



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE MEDICINA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**PARTICIPAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T
NA LESÃO GRANULOMATOSA**

THAÍS ALVES DA COSTA LAMOUNIER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

**BRASÍLIA
2007**

**PARTICIPAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T
NA LESÃO GRANULOMATOSA**

THAÍS ALVES DA COSTA LAMOUNIER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina,
Universidade de Brasília, para obtenção do título de
Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora:
Prof. Dra. ANAMÉLIA LORENZETTI BOCCA

BRASÍLIA
2007

DEDICATÓRIA

A Deus, meu guia, meu companheiro, meu conforto, pela força para realização deste trabalho.

Ao meu pai José Afonso, meu mestre e ídolo e a minha mãe Marlene, minha heroína. Agradeço a vocês por minha formação e ensinamentos constantes, que através do amor me fizeram acreditar que tudo é possível quando acreditamos na vitória.

Ao meu marido Wislon, pela paciência e companheirismo em todas as jornadas, principalmente para mais essa conquista.

Ao meu amado sobrinho Caio Alexandre, pelo simples fato de ter nascido e fazer parte da minha vida.

Dedico a todos este meu trabalho com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca, pela oportunidade, ensinamentos e conhecimentos compartilhados e principalmente pela imensa admiração que sinto pelo seu trabalho e competência.

A Dra. Fabiana Pirani, pela ajuda, dedicação e torcida para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

A Viviane Monteiro e Mauracilene S. Moreira, pelo carisma, cordialidade e fundamentais contribuições.

Aos amigos João Marcelo e Márcia, pela disponibilidade e imprescindível ajuda.

Ao Laboratório LIB, pelo fornecimento das biópsias necessárias e financiamento das imuno-histoquímicas, bem como toda presteza dispensada.

Ao Laboratório de Anatomia Patológica da UnB, pela concessão dos blocos de parafina com as biópsias selecionadas.

Ao Laboratório de Patologia Molecular, que juntamente com o apoio da Capes, me forneceu os anticorpos testados.

A Universidade de Brasília e a Faculdade de Medicina, pela oportunidade de crescimento.

Ao Laboratório Sabin de Análises Clínicas e a Graciella pelo apoio e flexibilidade.

SUMÁRIO

PREFÁCIO.....	xx
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Células T regulatórias.....	1
1.2 Marcadores moleculares de superfície	4
1.3 Células TCD4 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺ e doenças inflamatórias granulomatosas ...	9
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 Amostras.....	16
3.2 Reação de Imuno-histoquímica	16
3.3 Análise dos Resultados.....	18
3.3.1 Análise Morfológica da Lesão	18
3.3.2 Análise Quantitativa das células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD25 ⁺ , CTLA-4 ⁺ , CD20 ⁺ , CD75 ⁺ , CD3 ⁺ e CD45RO ⁺	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Caracterização microscópica dos espécimes selecionados	20
4.1.1 Casos de Paracoccidiodomicose.....	20
4.1.2 Casos de Tuberculose	21
4.1.3 Casos de Sarcoidose	23
4.2 Descrição quantitativa da imunomarcção das amostras de Paracoccidiodomicose, Tuberculose e Sarcoidose.....	24
4.3 Análise comparativa dos diferentes tipos celulares nas lesões de Paracoccidiodomicose, Tuberculose e Sarcoidose.....	29
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES	42
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS.....	47

PREFÁCIO

"Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade"
(Raul Seixas)

"Cada pessoa que passa em nossa vida,
passa sozinha, é porque cada pessoa é
única e nenhuma substitui a outra! Cada
pessoa que passa em nossa vida passa
sozinha e não nos deixa só, porque deixa
um pouco de si e leva um pouquinho de
nós. Essa é a mais bela responsabilidade da
vida e a prova de que as pessoas não se
encontram por acaso."

