos quais se identificou hiperplasia linfocitária, desenvolvimento de doença linfoproliferativa e autoimunidade, indicativos de uma expansão de linfócitos incontrolada (WATANABE-FUKUNAGA et al., 1992). Por outro lado, em determinadas situações clínicas, a apoptose de células antígeno-específicas pode representar um importante mecanismo de indução de anergia, principalmente em situações de resposta imune a altas doses de antígeno (MARTH et al., 1996), ou de hiporreatividade de células Th-1 em determinadas doenças infecciosas.

Em relação a este último aspecto, estudos em pacientes com malária, esquistossomose e tuberculose destacam a importância da apoptose como mecanismo de controle da resposta imune e da persistência ou não do agente agressor (MOLLOY et al., 1994; CARNEIRO-SANTOS et al., 2000; TOURE-BALDE et al., 1996). Neste sentido, vimos recentemente estudando em pacientes com PCM ativa e controles curados a correlação entre a diminuição da resposta proliferativa de linfócitos e a presença de apoptose na resposta *in vitro* à gp43 e CMA. Verificamos que após 6 dias de cultivo na presença de gp43 e também de CMA, havia altos índices de apoptose em células mononuclerares, sem que se observasse, no entanto, resposta proliferativa em células de pacientes estimulados com gp43, diferentemente de CMA, em que se detectou resposta proliferativa (CACERE et al., 2003). Desta forma, nos pacientes com PCM, ausência de resposta proliferativa se associava a níveis elevados de apoptose. Nas culturas em presença de CMA, o mecanismo que promove morte celular está associado à ativação e proliferação celular, no entanto, a apoptose observada sob estímulo de gp43 pode estar relacionada a mecanismo alternativo, ainda não esclarecido, e possivelmente

relacionado à ativação celular inadequada; da mesma forma não foi determinada a participação dos linfócitos CD4 e CD8 na população celular em apoptose.

Neste contexto, alguns autores têm demonstrado em modelos de anergia induzida por altas doses de antígeno, que a inibição da sinalização para IL-12 estaria associada a índices reduzidos de apoptose e que esses eventos poderiam participar, mesmo que parcialmente, desta anergia (MARTH et al., 1996, 1999). A redução da apoptose pela IL-12, tem sido relacionada com a inibição de Fas-Fas-L durante a ativação de linfócitos, através da inibição de caspase 3 e 9 (PALMER et al., 2001). Alternativamente, a IL-10 também parece proteger linfócitos T da apoptose, apesar de seu efeito inibitório na resposta Th-1 (COHEN et al., 1997). Estudos realizados em nosso laboratório com PBMC de pacientes com PCM, utilizando anticorpo neutralizante anti- IL-10 nas culturas com gp43 e CMA, observamos aumento nos níveis de apoptose nas células estímuladas com gp43, o que não ocorreu nas células estímuladas com CMA (CACERE et al., 2003).

Duas modalidades de indução de apoptose em linfócitos T ativados são reconhecidas. Células T efetoras ativadas podem ser eliminadas pela morte induzida por ativação (AICD), levando ao clearence de patógenos existentes. Este processo resulta da interação do receptor de morte com seus ligantes específicos, que por sua vez recruta a molécula adaptadora do domínio de morte (FADD) Nicholson et al., 1999. A ligação Fas-FADD recruta a pró-caspase 8, e estas 3 moléculas se fundem em uma só. A junção dessas leva à formação do complexo sinalizador indutor de morte que em seguida cliva a pro-caspase 8 para sua forma ativa, caspase 8. A forma ativa da caspase 8 inicia a clivagem proteolítica da caspase 3 que resulta na clivagem de outras caspases, como caspase 6 e 7, levando as células à morte por apoptose (NICHOLSON et al., 1999).

Em relação à primeira modalidade, o bloqueio da apoptose via Fas-Fas-L deve resultar em potente inibição da apoptose. Entretanto, os dados de Campanelli (et al., 2003), demonstrando que anticorpo bloqueador anti-CD95 foi capaz de reduzir apenas parcialmente a apoptose de células estimuladas *in vitro* (~ 35% de inibição de

apoptose), e incapaz de reverter a ausência de resposta proliferativa, sugerem que possivelmente a o mecanismo envolvido na anergia/apoptose não seja mediado, em sua maior parte, por Fas/FasL, não representando desta forma AICD ou via extrínseca. De fato vários estudos mostram que células T ativadas morrem durante respostas imunes por apoptose independentemente da presença de Fas-FasL, e que Bcl-2 estaria primordialmente envolvida neste processo. Alguns autores sugerem que a apoptose de linfócitos TCD4+ de pacientes HIV+ se dá pela via intrínseca ou mitocondrial da apoptose, associada a baixos níveis de Bcl-2 intracelular e aumento da ativação de caspase 9 (FENG YUN YUE et al., 2005). A possibilidade de que na PCM a eliminação das células TCD4+ também seja mediada pela via intrínseca ou mitocondrial, será também um dos objetivos de estudo deste trabalho.

A caspase 3 também está envolvida na apoptose intrínseca que envolve principalmente a mitocôndria, levando a permeabilização e diminuição do potencial de transmenbrana da mesma, ocorrendo a liberação do citocromo *c* que, ao se localizar no espaço intermembrana, se liga a Apaf-1. A interação entre Apaf-1, dATP, citocromo C e pró-caspase 9 no citoplasma da célula leva a formação de um complexo de multiproteínas denominado apoptossoma (ZOU et al., 1999), iniciando então a ativação e o processamento da caspase 9 que cliva e ativa eficientemente a caspase 3.

Membros da família Bcl-2 estão aumentados em células T de memória e diminuídos em células T efetoras, implicando um importante papel dessas moléculas em modular a susceptibilidade das células para iniciar apoptose induzida por ativação (GRAYSON et al., 2000; KAECH et al., 2003). A variabilidade nos níveis de expressão das caspase pode contribuir para regular a susceptibilidade de distintos subgrupos de células T entrarem em apoptose. Laurent (et al., 2004), demonstraram que o mRNA e níveis da proteína caspase 3 estão aumentados após a ativação via TCR em células T efetoras onde a morte é induzida por ativação, diferentemente das células T de memória.

É importante salientar que uma resposta imune celular efetiva envolve ativação produtiva da célula T através de dois sinais: o primeiro que se relaciona ao reconhecimento do peptídeo antigênico no contexto do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) pelo receptor da célula T (TCR) e o segundo sinal, também

denominado coestimulação, que se relaciona a várias moléculas presentes na superfície da célula apresentadora de antígeno (moléculas B7) interagindo com correceptores da célula T (CD28 e CTLA-4) (DUBEY et al., 1995; SWAIN et al., 1999). Vários trabalhos têm demonstrado o envolvimento das citocinas de padrão Th1 e Th2 no controle ou disseminação da infecção pelo fungo. Na tentativa de compreender melhor o desbalanço na produção das citocinas, tem se investigado o envolvimento de moléculas co-estimulatórias.

O grupo de moléculas co-estimulatórias melhor caracterizado até o momento são os membros da família B7: a molécula CD28, que é expressa constitutivamente na superfície de células T; a CTLA4, também expressa nessas células e rapidamente regulada durante a ligação a seus ligantes, B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86) expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos. Estas moléculas têm um importante papel após a ligação peptídeo MHC, exercendo um segundo sinal para a manutenção da ativação e regulação da tolerância de células T. Na ausência do segundo sinal, os linfócitos não são ativados adequadamente, permanecendo anérgicos e iniciando o processo de eliminação por apoptose. Tanto CD28 como CTLA4 se ligam a B7-1 e B7-2. Entretanto o CD28 é que promove a ativação e diferenciação celular, enquanto o CTLA4 inibe a ativação celular, regulando desta forma a resposta celular (FREEMAN et al., 2002).

A expressão de CD80 e 86 em linfócitos, por outro lado, tem sido pouco explorada na literatura, apesar de vários estudos terem demonstrado função de regulação negativa destas moléculas na resposta imune (ZHONG-WEN et al., 2005). A cinética de expressão destas moléculas em linfócitos T foi recentemente documentada (ZHONG-WEN et al., 2005). Von Boehmer, 2005, sugere esta via alternativa (interação CTLA4-CD80/86 não dependente de células T regulatórias) como um importante mecanismo de regulação da resposta imune.

Vários trabalhos demonstraram que a ligação do CD28 de células T naïve com seus ligantes nas células apresentadoras, B7-1 ou B7-2, acarreta um potente sinal co-estimulatório para ativação de células T que resulta na indução de produção de IL-2, expressão do CD25 e início da ativação do ciclo celular. No entanto a ligação com a

molécula CTLA4 leva à inibição da ativação celular com diminuição de IL-2 e da progressão do ciclo celular. O papel inibitório regulador de CTLA4 na ativação de células T foi demonstrado em camundongos deficientes, que morreram de 3-4 semanas com infiltração massiva linfocítica levando a destruição dos órgãos e tecidos (CHEN et al., 2004).

Na paracoccidioidomicose foi demonstrado que células T de pacientes mantidas em cultura com estímulos inespecíficos, por exemplo, a fitohemaglutinina (PHA), a expressão do CTLA4 foi maior quando comparada com células de indivíduos normais não sensibilizados ao fungo. Já a expressão de CD28 não foi diferente nos dois grupos. Entretanto esses resultados não foram reproduzidos quando utilizaram antígenos do fungo (CAMPANELLI et al., 2003).

Por outro lado, Bozzi et al. (2004), demonstraram que, em células mononucleares de pacientes com paracoccidioidomicose mantidas em cultura por 6 dias com antígeno bruto do fungo (PbAg), a expressão de CD28 em linfócitos T CD8+ foi menor quando comparada com o grupo controle. Quando analisaram a ativação dos linfócitos B desses mesmos pacientes, e nas mesmas condições de cultura, observaram altos níveis de expressão da molécula CD86 quando comparados com os indivíduos controles. A diminuição da ativação celular em resposta a antígenos do fungo pode ser utilizada pelo mesmo mecanismo de escape da resposta imunológica do hospedeiro.

Outras moléculas coestimulatórias da família B7 têm sido mais bem estudadas nos últimos anos, entre elas ICOS (Indutor coestimulatório de células T), expressa em células T, e seus ligantes ICOSL e B7-H2, expressos em células B, monócitos e células dendríticas. Além de ICOS, outra molécula, PD-1 (Programador de morte-1) foi descrita, com seus ligantes PDL-1 e PDL-2 encontrados em monócitos e células dendríticas e sua expressão parece ser regulada por IFN-γ ou IFN-γ/LPS.

ICOS é uma molécula expressa em células T rapidamente após a ligação TCR-MHC e não é expressa constitutivamente em células T naive, o que a diferencia do CD28. Essa molécula regula tanto as células Th1 como Th2 durante a fase inicial de diferenciação. Durante a ativação inicial das células T naive o efeito do ICOS na

proliferação celular e na produção de IL-2 são modestos e suficientes para manter a ativação e diferenciação celular quando comparado com a estimulação com CD28. Considera-se que a co-estimulação inicial do CD28 será importante para a produção de IL-2 pelas células T naive e ICOS estaria sustentando a ativação e diferenciação celular. Vários trabalhos demonstraram que o ICOS pode regular a produção de citocinas por células T efetoras recentemente ativadas. Após adicionarem anticorpos anti-ICOS ou ICOSr observaram aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ, TNF e GMCSF. O bloqueio de ICOS no início da estimulação das células T naive aumentou a diferenciação celular para um padrão de citocinas Th1 (FREEMAN et al., 2002).

PD-1 é uma molécula expressa por células T CD4+ e CD8+, linfócitos B e células mielóides ativadas, não sendo encontrada em células não estimuladas. O principal papel de PD-1 no sistema imune é a manutenção da tolerância periférica. Após a interação com seus ligantes mediada pelo TCR, inibe a proliferação e produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN-γ) pelas células T previamente ativadas.

Alguns trabalhos utilizaram anticorpos específicos para PD-1, além de outros que utilizaram os ligantes naturais PDL-1 e PDL-2, demonstraram que esses ligantes inibem a proliferação de células T após estímulo com dose subótima de CD3 (FREEMAN et al., 2000; LATCHMAN et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado que RNAm do PD-1 está expresso em altos níveis em células T regulatória CD4+CD25+ e em células T anérgicas, sugerindo vários meios pelo qual o PD-1 estaria envolvido na regulação da tolerância de células T (GAVIN et al., 2002; LECHNER et al., 2001). A interação PD-1: PDL-2 mediada via TCR também inibe a proliferação de células T e produção de citocinas pelas células T CD4+ (LATCHAMAN et al., 2001). Em baixa concentração de antígenos, a interação PD-1: PDL-2 inibe fortemente o sinal B7-CD28. Em contraste, altas doses de antígeno reduzem a produção de citocinas, mas não inibe a proliferação de células T. A interação PD-1: PDL-1 pode contrabalancear a ativação mediada por CD3 quando a coestimulação mediada pelo CD28 é sub ótima (FREEMAN et al., 2000). Pierre Sekaly et al. (2006), demonstraram que células T CD8+ e CD4 de pacientes HIV+ têm um aumento da expressão de PD-1 em sua superfície, porém ausência de resposta

proliferativa quando estimuladas com um antígeno específico do HIV utilizado para analisar a reposta imune celular, a proteína Gag. Com o bloqueio da interação do PD-1 com seu ligante PDL-1, houve reversão da resposta das células TCD8 e CD4, aumentando a sobrevivência dessas células, mantendo a proliferação celular e, principalmente, restabelecendo a produção de citocinas.

A inibição da proliferação de células T pela interação PD-1 – PDL é mediada pela diminuição da produção de IL-2 atingindo tanto o subgrupo de células T CD8+ como as células T CD4+ (CARTER et al., 2002). O bloqueio dessa interação aumenta a expansão de células T antígeno-específicas em resposta à imunização *in vivo* e afeta tanto células Th1- como Th-2 (SALAMA et al., 2003). A inibição de PD-1 induz a proliferação de células T efetoras em indivíduos infectados pelo adenovírus resultando na rápida eliminação do vírus (IWAI et al., 2003).

Tendo em vista estas considerações, parece-nos também relevante investigar melhor o papel das moléculas co-estimulatórias em PBMC de pacientes com PCM, como um provável mecanismo associado à imunossupressão da resposta Th-1, além de avaliar o mecanismo da apoptose/ envolvida nas células dos pacientes. Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos ou vias de indução da hiporreatividade descrita em relação à resposta celular T dos pacientes com PCM, analisamos: a expressão de várias moléculas co-estimulatórias, identificadas e detalhadas nesta introdução, tentando estabelecer diferenças entre os parâmetros de ativação celular entre pacientes e controles curados. Esses últimos foram selecionados por apresentarem resposta proliferativa positiva ao principal antígeno de *P. brasiliensis.*

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo específico

Analisar a participação das moléculas coestimulatórias na hiporreatividade e na indução da apoptose e na dos pacientes frente a gp43.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão das moléculas co-estimulatórias (B7-1 e B7-2), na superfície de monócitos (CD14+) e linfócitos T CD3+.

- Avaliar a expressão das moléculas co-estimulatórias (CD28, CTLA-4, ICOS e PD-1) durante a ativação de linfócitos *in vitro*

- Avaliar o papel das moléculas B7-1, B7-2, CTLA4, PD-1 e ICOS na resposta linfoproliferativa de pacientes e controles, adicionando os respectivos anticorpos neutralizantes nas culturas.

- Avaliar a expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 em células mononucleares.

- Avaliar a expressão das caspases 8 e 9 na forma ativa em células mononucleares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Para a realização do trabalho foi analisado um total de 71 pacientes com paracoccidioidomicose, sendo 6 com a forma aguda da doença (4 do sexo masculino e duas do sexo feminino, com idade entre 17 meses e 14 anos), e 65 com a forma crônica da doença (60 homens e 5 mulheres entre 28 e 71 anos). Todos os pacientes tinham a doença ativa, recém diagnosticada, ou em tratamento por no máximo 15 dias. Esses pacientes foram referidos pelos seguintes profissionais: Dra. Adriana Kono, da Divisão de Doenças Infecciosas e Parasitárias no Hospital das Clínicas; Dra. Luisa Batista, do Instituto de Infectologia Emílio Ribas; Dr. Cor Jesus Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso, e pelo Dr Antonio Carlos Francesconi do Vale do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, da Fiocruz.

Em paralelo, foram analisadas células de 24 indivíduos controles (6 mulheres entre 35 – 45 anos e 18 homens entre 30 – 65 anos) curados da PCM há mais de 5 anos, sem recidiva da doença, e com teste cutâneo pós-tratamento paracoccidioidina positivo. De cada paciente ou controle, foram coletados 10-20 mL de sangue heparinizado com consentimento do paciente ou dos responsáveis. A coleta de amostras de sangue foi feita durante a punção venosa para outra avaliação laboratorial, com consentimento do paciente ou dos responsáveis, implicando sempre em risco mínimo, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

O diagnóstico foi estabelecido pela identificação de formas leveduriformes do *P. brasiliensis* em biópsias ou secreção, e pela sorologia.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (n° 569/03).

3.2 Ensaios de cultura de Linfócitos

Células mononucleares (PBMC) foram isoladas de sangue periférico heparinizado por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Sweden) e ressuspensas em meio RPMI suplementado com gentamicina e 10% soro AB (Sigma, USA). As células (2,5 x 10^5/well) foram cultivadas por 6 dias em placas de cultura de 96 alvéolos (Corning-Costar, Cambridge, MA) a 37° C com 5% de CO_2 na presença de meio de cultura apenas, fitohemaglutinina (PHA, 5μg/mL, Pharmacia), *Candida albicans* (CMA, 10μg/mL) e gp43 (40 μg/mL) de *P. brasiliensis* (gentilmente cedida pela Dra. Maria José Mendes Giannini). A linfoproliferação foi avaliada pela incorporação de timidina triciada (0,5 μCi/alvéolo Amersham, NEN) adicionada 18 h antes do fim do cultivo e a radioatividade foi medida em contador beta (1205 Betaplate Wallac).

Para a análise da possível restauração da resposta linfoproliferativa, realizamos o bloqueio da ligação de algumas moléculas co-estimulatórias expressas por células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura com e sem os antígenos do estudo. A molécula CTLA4 foi bloqueada adicionando-se 10μg/mL de anticorpo purificado anti-CTLA4 (isotipo IgG2a, clone BI3, BD PharMingen), de acordo com o previamente estabelecido por Morton *et al.*, 1996 e Campanelli et al., 2003, desde o início da cultura. Com essa mesma concentração de anticorpo (10μg/mL) também foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD80 (isotipo IgG1, clone 2D10.4, eBioscience) e anti-CD86 (isotipo IgG2b, clone IT2.2, eBioscience), anti-PD-1 (isotipo IgG1, clone J116, eBioscience), anti-PDL-1 (isotipo IgG1, clone MIH1, eBioscience), anti-PDL-2 (isotipo IgG1, clone MIH18, eBioscience) e anti-ICOS-L (IgG1, clone MIH12, eBioscience).A adição dos anticorpos anti-CD80 e anti-CD86 foi feita separadamente no dia 0 e também com 4 dias de cultura com e sem estímulo de CMA e gp43. O anticorpo anti-PD-1 foi acrescentado apenas no 4º. dia de cultura e os anticorpos anti-PDL-1, anti-PDL-2 e anti-ICOS-L, no início da cultura. Em paralelo ao ensaio funcional, foram realizados alguns experimentos com adição dos respectivos controles isotípicos nas mesmas condições de cultura.

3.3 Análise da expressão das moléculas coestimulatórias por citometria de fluxo

Células mononucleares (PBMC) foram isoladas de sangue periférico heparinizado por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Sweden) e ressuspensas em meio RPMI suplementado com gentamicina e 10% soro AB (Sigma, USA) como descrito no item anterior. Para realizarmos a cinética da expressão de moléculas coestimulatórias, foram realizadas marcações nas células "ex-vivo", ou seja, assim que separadas com ficoll-hipaque, e também "in vitro", após estímulo com PHA, CMA e gp43, nas concentrações indicadas acima, em dias variados de acordo com cada protocolo. Após observarmos que o melhor dia para a análise da expressão das moléculas coestimulatórias seria o 4°. dia, as células foram cultivadas em placas de 24 alvéolos (Corning-Costar, Cambridge, MA), na concentração de 2,5 x 10^6/well à 37° C com 5% de CO_2 na presença de meio e dos antígenos e mitógeno mencionados acima.

Após o período de cultivo, as células estimuladas ou não estimuladas foram removidas da placa de 24 alvéolos e lavadas com PBS/BSA 1%. Em seguida foram adicionados 10 μL dos anticorpos de superfície marcados com seus respectivos fluorocromos, e para cada marcação o controle isotípico. Em um tubo, tanto as células estimuladas como as células sem estímulos, foram marcadas com os anticorpos anti-CD14 (tri-color, Caltag), anti-CD80 (FITC, Caltag) e anti-CD86 (PE, Caltag), e em outro tubo foram adicionados os anticorpos anti-CD3 (tri-color, Caltag), anti-CD28 (PE, Caltag) e anti-CTLA4 (Cy-chrome, Pharmingen). Para as outras marcações, também foram utilizados tubos de citometria separados. Essas células foram incubadas por 30 minutos e ressuspensas em 500 μl de PBS/BSA 1x e, em seguida, submetidas a análise por citometria de fluxo (Coulter, EPICS-XL).

Para análises da expressão das moléculas ICOS, PD-1, CD80 e CD86 nos linfócitos T CD3+, foram realizadas culturas de PBMC de pacientes e controles mantidas por 4 dias com ou sem estímulos antigênicos, e como controle positivo da ativação celular utilizamos a fitohemaglutinina (PHA) para análise da expressão das moléculas ICOS e PD-1. Após este período, as células estimuladas ou não foram removidas e lavadas com PBS/BSA 1x e acrescidas de 10 μl anticorpos anti-CD3 (tri-color, caltag), anti-PD-1 (FITC, e Bioscience) e anti-ICOS (PE, e Bioscience) e outro

tubo com os anticorpos anti-CD3, anti-CD80 e anti-CD86. As células foram incubadas por 30 minutos, sendo então adicionados mais 500 μl do tampão de lavagem para serem submetidas à análise por citometria de fluxo.

3.4 Análise da expressão da molécula Bcl-2 por citometria de fluxo

PBMC isoladas como descrito acima foram analisadas logo após a separação e em seguida cultivadas por 4 dias na concentração 2,5 x 10^6/alvéolo em placas de 24 (Corning-Costar, Cambridge, MA), à 37° C com 5% de CO_2 na presença de meio apenas, CMA e gp43 de *P. brasiliensis*.

