

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 memoriam*), 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 Paracoccidiodomicose.

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 compartilhado 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 compartilharam 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 paracoccidiodomicose. 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 paracoccidiodomicose 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 4º dia da cultura não modificou a resposta linfoproliferativa 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 paracoccidiodomicose, 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 específica 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: Paracoccidiodomicose, 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 hyporesponsiveness are not well known. We have previously demonstrated that patients' mononuclear cells in presence of gp43 exhibit enhanced apoptotic levels. In an attempt to explain such findings, we hypothesized 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 that the expression of CD28 was comparable between patients and 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 day 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* restimulated 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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