(Charles Chaplin)

RESUMO

As células T regulatórias (Treg) possuem um importante papel na supressão da resposta imune efetora de linfócitos T, mas as condições especiais de expressão ao antígeno que levam à geração dessas células, ainda não são bem conhecidas. Neste estudo, foram analisadas as populações celulares presentes em lesões granulomatosas obtidas de biópsias de pacientes com paracoccidiodomicose, tuberculose e sarcoidose. A análise imuno-histoquímica dos marcadores moleculares CD4, CD8, CD25, CTLA-4, CD20, CD75, CD3 e CD45RO, demonstrou que em todos os casos houve uma importante migração de células com fenótipo CD3⁺, CD45RO⁺, CD20⁺ e CD75⁺. Analisando estes marcadores observaram-se uma correlação positiva entre os marcadores CD3 e CD45RO e entre CD8, CD25 e CTLA-4. A expressão de CTLA-4 foi maior em lesões de linfonodo do que nas lesões pulmonares. A presença de possíveis células Treg nestas lesões pode ser CD8⁺, com capacidade de modular negativamente a resposta de células T. Porém, apesar do fenótipo CD4⁺CD25⁺ ser o mais descrito para as células Treg, outras populações celulares podem participar desta regulação, sendo necessário uma análise adicional de outros marcadores de superfície para caracterizar estas células T como regulatórias.

Palavras chave: células T regulatórias, marcadores moleculares e doenças inflamatórias crônicas.

ABSTRACT

Regulatory T cells have an important role in the suppression of the lymphocytes T immune response, although the special conditions of expression to the antigen, that conduct to the generation of those cells, are not yet well-known. In this work, it was analysed the cellular population present in granulomatous lesions, obtained from the biopsies of patients with Paracoccidioidomycosis, Tuberculosis and Sarcoidosis cases. The Immunohistochemical analysis of the molecule markers CD4, CD8, CD25, CTLA-4, CD20, CD75, CD3 AND CD45RO, have demonstrated, in all cases, an important migration of cells with the phenotypes CD3⁺, CD45RO⁺, CD20⁺ and CD75⁺. Analysing these markers, it was observed a positive correlation between the CD3 and the CD45RO and among the TCD8, CD25 and the CTLA-4. The expression of CTLA-4 was bigger in lymphonode lesions cases than the ones with pulmonary lesions. The possible presence of Regulatory T cells in these lesions may be CD8⁺, with the capacity to negativity modulate the answer of T cells. However, despite the phenotype CD4⁺CD25⁺ be the most described in the regulatory T cells, other cellular populations may take part in this regulation, being necessary an additional analysis of different surface markers to characterize these T cells as regulatory.

Key words: Regulatory T cells, molecule markers and chronicle inflammatory diseases.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células T regulatórias

As células T regulatórias (Treg), formalmente chamadas de células T supressoras, são linfócitos T que possuem um papel central na manutenção da tolerância imunológica. Este tipo de célula ressurgiu como célula Treg no final dos anos 1990, quando várias subpopulações de células T foram identificadas com a habilidade de inibir a proliferação de outras células, principalmente células T auto-reativas (ABBAS; LICHTMAN, 2006).

Estudos recentes mostram que as células T regulatórias pertencem ao subtipo de células TCD4⁺. Entretanto, suas linhagens celulares, fatores de diferenciação, especificidade antigênica e mecanismos de ação, ainda não são bem compreendidos (FOUSSAT *et al.* 2003). Células Treg CD4⁺ são potentes moduladores da resposta imune mediada por células T *in vitro* e *in vivo* e os dois subtipos mais estudados são as células T regulatórias naturais (nTreg) e as células T regulatórias adaptativas (aTreg), que previnem, respectivamente, respostas imunes contra auto-antígenos e respostas imunes adaptativas. Estas células também têm importante função imunoregulatória, sendo capazes de suprimir respostas imunes mediadas por células Th1 e Th2 (ZHANG *et al.* 2006; PYZIK; PICCIRILLO, 2007).

As populações de células T auxiliares que poderiam ser distinguidas com base em suas citocinas secretadas foram descobertas nos anos 1980, mediante o estudo de grandes painéis de linhagens celulares clonadas, derivadas de células TCD4⁺ de camundongo, estimuladas com antígenos. Hoje já está claro que células individuais podem expressar várias misturas de citocinas, com a possibilidade de haver muitas

subpopulações munidas de padrões mais heterogêneos, especialmente em seres humanos. Entretanto, as reações imunes crônicas são freqüentemente dominadas por uma das duas populações, Th1 ou Th2. Essas populações celulares são distinguidas mais claramente pelas citocinas que produzem, pois mostram diferenças na expressão de vários receptores de citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2006).