Essas células foram centrifugadas e ressuspensas em 100 μL PBS/BSA 1% e acrescida de anticorpo 7 μL de anticorpo anti-CD3 (tricolor caltag) e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após a incubação, as células foram centrifugadas e fixadas com 100 μL de paraformoldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas 1 vez com PBS/BSA e acrescida de 100μL de saponina contendo o anticorpo monoclonal purificado de camundongo anti-humano Bcl-2 (BD Pharmingen) na concentração de 1μg por 1 x 10^6 e mantidas incubando por 30 minutos em estufa à 37° C com 5% de CO_2. Após nova lavagem as células foram ressuspensas em 100 μL dessa solução acrescentando 5 μL de anticorpo marcado com fluorocromo PE, BD Pharmingen, incubadas por 20 minutos no escuro, e submetidas a seguir a análise por citometria de fluxo.

3.5 Análise da expressão das caspases 8 e 9 por citometria de fluxo

PBMC isoladas como descrito acima foram cultivadas por 4 dias na concentração 2,5 x 10^5 células/alvéolo em placas de 24 alvéolos (Corning-Costar, Cambridge, MA), a 37° C com 5% de CO_2 na presença de meio apenas, CMA e gp43 de *P. brasiliensis*.

Após o período de cultivo, as células estimuladas ou não estimuladas, foram removidas da palca de 24 alvéolos e lavadas com PBS/BSA 1%. Para essas análises

foram realizadas culturas de PBMC de pacientes e controles mantidas por 4 dias com ou sem estímulos antigênicos para análise da expressão das caspases 8 e 9. Após este período, as células estimuladas ou não foram removidas e lavadas com tampão de lavagem (Kit, Calbiochem) e acrescidas de 10 μl anticorpos anti-CD3 (tri-color, Caltag), 1μl de caspase 9 (FITC-LEHD-FMK, Calbiochem) e 1 μl de caspase 8 (Red-IETD-FMK, Calbiochem). As células foram incubadas por 30 minutos a 37° C com 5% de CO_2 e então adicionados mais 500 μl do tampão de lavagem para serem submetidas à análise por citometria de fluxo.

Essas mesmas marcações e análises foram feitas com as células logo após a separação por Ficoll-Hypaque, "ex vivo", tanto nas células de pacientes como nas células de indivíduos controles.

3.6. Análise estatística

Para compararmos as porcentagens de expressão de moléculas encontradas nas diferentes condições de cultura tanto nos pacientes como controles, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foram utilizados adicionalmente para compararmos dados não pareados e entre dois ou três grupos respectivamente. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0.05$. Os resultados de citometria foram apresentados individualmente com a mediana do grupo. Os resultados das respostas linfoproliferativa foram apresentados em colunas + ou – desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da resposta linfoproliferativa de pacientes e controles

A resposta linfoproliferativa dos pacientes previamente ao tratamento, frente à gp43 encontra-se significativamente diminuída quando comparamos com a resposta dos indivíduos controles. A resposta dos pacientes para CMA é normal na maioria dos pacientes, entretanto, nitidamente superior à da gp43, salientando mais uma vez a natureza predominantemente específica do déficit imunológico na paracoccidioidomicose (fig. 1).

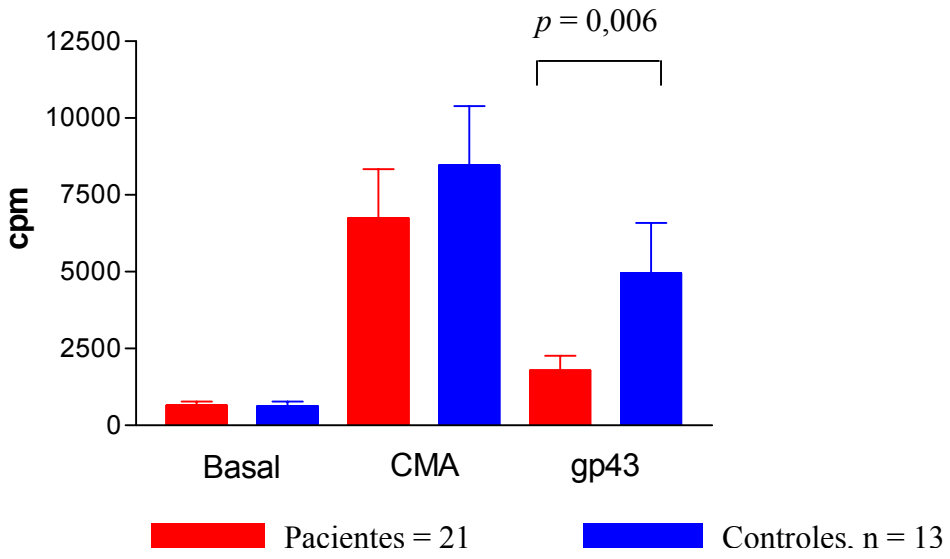

Fig. 1. Células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 7 dias sem estímulo ou na presença dos antígenos CMA e gp43. Teste de Mann Whitney.

4.2 Análise da expressão (%) e média da intensidade de fluorescência (MFI) na superfície de células T CD3+, CD28+ e CTLA4+ de pacientes e controles mantidos em cultura com ou sem estimulo antigênico

Foram realizados ensaios quantificando a porcentagem de linfócitos T CD3+CD28+ de 25 pacientes (3 com a forma aguda e 22 com a forma crônica), e 15 indivíduos controles. Para a análise de células T CD3+CTLA4+ foram estudados 18 pacientes (2 com a forma aguda e 16 com a forma crônica), e 10 indivíduos controles. Essas células foram mantidas em cultura sem estímulo ou estimuladas com CMA e gp43. Após o período de 4 dias de cultura, as células foram removidas e marcadas com anticorpo anti-CD3, anti-CD28 e anti-CTLA4 e em seguidas submetidas à análise por citometria de fluxo (fig. 2).

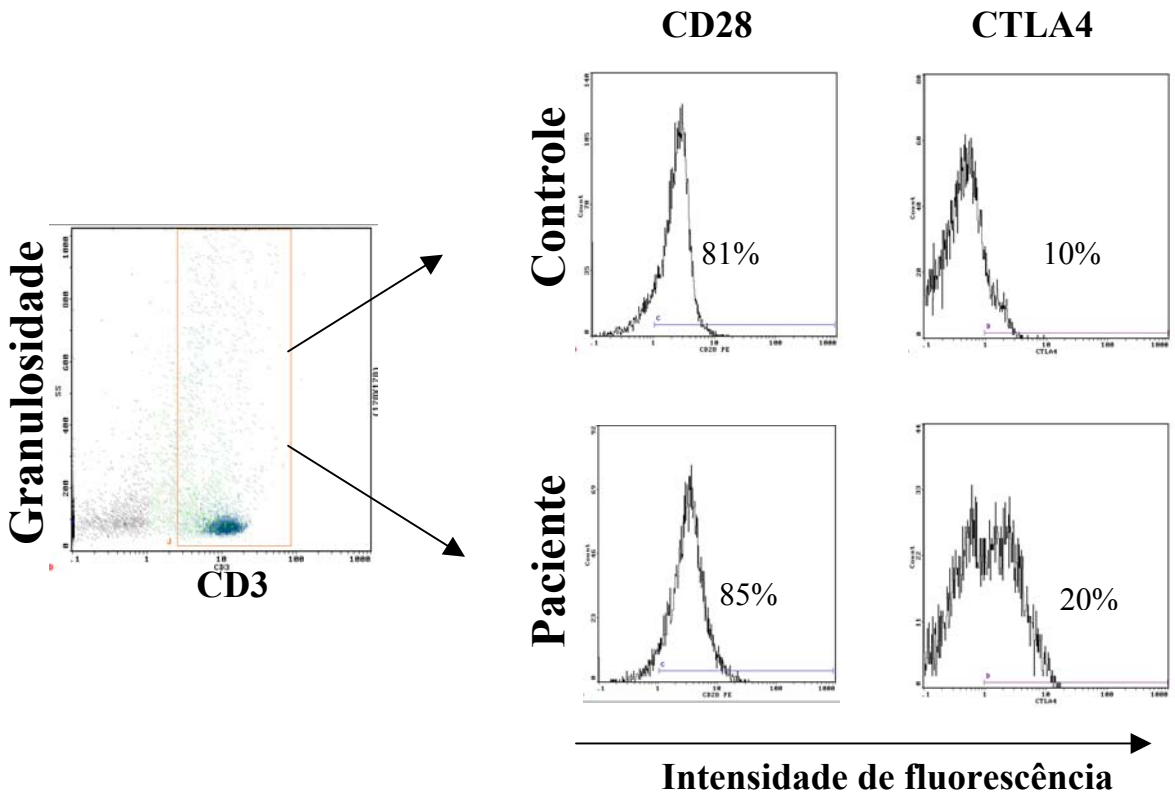

Fig. 2. Exemplo ilustrativo da análise da média de intensidade de fluorescência e da porcentagem de células expressando os respectivos marcadores de superfície. Células mononucleares de paciente mantidas em cultura por 4 dias, com estímulo pela gp43.

Observamos que nas células mononucleares dos pacientes estimuladas com gp43, CMA e mantidas sem estímulo antigênico, as porcentagens de células T CD3+CTLA4+ foram maiores quando comparadas com células dos indivíduos controles mantidas nas mesmas condições (P = 0,01, P = 0,01 e P = 0,03 respectivamente). Entretanto, em ambos os grupos, a adição de gp43 ou CMA não resultou em modificação significativa das porcentagens de expressão (fig. 3).

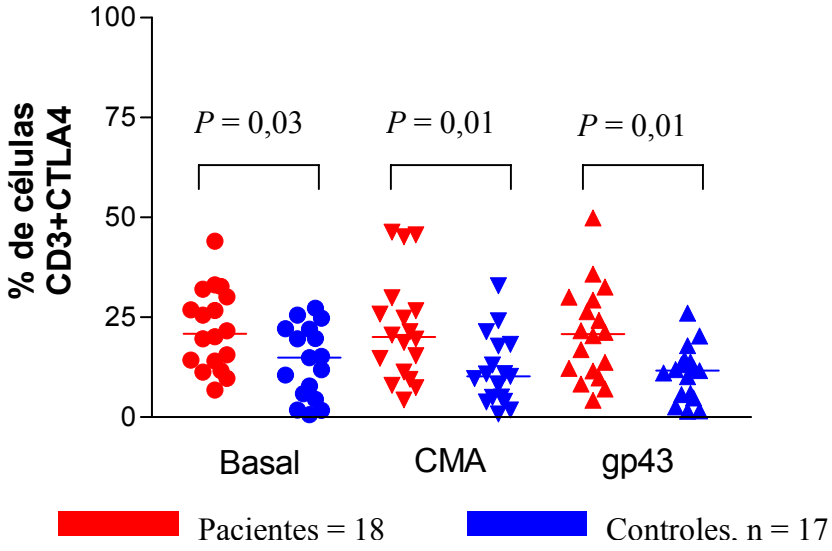

Fig. 3. Análise da porcentagem de células T CD3+ CTLA-4+ de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias, na presença ou não dos antígenos CMA e gp43. Teste de Mann Whitney.

Em paralelo a análise da porcentagem das células T CD3+CTLA4+, analisamos o MFI dessas células. As diferenças observadas na análise das porcentagens, comparando-se as células dos pacientes e as células dos indivíduos controles, não se repetiram na análise da MFI: não observamos diferenças entre pacientes e controles na presença ou ausência de estímulo. Na análise realizada intra-grupo, não houve aumento do MFI tanto nas células de pacientes como de indivíduos controles quando adicionamos CMA e gp43 (fig. 4).

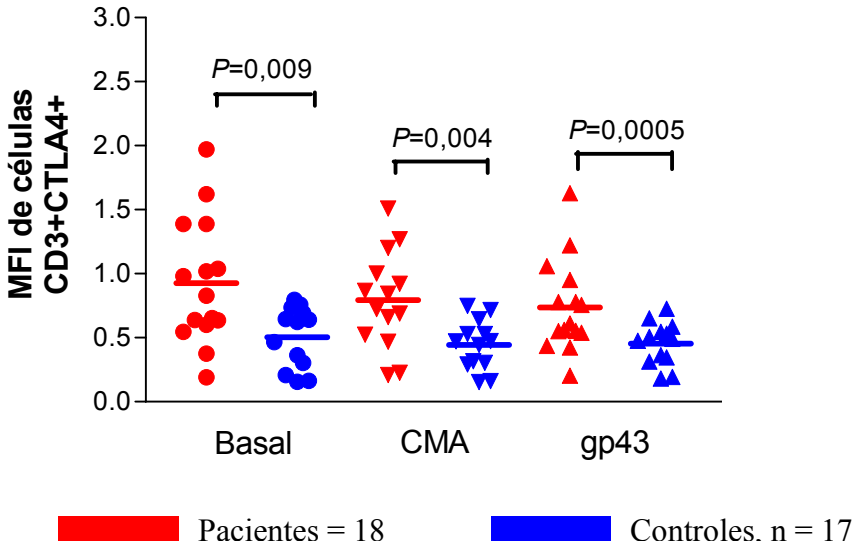

Fig. 4. Análise da Média da Intensidade de Fluorescência (MFI) da molécula CTLA4 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias na presença ou não dos antígenos CMA e gp43. Teste de Mann Whitney.

Quando analisamos a subpopulação T CD3+CD28+ nas culturas de células mononucleares de pacientes não observamos diferenças significativas quando comparamos com as células dos controles nas mesmas condições. Não houve diferença na porcentagens de expressão entre células estimuladas e não estimuladas, tanto nos controles como nos pacientes (Fig. 5).

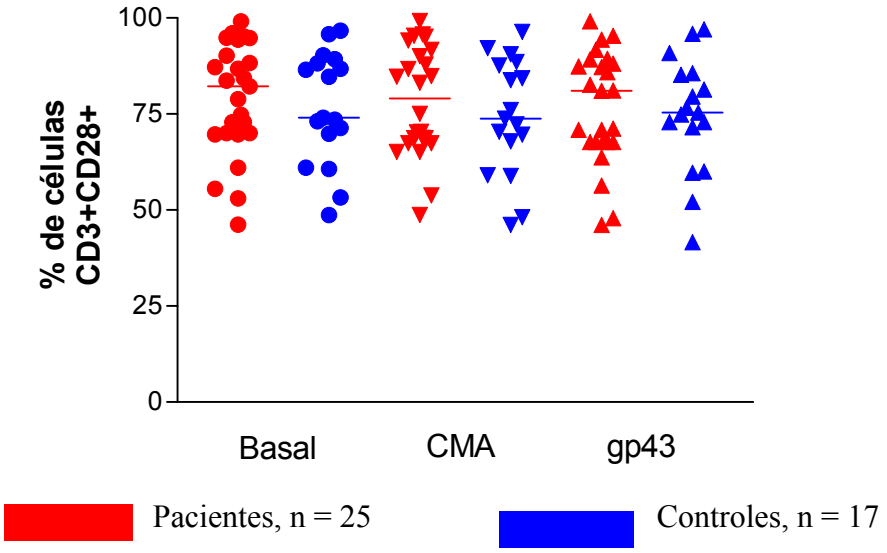

Fig. 5. Análise da porcentagem de expressão da molécula CD28 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias na presença ou não dos antígenos CMA e gp43. Teste de Mann Whitney.

A média de intensidade de fluorescência de CD28 nas células T CD3+ também não foi diferente comparando-se pacientes e controles nas diferentes condições de cultura, consistente com os resultados encontrados na análise de porcentagem de expressão nestas células (Fig. 6).

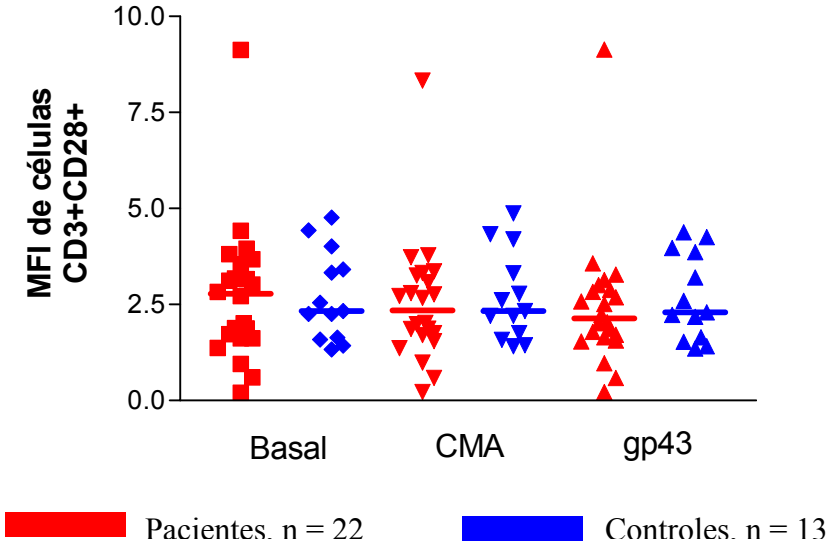

Fig. 6. Análise da Média da Intensidade de Fluorescência (MFI) da molécula CD28 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias na presença ou não dos antígenos CMA e gp43. Teste de Mann Whitney

4.3 Análise da resposta linfoproliferativa de pacientes e controles com adição de anticorpo bloqueador anti-CTLA4

Para melhor explicarmos o papel exercido pelo CTLA4, uma vez que observamos maiores porcentagens em pacientes do que nos controles de células T CD3+ estimuladas com CMA e gp43 ou mantidas sem estímulos expressando esta molécula, realizamos culturas nas mesmas condições, porém adicionando 10µg/mL de anticorpo bloqueador anti-CTLA4 no início da cultura de 9 pacientes e 7 indivíduos controles. Demonstramos que não houve diferença significante nas respostas proliferativas entre os grupos de pacientes e controles com ou sem a adição do anticorpo anti-CTLA-4 (Fig. 7).

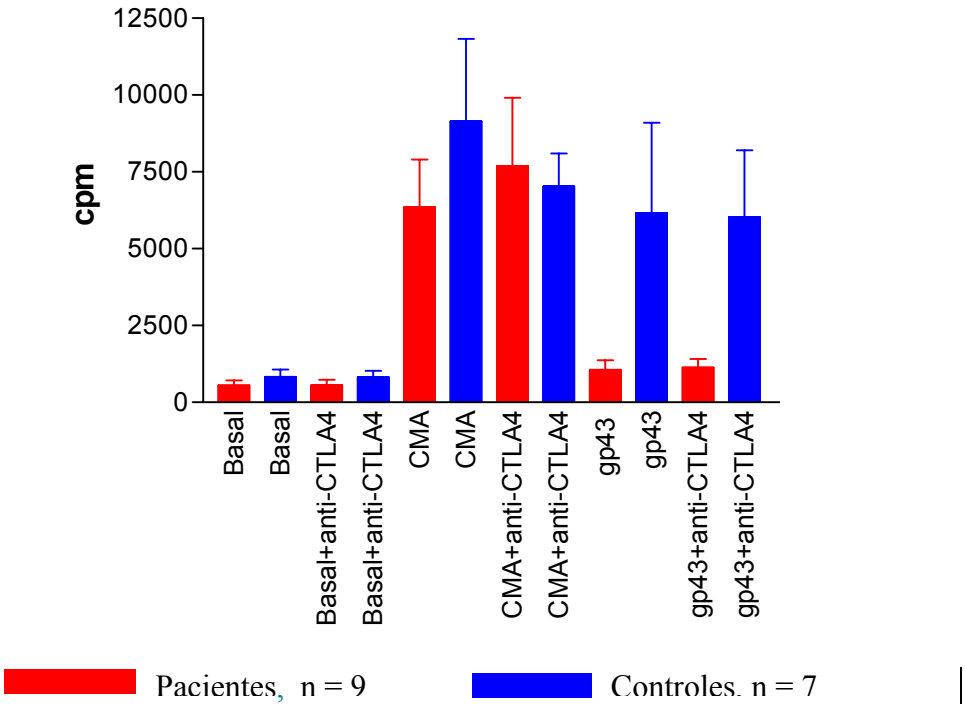

Fig. 7. Resposta proliferativa de células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 7 dias sem estímulo ou na presença dos antígenos CMA e gp43 com e sem adição do anticorpo bloqueador anti-CTLA4 no dia 0 da cultura.

4.4. Análise da expressão (%) das moléculas co-estimulatórias PD-1 e ICOS na superfície dos linfócitos T CD3+ de pacientes e controles mantidos em cultura com ou sem estimulo antigênico

Foram realizadas análises *in vitro* de células T CD3+ICOS+ em pacientes e indivíduos controles. Analisando-se os grupos separadamente, observamos um aumento na porcentagem de células expressando este marcador após o estímulo mitogênico tanto nos pacientes (P = 0,0001) como nos controles (P = 0,0001), como de certa forma esperado, já que o estímulo mitogênico foi utilizado como controle positivo da ativação celular.

As porcentagens de células TCD3+ expressando ICOS foram relativamente baixas no grupo controle em relação aos pacientes: no grupo controle as medianas foram 8.9% (CMA), 8.50% (gp43) e em células mantidas sem estímulo 9.42%; nos pacientes as medianas foram de 21.10% (CMA), 18.5% (gp43) e 14.10% em células sem estímulo. Com estímulo mitogênico estas porcentagens atingiram 64% e 46% respectivamente. A porcentagem das células TCD3+ dos pacientes expressando a molécula ICOS na superfície foi maior quando estimuladas com CMA e gp43 quando comparadas com células dos indivíduos controles nas mesmas condições (P=0,03 e P=0,02, respectivamente). Também houve tendência a maior número de células expressando esta molécula tanto com o estímulo de PHA (P= 0.07) como nas células mantidas apenas com meio (P=0,07) nos pacientes (Fig. 8).

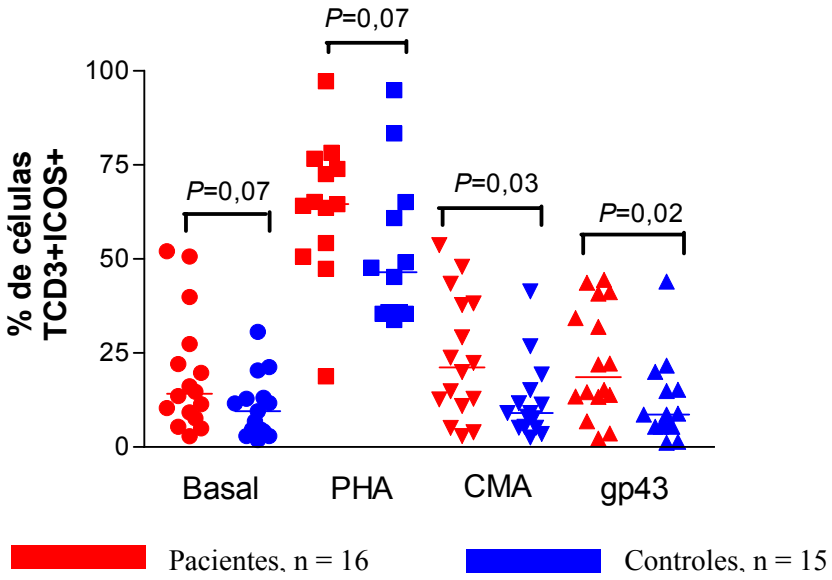

Fig. 8. Análise da porcentagem de expressão da molécula ICOS em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias na presença ou não dos antígenos CMA e gp43 e da mitógeno PHA. Teste de Mann Whitney

Em paralelo à análise do ICOS, também foram realizadas análises da porcentagem de expressão da molécula PD1 em células T CD3+ em pacientes e controles. A análise da expressão desta molécula mostrou maior porcentagem nas células dos pacientes que nas células dos indivíduos controles tanto com o estímulo de CMA (P = 0,03) como com gp43 (P = 0,01). Já nas células estimuladas com PHA, não observamos diferença comparando células de pacientes com as do controle. Houve também tendência ao aumento da expressão de PD-1 nas células não estimuladas dos pacientes comparadas com as células não estimuladas de indivíduos controles (P = 0,07) (Fig.9).