As citocinas produzidas não somente determinam as suas funções efetoras, mas também participam do desenvolvimento e expansão das respectivas populações. Por exemplo, o IFN- γ secretado pelas células Th1 promove a diferenciação adicional de Th1 e inibe a proliferação de células Th2. Contrariamente, a IL-4 produzida por células Th2 promove sua diferenciação e a IL-10, também produzida pelas células Th2 (bem como por outras células) inibe a ativação das células Th1. Assim, uma vez que uma resposta imune se desenvolve ao longo de uma via, ela se torna cada vez mais polarizada naquela direção e a polarização mais extrema é vista nas infecções crônicas ou na exposição crônica a antígenos ambientais, quando a estimulação imune é persistente (FENHALLS *et al.* 2002).

As células T regulatórias adaptativas são ainda subdivididas em Treg tipo 1 (Tr1) e tipo 3 (Th3), onde medeiam exclusivamente à supressão via citocinas IL-10 e TGF- β , nesta ordem. O aumento dos níveis de IL-10 e TGF- β , que são produzidos pelas Treg, potencialmente suprimem a produção de IgE, enquanto simultaneamente aumentam a produção de IgG e IgA pelos linfócitos B (BLUESTONE; TANG, 2005, YI *et al.* 2006).

Células Treg com fenótipo CD4⁺CD25⁺ representam cerca de 5 a 10% do total de células TCD4⁺ no sangue periférico e na medula óssea alcançam 20%, podendo ser induzidas durante o curso de uma resposta imune normal, utilizando um repertório de células T contra auto-antígenos (FOUSSAT *et al.* 2003). Assim, a discriminação entre o

próprio e o não-próprio é a chave fundamental para a tolerância imunológica que pode ser central ou periférica (ABBAS; LICHTMAN, 2006, PYZIK; PICCIRILLO, 2007).

A tolerância central assegura que o repertório de linfócitos maduros não reconheça antígenos próprios amplamente disseminados nos órgãos linfóides primários. Esse é o principal mecanismo responsável pela eliminação dos linfócitos auto-reativos do repertório de linfócitos maduros, que podem causar auto-reatividade através da discriminação do próprio e do não-próprio. No entanto, a tolerância central não explica porque o sistema imune não responde aos antígenos que estão presentes somente nos tecidos periféricos. Sendo assim, a tolerância periférica é importante para a manutenção da não-resposta aos antígenos próprios que estão expressos nos tecidos periféricos e não nos órgãos linfóides primários (ABBAS; LICHTMAN, 2006). O repertório de linfócitos maduros contém células capazes de reconhecer os antígenos próprios. Porém, essa resposta pode não evoluir e não ser regulada de forma eficiente o que resulta na manutenção da auto-tolerância (ZHANG *et al.* 2006).

Os principais mecanismos da tolerância de linfócitos são: a indução de morte celular por apoptose, chamada de eliminação clonal (deleção); inativação funcional sem a morte celular (anergia) e a supressão da ativação e função efetora dos linfócitos por células T regulatórias (FOUSSAT *et al.* 2003). Contudo, os efeitos supressores não são restritos à resposta imune adaptativa, que é mediada por linfócitos T e B.

A função efetora está ligada aos linfócitos T e serve como mecanismo de defesa contra microrganismos que sobrevivem dentro dos fagócitos e/ou células não-fagocíticas infectadas. Pode estar influenciada na ativação e função de células da resposta imune inata, que consiste em barreiras epiteliais, células circulantes e proteínas que reconhecem microrganismos ou substâncias produzidas em infecções e então iniciam as respostas que eliminam esses microrganismos. As principais células efetoras

da imunidade inata são os neutrófilos, os fagócitos mononucleares e as células NK (*natural killer*) (ABBAS; LICHTMAN, 2006).

O equilíbrio homeostático do sistema imune é atingido por resposta celular e humoral normais (YI *et al.* 2006). Historicamente, os imunologistas dividiram a imunidade adaptativa em imunidade humoral, sendo que sua fase efetora é desencadeada pelo reconhecimento do antígeno por anticorpos secretados; desse modo, a imunidade humoral neutraliza e elimina microrganismos extracelulares e toxinas que são acessíveis a anticorpos. Porém, ela não é eficaz contra microrganismos que sobrevivem e se replicam dentro de células infectadas, fazendo com que este reconhecimento seja específico às células T (ABBAS; LICHTMAN, 2006).

Alguns agentes inflamatórios, sejam físicos, químicos ou infecciosos, induzem uma resposta imunológica que pode resultar na desregulação dos processos básicos para manter a auto-tolerância, ou seja, causando dano tecidual e doenças auto-imunes (YI *et al.* 2006).