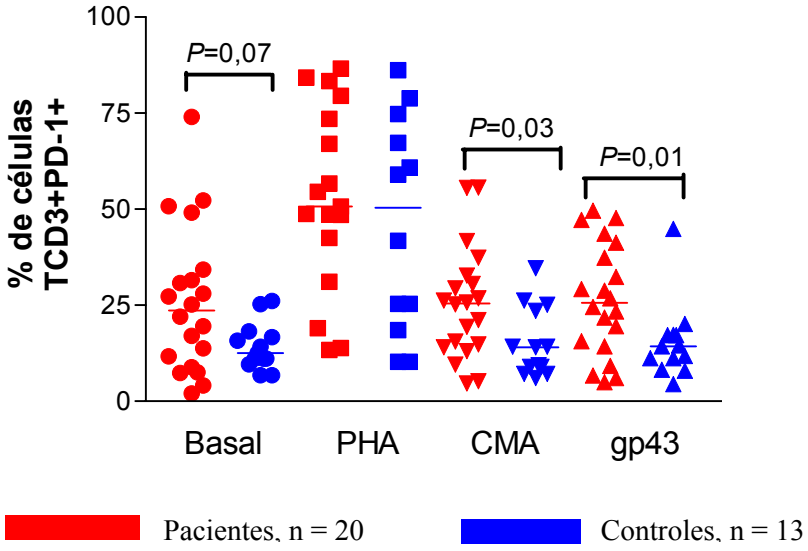

Fig. 9. Análise da porcentagem de expressão da molécula PD-1 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias na presença ou não dos antígenos CMA e gp43 e do mitógeno PHA. Teste de Mann Whitney.

Quanto à análise da média de intensidade de fluorescência das células dos pacientes e controles tanto em relação à expressão do ICOS, não observamos diferenças estatísticas (fig. 10). Já a média da intensidade de expressão da molécula PD-1 foi maior nas células de pacientes estimuladas com gp43 (P=0,01), CMA (P=0,04), como também sem estímulo (P=0,04), quando comparadas com células de indivíduos controles.

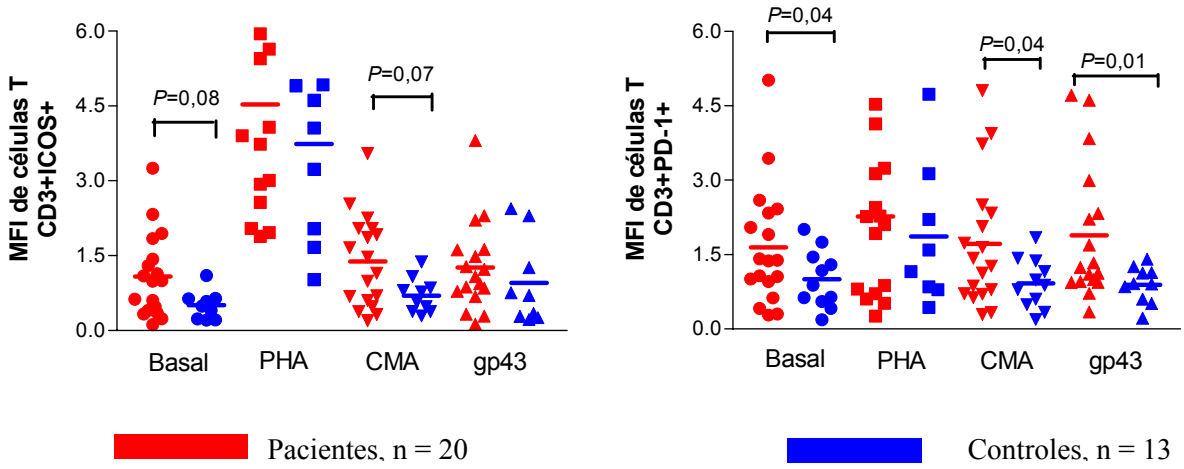

Fig. 10. Análise da Média da Intensidade de Fluorescência (MFI) das moléculas ICOS e PD-1 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias sem estímulo ou na presença dos antígenos CMA e gp43, e do mitógeno PHA. Teste de Mann Whitney.

4.5. Análise da resposta linfoproliferativa de pacientes e controles com adição dos anticorpos bloqueadores anti-PD-1, anti-ICOSL, anti-PDL-1 e anti-PDL-2.

Após observarmos que a porcentagem das moléculas PD-1 e ICOS está aumentada na superfície de linfócitos dos nossos pacientes, e sabendo que essas moléculas também estão envolvidas na ativação celular - eventualmente exercendo papel inibitório, foram realizadas culturas com células mononucleares de cinco pacientes e três indivíduos controles, com estímulo de CMA e gp43 e também sem estímulo antigênico, com ou sem acréscimo de anticorpo anti-PD-1.

Sabendo que a expressão dessas moléculas ocorre em período mais tardio da ativação celular, acrescentamos os anticorpos bloqueadores anti-PD-1 e anti-ICOS, após 4 dias de cultura, período no qual observamos aumento da expressão das mesmas nas células dos pacientes e controles.

Observamos que a resposta linfoproliferativa à CMA de 4 pacientes, na presença de anti-PD-1, foi discretamente maior que na ausência do anticorpo. Já nas células sem estímulo ou estimuladas com gp43, o acréscimo do anticorpo não resultou em resposta proliferativa. Ao contrário, no único paciente com resposta proliferativa a gp43, bloqueio de PD-1 inibiu parcialmente a resposta. Nos 3 indivíduos controles a adição desse anticorpo não modificou a resposta celular nem para CMA nem para gp43 (Quadro 1).

Pacientes		anti-PD-1		anti-PD-1		anti-PD-1
	Basal	Basal	CMA	CMA	gp43	gp43
a	484	167	8308	10110	5347	2732
b	398	192	9526	18741	450	188
c	247	254	983	2037	327	257
d	225	176	3248	3623	319	291
e	149	147	434	199	268	281
Controles						
a	248	267	16332	10110	6241	2732
b	269	552	10616	13914	4407	4984
c	312	176	3274	3937	967	949

Quadro 1. Resposta linfoproliferativa (cpm) de células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 7 dias, com ou sem o acréscimo de 10 μg/mL do anticorpo bloqueador anti-PD-1 no 4º. dia de cultura, na presença ou ausência de estímulos antigênicos.

Foram realizados também alguns ensaios bloqueando os ligantes de PD-1, PDL-1 e PDL-2, expressos em grande variedade de células Esses anticorpos foram acrescentados desde o início da cultura nas células estimuladas com os antígenos ou não. Com o bloqueio dos ligantes de PD-1, tanto nas células dos pacientes com ou sem estímulo, como nas células dos controles nas mesmas condições; não observamos diferenças na resposta linfoproliferativa (Quadro 2)

Pacientes		anti-PDL-1 + anti-PDL-2		anti-PDL-1+ anti-PDL-2		anti-PD-1L + anti-PDL-2
	Basal	Basal	CMA	CMA	gp43	gp43
a	835	483	2206	1010	510	448
b	659	577	5572	6858	488	1584
c	786	468	925	451	539	326
d	386	217	3352	1320	157	343
Controle	397	850	8340	6753	6914	5248

Quadro 2. Resposta linfoproliferativa de células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 7 dias, com ou sem o acréscimo de 10 μg/mL do anticorpo bloqueador anti-PDL-1 e anti-PDL-2 no início da cultura, na presença ou ausência de estímulos antigênicos

Para observarmos a participação da molécula ICOS-L na resposta celular dos pacientes foram realizados alguns experimentos utilizando anticorpo anti-ICOS-L. Células mononucleares dos três pacientes e de um indivíduo controle curado foram estimuladas com os antígenos na presença ou ausência do anticorpo anti-ICOS-L. Quando estimuladas com CMA, a resposta linfoproliferativa diminuiu, sugerindo a importância do ICOS para a manutenção da resposta celular específica.

No entanto, quando analisamos a resposta a gp43 do indivíduo controle que exibiu resposta proliferativa positiva o bloqueio com o anticorpo anti-ICOS-L inibiu a resposta a gp43como ocorreu com a CMA. Já nos pacientes, o bloqueio de ICOS não reverteu a ausência de resposta linfoproliferativa (Tabela 3).

Pacientes		anti – ICOS-L		anti – ICOS-L		anti – ICOS-L
	Basal	Basal	cma	cma	gp43	gp43
a	835	610	2206	659	510	445
b	659	826	5572	689	488	423
c	786	807	925	404	539	484
Controle						
a	397	656	8340	541	6914	706

Quadro 3. Resposta linfoproliferativa de células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 6 dias, com ou sem o acréscimo de 10 μg/mL do anticorpo bloqueador anti-ICOSL no início da cultura, na presença ou ausência de estímulos antigênicos

4.6. Análise da expresão de moléculas co-estimulatórias em células CD14+ de pacientes e controles

Como um dos nossos objetivos foi o de observar o comportamento das moléculas co-estimulatórias em resposta ao antígeno específico (gp43) do fungo, iniciamos a análise com as células mantidas em cultura por 4 dias, período necessário para processamento e apresentação antigênica, e após o qual estaria ocorrendo então a ativação antígeno-específica dos linfócitos T.

Para obtermos um número suficiente de monócitos, as células mononucleares totais foram cultivadas por 4 dias em placas de 24 alvéolos (em vez de placas de 96 alvéolos) com ou sem estímulo antigênico (fig.11). Com o aumento do número total de monócitos recuperados das placas mantidas em cultura com ou sem estímulos antigênicos, pudemos analisar as porcentagens e médias de fluorescências encontradas tanto de CD80 como de CD86 expressos na membrana dos monócitos de 15 pacientes.

Quando analisamos a porcentagem de células CD80+ na subpopulação CD14+ mantida em cultura tanto com gp43 como com CMA ou sem estímulo, não observamos diferenças comparando as células dos pacientes com as células do grupo controle. No entanto, no grupo controle, a porcentagem de células CD14+CD80+ após estímulo com gp43 e com CMA foi discreta, porém significativamente maior (Wilcoxon matched pairs test) quando comparada com as células mantidas em cultura sem estímulos. Essa mesma análise foi realizada nos pacientes onde não observamos diferença com o acréscimo dos antígenos (Fig. 12).

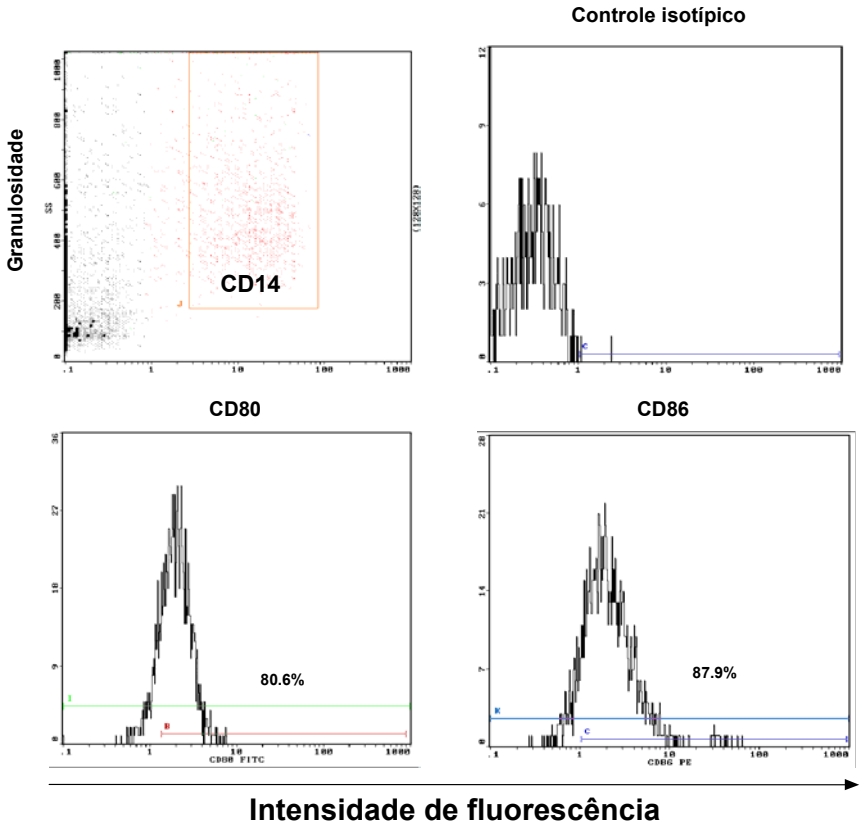

Fig. 11. Exemplo ilustrativo da análise da média de intensidade de fluorescência e da porcentagem de células expressando os respectivos marcadores de superfície (CD14, CD80, CD86). Células mononucleares de paciente mantidas em cultura por 4 dias, com estímulo pela gp43.

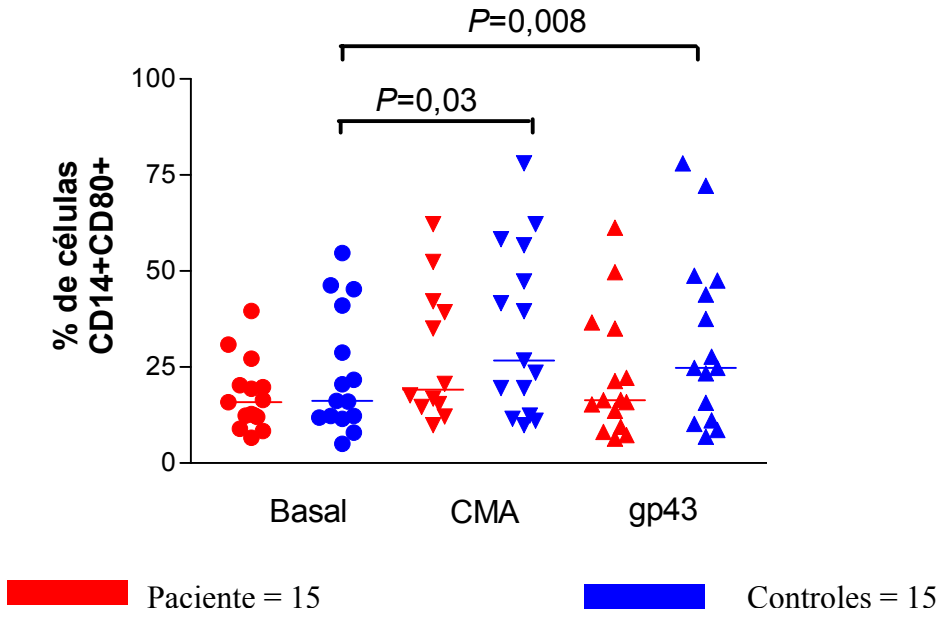

Fig. 12. Análise da porcentagem de expressão da molécula CD80 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias sem estímulo ou na presença dos antígenos CMA e gp43. Comparação intra-grupo pelo teste "Wilcoxon matched pairs test".

A média de intensidade de fluorescência relacionada à expressão da molécula CD80 na superfície de células CD14+ dos pacientes, estimuladas ou não com os antígenos, não foi diferente quando comparada com o grupo controle nas mesmas condições. Na análise separada dos 2 grupos não observamos diferenças quando adicionamos gp43 ou CMA no grupo controle, assim como não houve diferença quando adicionamos CMA ou gp43 no grupo de pacientes (Fig. 13).

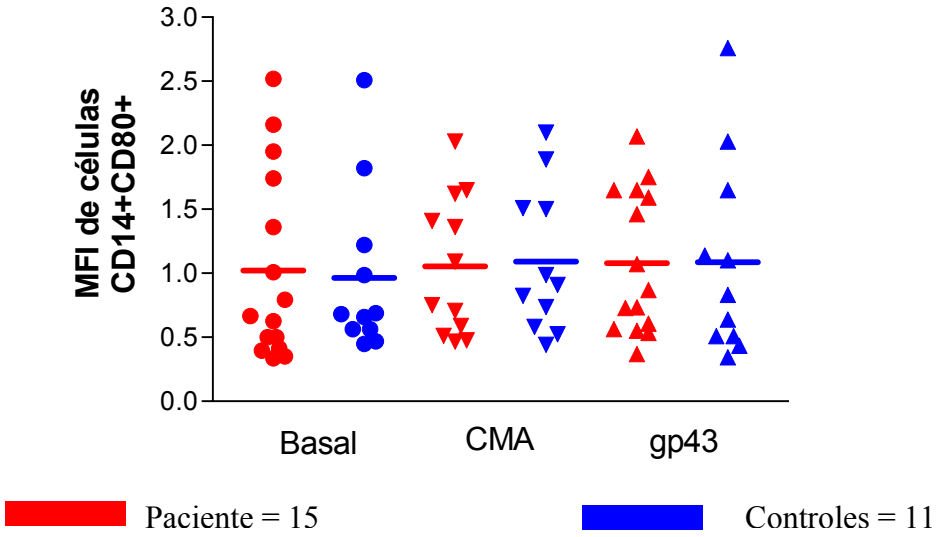

Fig. 13. Análise da média de intensidade de fluorescência das moléculas co estimulatórias CD80 na superfície de monócitos (CD14+) de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias com ou sem o estímulo de CMA e gp43. Mann Wthiney test

Na análise da porcentagem de células CD86+ na subpopulação CD14+, não observamos diferenças entre o grupo de pacientes e o grupo controle, tanto com as células estimuladas com os antígenos do estudo, como com as células mantidas em cultura sem estímulo. Na análise separada dos grupos, a porcentagem de expressão da molécula CD86 na superfície de células CD14+ também não foi diferente quando comparamos as células sem estímulos com as células estimuladas com gp43 e CMA, tanto nos pacientes como controles (fig. 14).

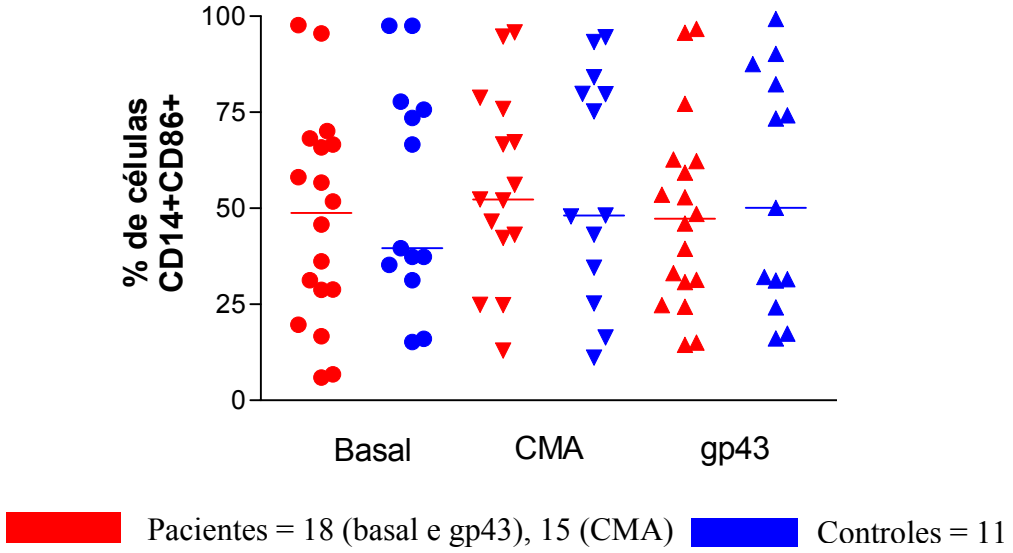

Fig. 14. Análise da média de intensidade de fluorescência da molécula coestimulatórias CD86 na superfície de monócitos (CD14+) de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias com ou sem o estímulo de CMA e gp43. Teste de Mann Whitney.

As médias de intensidade de fluorescência da molécula CD86 na superfície das células CD14+ estimuladas com gp43 e CMA, e também as células mantidas sem estímulo, não foram estatisticamente diferentes entre pacientes e controles. Porém, observa-se que as células dos pacientes tanto estimuladas como mantidas sem estímulo têm uma tendência ao aumento da MFI de CD86 na superfície das células CD14+. A análise realizada intra grupo não mostrou diferença tanto nos pacientes como nos controles em células estimuladas vs. células não estimuladas (fig. 15).

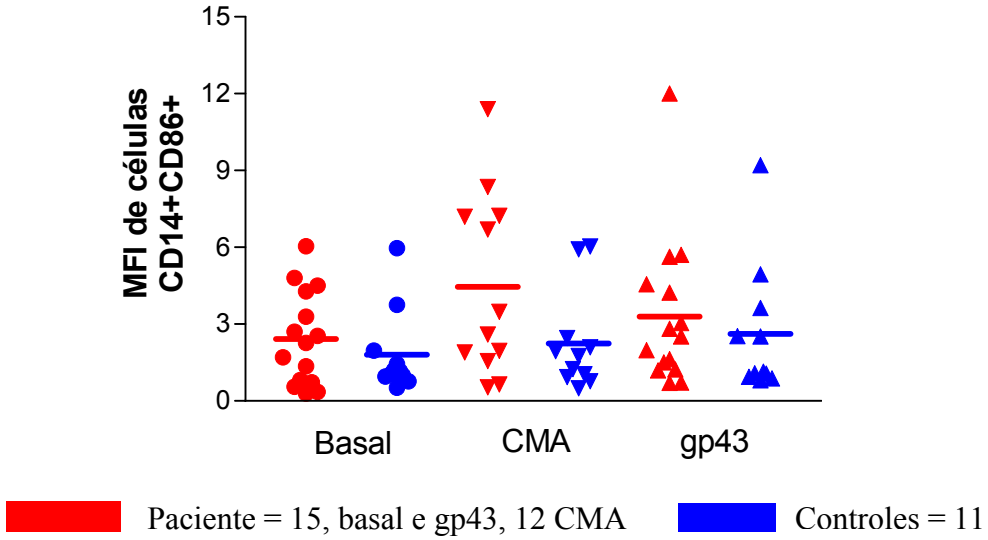

Fig. 15. Análise da média de intensidade de fluorescência da molécula coestimulatórias CD86 na superfície de monócitos (CD14+) de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias com ou sem o estímulo de CMA e gp43. Teste de Mann Whitney.

4.6. Análise da expressão (%) e da média de intensidade de fluorescência (MFI), das moléculas CD80 e C86 na superfície dos linfócitos T CD3+ de pacientes e controles mantidos em cultura com ou sem estimulo antigênico

Em paralelo às análises das moléculas CD80 e CD86 na superfície de células CD14+, foram realizadas marcações dessas mesmas moléculas na superfície de células T CD3+. A porcentagem de expressão do CD80 na superfície dos linfócitos T CD3+ foi maior nos pacientes que nos grupo controle, tanto nas células estimuladas com gp43, CMA ou PHA, como mantidas em cultura sem estímulo (P = 0,0005, P = 0,003, P = 0,05, P =0,003, respectivamente). Quando a expressão do CD80 foi analisada intra-grupo, observamos que nos pacientes o acréscimo da PHA levou ao aumento, porém não significativo, da expressão dessa molécula, não ocorrendo o mesmo no grupo controle (Fig. 16).

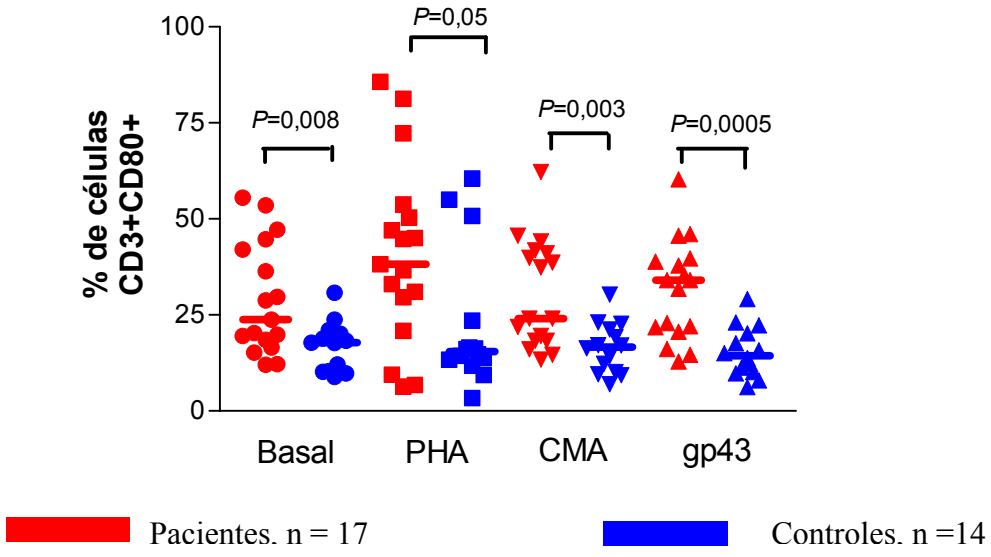

Fig. 16. Análise da porcentagem de expressão da molécula CD80 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias sem estímulo ou na presença dos antígenos CMA e gp43, e do mitógeno PHA. Teste de Mann Whitney.

Esses resultados foram de certo modo surpreendentes, pois as porcentagens de linfócitos T expressando estas moléculas foram relativamente altas: as medianas das porcentagens de células dos pacientes estimuladas com CMA e gp43 expressando CD80 foram 24,0% e 34,0%, respectivamente, enquanto no grupo controle as medianas nas células estimuladas com CMA e gp43 foram 16.65% e 14,40%. Ou seja, diferentemente da expressão nas células CD14+, a expressão de CD80 em linfócitos permitiu diferenciar pacientes de controles.

A análise da MFI da molécula CD80 tanto na superfície das células de pacientes como de controles, mantidas com ou sem estímulo antigênico, revelou-se parcialmente diferente daquela obtida com a análise das porcentagens. Tanto as comparações realizadas entre as células de pacientes com as células dos controles, como as análises intra-grupo, não revelaram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 17).

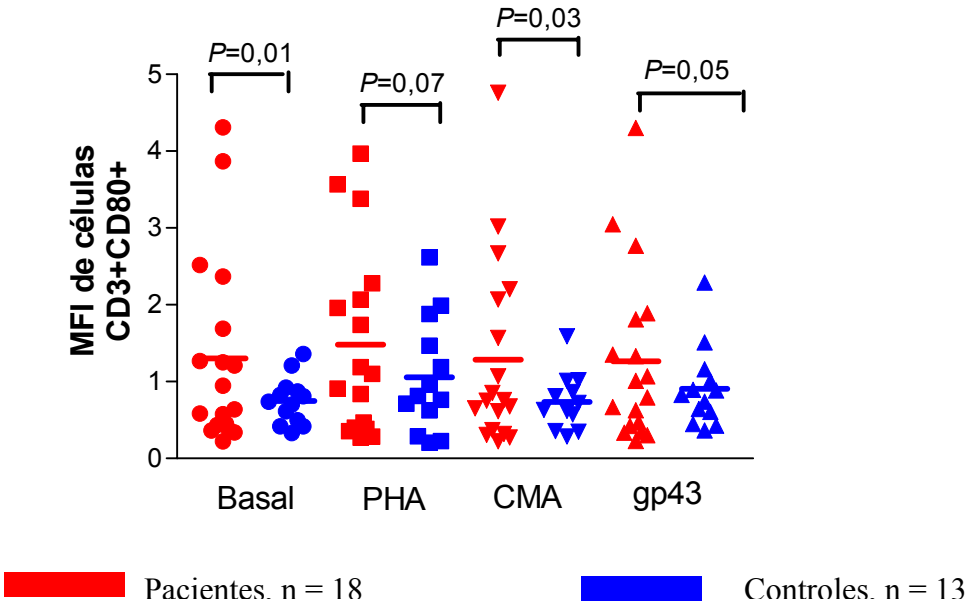

Fig. 17. Análise da média de intensidade de fluorescência em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias sem estímulo ou na presença dos antígenos CMA e gp43, e do mitógeno PHA. Teste de Mann Whitney.

A porcentagem células expressando CD86 dos pacientes estimuladas com CMA, gp43 ou sem estímulo foi maior que nas células dos controles. Como ocorreu com a molécula CD80, a expressão da molécula CD86 nas células T CD3+ dos pacientes demonstrou-se aumentada também com estímulo de PHA em relação às células dos indivíduos controles (Fig. 18).

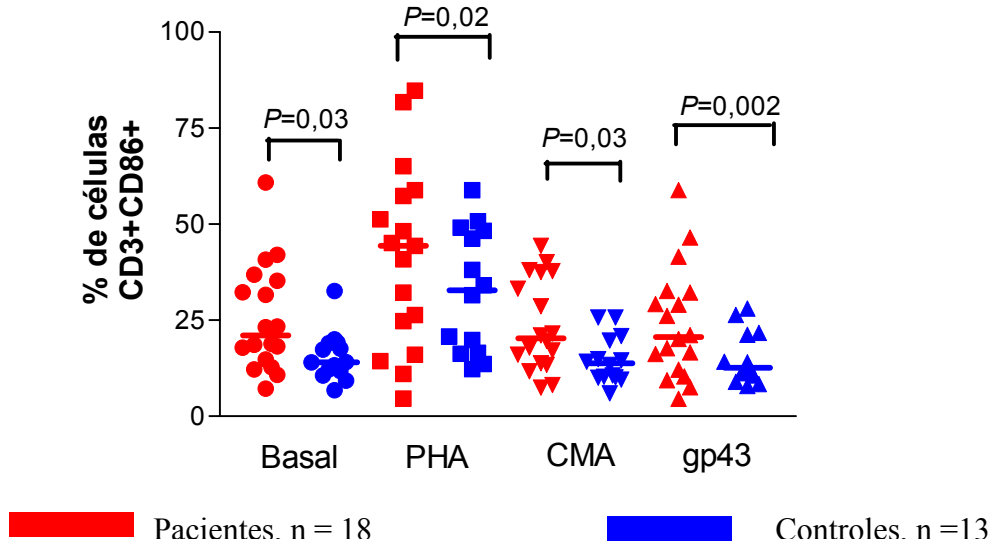

Fig. 18. Análise da porcentagem de expressão da molécula CD86 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias sem estímulo ou na presença dos antígenos CMA e gp43, e do mitógeno PHA. Teste de Mann Whitney.

A média de intensidade de fluorescência da molécula CD86, também se comportou de forma diferente da análise feita da porcentagem de expressão dessa molécula. Quando comparamos as células dos pacientes com as dos controles, observamos um maior MFI nas células dos pacientes, tanto quando estimuladas, como também nas células mantidas sem estímulos. (Fig. 19).

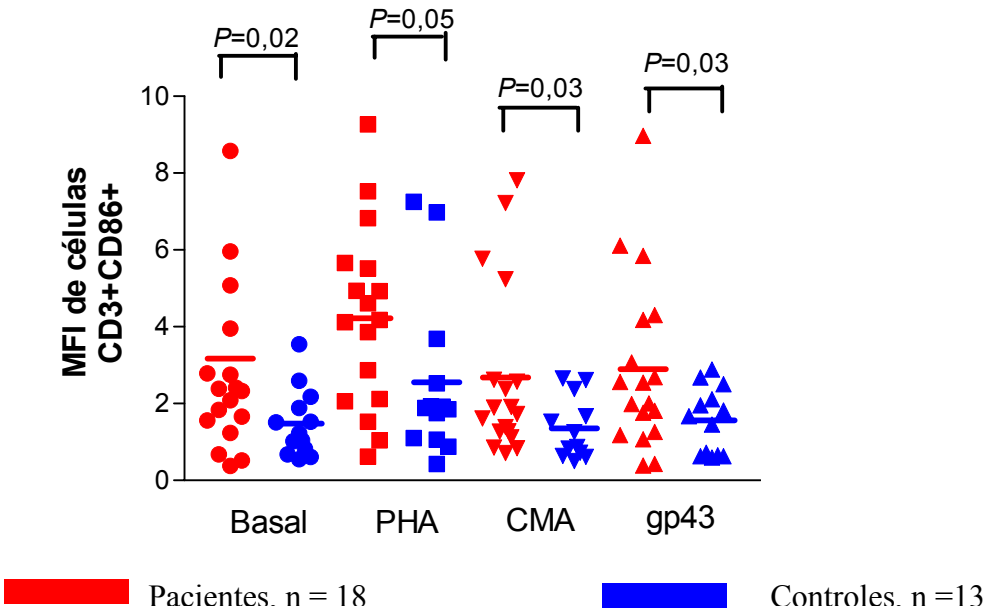

Fig. 19. Análise da média de intensidade de fluorescência da molécula CD86 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias sem estímulo ou na presença dos antígenos CMA e gp43, e do mitógeno PHA. Teste de Mann Whitney.

4.8 Análise da resposta linfoproliferativa de pacientes e controles com adição de anticorpo bloqueador anti-CD80 ou anti-CD86

Para tentarmos compreender melhor o papel exercido pelo CD80 e CD86, realizamos culturas nas mesmas condições, ou seja, estimuladas com CMA, gp43 e sem estímulo, porém adicionando-se 10μg/mL do anticorpo bloqueador anti-CD80 ou anti-CD86 no início da cultura, em 7 pacientes e 6 indivíduos controles.

Os resultados das respostas linfoproliferativas com a adição do anticorpo anti-CD86 nas células dos pacientes estimuladas com CMA e gp43 foram menores em comparação com os mesmos estímulos sem o anticorpo, ou seja, o bloqueio da sinalização via CD86 diminuiu a resposta proliferativa aos antígenos dos pacientes. O mesmo não ocorreu com a adição do anticorpo anti-CD80, sugerindo que a sinalização via CD80 não seja indispensável para a resposta proliferativa ao CMA. No grupo controle, da mesma forma, a resposta proliferativa de células estimuladas tanto com CMA como com gp43 também foi diminuída com o acréscimo do anticorpo anti-CD86; já o acréscimo do anticorpo anti-CD80 diminui também a resposta proliferativa das células estimuladas com gp43 (fig. 20).

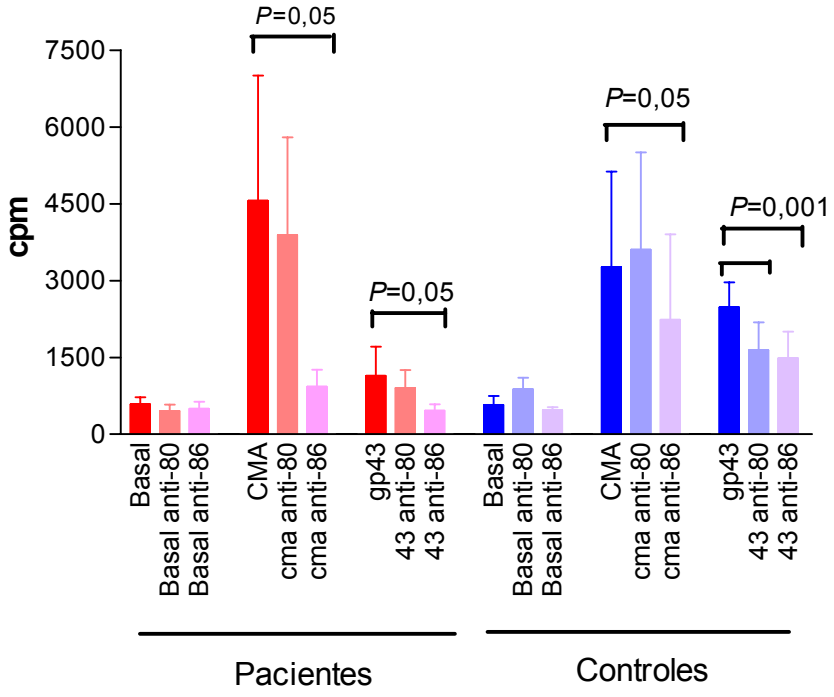

Fig. 20. Resposta proliferativa de células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 7 dias sem estímulo (7 pacientes, 7 controles) ou na presença dos antígenos CMA (7 pacientes, 7 controles) e gp43 (6 pacientes, 7 controles) com e sem adição dos anticorpos bloqueadores anti-CD80 e anti-CD86, acrescidos no dia 0. Mann Whitney test.

Em seguida, adicionamos os mesmos anticorpos nas mesmas concentrações, no entanto após 4 dias de cultura. Para esses experimentos foram analisadas células de 6 pacientes com e sem estímulo antigênico e células de 9 indivíduos controles com estímulo de CMA e sem estímulo, e 6 controles estimulados com gp43. O acréscimo nesse período, com o objetivo de não interferir na apresentação antigênica por monócitos, permitiu analisar a atividade de sinalização dessas moléculas, uma vez que foi observado aumento da expressão das moléculas CD80 e CD86 na superfície dos linfócitos dos pacientes, comparados com os linfócitos dos indivíduos controles.

No entanto, o acréscimo dos anticorpos anti-CD80 e anti-CD86 no 4º. dia de cultura levou a um discreto aumento (porém não significativo) da resposta linfoproliferativa das células mononucleares dos pacientes estimuladas com CMA. Com gp43, o acréscimo do anticorpo anti-CD80 diminuiu ainda mais a resposta proliferativa das células mononucleares. Com anti-CD86 a resposta não se modificou. Nas células mononucleares dos controles, o acréscimo dos anticorpos levou a um aumento (não

significativo) da resposta linfoproliferativa com o antígeno de CMA, e a uma tendência a diminuição da resposta desses indivíduos frente a gp43 (Fig. 21).

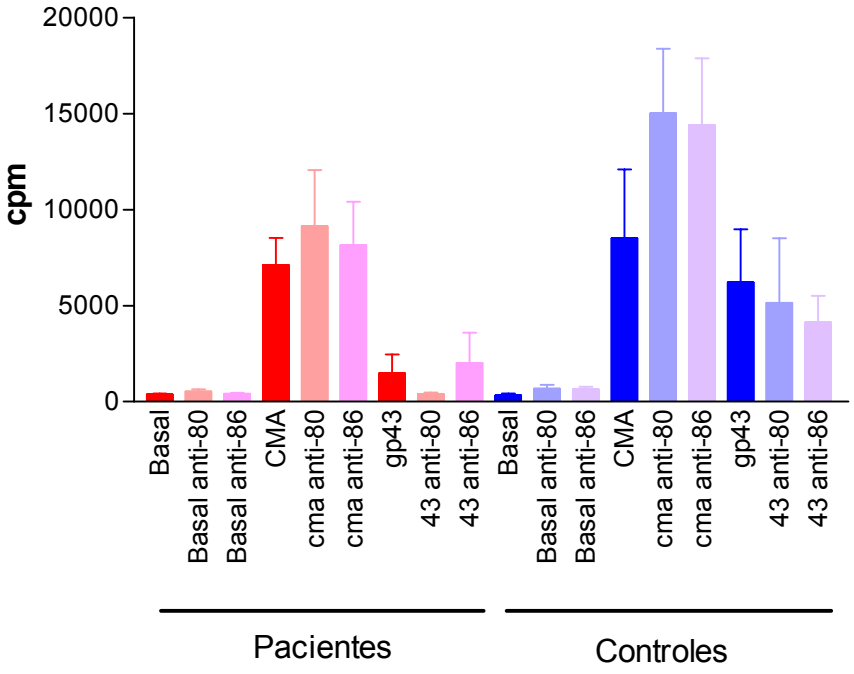

Fig. 21. Análise da resposta proliferativa de células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 7 dias sem estímulo (6 pacientes, 9 controles) ou na presença dos antígenos CMA (6 pacientes, 9 controles) e gp43 (5 pacientes, 4 controles) com e sem adição dos anticorpos bloqueadores anti-CD80 e anti-CD86, acrescidos no 4º dia. Mann Whitney test.

4.9 Análise da expressão da molécula Bcl-2 por citometria de fluxo

Foram então realizados análises da expressão *ex vivo* da molécula Bcl-2 em 10 pacientes e 9 indivíduos controles.

Primeiramente foram analisados os linfócitos TCD3+ em repouso (gate E), i. e., células CD3+ de pequeno tamanho e baixa granulosidade, morfologia vista normalmente em células T não ativadas (fig. 22a). Nessas condições, não observamos diferença quando comparamos as porcentagens de expressão da molécula Bcl-2 em linfócitos TCD3 dos pacientes com os dos indivíduos controles, demonstrando que os linfócitos em repouso, tanto dos pacientes como dos controles, expressam porcentagens elevadas e semelhantes da molécula Bcl-2. Como exceção, observamos dois pacientes nos quais a expressão da molécula Bcl-2 foi notavelmente mais baixa (Fig. 22b).

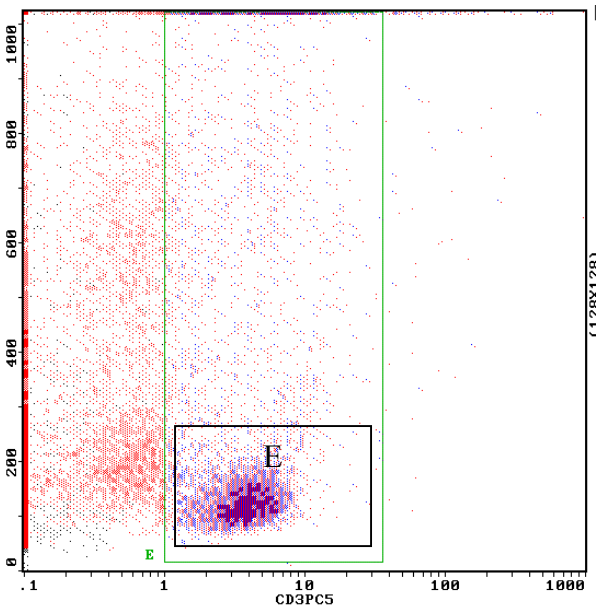

Fig. 22a

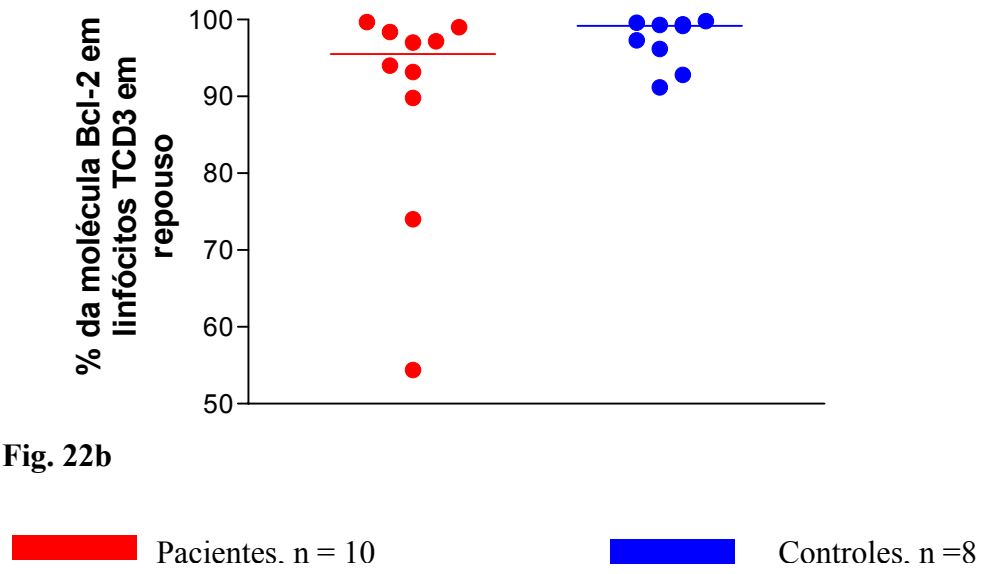

Fig. 22b

Figura 22 (a). Exemplo ilustrativo da aquisição de células para análise da expressão de Bcl-2 em células TCD3+ de pacientes e controles. O quadrante E representa a janela de linfócitos T em repouso, com tamanho e granulosidade correspondentes a células não ativadas. **(b)** A partir dessa janela analisamos as células quanto à expressão intracelular de Bcl-2. Teste de Mann Whitney.

Realizamos também a análise de células totais, incluindo além dos linfócitos em repouso, linfócitos ativados com maior tamanho e granulosidade e monócitos ativados ou não (gate B) (fig.23a). Nessas células comparamos a porcentagem de expressão da molécula Bcl-2 entre pacientes e controles onde observamos que nas células dos pacientes a expressão da molécula bcl-2 foi menor que no grupo controle (*P* = 0,05) (Fig. 23b).