1.2 Marcadores moleculares de superfície

Os linfócitos possuem moléculas de superfície que podem ser detectadas como marcadores moleculares. Os linfócitos T possuem dupla especificidade: reconhecem os resíduos polimórficos próprios das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, que são responsáveis pela restrição ao MHC e também reconhecem resíduos de antígenos peptídicos expostos pelas moléculas do MHC (ABBAS; LICHTMAN, 2006).

O receptor que reconhece esse complexo peptídeo-MHC é chamado de receptor de células T (TCR). Este receptor é distribuído clonalmente, o que significa que os clones de linfócitos que apresentam diferentes especificidades expressam TCRs distintos. Os sinais bioquímicos que são acionados nas células T pelo reconhecimento do antígeno não são traduzidos pelo TCR, mas sim por proteínas não variáveis como CD3, que estão ligadas de forma não-covalente ao receptor do antígeno para formar o complexo TCR (ALKIM *et al.* 2007, ABBAS; LICHTMAN, 2006).

A molécula CD3 é composta por três proteínas que são conhecidas como CD3 γ , δ e ϵ . Essas proteínas são idênticas em todas as células T, independentemente da especificidade, o que é consistente com o seu papel de sinalizar ou não o reconhecimento do antígeno (ALKIM *et al.* 2007).

As células T também expressam outros receptores de membrana que não reconhecem, mas participam da resposta ao antígeno. Esses receptores são genericamente chamados de moléculas acessórias. A significância fisiológica de algumas moléculas acessórias consiste em liberar sinais para células T que funcionam em colaboração com os sinais provenientes do complexo TCR, a fim de ativar totalmente essas células (ABBAS; LICHTMAN, 2006).

As moléculas CD4 e CD8 são moléculas acessórias e proteínas das células T que se ligam às regiões não-polimórficas das moléculas de MHC e também traduzem os sinais que, juntamente com os sinais liberados pelo complexo TCR, iniciam a ativação de células T. Assim, os co-receptores CD4 e CD8 possuem funções semelhantes, mas são estruturalmente diferentes. O CD4 é expresso como um monômero na superfície das células T e dos timócitos, mas também pode ser encontrado em fagócitos mononucleares e em algumas células dendríticas, ao passo que o CD8 é constituído por heterodímeros (ALKIM *et al.* 2007).

A ligação seletiva do CD4 às moléculas do MHC classe II e do CD8 às moléculas do MHC classe I, garante que as células TCD4⁺ respondam aos antígenos peptídicos associados à classe II e que as células TCD8⁺ respondam aos antígenos peptídicos associados à classe I (ALKIM *et al.* 2007).

Outras moléculas que participam da ativação de linfócitos são as moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que estão principalmente expressas nas APCs, incluindo as células dendríticas, os macrófagos e as células B. A expressão de ambas as moléculas é induzida por vários tipos de sinais, incluindo endotoxinas, citocinas inflamatórias tais como IL-2, IFN- γ e a interação do CD40 com o CD40L (ZHANG *et al.* 2006).

O primeiro receptor descoberto para moléculas co-estimulatórias B7-1 e B7-2 foi a molécula CD28, que é constitutivamente expressa em mais de 90% das células TCD4⁺ e em 50% das células TCD8⁺ em seres humanos, sendo o principal receptor para liberar os segundos sinais para ativação de células T. A ligação do CD28 depende da proliferação de células T induzindo a produção de IL-2 e fatores antiapoptóticos (YI *et al.* 2006).

Um segundo receptor para moléculas B7 foi descoberto mais tarde e é chamado de CTLA-4 (*intracellular cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*) ou CD152, que é uma molécula da família do CD28, a qual foi caracterizada com o uso de anticorpos monoclonais. O nome CTLA-4 foi baseado no fato dessa molécula ser o quarto receptor expresso nas células CTLs, mas a sua expressão e função não estão restritas às CTLs. O CTLA-4 é estruturalmente homólogo ao CD28, servindo como regulador negativo para ativação de linfócitos T (QUEZADA *et al.* 2006). Quando o CTLA-4 se liga ao B7-1 e B7-2 e é expresso nas células T ativadas, contrariamente ao CD28, funciona como terminador da resposta das células T e tem um papel importante na auto-tolerância, pois promove a expressão de citocinas como IL-10 e IL-4, embora não libere fatores de

crescimento para as células T, como IL-12. Então, o balanço dinâmico entre a sinalização TCR, CD28 e CTLA-4 tem sido o limite para o desenvolvimento da resposta imune efetora, inibindo sua proliferação (YI *et al.* 2006).