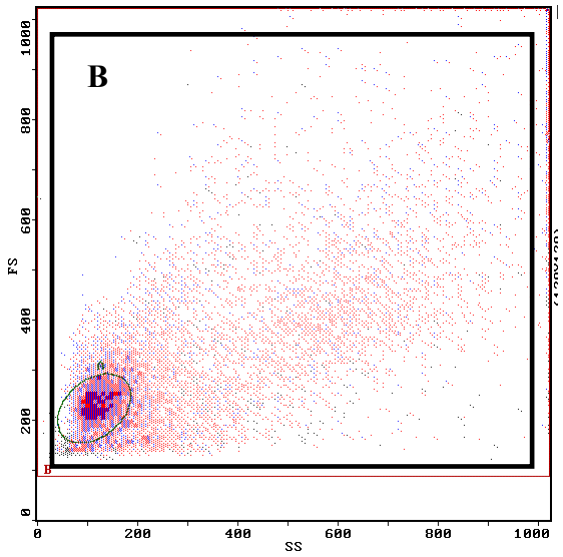

Fig. 23b

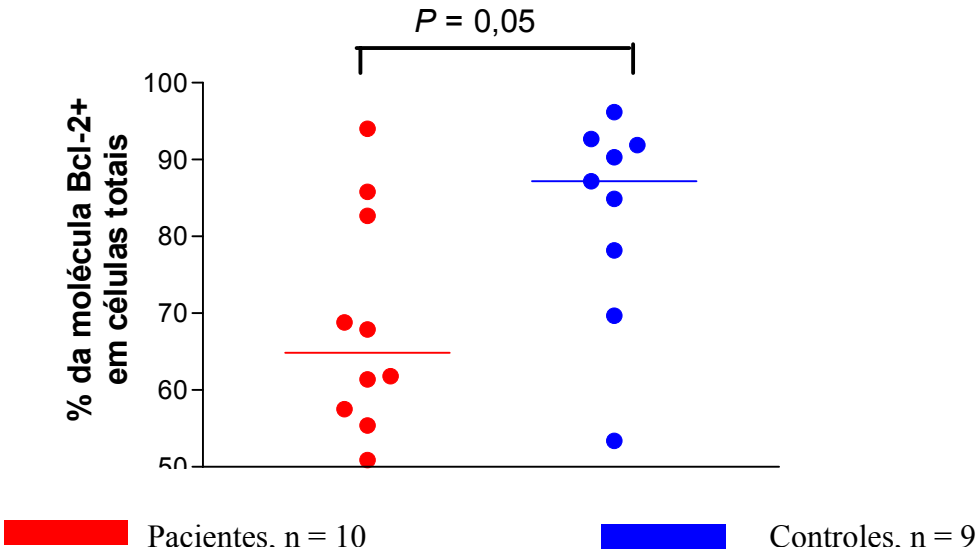

Fig. 23 (a). Exemplo ilustrativo da aquisição de células para análise da expressão de Bcl-2 em células TCD3+ de pacientes e controles. "E" representa a janela de linfócitos totais em repouso, com tamanho e granulosidade correspondentes a células não ativadas; **(b)**, a partir dessa janela analisamos as células quanto à expressão intracelular de Bcl-2. Teste de Mann Whitney.

A partir do gate B, separamos as células T CD3+Bcl-2+ (gate F) (fig. 24 a,b), onde observamos também uma diminuição da expressão da molécula bcl-2 nas células dos pacientes em relação ao grupo controle (P = 0,07) (fig. 24c). Esses resultados reforçam que a maior parte das células com menor expressão do bcl-2 são linfócitos T CD3+.

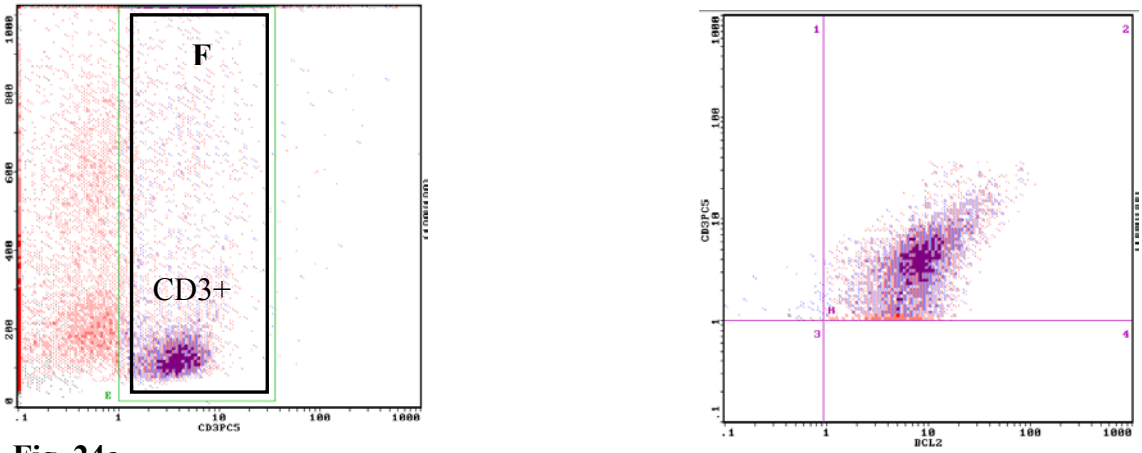

Fig. 24a

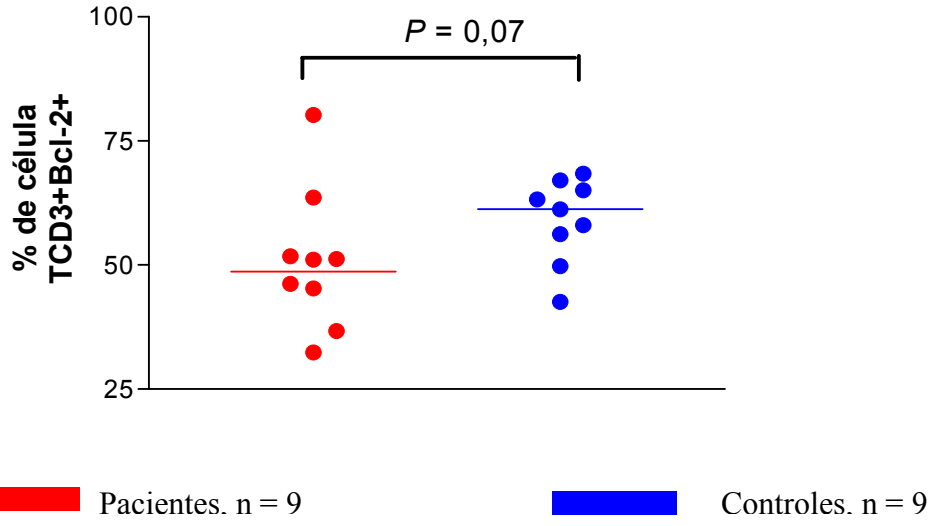

Fig. 24b

Fig. 24a. Exemplo ilustrativo da aquisição de células para análise da expressão de Bcl-2 em células TCD3+ de pacientes e controles. O quadrante F representa a janela de linfócitos T totais em repouso e ativados; **Fig. 24b**, a partir dessa janela analisamos as células quanto à expressão intracelular de Bcl-2. Teste de Mann Whitney

Paralelamente foram realizados experimentos em que as células de pacientes como de controles foram mantidas em cultura por 4 dias na presença dos antígenos CMA e gp43 para a análise da expressão da molécula Bcl-2 nestas condições.

Quando analisamos as células totais estimuladas ou não com CMA e gp43, observamos que a expressão da molécula Bcl-2 foi menor, porém não estatisticamente significante, nas células dos pacientes que nas células dos controles (fig. 25). Nessa análise observamos também que a expressão da molécula Bcl-2 nas células dos pacientes estimuladas com gp43 foi menor em relação ao basal que as células estimuladas com gp43. Lembramos que pacientes mantêm a resposta celular preservada com a CMA, diferentemente de gp43.

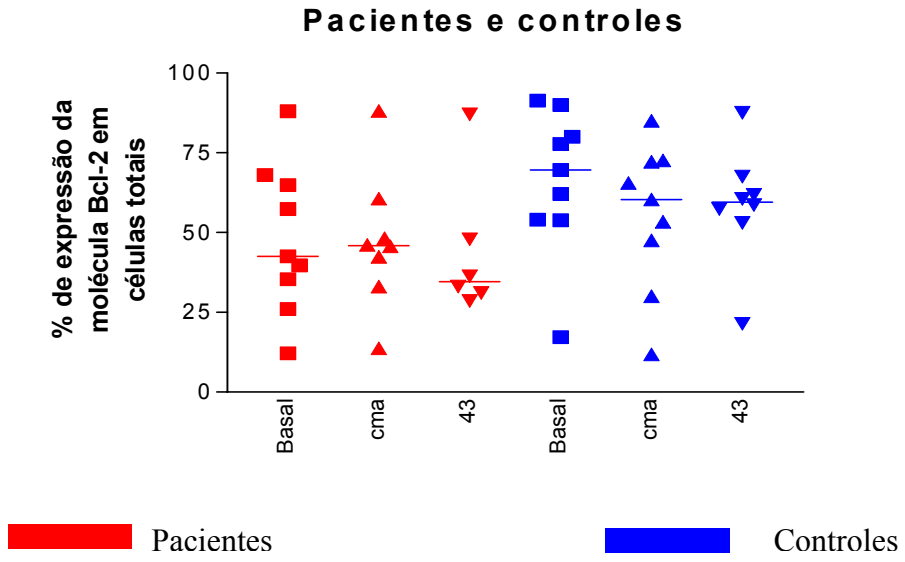

Fig. 25. Análise da expressão de Bcl-2 em células mononucleares de pacientes e controles, mantidas em cultura por 4 dias com estimulo por CMA (8 pacientes, 9 controles); gp43 (6 pacientes, 8 controles) e sem estímulo (9 pacientes, 9 controles). Essa análise foi realizada a partir do gate B da fig. 23a. Teste de Mann Whitney.

4.10. Análise da expressão das caspases 8 e 9 por citometria de fluxo

Para análise da expressão das caspases 8 e 9, foram realizadas culturas de células mononucleares estimuladas com CMA e gp43de 10 pacientes e 8 controles. As análises das caspases 8 e 9 foram realizadas no quarto dia de cultura com ou sem estímulo antigênico. Apresentamos abaixo um exemplo utilizando células mononucleares de 1 paciente mantida em cultura por 4 dias, com estímulo de gp43, de como as células TCD3+ foram analisadas no citômetro de fluxo (Fig. 26).

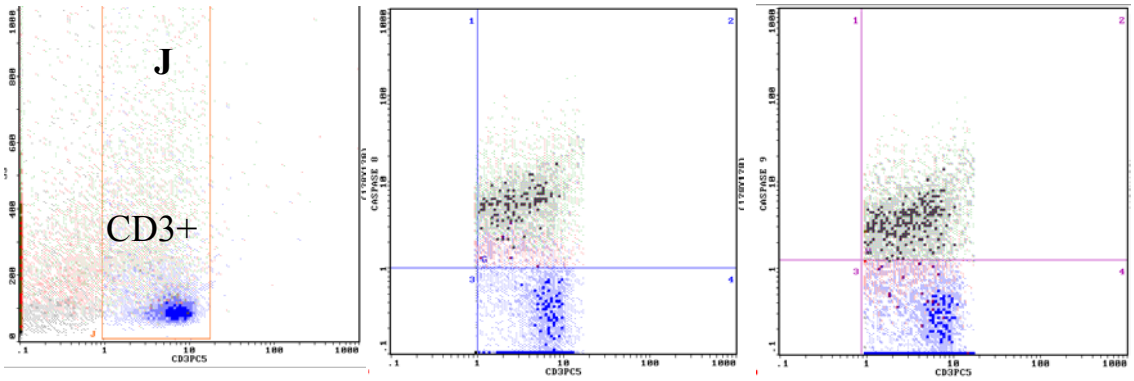

Fig. 26. Exemplo ilustrativo da aquisição de células para análise da expressão de caspase 8 e 9 em células TCD3+ de pacientes e controles. Células mononucleares de paciente mantidas em cultura por 4 dias, com estímulo pela gp43. Após esse período, as células foram removidas e marcadas com anticorpo anti-CD3 e anti-caspase 8 e caspase 9 na forma ativa. No primeiro quadrante observamos a janela J, onde as células foram separadas por marcação com CD3+ e por tamanho, desta forma analisando também células ativadas CD3+. A partir do "gate" J as células foram quantificadas em células com dupla marcação CD3+/caspase 8+ (histograma b) e CD3+/caspase 9+ (histograma c).

Com os resultados obtidos, observamos que a expressão da caspase 8 pelas células mononucleares de pacientes com ou sem estímulo por CMA e gp43 foi menor quando comparamos com células dos indivíduos controles, porém não houve diferença significativa. Esses resultados também demonstraram que a expressão da caspase 8 na forma ativa em células mononucleares de pacientes estimuladas com CMA e gp43 não foram diferentes quando comparadas com as células sem estímulos, onde as medianas foram de 22% e 24% respectivamente, com mediana de 26% . No grupo controle, também não observamos diferença das células estimuladas tanto com CMA (mediana 16,10%) como gp43 (mediana 16,30%), comparadas com células sem estímulo (mediana 18,6%) (Fig. 27).

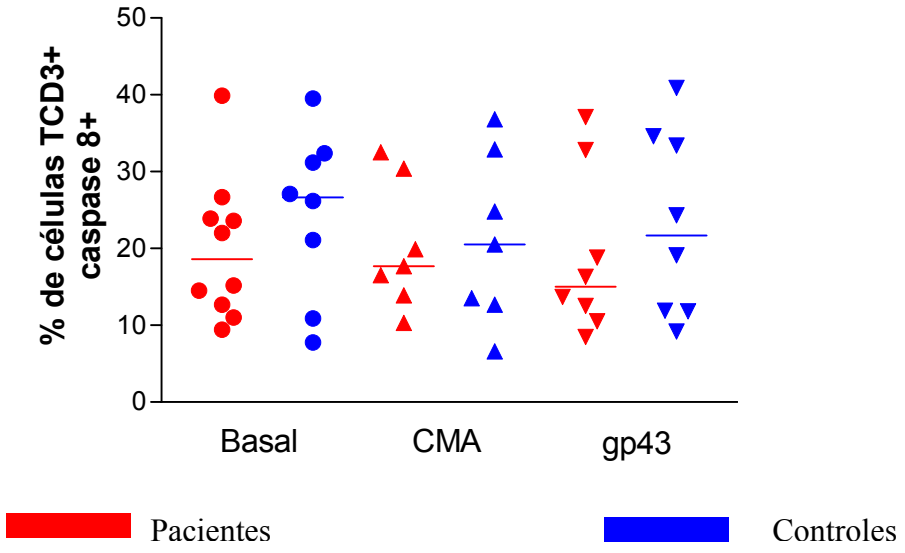

Fig. 27. Análise da expressão de caspase 8 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias, estimuladas ou não com CMA e gp43. Foram analisados 7 pacientes e 7 controles estimulados com CMA, 8 pacientes e 8 controles com gp43 e 10 pacientes, 8 controles sem estímulo antigênico.

A expressão da caspase 9 na forma ativa não foi diferente quando comparamos células mononucleares de pacientes com células de indivíduos controles. As medianas das células dos pacientes estimuladas com CMA e gp43 foram de 13.7% e 11.7%, respectivamente, e nos controles com o estímulo de CMA a mediana foi de 19.5% e com gp43 15%. As células sem estímulos dos pacientes tiveram uma mediana de 13.30% e nos controles a mediana foi de 20.9% (Fig. 28).

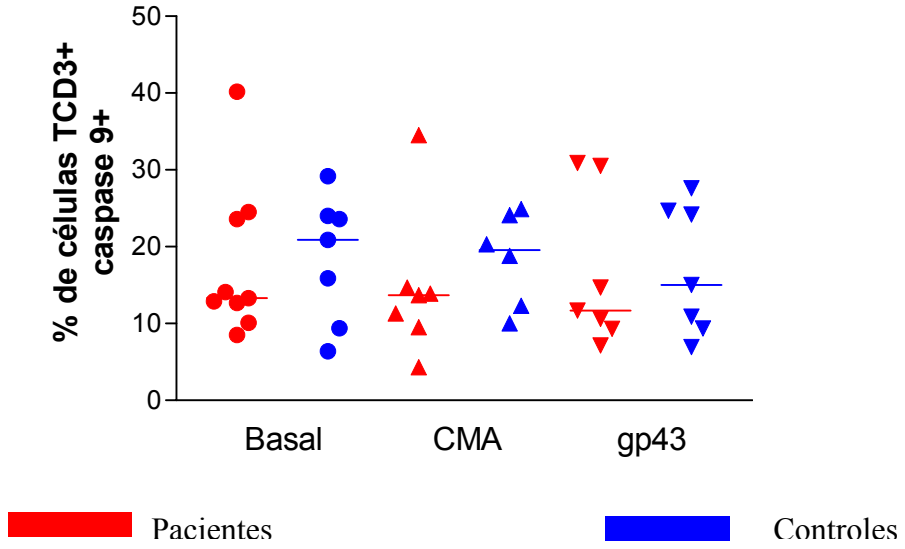

Fig. 28. Análise da expressão de caspase 9 em células mononucleares de pacientes e controles mantidas em cultura por 4 dias, estimuladas ou não com CMA e gp43. Foram analisados 7 pacientes e 6 controles estimulados com CMA, 7 pacientes e 7 controles com gp43 e 9 pacientes, 7 controles sem estímulo antigênico.

Em seguida, analisamos a expressão das caspases 8 e 9 na forma ativa em células de pacientes e controles *ex vivo*. Essa análise nos revelou que tanto a caspase 8 como a caspase 9 estão ativadas em níveis significativamente maiores em células de pacientes quando comparadas com células de indivíduos controles, antes mesmo de serem reestimuladas com os antígenos de CMA e gp43 (Fig. 29).

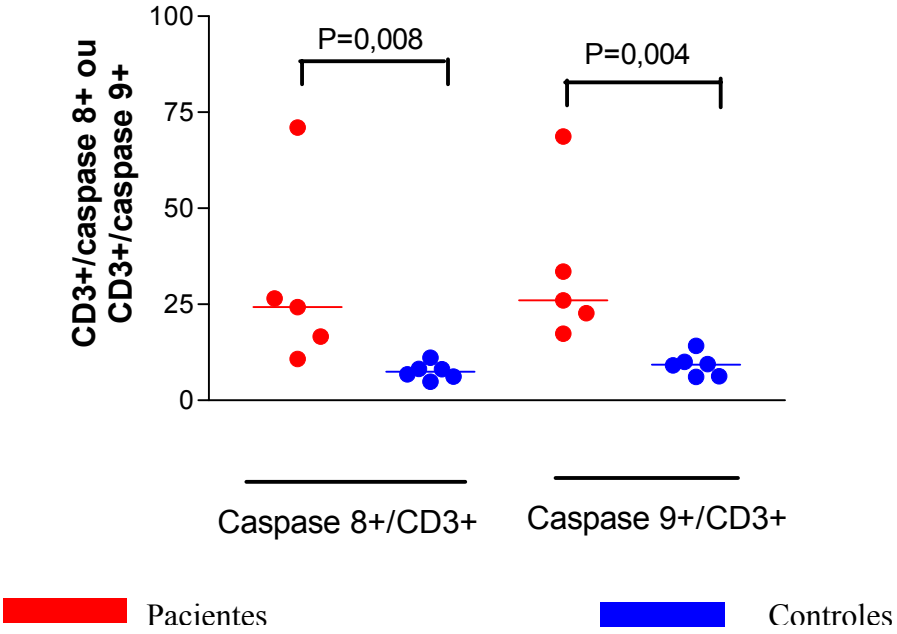

Fig. 29. Análise da expressão de caspase 8 e 9 "ex-vivo" em células mononucleares de pacientes e controles. Foram analisadas a expressão das caspases 8 e 9 na forma ativa em células mononucleares de 5 pacientes e 6 controles *ex vivo*. Teste de Mann Whitney

5 DISCUSSÃO

Há mais de uma década está bem estabelecido o conceito de que moléculas co-estimulatórias exercem um papel crucial na ativação celular e na regulação da resposta imunológica, incluindo a resposta a agentes causadores de doenças infecciosas crônico-granulomatosas. Por outro lado, neste mesmo período, o número de moléculas para as quais se descreveu atividade coestimulatória de linfócitos, sinalizando tanto negativa como positivamente, aumentou sobremaneira, tornando esta área do conhecimento bastante ativa, e complexa.

Em relação ao nosso trabalho, inicialmente sugerimos que a anergia/apoptose, poderiam estar relacionadas a um padrão específico e característico de coestimulação nos pacientes.

Para este estudo selecionamos moléculas coestimulatórias bem caracterizadas como sinalizadoras positivas ou negativas no controle da resposta imunológica, ou seja, membros da família B7 - CD28 como CTLA-4, CD28 e seus ligantes CD80 e CD86 e também ICOS, PD-1 com seus respectivos ligantes ICOSL, PDL-1 e PDL-2.

A molécula CD28 é expressa constitutivamente na superfície de células T, enquanto a expressão do CTLA-4 aumenta rapidamente após ativação celular. CTLA-4 tem grande afinidade por ambos receptores, CD80 e CD86, no entanto, a cinética da expressão desses dois receptores e diferente. CD86 é expresso constitutivamente em baixos níveis e aumenta rapidamente enquanto CD80 é expresso mais tardiamente. O aumento da expressão de CTLA-4 em células T em repouso inibe a ativação dessas células. A exposição repetida a estímulos inflamatórios aumenta a expressão das moléculas CD80 e CD86 na superfície de células apresentadoras de antígenos promovendo o sinal B7: CD28, que junto com o TCR leva a ativação celular. Em seguida, CTLA4 é rapidamente expresso na superfície das células T onde ocorre a interação B7: CTLA4, inibindo a respostas das células T ao estímulo inflamatório. No entanto, ainda não está claro como esta regulação ocorre. Possivelmente a molécula CTLA4 inibe a ativação das células T mediada por CD28 ligando-se ao CD80 ou CD86 nas superfícies das células, neutralizando diretamente o sinal do TCR ou CD28 dentro da célula (SHARPE, 2005).

Inicialmente, confirmamos observações prévias de que o déficit imunológico (ausência de resposta proliferativa ou "anergia") na PCM é predominantemente relacionado à resposta imune anti-*P. brasiliensis*. A resposta proliferativa ao antígeno de *C. albicans*, usado como antígeno fúngico não relacionado ao *P. brasiliensis*, esteve preservada na maioria dos pacientes, e a resposta no grupo de pacientes como um todo foi comparável à dos controles e superior à com gp43.

CAMPANELLI et al., 2003, estudaram a apoptose e a expressão de CTLA4/CD28 em PBMC de pacientes com PCM em relação às de indivíduos controles normais. Estes autores demonstraram que pacientes com PCM ativa têm um aumento na expressão do CTLA4 tanto ex-vivo como após estímulo com PHA, comparativamente a indivíduos sadios normais, sendo que não havia diferença nas porcentagens de PBMC CD28+ entre os 2 grupos. Entretanto após estimulação com diferentes preparações antigênicas de *P. brasiliensis*, os índices de expressão foram próximos aos obtidos na presença de meio apenas e na maioria das vezes não significativamente diferentes dos controles.

Nossos dados corroboram em parte aos achados acima, ao demonstrarem maior expressão de CTLA4 em células T de pacientes independentemente da presença ou não de estímulo antigênico (i. é., constitutivamente: houve aumento em relação aos controles tanto na presença de CMA, gp43, ou somente meio de cultura). Entretanto, a importância desta molécula como reguladora da resposta imune não se comprovou quando avaliamos o efeito da adição de anticorpo anti-CTLA4 bloqueador na resposta proliferativa em número significativo de pacientes (n = 15): não houve em nenhum paciente restabelecimento de resposta proliferativa. Portanto, o bloqueio da sinalização via CTLA4 não restabelece resposta linfoproliferativa frente a gp43, e também não modifica significativamente a resposta ao CMA, já presente na maioria das vezes em proporção adequada. De fato, apesar do aumento de expressão desta molécula, o bloqueio da mesma, utilizando o mesmo anticorpo bloqueador (mesmo clone na mesma concentração), também não foi capaz de reverter a supressão da resposta mitogênica nas células dos pacientes no estudo de Campanelli et. al., 2003 (índices de estimulação de 20, enquanto no grupo controle nas mesmas condições os índices foram em média de 220).

O mesmo pode-se dizer em relação à tuberculose, cujo processo inflamatório crônico-granulomatoso guarda muitas similaridades com a PCM. GONG et al., 1996, observaram diminuição da expressão de CTLA4 em pacientes com tuberculose, porém seu bloqueio não alterou a produção suprimida de IFN-γ específica. Esta supressão pode ser revertida pela ação de IL-12 e/ou anti-IL-10, independentemente da presença ou não do bloqueio desta via coestimulatória.

Em modelo experimental de micobacteriose, o bloqueio com anti-CTLA4 foi capaz de aumentar a expansão, proliferação e produção de IFN-γ em linfócitos, sem entretanto conferir maior proteção contra a infecção (MERLO et al., 2001). Por outro lado, demonstrou-se que a sinalização via CTLA4 exerce potente efeito inibitório em clones de linfócitos TCD4+ citotóxicos anti-*M. tuberculosis*, porém, novamente, os autores sugerem que este efeito se relaciona mais a um fenômeno de auto-regulação que de imunossupressão propriamente dita (Kirman et al., 1999). Bozzi et al., 2004, também examinaram a expressão de CTLA4 por linfócitos de pacientes com PCM e não encontraram diferenças em relação ao grupo controle.

Inobe et al., 2004, demonstraram que a tolerância adaptativa de células T é mantida quando ocorre reestimulação continuada dessas células pela influência da persistência antigênica nos hospedeiros. Esse efeito leva também a diminuição drástica na produção de citocinas em um período de 21 dias, direcionando as células a um estado de tolerância adaptativa sistêmica. Estes autores também demonstraram que a molécula CTLA-4 não foi importante para manutenção do estado de tolerância adaptativa após a transfecção das células T em um ambiente livre de antígenos, concluindo que a molécula CTLA-4 não estava envolvida no mecanismo de modulação da tolerância adaptativa.

O papel da molécula CTLA-4 tem sido estudada em vários outros modelos de tolerância *in vivo* tanto utilizando camundongos nocautes ou anticorpo anti-CTLA-4. O bloqueio *in vivo* do CTLA-4 aumentou a resposta primaria de células T, mas não foi suficiente para previnir a indução da tolerância tumoral antígeno especifica (SOTOMAYOR et al., 1999) confirmando que o CTLA4 não é importante para a regulação da tolerância adaptativa.

Em relação à expressão de CD28, não verificamos diminuição nas células de pacientes comparado com indivíduos controles após 4 dias em cultura semelhante aos resultados de Campanelli et al., 2003. Entretanto, as porcentagens de expressão de CD28 foram levemente menores nos indivíduos controles, possivelmente porque a resposta dos controles curados frente aos antígenos está normalmente presente, e após a ativação as células T sofrem uma diminuição fisiológica na expressão do CD28 (JAMES et al., 2004).

Por outro lado, Bozzi *et al.*, 2004 verificaram diminuição da expressão de CD28 em células CD8+, porém não CD4+, de pacientes virgens de tratamento estimuladas *in vitro* com antígenos de *P. brasiliensis* comparativamente aos controles. Estas observações, tomadas em conjunto, parecem indicar que o déficit de expressão de CD28 e de co-estimulação via CD28, se de fato presentes, não devem contribuir como principal mecanismo para a hiporreatividade linfocitária de pacientes com PCM. Resultados similares também foram descritos em pacientes com tuberculose (GONG et al., 1996).

Outras moléculas com funções semelhantes ao CD28 e CTLA4 também foram analisadas. Assim como CD28, ICOS também é uma molécula envolvida na diferenciação de células T, produção de citocinas e importante para produção de imunoglobulinas (FREEMAN et al., 2002, SPERLING, 2001).

Villegas et al., 2002, demonstraram que esplenócitos de camundongos estimulados com antígeno específico do *Toxoplasma gondii* têm um aumento da expressão da molécula ICOS correlacionado com o aumento da produção de IFN-γ, diferenciando as células para um perfil de células Th1. Na infecção com *Schistosoma mansoni* e em processos alérgicos, principalmente na asma, as principais citocinas detectadas foram IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 (AKBARI et al., 2002, BONHAGEN et al., 2003), caracterizando um perfil de células Th2.

Miyahira et al., 2003, observaram que o bloqueio do ICOS com administração de anticorpo monoclonal anti-ICOL em células de linfonodos de camundongos suscetíveis infectados com *L. major* diminuiu os níveis de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10

em comparação com células de camundongos não infectados. O mesmo ocorreu com os níveis de anticorpos IgE e IgG 1. Nesse trabalho, ICOS demonstrou-se importante no diferecionamento das células para um padrão Th1 ou Th-2. Tendo em vista que pacientes com paracoccidioidomicose demonstram níveis elevados de IL-10 e IL-4 e baixos níveis de IL-2, IL-12 e IFN-γ na resposta a gp43, especulamos então se essa molécula co-estimulatória estaria regulando o direcionamento das células T para Th-2 nos pacientes com PCM.

Nossos resultados demonstraram que células mononucleares de pacientes estimuladas com PHA, CMA e gp43, a porcentagem de expressão da molécula ICOS foi maior comparada com células de indivíduos controles nas mesmas condições de cultura. Esses resultados são consistentes com os níveis elevados de IL-10 (responsável por inibir principalmente várias atividades de macrófagos) encontrados em células de pacientes estimuladas com gp43 em trabalhos prévios de nosso laboratório.

No entanto, ao contrário do que esperávamos, quando inibimos a atividade da molécula ICOS com adição de anticorpo monoclonal anti-ICOS-L observarmos uma importante diminuição na reposta linfoproliferativa de células mononucleares de 3 pacientes e 1 indivíduo controle estimuladas com CMA, e com gp43. Já nos 3 pacientes, a adição do anticorpo anti-ICOS-L não reverteu a ausência de resposta à gp43, sugerindo que apesar de ter sido expressa em altos índices em células T, essa molécula não estaria envolvida de forma negativa na resposta antígeno específica de pacientes com paracoccidioidomicose. Portanto, com estes resultados observamos que a sinalização via ICOS: ICOS-L parece ser importante para a manutenção, ativação e diferenciação celular na resposta linfoproliferativa a antígenos fúngicos, e não para sua inibição.

PD-1 é uma molécula expressa durante o desenvolvimento celular no timo em células duplamente negativas, $CD4^-CD8^-$ e em timócitos γδ (NISHIMURA et al., 2000). Na periferia, PD-1 é induzido após a ativação em células T CD4+, CD8+, células B, monócitos e também expresso em baixos níveis em células NK-T (NISHIMURA et al., 2000, AGATA et al., 1996). Assim como CTLA4, níveis muito baixo de PD-1 são suficientes para inibir a ativação de células T num estágio mais tardio da resposta imune (CHEMNITZ et al., 2004).

Os ligantes dessa molécula são expressos de forma diferenciada, a expressão do PDL-1 de modo geral é maior que a expressão do PDL-2. PDL-1 é expresso em células T, B, mielóides e células dendríticas em repouso e ativadas (LIANG et al., 2003). Ao contrário de CD80 e CD86, PDL-1 é expresso também em células não hematopoiéticas incluindo células do endotélio microvascular e em órgãos não linfóides como o coração, pulmão, pâncreas, músculo e placenta (WIENDL et al., 2003, LIANG et al., 2003, ISHIDA et al., 2002). Já a expressão de ligante PDL-2 induzida por citocinas apenas na superfície de macrófagos e células dendriticas. Loke et al., 2003 demonstraram que a expressão de PDL-1 foi estimulada pelo IFN-γ e a expressão do PDL-2 foi induzido pela IL-4, sugerindo que os ligantes de PD-1 estariam envolvidos na diferenciação das células em Th1 e Th2.

Alguns trabalhos demonstraram que os ligantes PDL-1 e PDL-2 podem estimular a proliferação de células T. Dong et al., 1999, e também Tamura et al., 2001, demonstraram que células T em repouso quando estimuladas com uma baixa concentração de anticorpo anti-CD3 mais B7-H1-Ig (PDL-1 – Ig), apresentaram modesto aumento na proliferação de células T e na produção de citocinas IFN-γ e GM-CSF seguido de uma produção muito baixa de IL-2 e IL-4. Observou-se também um aumento significativo na produção de IL-10. Para avaliar a participação do PDL-2 na ativação e diferenciação de células T, Tseng et al., 2001 realizaram experimentos utilizando células TCD4+ em repouso, com adição de anticorpo anti-CD3 mais B7-DC-Ig (PD-L2-Ig). Os resultados demonstraram um aumento expressivo na proliferação e na produção de IFN-γ pelas células TCD4+, seguida de pouco efeito na produção de IL-2, IL-4 e IL-10. Não foi observado nenhum efeito significativo com a adição do PD-L2 na resposta de células T CD8+.

Em doenças infecciosas a interação das moléculas PD-1 com seu ligante PD-L1 tem-se demonstrado importante no controle da resposta de células TCD8+ anti-viral. Camundongos PD-1-/- infectados com adenovirus demonstraram aumento na proliferação de células T efetoras do fígado, aumentando dessa forma o "clearance" viral (IWAI et al., 2003). As infecções virais crônicas estão freqüentemente associadas com a supressão da resposta de células T. A interação PD1: PD-L1 contribui para a inativação funcional de células TCD8+ vírus especifica, durante uma infecção crônica (LATCHMAN et al., 2004).

Palmer et al., 2007, analisaram a expressão da molécula PD-1 em cultura de células mononucleares de pacientes HIV+, e indivíduos controles HIV-, estimuladas com o peptídeo Gag e outros peptídeos controles. Esses autores demonstraram que células TCD4+ de pacientes infectados cronicamente pelo HIV tem um aumento na expressão da molécula PD-1 em sua superfície, associado com a replicação viral, quando comparadas com células estimuladas com outros peptídeos do estudo. Nos linfonodos dos pacientes a expressão do PD-1 foi maior, tanto nas células TCD8+ como nas células TCD4+, quando comparadas com as células isoladas do sangue periférico. Em paralelo, investigaram como se comportaria a resposta proliferativa de células TCD4+ de indivíduos HIV+ estimuladas com Gag, com a adição do anticorpo anti-PDL-1, inibindo dessa forma a interação PD-1: PD-L1. Observaram que com esse bloqueio ocorre um aumento significativo na resposta proliferativa de células TCD4+ em 8 de 10 pacientes estudados. Walker et al., 2006 também demonstraram comportamento semelhante da molécula PD-1 tanto em relação ao aumento na expressão, como seu papel na resposta linfoproliferativade na população de células TCD8+ HIV específicas.

Na forma ativa da paracoccidioidomicose, as células mononucleares dos pacientes são expostas aos antígenos do fungo cronicamente, semelhante ao que ocorre em pacientes infectados pelo HIV. É importante ressaltar que a imunossupressão na PCM não parece ser regulada nem por CTLA4 nem por ICOS, porisso consideramos importante avaliar a ativação de PD-1 na anergia antígeno-específica dos pacientes.

Em nosso estudo também observamos que células mononucleares de pacientes com PCM ativa quando estimuladas com CMA e gp43, apresentavam maiores índices de expressão da molécula PD-1 quando comparados com células dos indivíduos controles. O bloqueio tanto dessa molécula como de seus ligantes, com os anticorpos anti-PD-1 ou com anti-PDL-1 e anti-PDL-2, não resultou no aumento da resposta linfoproliferativa das células de pacientes estimuladas com gp43, demonstrando assim que a via de sinalização mediada por PD-1 não estaria relacionada com a manutenção da hiporreatividade antígeno-especifica da PCM.

Brodskyn et al., 2001, demonstraram a importância das moléculas co-estimulatórias na superfície dos monócitos de pacientes com leishmaniose que, da mesma forma que na PCM, apresentam resposta antígeno-específica comprometida. Estes autores observaram que monócitos dos pacientes mantidos em cultura por 7 dias na presença ou ausência de antígeno de *L. major* têm aumento da expressão das moléculas CD86 e CD40. Observaram também um aumento da expressão de CD80, porém apenas após estímulo com antígeno de leishmania. Quando essas moléculas foram bloqueadas com o auxílio de anticorpos específicos, demonstrou-se diminuição na produção de citocinas importantes na ativação celular como IL-12, IL-5 e IFN-γ, reforçando a participação dessas moléculas na resposta imune dos pacientes com leishmaniose. Esses autores concluíram que a infecção pela *L. major* pode influenciar na expressão de algumas moléculas co-estimulatórias em macrófagos humanos na presença de células mononucleares totais, e observaram que CD86 e o CD40 têm um importante papel no início da ativação *in vitro* das células T humanas anti-leishmania.

Entretanto, nossas análises da expressão de CD80 e CD86 na superfície de células CD14+ não mostraram diferenças entre células de pacientes com PCM e controles curados. Porém, observamos aumento na porcentagem de células CD14+ expressando CD80 nos controles curados após exposição aos antígenos gp43 e CMA. Neste sentido, como a resposta antígeno-específica está preservada nesses indivíduos, este resultado pode ser interpretado como sendo um aumento de expressão compensatório, como regulação fisiológica de uma resposta imune em andamento, sem implicar necessariamente em imunossupressão.

Nos experimentos com a adição dos anticorpos bloqueadores anti-CD80 e anti-CD86 no dia zero da cultura, procuramos avaliar o comportamento dos monócitos tanto de pacientes como controles, uma vez que desse modo estaríamos bloqueando a interação destas moléculas presentes na superfície de células apresentadoras (monócitos) com seus potenciais ligantes. Nestes experimentos, o bloqueio de CD86 comprometeu significativamente a resposta linfoproliferativa, provavelmente pelo fato dessa molécula coestimulatória ser expressa constitutivamente pelas células CD14+, e participar da etapa inicial da resposta a antígenos, ou seja, na ativação e apresentação dos antígenos pelos monócitos tanto de pacientes como nos indivíduos controles. Com o bloqueio de CD80, não houve inibição da resposta à CMA, mas somente da resposta à

gp43 nos controles, sugerindo a participação desta molécula na apresentação antigênica somente da gp43. Portanto, diferentes antígenos parecem requerer diferentes vias de apresentação antigênica.

Modlin *et al.*, 1998 já haviam estudado a dependência da resposta proliferativa antígeno-específica em relação às moléculas coestimulatórias CD80 e CD86. Neste estudo, os autores mostraram que a resposta proliferativa de PBMC de pacientes tanto com a forma tuberculóide como com a forma virchowiana a antígeno de *M. leprae*, podia ser igualmente inibida pelo uso de anticorpos bloqueadores anti-CD80 e anti-CD86. Entretanto estes autores não investigaram a resposta proliferativa a outros antígenos nestes pacientes, com a finalidade de se determinar se este padrão de coestimulação era uma característica própria de pacientes portadores de hanseníase, ou, se uma característica intrínseca da resposta ao antígeno de *M. leprae*.

A expressão de CD80 e 86 em linfócitos, por outro lado, tem sido pouco explorada no contexto de doenças infecciosas, apesar de vários estudos terem demonstrado função de regulação negativa destas moléculas na resposta imune (ZHONG-WEN et al., 2005). A observação de que significativamente maior proporção dos linfócitos T de pacientes com PCM expressam a molécula CD80, quando analisados no 4º. dia de cultura, independentemente do estímulo, que a mesma sub-população em controles curados, nos leva a especular que as mesmas possam exercer função de regulação negativa na resposta a antígenos em nossos pacientes. Von Boehmer et al., 2005, sugere esta via alternativa (interação CTLA4-CD80/86 não dependente de célula T regulatória) como um importante mecanismo de regulação da resposta imune. Para tentarmos responder esta questão, realizamos experimentos adicionais com células de pacientes, adicionando anticorpos anti-CD80 e anti-CD86 a partir do 4º. dia de cultura, a partir do qual provavelmente os anticorpos poderiam inibir preferencialmente a interação eventualmente "imunossupressora" entre linfócitos ativados via B7:CTLA4. Essas moléculas poderiam estar interagindo umas com as outras, na superfície dos linfócitos ativados, inibindo a resposta das células mononucleares dos pacientes frente a gp43. Desta forma seria possível verificar um eventual papel regulatório de CD80 e CD86 para além da sua interferência na fase inicial da apresentação antigênica, como também na manutenção da resposta antigênica deficiente ao antígeno do fungo nos pacientes. Observamos que com a adição desses anticorpos não houve modificação no

comportamento da resposta proliferativa com CMA tanto nos pacientes como nos controles. Com gp43, a adição do anti-CD80 diminuiu ainda mais a reposta a gp43. Nos indivíduos controles, o acréscimo dos dois anticorpos levou à diminuição discreta, não significativa, da resposta.

Estes resultados sugerem que essas moléculas co-estimulatórias são importantes para a apresentação e manutenção das respostas antígeno-específicas tanto nas células de pacientes como nas células de controles. Porém, alteração na expressão (e sinalização por) destas moléculas não explicam, por si só, a manutenção da resposta proliferativa dos pacientes frente a gp43, pois o bloqueio da sinalização das mesmas não foi suficiente para reverter a anergia antígeno-específica.

Desta forma, tendo em vista que apesar do aumento da expressão CTLA-4, PD-1, ICOS, CD80 e CD86 e a adição de anticorpos bloqueadores dessas moléculas ou de seus ligantes não foi capaz de reverter essa hiporreatividade, sugerimos que essas moléculas não sejam responsáveis pela indução ou manutenção desta hiporreatividade, pelo menos *in vitro*. Uma hipótese para explicar a dificuldade encontrada em se mudar o comportamento *in vitro* das células dos pacientes é que estas já estariam possivelmente pré-ativadas *in vivo*, ou seja, estas células teriam sofrido um processo de tolerância adaptativa em que foram não só primadas, mas também expostas repetidas vezes a antígenos de *P. brasiliensis* presentes na circulação do paciente.

Neste sentido, vários trabalhos descreveram possíveis mecanismos que podem estar envolvidos na regulação da tolerância adaptativa em diferentes modelos e que podem contribuir para entendermos melhor o possível envolvimento desse mecanismo na paracoccidioidomicose.

Tanchot et al., 2001, descreveram um modelo transgênico (TCR/ Ag) em que células T antígenos específicas, na contínua presença de antígenos *in vivo*, exibem uma hiporesposta sendo que estas células sofrem uma expansão inicial seguida de uma subseqüente deleção. Este estado foi caracterizado pela redução em 85-95% na produção de todas as citocinas e uma importante falha na re-expressão das moléculas CD25 e CD69, com conseqüente inibição da resposta proliferativa aos antígenos. A adaptação à exposição crônica da população de células T aos antígenos circulantes não pareceu ser devido a mudanças na apresentação antigênica, e sim ao ambiente dessas

células no hospedeiro, porque a população de células T naïve que foi injetada no hospedeiro se adaptou e expandiu de forma normal.

Cuenca et al., analisaram como o sistema imune de indivíduos imunocompetentes deixa de reconhecer e se "defender" de tumores malignos sólidos, desta forma progredindo a doença para uma forma amplamente disseminada nesses hospedeiros. Pensava-se que esses tumores, por serem incapazes de expressar moléculas coestimulatórias, fariam com que não houvesse uma co-estimulação adequada das células pela ausência do segundo sinal, induzindo à tolerância imunológica. Esses autores demonstraram que, ao contrário, o crescimento extralinfático de tumores sólidos não é ignorado imunologicamente pelos órgãos linfóides. Verificou-se que inicialmente ocorre uma expansão clonal de células TCD4+ antígeno-específicas que são, porém, rapidamente induzidas à tolerância. Já neste modelo os autores sugerem que a apresentação de antígenos tumorais por células apresentadoras de antígenos derivadas da medula óssea representaria um mecanismo dominante na indução da tolerância de células TCD4+.

Nobuki et al., 2002, analisaram células Th1 de memória derivadas de camundongos transgênicos, com TCR especifico para peptídeos de citocromo *c*. Quando esses camundongos foram reestimulados in vivo com citocromo c no período entre 30-60 dias, as células transgênicas foram capazes de ativar-se expressando RNAm para IFN-γ e iniciar sua divisão. No entanto, 48hs após este reestímulo, a freqüência destas células foi progressivamente diminuindo, persistindo assim até 90 dias. As células que permaneceram "anérgicas" foram identificadas por não proliferarem e não produzirem IFN-γ em resposta a estimulo antigênico *in vitro*. Mesmo utilizando o adjuvante de Freund´s como reestímulo para as células, a diminuição dessa população foi mantida. Através destes experimentos, esses autores sugerem que o reestímulo antigênico de células TCD4 Th1 de memória obtidas de camundongos leva a uma importante diminuição da maior parte dessas células antígeno-especificas, ao invés do aumento da memória imunológica. No entanto os potenciais mecanismos dessa perda celular não foram investigados.

Andrews et al., 1997, descreveram que em camundongos com Aids murina (MAIDS), a partir da 8ª. semana da infecção, com a progressão da doença, a resposta de células TCD4+ para antígenos e mitógenos era suprimida. Os mecanismos de supressão foram investigados pela adição de fatores co estimulatórios (anticorpo anti-CD28 e citocina IL-12), com o objetivo de restaurar as funções celulares. Porém, essa estratégia foi eficiente apenas no estágio inicial da infecção (até quatro semanas), onde observaram um aumento da proliferação e da produção de citocinas. No estágio mais tardio, em que a "anergia" já está estabelecida, não houve restauração da resposta celular. Quando as células TCD4+ "parcialmente anérgicas" provenientes de camundongos timectomizados foram avaliadas após 4 semanas de infecção, mostraram que, diferentemente dos animais não-timectomizados, as células desses animais permaneciam com diminuição da proliferação e da produção de citocinas, indicando que apenas as células recentemente derivadas do timo, i.é, com pouca exposição a antígenos exógenos circulantes, podiam ser manipuladas *in vitro*.