Outra molécula co-estimulatória é a CD45 (originalmente chamada de antígeno leucocitário comum), uma glicoproteína de superfície celular com o domínio citoplasmático tirosina fosfatase, cujo papel é a ativação de células T. Várias formas são expressas nos leucócitos imaturos e maduros, inclusive nas células T e B, timócitos, fagócitos mononucleares e leucócitos polimorfonucleares. A família CD45 é composta por múltiplos membros, todos produtos de um único complexo gênico. As isoformas da proteína CD45 que são expressas em um grupo restrito de tipos celulares são designadas CD45R. A maioria das células T *naive* (células T primordiais) humanas expressa uma forma de CD45R chamada CD45RA, enquanto as células T de memória expressam uma isoforma diferente chamada CD45RO. Contudo, esses tipos de expressão não são fixos e não existem evidências de que as variáveis isoformas de CD45R executem funções diferentes (ALKIM *et al.* 2007).

Recentemente, vários marcadores de superfície têm sido utilizados para a identificação das células Treg, sendo que a molécula CD25 é um importante marcador, pois se trata da cadeia α do receptor da IL-2, que é expresso pelos linfócitos T e B ativados. Cerca de 1 a 3% das células T expressam CD25 com alta intensidade (CD25^{high}) e também expressam o CTLA-4 (MIYARA *et al.* 2006).

A prevenção de doenças auto-imunes fica menor com a redução de células CD4⁺ e não com a redução de T CD8⁺, o que indica que a maioria das células T regulatórias pertencem a classe CD4⁺ que expressam Foxp3 (*forkhead box p3*) e este marcador celular parece ser central no desenvolvimento das células Tregs (PILLAI *et al.* 2007). O análogo humano do Foxp3 de camundongo foi encontrado como uma mutação nos

pacientes afetados pela *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome* (IPEX). Em contraste com outros marcadores de células Tregs, o Foxp3 não é induzido após estimulação, uma vez que é requerido para o desenvolvimento dessa linhagem celular, sendo o marcador mais específico disponível (BRAS; GEHA,2006) .

Níveis baixos de Foxp3 podem ser detectados em células T CD4⁺CD25⁻ com atividade regulatória em ratos e em seres humanos, pois células CD25⁻Foxp3⁺ podem constituir um reservatório periférico e recrutar células CD25⁺ como forma de expansão ou ativação homeostática (YI *et al.* 2006). Por isso, o Foxp3 é considerado um fator chave para controlar o desenvolvimento das células CD4⁺CD25⁺Treg no timo, pois sua expressão está melhor relacionada com a atividade supressora do que apenas com a expressão de CD25. Níveis diminuídos de Foxp3 são encontrados em pacientes com infecções virais e doenças auto-imunes (BRAS; GEHA, 2006; NISHIOKA *et al.* 2006).

Entretanto, existem alguns problemas que devem ser observados sobre o Foxp3 como um marcador específico de células Treg: primeiramente o fato do Foxp3 ser uma proteína nuclear, o que limita sua aplicação como uma ferramenta para isolar células ex-vivo; em segundo lugar, o seu papel mediador no desenvolvimento das células Treg em humanos é controverso (YI *et al.* 2006).

Alguns grupos de pesquisa realizaram análises para obter a expressão de outro gene que poderia ser específico para células Treg. Trata-se da superfamília do TNFR (receptor do fator de necrose tumoral), que inclui vários receptores tais como: GITR, OX40 (CD134), CD95, dentre outros. Alguns deles possuem um papel importante nas funções das células Treg (YI *et al.* 2006). O GITR é requerido para indução da apoptose por TCR, gerando células T resistentes; essa sinalização intracelular recruta proteínas associadas ao TNF (fator de necrose tumoral), que é expressado em vários linfócitos em

níveis diferentes e quando elevado, é específico das células Treg que ficam na periferia e no timo (BLUESTONE; TANG, 2005).

1.3 Células T CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺ e doenças inflamatórias granulomatosas

As células Tregs ajudam a limitar o dano causado por uma resposta imune rigorosa. Porém, mecanismos regulatórios defeituosos podem permitir a quebra da tolerância imune periférica, que será seguida por inflamação crônica, podendo causar doenças (FOUSSAT *et al.* 2003).