Mais recentemente, alguns trabalhos vêm discutindo as diversas formas de indução da anergia observada em alguns estados biológicos, geralmente caracterizados pela incapacidade de produção de IL-2 e de sustentação da resposta proliferativa, e conseqüentemente da ativação celular. Chiodetti et al., 2006, compararam anergia clonal de células T com tolerância adaptativa *in vivo*. Segundo estes autores, anergia clonal representaria um crescimento interrompido, com diminuição na produção de certas citocinas (IL-2 e IL-3) em resposta a estimulação via TCR, e que não requereriam contato com antígeno para se manterem nesse estado, podendo ser revertido com o acréscimo de IL-2 *in vitro*. Já a tolerância adaptativa resultaria na diminuição de toda a produção de citocinas induzida via TCR e requer a presença persistente do antígeno circulante para sua manutenção. A adição da IL-2 nessas condições não restauraria a resposta celular.

Os mecanismos descritos acima por Chiodetti e pelos outros autores em diferentes modelos de "anergia" são compatíveis com o que observamos na PCM. As células T dos pacientes estão em contato constante com antígenos do fungo in vivo, possivelmente direcionando as células ao mecanismo de tolerância adaptativa. Nos

pacientes a manifestação da doença pode ocorrer depois de meses ou até anos após a infecção. Durante esse período, altos níveis de antígenos do *P. brasilienses*, incluindo a própria gp43, ficam circulantes no organismo do paciente, sendo que essa carga fúngica diminui muito (ou desaparece) após o tratamento. Essas células tornam-se então tolerantes, de acordo com as principais características mencionadas acima: diminuição da resposta proliferativa antígeno-especifica e diminuição da produção de IL-2 (e IFN-γ), citocinas importantes para a manutenção da resposta imunológica. Nossa observação poderia ser explicada pelo fato de que a adição de IL-2, com o intuito de reverter a resposta celular dos pacientes frente à gp43, não foi efetiva.

Nossa pergunta subseqüente foi tentar entender o mecanismo envolvido neste estado de tolerância. Propusemo-nos então analisar a expressão das moléculas Bcl-2 e caspase 8 e 9, envolvidas na apoptose, com a hipótese de que estas células tolerizadas estariam talvez direcionadas para morte celular.

Membros da família Bcl-2 estão aumentados em células T de memória e diminuídos em células T efetoras, implicando um importante papel dessas moléculas em modular a susceptibilidade das células para iniciar apoptose induzida por ativação (GRAYSON et al., 2000; KAECH et al., 2003). A variabilidade nos níveis de expressão das caspase pode contribuir para regular a susceptibilidade de distintos subgrupos de células T entrarem em apoptose. Laurent et al., 2004, demonstraram que o mRNA e níveis da proteína caspase 3 estão aumentados após a ativação via TCR em células T efetoras onde a morte é induzida por ativação, diferentemente das células T de memória. De fato vários estudos mostram que células T ativadas morrem durante respostas imunes por apoptose independentemente da presença de Fas-FasL, e que Bcl-2 estaria primordialmente envolvida neste processo. Estudos sobre a apoptose de linfócitos TCD4+ de pacientes HIV sugerem que o principal mecanismo de eliminação de células TCD4+ HIV-específicas se dá pela via mitocondrial, associada a baixos níveis de Bcl-2 intracelular, e não àquela relacionada a Fas-FasL (FENG YUN YUE et al., 2005).

No mesmo modelo de camundongos com MAIDS, referido anteriormente, Muralichar et al., 1996 observaram que as células TCD4 demonstraram baixos níveis de expressão da molécula Bcl-2 *ex vivo*. Quando essas células foram reestimuladas *in vitro*

com anti-CD3 mais PMA, os níveis da expressão de Bcl-2 foram ainda mais baixos. A adição *in vitro* de IL-2 em células TCD4 de camundongos infectados não levou ao aumento nos níveis de expressão da molécula Bcl-2, como também não inibiu a apoptose dessas células. Esses resultados indicam que células TCD4 de camundongos infectados seriam pré-programadas para entrar em apoptose, pois demonstraram que pelo menos um dos proto-oncogenes (Bcl-2) que agem contra a apoptose, está regulado de forma negativa dentro da população de células TCD4 desses camundongos já *ex vivo*. Estes resultados de Bcl-2 deste modelo de infecção são comparáveis aos observados em nosso estudo.

Mukherjee et al., 2006, demonstraram que, em modelo experimental de leishmaniose, linfócitos obtidos de linfonodos de camundongos infectados após 4 meses mantidos *in vitro* apresentaram níveis elevados de apoptose em células mantidas sem estímulos comparadas com células obtidas de camundongos normais. Os níveis de apoptose observados foram acompanhados de uma importante diminuição na expressão da molécula Bcl-2 e aumento da expressão de Bax em células mantidas nas mesmas condições comparando com células de camundongos não infectados. Após o tratamento *in vitro* com PMA e ionomicina, a razão Bcl-2/ Bax permaneceu baixa tanto em camundongos infectados quando comparados com camundongos não infectados. Durante a infecção crônica, a expressão de moléculas pro-apoptoticas (Bax, Bad, etc) e anti-apoptoticas (Bcl-2, Bcl-xl, etc) podem ser moduladas de forma diferente permitindo baixos níveis de apoptose em células T ativadas. Esses experimentos sugerem que as células de linfonodos de camundongos cronicamente infectados podem contribuir para o aumento da susceptibilidade desses animais a entrarem em apoptose em decorrência da exposição prolongada *in vivo* a antígenos do parasita.

Em nossos pacientes com paracoccidioidomicose também observamos que as células TCD3+ demonstraram baixos níveis de expressão *ex vivo* da molécula Bcl-2 quando comparadas com células de indivíduos controles. Quando essas células foram reestimuladas *in vitro* e analisadas após 4 dias de cultivo com gp43 e CMA ou até mesmo quando mantidas apenas com meio, os níveis da expressão de Bcl-2 foram mais baixos que quando analisadas pré-estímulo, enquanto células de indivíduos controles mantiveram níveis elevados de expressão dessa molécula.

O fenômeno de tolerância adaptativa pode ser utilizado para explicar também a hiporreatividade celular associada à PCM ativa. Com a exposição contínua *in vivo* a antígenos do fungo nos pacientes, e a diminuição progressiva da expressão da molécula Bcl-2, podemos sugerir que as células dos pacientes poderiam estar em um processo de ativação alterada, evidenciada pelo aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos de pacientes, tanto re-estimuladas como não re-estimuladas *in vitro*, que culminaria na indução de um processo de apoptose. Para melhor identificarmos se essa ativação *in vivo* estaria de fato direcionando as células para morte por apoptose, avaliamos a expressão de caspase 8 e 9.

A análise das caspases 8 e 9 na forma ativa foi então realizada com o intuito de verificar uma suposta diferença na expressão dessas moléculas entre células de pacientes e controles e também diferenciar se a apoptose de células T seria pela via intrínseca ou via extrínseca. A via intrínseca é caracterizada por falta de fatores de crescimento para sobrevivência das células no ambiente em que se encontram. Essa ausência de fatores levaria a ativação via mitocôndria de várias moléculas, Bcl-2, Bim, caspase 9 e por último a caspase 3. Pela via extrínseca a apoptose é induzida via Fas e ativa caspase 8, que por sua vez ativa caspase 3, sem que ocorra dano na mitocôndria (LOQUE SE et al., 2008).

A ativação das caspases no processo de apoptose em modelos de doenças infecciosas pode variar conforme o processo infeccioso. Por exemplo, Lopes et al., 2007, demonstraram que a apoptose de células TCD4+ de camundongos infectados com *T. cruzi* analisada após 14 dias de infecção ocorria via ativação de caspase 8, conseqüentemente dependente de Fas/ FasL. Já Jurak et al., 2006, analisaram o comportamento de células humanas *in vitro* infectadas com citomegalovirus murino após 48hs, e observaram que esse vírus provavelmente age inibindo a molécula Bcl-2, induzindo as células entrarem num processo de apoptose via intrínseca pela ativação da caspase 9. Quando a replicação viral foi inibida não observaram a ativação das caspases 9 e 3.

A análise de expressão das caspases 8 e 9 na forma ativa em células de pacientes com PCM foi realizada primeiramente em células mantidas em cultura por 4

dias com e sem estímulo antigênico. Nessa análise, observamos que tanto a expressão da caspase 8 como caspase 9 tendeu a ser maior (ainda que não significativamente), em células de controles estimuladas ou não, que em células de pacientes. Esses resultados foram surpreendentes, uma vez que o aumento da expressão de moléculas que estariam direcionando as células para apoptose era esperado em células de pacientes, que além de demonstrarem níveis diminuídos de Bcl-2 também demonstraram altos índices de apoptose, quando comparados com células de controle nas mesmas condições, estimuladas com gp43 (CACERE et al., 2003).

Para explicar este resultado sugerimos a hipótese de que as células dos pacientes poderiam estar entrando em apoptose num estágio mais inicial, antes do quarto dia. Por isso realizamos experimentos adicionais em que analisamos a expressão dessas caspases *ex vivo*. Com essa analise observamos que células TCD3+ de pacientes expressam altos níveis tanto de caspase 8 como caspase 9 comparados com células de controles. Esses resultados, apesar do número ainda pequeno de pacientes e controles analisados, podem explicar porque nos ensaios para a análise da resposta proliferativa de pacientes com acréscimo de anticorpos bloqueadores de moléculas coestimulatórias, não houve reconstituição da resposta especifica a gp43: células estariam "pré-ativadas" e "pré-programadas" para entrarem apoptose, e, portanto, refratárias a tratamentos *in vitro* (p. ex. IL-2 ou moléculas coestimulatórias).

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados sugerem que linfócitos dos pacientes estimulados com gp43, CMA e também células mantidas sem estímulos apresentam níveis elevados de expressão de moléculas co-estimulatórias, correlacionadas com a regulação negativa da resposta imune. No entanto, quando adicionamos os respectivos anticorpos bloqueadores com o objetivo de restaurar a resposta linfoproliferativa, o mesmo não ocorreu. Provavelmente esta observação deve-se ao fato dessas células já estarem previamente ativadas *in vivo* por exposição constante a antígenos do fungo, conseqüente à persistente antigenemia presente nesses pacientes, incluindo a gp43. Desse modo, as células de pacientes com doença ativa estariam submetidas a um processo de tolerância adaptativa, descrita em outros modelos de doenças infecciosas, mas principalmente de resposta imune a antígenos tumorais, ao qual se sucederia um processo de morte por apoptose induzida por essa ativação "anômala", como demonstrado pelo aumento *ex vivo* das caspases 8 e 9 e também pela diminuição da expressão da molécula Bcl-2.

REFERÊNCIAS

AGATA, Y.; KAWASAKI, A.; NISHIMURA, H.; ISHIDA, Y.; TSUBATA, T.; YAGITA, H.; HONJO, T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. **Int. Immunol.**, v. 8, n. 5, p. 765-72, 1996

AKBARI, O.; FREEMAN, G.J.; MEYER, E.H.; GREENFIELD, E.A.; CHANG, T.T.; SHARPE, A.H.; BERRY, G.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. **Nat. Med.**, v. 8, n. 9, p. 1024-32, 2002.

ALMEIDA, S.R.; MORAES, J.Z.; CAMARGO, Z.P.; GESZTESI, J.L.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Pattern of immune response to gp43 from Paracoccidioides brasiliensis in susceptible and resistant mice is influenced by antigen- presenting cells. **Cell. Immunol.,** v. 190, p. 68-76, 1998.

AZUMA, M.; ITO, D.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; PHILLIPS, J.H.; LANIER, L.L.; SOMOZA, C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. **Nature,** v. 366, n. 6450, p. 76-79, 1996.

BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETO, M.; COSTA, C.H.; COFFMAN, R.L.; JOHNSON, W.D.; CARVALHO, E.M. IL-12 restores Interferon gamma production and cytotoxic response in visceral Leismaniasis. **JID**, v. 173, p. 1515-1518, 1996.

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 form paracoccidioidomycosis. **Microbes Infect.**, v. 1, p. 273-278, 1999.

BASHUDA, H.; KIMIKAWA, M.; SEINO, K.; KATO, Y.; ONO, F.; SHIMIZU, A.; YAGITA, H.; TERAOKA, S.; OKUMURA, K. Renal Allograft Rejection Is Prevented By Adoptive Transfer Of Anergic T Cells In Nonhuman Primates. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 7, p. 1896-902, 2005.

BENARD, G.; HONG, M.A.; DEL NEGRO, G.M.B.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; DUARTE, A.J.S. Antigen specific immunosupression in Paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, p. 7-12, 1996.

BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E.T.; DUARTE, A.J.S. Immunosupression in Paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two Paracoccidioides brasiliensis glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **J. Infect. Dis.**, v. 175, p. 1263-7, 1997.

BENARD, G.; ROMANO, C.; CACERE, C.R.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S. Imbalance of IL-2, IFN-gama and IL-10 secretion in the immunosupression associated with human paracoccidioidomycosis. **Cytokine,** v. 13, p. 248-52, 2001.

BIRON, C.; GAZZINELLI, T. Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Curr. Biol.**, v. 7, p. 485-496, 1995.

BISELLI, P.J.; JUVENALE, M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.; BENARD, G. IgE antibody respomse to the main antigenic component of Paracoccidioides brasiliensis in patients with paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 475-478, 2001.

BLOTTA, M.H.S.; CAMARGO, Z.P. Immunological response to cell free antigens of Paracoccidioides brasiliensis: relantionship with the clinical forms os paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 671-675, 1993.

BONHAGEN, K.; LIESENFELD, O.; STADECKER, M.J.; HUTLOFF, A.; ERB, K.; COYLE, A.J.; LIPP, M.; KROCZEK, R.A.; KAMRADT, T. ICOS+ Th cells produce distinct cytokines in different mucosal immune responses. **Eur. J. Immunol.,** v. 33, n. 2, p. 392-401, 2003.

BOONEN, G.J.; VAN DIJK, A.M.; VERDONCK, L.F.; VAN LIER, R.A.; RIJKSEN, G.; MEDEMA, R.H. CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 3, p. 789-98, 1999.

BORKOW, G.; LENG, Q.; WEISMAN, Z.; STEIN, M.; GALAI, N.; KALINKOVICH, A.; BENTWICH, Z. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. **J. Clin. Investigat**., v. 106, p. 1053-60, 2000.

BOZZI, A.; REIS, B.S.; PRADO, F.L.S.; PEDROSO, E.P.; LEITE, M.F.; GOES, A.M. Modulation Of CD28 And CD86 Expression In Patients With Paracoccidioidomycosis In Different Periods Of Treatment. **Scand. J. Immunol.,** v.60, p. 500-505, 2004.

BRENNAN, P.; BABBAGE, J.W.; BURGERING, B.M.; GRONER, B.; REIF, K.; CANTRELL, D.A. Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. **Immunity**, v. 7, n. 5, p. 679-89, 1997.

BRODSKYN, C.I.; DEKREY, G.H.; TITUS, R.G. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 665-672, 2001.

CACERE, C.R.; ROMANO, C.C.; MENDES GIANNINI, M.J.; DUARTE, A.J.; BENARD G. The Role Of Apoptosis In The Antigen-Specific T Cell Hyporesponsiveness Of Paracoccidioidomycosis Patients. **Clin. Immunol.,** v. 105, n. 2, p. 215-22, 2003.

CALICH, V.L.G.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of Paracoccidioides brasiliensis infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 615-623,1998.

CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L.R. The use of cell-free-antigen of Paracoccidioides brasiliensis in serological tests. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 31-8, 1991.

CAMPANELLI, A.P.; MARTINS, G.A.; SOUTO, J.P.; MARTINEZ, R.; SILVA, J.S. Possible Involvement Of Fas-Induced Apoptosis And CTLA-4 Engagement In The Hypo-Responsiveness Induced By *Paracoccidioides Brasiliensis* Infection. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1496-1505, 2003.

CANTRELL, D.A.; SMITH, K.A. The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. **Infect. Immun**., v. 69, n. 10, p. 6022-9, 2001.

CARBONELL, L.M. Ultrastructure of dimorphic transformation in Paracoccidioides brasiliensis. **J. Bacteriol.**, v. 100, p. 1076-8, 1969.

CARNEIRO-SANTOS, P.; MARTINS-FILHO, O.; ALVES-OLIVEIRA, L.F.; SILVEIRA, M.A.S.; COURA-FILHO, P.; VIANA, I.R.C.; WILSON, R.A.; CORREA-OLIVEIRA, R. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. **Parasite Immunol.,** v. 22, p. 267-77, 2000.

CARTER, L. et al. PD-1: PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. **Eur. J. Immunol.**, v.32, p. 634-643, 2002.

CHEHIMI, J. et al. Impaired interleukin 12 production in human imunodeficieny vurus-infected patients. **J. Exp. Med.**, v. 179, p 1361-66, 1994.

CHEMNITZ, J.M.; PARRY, R.V.; NICHOLS, K.E.; JUNE, C.H.; RILEY. J.L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. **J. Immunol.,** v. 15, n.173, p. 945-54, 2004.

CHEN, L.; WANG, S. Co-signaling molecules of the B7 – CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocytes response. **Microbes .infect.**, v. 6, p. 759-766, 2004.

CHIODETTI, L.; CHOI, S.; BARBER, D.L.; SCHWARTZ, R.H. Adaptive tolerance and clonal anergy are distinct biochemical states. **J. Immunol**., v. 176, n. 4, p. 2279-91, 2006.

COHEN, S.B.A.; CRAWLEY, J.B.; KAHAN, M. C.; FELDMANN, M.; FOXWELL, B. M. J. Interleukin-10 rescue T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. **Immunology,** v. 92, p. 1-5, 1997.

COLOMBETTI, S.; BENIGNI, F.; BASSO, V.; MONDINO, A. Clonal anergy is maintained independently of T cell proliferation. **J. Immunol.,** v. 169, n. 11, p. 6178-86, 2002.

CUENCA, A.; CHENG, F.; WANG, H.; BRAYER, J.; HORNA, P.; GU, L.; BIEN, H.; BORRELLO, I.M.; LEVITSKY, H.I.; SOTOMAYOR, E.M. Extra-Lymphatic Solid Tumor Growth Is Not Immunologically Ignored And Results In Early Induction Of

Antigen-Specific T-Cell Anergy: Dominant Role Of Cross-Tolerance To Tumor Antigens. **Cancer Res.,** v. 15, n. 63, p. 9007-15, 2003.

DAFTARIAN, M.P.; DIAZ-MITOMA, F.; CREERY, W.D.; CAMERON, W.; KUMAR, A. Dysregulated production of interleukin – 10 (IL-10) and IL-12 by peripheral blood lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals is associated with altered proliferative response to recall antigens. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 2, n. 6, p. 712- 18, 1995.

DAY, C.L.; KAUFMANN, D.E.; KIEPIELA, P.; BROWN, J.A.; MOODLEY, E.S.; REDDY, S.; MACKEY, E.W.; MILLER, J.D.; LESLIE, A.J.; DEPIERRES, C.; MNCUBE, Z.; DURAISWAMY, J.; ZHU, B.; EICHBAUM, Q.; ALTFELD, M.; WHERRY, E.J.; COOVADIA, H.M.; GOULDER, P.J.; KLENERMAN, P.; AHMED, R.; FREEMAN, G.J.; WALKER, B.D. PD-1 Expression On HIV-Specific T Cells Is Associated With T-Cell Exhaustion And Disease Progression. **Nature**, v. 21, n. 443, p. 350-4, 2006.

DINIZ, S.N.; CISALPINO, P.S.; FREIRE, A.T.; SILVA-TEIXEIRA, D.N.; CONTIGLI, C.; RODRIGUES, J.V.; GOES, A.M. In vitro granuloma formation, NO production and cytokine profile from human mononuclear cells induced by frationated antigens of Paracoccidioides brasiliensis. **Hum. Immunol.**, v. 62, p. 799-808, 2001.

DONG, H.; ZHU, G.; TAMADA, K.; CHEN, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. **Nat Med.,** v. 5, n. 12, p. 1365-9, 1999.

D'SOUZA, M.; FONTENOT, A.P.; MACK, D.G.; LOZUPONE; C.; DILLON, S.; MEDITZ, A.; WILSON, C.C.; CONNICK, E.; PALMER, B.E. Programmed Death 1 Expression On HIV-Specific CD4+ T Cells Is Driven By Viral Replication And Associated With T Cell Dysfunction. **J. Immunol**., v. 179, n. 3, p. 1979-87, 2007.

DUBEY, C.; CROFT, M.; SWAIN, S.L. Costimulatory requeriment of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are requered for optimum response. **J. Immunol.**, v.155, p. 45-57, 1995.

ELLOSO, M. M.; SCOTT, P. Differential requeriment of CD28 for IL-12 receptor expression and function in CD4+ and CD8+ T cells. Evidence against a role for costimulatory molecules in the antigen-specific Th-1 type anergy of paracoccidioidomycosis patients. **Eur. J. Immunol.**, v.31, p. 384-95, 2001.

FENG YUN YUE et al. Preferential apoptosis of HIV-1 specific CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v. 174, p. 2196-2204, 2005.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Micol**., v. 38, p. 185-91, 2000.

FRANCO, M.F. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.,** v. 25, p. 548, 1987.

FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZZALLAH-WASSO, M.; MONTENEGRO, M.R.; London, Bailliere's. Paracoccidioidomycosis. **Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, p. 18-196, 1989.

FRAUWIRTH, K.A.; THOMPSON, C.B. Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. **J. Clin. Invest.**, v. 109, p. 295-299, 2002.

FREEMAN, G.J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitoryreceptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lynphocyte activation. **J. Exp. Med.**, v.192, p. 1027-1034, 2000.

FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. The B-7 – CD28 Superfamily. **Nat. Rev.**, v.2, p.116-126, 2002.

GAVIN M.A.; CLARKE S.R.; NEGROU E.G.; RUDENSKY A. Homeostasis and anergy of CD4+CD25+ suppressor T cells in vivo. **Nat. Immunol.,** v. 3, p. 33-41, 2002.

GHALIB, H.W.; WHITTLE, J.; KUBIN, M.; HASHIM, F.; EL-HASSAN, M.; GRABSTEIN, K.H.; TRINCHIERI, G. and REED, S.G. IL-12 enhances TH-1 type responses in human Leishmania donovani infections. **J. Immunol.,** v. 154, p. 4623-29, 1995.

GONG JH, ZHANG M, MODLIN RL, LINSLEY PS, IYER D, LIN Y, BARNES PF. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. **Infect Immun.**; v. 64, p. 913-8, 1996.