O estabelecimento de uma resposta inflamatória crônica em decorrência de patógenos e agentes irritantes persistentes levam a a formação de granuloma, o qual é definido como uma coleção compacta de células do sistema fagócito mononuclear, podendo sofrer transformação para células epitelióides e gigantes. Linfócitos, plasmócitos, fibroblastos e eosinófilos geralmente estão presentes (VAN FURTH *et al.*, 1972; WILLIAMS & WILLIAMS, 1983).

Estruturalmente estes granulomas são pequenas coleções, de 0,5 a 0,2 mm de macrófagos modificados, chamados de células epitelióides, tendo origem nos monócitos que saem do sangue. Essas células possuem uma maior função secretora de enzimas do que fagocitose e por isso possuem o retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi desenvolvidos e muitas vesículas no citoplasma (BOGLIOLO L; BRASILEIRO FILHO, 2000).

O granuloma é a lesão fundamental em doenças infecciosas (tuberculose, hanseníase, esquistossomose, histoplasmose, dentre outras) sendo resultado de uma reação de hipersensibilidade tardia (DTH) contra antígenos do agente infeccioso

(WILLIAMS & WILLIAMS, 1983; BRITO & FRANCO, 1994; CHENSUE *et al* 1994; ROMANI, 1997).

Uma importante característica dos granulomas é a presença de um tipo especial de célula multinucleada denominada de célula gigante, que se origina dos macrófagos e tem grande capacidade de fagocitose e digestão intracelular. O macrófago faz a divisão nuclear várias vezes sem dividir o citoplasma e aumenta o tamanho da célula. Na esquistosomose crônica observa-se ovos de *Schistosoma* dentro dessas células no fígado e nas blastomicoses também é possível verificar a presença de fungos dentro do citoplasma sofrendo digestão. Existem vários padrões de células gigantes:

- células gigantes de Langhans - são células que aparecem nos granulomas formados contra agentes infecciosos e estruturalmente consiste em uma célula grande com os núcleos ao redor da periferia e um polo da célula contendo um aglomerado;
- células gigantes do tipo corpo estranho - são células gigantes formadas contra determinados agentes exógenos não-vivos como partículas de poeira, silício, berílio e outros materiais. Essas substâncias são indigeríveis e por isso desencadeiam a formação das células gigantes que vão tentar removê-las do local. Estruturalmente são diferentes das Langhans por terem núcleos mais numerosos e espalhados por todo o citoplasma;
- células gigantes de Touton - são associadas a doenças de degeneração da gordura, possuem o citoplasma espumoso e os núcleos estão alinhados de forma ondulada no citoplasma;
- células gigantes do sarampo - também são chamadas de células Warthin-Finkeldey, que são encontradas nos tecidos linfáticos e com mais frequência no apêndice de crianças no estágio de pródrômo do sarampo. Estruturalmente são semelhantes as células de Langhans, porém os núcleos são maiores e ocupam mais o citoplasma que a periferia (BOGLIOLO L; BRASILEIRO FILHO, 2000).

Ainda, existem classificações para os granulomas utilizando critérios anatômicos e morfológicos, de etiologia (envolvendo a causa do processo) ou de patogenia (envolvendo os mecanismos de origem). Podem ser **difusos e focais**, conforme se distribuam pelos limites agredidos; **simples e compostos**, quando apresentam apenas macrófagos ou macrófagos associados a células gigantes, respectivamente; **complexos (ou tuberculóides)**, quando se considera um padrão de granuloma composto, associados aos fenômenos de defesa imunitária do paciente; **imunitários e não-imunitários**, em que se mede principalmente o padrão de manutenção da estrutura granulomatosa a partir de elementos de defesa imune, como os linfócitos. Assim, diz-se que são imunitários os granulomas em que há diminuição do agente agressor, contudo, isso não garante que o granuloma seja resolvido, pelo contrário, em muitas situações os mecanismos de defesa imune contra o agente podem provocar maior destruição tecidual, aumentando o foco de necrose e contribuindo para a manutenção da estrutura inflamatória; **supurativos ou não-supurativos**, quando exibem pus, causado principalmente por bactérias piogênicas de baixa virulência (NOVELLI *et al*, 1993).

O processo de formação das células que compõem o granuloma ocorre quando o antígeno estimula uma resposta imune celular. Ocorre então a apresentação do antígeno ao linfócito T helper que irá secretar citocinas que estimulam mais linfócitos. Essas citocinas estimulam os monócitos que chegam da circulação a mudarem sua estrutura e se transformar em células epitelióides e os macrófagos se diferenciam em células gigantes (ROBBINS, 2000).

No presente trabalho serão analisadas as seguintes doenças granulomatosas:

- Paracoccidioidomicose:

Trata-se de uma micose profunda ou sistêmica caracterizada por manifestações clínicas de doença granulomatosa crônica. Acredita-se que a infecção primária ocorra principalmente através da inalação de conídios ou fragmentos de micélio (McEWEEN *et al.*, 1987), com o fungo estabelecendo-se inicialmente nos pulmões e podendo disseminar-se através da corrente sangüínea e/ou sistema linfático para linfonodos, superfícies cutâneas e outros órgãos (BRUMMER *et al.*, 1993).

O granuloma é um componente essencial na defesa anti-*P. brasiliensis*, pois é onde ocorre a cooperação linfócito T - macrófago, permitindo que o macrófago não apenas exerça suas atividades microbidas e de apresentador de antígeno, mas também juntamente com o linfócito T produza citocinas e outros fatores que proporcionariam um granuloma competente com o objetivo de destruição e contenção do fungo, a fim de evitar sua disseminação. Como a manutenção do granuloma é uma das características principais da imunidade celular, esse ramo do sistema imune adaptativo deve exercer um papel crucial na proteção contra a infecção por *P. brasiliensis*. Assim, dependendo da resposta imunológica celular, a Pbmicose pode evoluir com lesões bem definidas ou com lesões frouxas e difusas (FRANCO *et al.*, 1993). Macrófagos ativados, cercados por linfócitos e fibroblastos, além de eosinófilos, células gigantes de Langhans e uma grande quantidade de células polimorfonucleares compõem o granuloma da Paracoccidioidomicose (ESSAYAG *et al.* 2002, DEFAVERI *et al.*1989).

- Tuberculose:

A Tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que possui a capacidade de invadir e disseminar-se pelo corpo humano, principalmente, devido à condição dos bacilos de sobreviver e proliferar no interior de fagócitos mononucleares (FENHALLS *et al.*, 2002).

No aspecto imunológico, o bacilo da tuberculose é fagocitado por um macrófago alveolar e pode sobreviver e se replicar dentro desta célula. Monócitos são recrutados para formar o granuloma no local da infecção e os bacilos podem ser visualizados dentro dos macrófagos quando corados pelo método de Ziehl-Neelsen (CHEN *et al.*, 2007).

O granuloma da tuberculose pode ser visto como um produto da co-evolução do hospedeiro e patógeno através do qual o patógeno permanece restrito e incapaz de disseminar-se, porém o hospedeiro é incapaz de destruí-lo completamente. Esse equilíbrio persiste até ser perturbado por fatores que comprometam uma resposta imune eficaz (GUYOT-REVOL *et al.* 2006). Este granuloma se torna maior quando mais células são recrutadas formando várias zonas aparentes. A área central (denominada necrose caseosa) é formada quando ocorre apoptose de macrófagos infectados e ativação de células T e essa necrose geralmente é cercada por células epitelióides, células gigantes multinucleadas e linfócitos (ROACH *et al.* 2002).

- Sarcoidose:

Doença sistêmica de causa desconhecida, caracterizada pela inflamação local extensiva formando granulomas não-caseosos, mais comumente nos pulmões, olhos, linfonodos, pele e fígado. Pode ser decorrente de uma infecção ou de uma resposta anormal do sistema imune e fatores hereditários podem ser importantes (TEIRSTEIN *et al.*, 2005).

Os granulomas vistos na Sarcoidose são agregados de células epitelióides, similares aos granulomas da tuberculose, entretanto, a quantidade de necrose é menor e não caseosa. As células gigantes multinucleadas do tipo Langhans e do tipo corpo estranho estão presentes, porém são menos numerosas e podem possuir estruturas em

seu interior, como por exemplo, corpos asteróides ou corpos de Schaumann, embora estas inclusões não sejam específicas da sarcoidose (MOLLER, 2007, TEIRSTEIN *et al.*, 2005).