GRAYSON, J.M.; ZAJAC, A.J.; ALTMAN, J.D.; AHMED, R. Increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cell. **J. Immunol.**, v. 164, p. 3950, 2000.

GREENWALD, R.J.; FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. The B7 Family Revisited. **Annu. Rev. Immunol.,** v. 23, p. 515-48, 2005.

GUEZELE, E. Aislamiento de Paracoccidioides sp. De heces de pinguino de la Antártida, res. B2. In: ENCUENTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 4., 1989, Caracas. **Resúmenes…** Caracas, 1989.

HÖLLSBERG, P.; SCHOLZ, C.; ANDERSON, D.E.; GREENFIELD, E.A.; KUCHROO, V.K.; FREEMAN, G.J.; HAFLER, D.A. Expression Of A Hypoglycosylated Form Of CD86 (B7-2) On Human T Cells With Altered Binding Properties To CD28 And CTLA-4. **J. Immunol.,** v. 15, n. 159, p. 4799-805, 1997.

HUTLOFF, A.; DITTRICH, A.M.; BEIER, K.C.; ELJASCHEWITSCH, B.; KRAFT, R.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; KROCZEK, R.A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. **Nature**, v. 21, n. 397, p. 263-6, 1999.

INOBE, M.; SCHWARTZ, R.H. CTLA-4 Engagement Acts As A Brake On CD4+ T Cell Proliferation And Cytokine Production But Is Not Required For Tuning T Cell Reactivity In Adaptive Tolerance. **J. Immunol.,** v. 15, n. 173, p. 7239-48, 2004.

ISHIDA, M.; IWAI, Y.; TANAKA, Y.; OKAZAKI, T.; FREEMAN, G.J.; MINATO, N.; HONJO, T. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. **Immunol. Lett.,** v. 21, n. 84, p. 57-62, 2002.

IWAI, Y.; TERAWAKI, S.; IKEGAWA, M.; OKAZAKI, T.; HONJO, T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. **J. Exp. Med.**, v. 7, n. 198, p. 39-50, 2003.

JENKINS, M.K.; CHEN, C.A.; JUNG, G.; MUELLER, D.L.; SCHWARTZ, R.H. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. **J. Immunol.,** v. 1, n. 144, p. 16-22, 1990.

JENKINS, M.K.; SCHWARTZ, R.H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 165, n. 2, 302-19, 1987.

JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G.M.; DUARTE, A.J., BENARD, G. Antibody isotypes to a *Paracoccidioides brasiliensis* somatic antigen in sub-acute and chronic form paracoccidioidomycosis. **J. Med. Microbiol.,** v. 50, p. 127-34, 2001.

KAECH S.M. et al. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cell that give rise to long-lived memory cells. **Nat. Immunol.,** v. 4: 1191, 2003.

KARHAWI, A.S.K.; COLOMBO, A.L.; SALOMÃO, R. Production of IFNγ is impaired in patients with paracoccidioidomycosis during active disease and is restored after clinical remission. **Med. Micol.,** v. 38, p. 225-29, 2000.

KIRMAN, J. et al. CTLA-4 blockade enhances the immune response induced by mycobacterial infection but does not lead to increased protection. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 67, p. 3786-792, 1999.

KREISEL, D.; SANKARAN, D.; WELLS, A.D.; TURKA, L.A. Interleukin-2-mediated survival and proliferative signals are uncoupled in T lymphocytes that fail to divide after activation. **Am. J. Transplant.**, v. 2, n. 2, p. 120-8, 2002.

LACAZ, CS. Historical evolution of the knowledge on paracoccidiodomycosis and its etiologoc agent, Paracoccidioides brasiliensis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S; RESTREPO-MORENO, A.; DEL-NEGRO, G. (Ed.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: S.l.p., 1994. p. 1-11.

LATCHAN, Y. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat. Immunol.***,* v.2, p. 261-268, 2001.

LATCHMAN, Y.E.; LIANG, S.C.; WU, Y.; CHERNOVA, T.; SOBEL, R.A.; KLEMM, M.; KUCHROO, V.K.; FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,** v. 20, n. 101, p. 10691-6, 2004.

LAURENT, S. et al. The selective increase in caspase-3 expression in effector but not memory T cells allows susceptibility to apoptosis. **J. Immunol.**, v. 173, p. 5425-5433, 2004.

LECHNER, O. et al. Fingerprints of anergic T cells. **Curr. Biol.**, v. 11, p. 587-595, 2001.

LENARDO, M.; CHAN, F.K.M.; HORNUNG, F.; McFARLAND, H.; SIEGEL, R.; WANG J.; ZHENG, L. Mature T lymphocyte apoptosis-Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. **Rev. Immunol.**, v. 17, p. 221-53, 1999.

LIANG, S.C.; LATCHMAN, Y.E.; BUHLMANN, J.E.; TOMCZAK, M.F.; HORWITZ, B.H.; FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. **Eur. J. Immunol.,** v. 33, p. 2706-16, 2003.

LIBRATY, D.H.; AIRAN, L.E.; UEMURA, K.; JULLIEN, D.; SPELLBERG, B.; REA, T.H.; MODLIN, R.L. Interferon gama differentially regulates Interleukin 12 and Interleukin 10 production in Leprosy. **J. Clin. Invest.,** v.99, p. 336-41, 1997.

LIU, M.F.; LI, J.S.; WENG, T.H.; LEI, H.Y. Differential expression and modulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes from patients with Sistemic Lupus Erythematosus. **J. Immunol.,** v.49, p. 82-87, 1999.

LOGUE, S.E.; MARTIN, S.J. Caspase activation cascades in apoptosis. **Biochem. Soc. Trans**., v. 36, p. 1-9, 2008.

LÖHNING, M.; HUTLOFF, A.; KALLINICH, T.; MAGES, H.W.; BONHAGEN, K.; RADBRUCH, A.; HAMELMANN, E.; KROCZEK, R.A. Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. **J. Exp. Med., v.** 20, n. 197, p. 181-93, 2003.

LU, P., ZHOU, X.D.; CHEN, S.J.; MOORMAN, M.; MORRIS, S.C.; FINKELMAN, F.D.; LINSLEY, P.; URBAN, J.F.; GAUSE,W.C. CTLA-4 ligands are requerid to induce na in vivo interleukin 4 response to a gastrointestinal nematode parasite. **J. Exp. Med.**, v.180, p. 693-98, 1994.

MADLUM, E. **Caracterização da função da IL-12 na Paracoccidioidomicose pulmonar experimental**. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MALAQUIAS, L.C.C.; FALCÃO, P.L.; SILVEIRA, M.A.S.; GAZZINELLI, G.; PRATA, A.; COFFMAN, R.L.; PIZZIOLO, V.; SOUZA, C.P.; COLLEY, D.G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Cytokine regulation of human immune response to Schistosoma mansoni: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scand. J. Immunol.,** v.46, p. 393- 98, 1997.

MALEK, T.R.; YU, A.; SCIBELLI, P.; LICHTENHELD, M.G.; CODIAS, E.K. Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and

functional maturation of antigen-activated T cells. **J. Immunol.,** v. 166, n. 3, p. 1675-83, 2001.

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

MARTH , T.; ZEITZ, M.; LUDVIKSSON, B.R.; STROBER, W.; KELSALL, B.L. Extinction of IL-12 signaling promotes Fas-Mediated apoptosis of antigen-specific T cells. **J. Immun.**, v. 162, p. 7233-40, 1999.

MARTH, T.; STROBER, W.; KELSALL, B.L. High dose oral tolerance in ovalbumina TCR-transgenic mice. Systemic neutralization of IL-12 augments TGF-β secretion and T cell apoptosis. **J. Immun.**, v.157, p. 2348-57, 1996.

MCADAM, A.J.; CHANG, T.T.; LUMELSKY, A.E.; GREENFIELD, E.A.; BOUSSIOTIS, V.A.; DUKE-COHAN, J.S.; CHERNOVA, T.; MALENKOVICH, N.; JABS, C.; KUCHROO, V.K.; LING, V.; COLLINS, M.; SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. **J; Immunol.,** v. 165, p. 5035-40, 2000.

McGAHA, T.; MURPHY, J.W. CTLA-4 down-regulates the protective anticryptococcal cell-mediated immune response. **Infect. Immun.,** v. 68, p. 4624-30, 2000.

MELLO, L.M.; SILVA-VERGARA, M.L.; RODRIGUES, J.V. Patients with active infection with Paracoccidioides brasiliensis present a Th2 immune response characterized by high interleukin-4 and interleukin-5 production. **Hum. Immunol.,** v. 63, p. 149-54, 2002.

MENDES-GIANNINI, M.J.S. et al. Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 43, p.200-206, 1990.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; MORAES, R.A.; RICCI, T.A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 32, p. 385, 1990.

MERLO, A.; SAVERINO, D.; TENCA, C.; GROSSI, C.E.; BRUNO, S.; CICCONE, E. CD85/LIR-1/ILT2 And CD152 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4) Inhibitory Molecules Down-Regulate The Cytolytic Activity Of Human CD4+ T-Cell Clones Specific For Mycobacterium Tuberculosis. Infect Immun. V. 69, p. 6022-9, 2001.

MIYAHIRA, Y.; AKIBA, H.; OGAWA, S.H.; ISHI, T.; WATANABE, S.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T.; AOKI, T.; TEZUKA, K.; ABE, R.; OKUMURA, K.; YAGITA, H.; WATANABE N. Involvement of ICOS-B7RP-1 costimulatory pathway in the regulation of immune responses to Leishmania major and Nippostrongylus brasiliensis infections. **Immunol. Lett.,** v. 31, n. 89, p. 193-9, 2003.

MOK, P.W.V.; GREER, D.L. Cell mediated immune responses in patients with paracoccidioidomycosis. **Clin. Exp. Immunol.,** v. 28, p. 89-92, 1977.

MOLLOY, A.; LAOCHUMROONVORAPONG, P.; KAPLAN, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. **J. Exp. Med.,** v. 180, p. 1499-509, 1994.

MONARI, C.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A.; PERICOLINI, E.; PIETRELLA, D., KOZEL, T.R.; VECCHIARELLI, A. Glucuronoxylomannan, A Microbial Compound, Regulates Expression Of Costimulatory Molecules And Production Of Cytokines In Macrophages. **J. Infect. Dis.**, v. 191, p. 127-37, 2004.

MORTON, P.A.; FU, X.T.; STEWART, J.A.; GIACOLETTO, K.S.; WHITE, S.L.; LEYSATH, C.E.; EVANS, R.J.; SHIEH, J.J.; KARR, RW.J. Differential Effects Of CTLA-4 Substitutions On The Binding Of Human CD80 (B7-1) And CD86 (B7-2). **Immunology,** v. 156, p. 1047-54, 1996.

MOTA, N.G.S. et al. Correlation between mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Trans. Royal. Med. Hyg.,** v.79, p.765-72, 1985.

MUKHERJEE, P.; SEN, P.C.; GHOSE, A.C. Lymph node cells from BALB/c mice with chronic visceral leishmaniasis exhibiting cellular anergy and apoptosis: involvement of Ser/Thr phosphatase. **Apoptosis,** v. 11, p. 2013-29, 2006.

MURALIDHAR, G.; KOCH, S.; BROOME, H.E.; SWAIN, S.L. TCR triggering of anergic CD4 T cells in murine AIDS induces apoptosis rather than cytokine synthesis and proliferation. **J. Immunol.**, v. 15, p. 157, p. 625-35, 1996.

MURPHY, M.L.; COTTERELL, S.E.; GORAK, P.M.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. Blockade Of CTLA-4 Enhances Host Resistance To The Intracellular Pathogen, Leishmania Donovani. **J. Immunol.**, v. 15, n. 161, p. 4153-60, 1998.

MURRAY, H.W.; HAUPRASHAD, J. Interleukin 12 is effective treatment for in established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.,** v. 181, p. 387-91, 1995.

MUSSATTI, C.; REZKALLAH, M.T.; MENDES, E.; MENDES, N.F. In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in pacients with paracoccidioidomycosis. **Cell Immunol.**, v. 24, p. 365-78, 1985.

NAGASAWA, T.; KOBAYASHI, H.; ARAMAKI, M.; KIJI, S.O.; IZUMI, Y. Expression of CD14, CD16 and CD45 RA on monocytes from periodontitis patients. **J. Periodont. Res**., v. 39, p. 72- 78, 2004.

NICHOLSON, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ.**, 1999.

NISHIMURA, H.; HONJO, T.; MINATO, N. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. **J. Exp. Med.,** v. 6, n. 191, p. 891-8, 2000.

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

PALMER, E. M.; FARROKH-SIAR, L.; SEVENTER, J. M.; SEVENTER, G. A. IL-12 decreases activation-induced cell death in human naive Th cells costimulated by intercellular adhesion molecule-1. I. IL-12 alters caspases processing and inhibits enzyme function. **J. Immunol.,** v. 167, p. 749-58, 2001.

PAUST S, LU L, MCCARTY N, CANTOR H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 13, n. 101, p. 10398-403, 2004.

PLANELLES. L.; THOMAS, M.C.; MARAÑÓN, C.; MORELL, M.; LÓPEZ, M.C. Differential CD86 And CD40 Co-Stimulatory Molecules And Cytokine Expression Pattern Induced By Trypanosoma Cruzi In Apcs From Resistant Or Susceptible Mice. **Clin. Exp. Immunol**., v. 131, p. 41-7, 2003.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L.R. 43 kilodalton glycoprotein from Paracoccidioides brasiliensis : Immunochemical reactions with sera from pacients with paracoccidioidomycosis ,histoplasmosis or Jorge Lobo's disease. **J. Clin. Microbiol.,** v. 29, p.1610, 1991.

RESTREPO, A. The ecology of Paracoccidioides brasiliensis. Apuzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323, 1985.

ROILIDES, E.; DIMITRIADOU, A.; KADILTSOGLOU, I.; SEIN, T.; KARPOUZAS, J.; PIZZO, P.A.; WALSH, T.J. IL-10 exerts supressive and enhancing effects aon antifungal activity of mononuclear phagocytes against Aspergillus fumigatus**. J. Immunol.,** v. 158, p. 322-29, 1997.

ROMANO, C. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; DUARTE, A. J. S.; BENARD, G. IL-12 and neutralization of endogenous IL-10 revert the in vitro antigen-specific cellular immunosuppression of paracoccidioidomycosis patients. **Cytokine,** 2002. In press.

SALAMA, A.D. et al. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimune encephalomyelitis. **J. Exp. Med.,** v.198, p. 71-78, 2003.

SCHLIENGER, K.; UYEMURA, K.; JULLIEN, D.; SIELING, P.A.; REA, T.H.; LINSLEY, P.S.; MODLIN, R.L. B7-1, But Not CD28, Is Crucial For The Maintenance Of The CD4+ T Cell Responses In Human Leprosy. **J. Immunol.,** v. 161, p. 2407-13, 1998.

SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J. The B7-CD28 superfamily. **Nat. Rev. Immunol**., v. 2, p. 116-26, 2002.

SHARPE, A.H.; WHERRY, E.J.; AHMED, R.; FREEMAN, G.J. The Function Of Programmed Cell Death 1 And Its Ligands In Regulating Autoimmunity And Infection. **Nat. Immunol**., v. 8, p. 239-45, 2007.

SIELING, P. et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in Human infectious disease. **J. Immunol.,** v. 153, p. 3639-47, 1994.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.B.; MAFFEI, C.M.L.; CHADU, J.B. Isolation of Paracoccidioides brasiliensis from armadillos (Dasypus novemcinctus) in na area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.,** v. 38, p. 193-99, 2000.

SOARES, A. M.; CALVI, S. A.; PERACOLI, M. T.; FERNANDEZ, A. C.; DIAS, L. A.; DOS ANJOS, A. R. Modulatory effect of prostaglandins on human monocyte activation for killing of high- and low-virulence strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Immunology,** v.102, p. 480-85, 2001.

SOBOSLAY, P.T.; LUDER, C.G.K.; RIESCH, S.; GEIGER, S.M.; BANLA, M.; BATCHASSI, E.; STADLER, A.; SCHULZ-KEY, H. Regulatory effects of TH1- type (IFNγ, IL-12) and TH2 type cytokines (IL-10, IL-13) on parasite specific cellular responsiveness in Onchocerca volvulus infected humans and exposed endemic controls. **Immunology,** v. 97, p. 219-25, 1999.

SOTOMAYOR, E.M.; BORRELLO, I.; TUBB, E.; ALLISON, J.P.; LEVITSKY, H.I. In Vivo Blockade Of CTLA-4 Enhances The Priming Of Responsive T Cells But Fails To Prevent The Induction Of Tumor Antigen-Specific Tolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 28, n. 96, p. 11476-81, 1999.

STEEL, C.; NUTMAN, T.B. CTLA-4 In Filarial Infections: Implications For A Role In Diminished T Cell Reactivity. **J. Immunol.**, v. 15, n. 170, p. 1930-8, 2003.

SWAIN, S.L.; HU, H.; HUSTON, G. Class II – independent generation of CD4 memory T cells from effecors. **Science,** v. 286, p. 1381-83, 1999.

SWANSON, J.A.; BAER, S.C. Phagocytosis by zyppers and triggers. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 89-93, 1995.

SYPEK, J.P. et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper 1 immune response. **J. Exp. Med.,** v. 177, p.1797, 1993.

TABORDA, C.P.; JULIANO, M.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L.R. Mapping of the Tcell epitope in the major 43-kilodalton glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis which induces a Th-1 response protective against fungal infection in Balb/c mice. **Infect. Immun.,** v. 66, p. 786-93, 1998.

TAMURA, H.; DONG, H.; ZHU, G.; SICA, G.L.; FLIES, D.B.; TAMADA, K.; CHEN, L. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. **Blood,** v. 15, n. 97, p. 1809-16, 2001

TANCHOT, C.; BARBER, D.L.; CHIODETTI, L.; SCHWARTZ, R.H. Adaptive Tolerance Of CD4+ T Cells In Vivo: Multiple Thresholds In Response To A Constant Level Of Antigen Presentation. **J. Immunol.**, v. 15, n. 167, p. 2030-9, 2001.

TAYLOR, P.A.; LEES, C.J.; FOURNIER, S.; ALLISON, J.P.; SHARPE, A.H.; BLAZAR, B.R. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions. **J. Immunol.**, v. 15, n.172, 2004.

TOURE-BALDE, A.; SARTHOU, J. L.; ARIBOT, G.; MICHEL, P.; TRAPE, J.F.; ROGIER, C.; ROUSSILHON, C. Plasmodium falciparum induces apoptosis in human mononuclear cells. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 744-750, 1995.

TRAUTMANN, L.; JANBAZIAN, L.; CHOMONT, N.; SAID, E.A.; GIMMIG, S.; BESSETTE, B.; BOULASSEL, M.R.; DELWART, E.; SEPULVEDA, H.; BALDERAS, R.S.; ROUTY, J.P.; HADDAD, E.K.; SEKALY, R.P. Upregulation Of PD-1 Expression On HIV-Specific CD8+ T Cells Leads To Reversible Immune Dysfunction. **Nat. Med.**, v. 12, p. 1198-202, 2006.

TRIPATHI, T; HILDEMAN, D. Sensitization of T cells to apoptosis. **Apoptosis**, v. 9, p. 515-523, 2004.

TSENG, S.Y.; OTSUJI, M.; GORSKI, K.; HUANG, X.; SLANSKY, J.E.; PAI, S.I.; SHALABI, A.; SHIN, T.; PARDOLL, D.M.; TSUCHIYA, H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. **J. Exp. Med.**, v. 2, p. 839-46, 2001.

USHERWOOD, E.J.; CROWTHER, G.; WOODLAND, D.L. Apoptotic cells are generated at every division of in vitro cultured T cell lines. **Cell. Immunol.**, v.196, p. 131-137, 1999.

VAHLENKAMP, T.W.; BULL, M.E.,; DOW J.L.; COLLISSON, E.W.; WINSLOW, B.J.; PHADKE, A.P.; TOMPKINS, W.A.; TOMPKINS, M.B. B7+CTLA4+ T Cells Engage In T-T Cell Interactions That Mediate Apoptosis: A Model For Lentivirus-Induced T Cell Depletion. **Vet. Immunol. Immunopathol**., v. 98, p. 203-14, 2004.

MORAES-VASCONCELOS, D.; ORII, N. M.; ROMANO, C. C.; IQUEOKA, R. Y.; DUARTE,A. J. S. Characterization of the cellular immune function of patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Clin. Exp. Immunol**., v. 123, p. 247-253, 2001.

VILLEGAS, E.N.; LIEBERMAN, L.A.; MASON, N.; BLASS, S.L.; ZEDIAK, V.P.; PEACH, R.; HORAN, T.; YOSHINAGA, S.; HUNTER, C.A. A role for inducible costimulator protein in the CD28- independent mechanism of resistance to Toxoplasma gondii. **J. Immunol.,** v. 169, p. 937-943, 2002.

VON BOEHMER, H. Mechanisms Of Suppression By Suppressor T Cells. **Nat. Immunol**., v. 6, p. 338-44, 2005. Review.

WATANABE-FUKUNAGA, R; BRANNAN, C.I.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; NAGATA, S. Related Articles, OMIM, Protein Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. **Nature**, v. 356, p. 314-317, 1992.

WIENDL, H.; MITSDOERFFER, M.; SCHNEIDER, D.; MELMS, A.; LOCHMULLER, H.; HOHLFELD, R.; WELLER, M. Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies. **Brain**, v.126, p. 1026-35, 2003.

WIERENGA, E.A. et al. ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: Increased ICOS expression enhances the effector function of both Th-1 and Th-2 cells. **J. Immunol.***,* v.173, p. 1779-1786, 2004.

YARZABAL, L.A; BOUT, D.; NAQUIRA, F., FRUIT, J.; ANDRIEU, S. Identification and purification of the specific antigen of Paracoccidioides brasiliensis responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia,** v. 15, p. 79-85, 1977.

ZHANG, M.; LIN, Y.; IYER, D.V.; GONG, J.; ABRAMS, J.S.; BARNES, P.F. T cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. **Infect. Immun.,** v. 63, p. 3231-34, 1995.

ZHENG, Y.; SANSOM, D.M.; MANZOTTI, C.N. What's the diference between CD80 qnd CD86? **TRENDS Immunol**., v. 24, p. 313-318, 2003.

ZHONG-WEN, S. et al. Time courses of B7 family molecules expressed on activated T-cells and their biological significance. **Cell. Immun**., 2005.

BELGE KU, DAYYANI F, HORELT A, SIEDLAR M, FRANKENBERGER M, FRANKENBERGER B, ESPEVIK T, ZIEGLER-HEITBROCK L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **J. Immunol.**, v. 168, p. 3536- 42, 2002.

ZOU, H.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, X. An APAF-1 cytocrome *c* multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. **J. Biol. Chem**., v. 274, p. 11549, 1999.