Então, ao se tratar de células regulatórias, a resposta imune pode ser gerada mediante o reconhecimento de antígenos próprios no timo ou nos órgãos linfóides periféricos, mas não se conhecem as condições especiais de expressão ao antígeno que levam à geração dessas células (PILLAI *et al.* 2007). Sendo assim, a presença de Tregs pode ser vantajosa e/ou prejudicial durante infecções crônicas, pois pode impedir a inflamação excessiva e patológica, como também podem promover a persistência da infecção. A infecção persistente pode promover uma fonte contínua para o antígeno que mantém resposta ótima para células T de memória (ABBAS, LICHTMAN, 2005).

2. OBJETIVOS

- Identificar as populações celulares presentes nas lesões granulomatosas de pacientes com Paracoccidiodomicose, Tuberculose e Sarcoidose.

- Correlacionar as populações celulares identificadas nas lesões entre si e com a presença de linfócitos TCD25⁺CTLA-4⁺.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram utilizadas 19 biópsias de pulmão e linfonodo, com diagnóstico de Paracoccidioidomicose, Tuberculose e Sarcoidose. As lesões pulmonares dos pacientes com diagnóstico de tuberculose eram recentes se comparadas com as lesões de linfonodos, visto que, os pacientes com este tipo de lesão já estavam em tratamento, com positividade da doença a cerca de 2 a 5 anos.

Os fragmentos das biópsias foram obtidos do Centro de Anatomia Patológica (CAP) do Hospital Universitário de Brasília e do Laboratório LIB. As biópsias foram previamente fixadas em formol tamponado a 10%, incluídas em parafina e realizados cortes de 4 μ m, que foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). Foram realizadas também colorações especiais para evidenciar fungos (Grocott) e o bacilo da tuberculose (Fite-faraco).

Todas as amostras analisadas possuíam diagnóstico clínico confirmado através dos exames histopatológicos. Foram analisados 5 casos de paracoccidioidomicose (PCM) 3 pulmonares e 2 de linfonodos, 11 casos de tuberculose (TB), sendo 8 pulmonares e 3 linfonodos e 3 casos de sarcoidose, todos de linfonodos.

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

3.2 Reação de Imuno-histoquímica

Para as análises de imuno-histoquímica, foram realizados cortes das amostras parafinadas em espessura de 4 μ m e fixados em lâminas de vidro contendo poli-L Lisina

(0,1% - Sigma). A técnica utilizada foi a de imunoperoxidase para a identificação das moléculas CD4, CD8, CD25, CTLA-4, CD20, CD75, CD3 e CD45RO.

Os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados em estufa a 50°C por 20 minutos e hidratados por 3 incubações em xilol por 5 minutos cada, sendo a primeira com xilol aquecido na estufa a 50°C. Então, os tecidos foram re-hidratados em álcool absoluto, em três cubas distintas, mantendo a mesma graduação.

Em seguida, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio (Merck) a 3% em metanol (Vetec), por 17 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram incubadas em tampão citrato (Sigma), pH = 6.2 e aquecidas a uma temperatura de 120°C sob pressão, para exposição antigênica, por 1 minuto e 30 segundos.

Após a exposição antigênica, as lâminas permaneceram no tampão citrato por 30 minutos, em banho-maria, a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubadas com soro de leite a 3% em PBS (leite desnatado Molico) por 30 minutos, a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. As lâminas foram então secas e incubadas com os anticorpos primários por 18 horas e mantidas na temperatura de 4°C. Os anticorpos que foram utilizados e suas respectivas diluições estão especificados na Tabela 1. Todas as diluições foram realizadas utilizando PBS associado a soro albumina bovina (PBS-BSA) a 1%. Após o período de 18 horas, realizaram-se as lavagens consecutivas e posteriormente a incubação com os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo por 20 minutos, à temperatura de 22 a 25 °C, seguido pela incubação da streptavidina marcada com peroxidase por 20 minutos, à temperatura ambiente.

Tabela 1: Anticorpos primários e suas respectivas diluições, clones, códigos e fabricantes

<i>Anticorpos</i>	Diluição	Clone	Código	Fabricante
Monoclonais de camundongo anti-célula T humana, CD3	1:100	PC3/188A	M7193	DAKO
Monoclonais de camundongo anti-célula T humana, CD8	1:100	CB/144B	M7103	DAKO
Monoclonais de camundongo anti-célula T humana, CD4	1:100	MT310	M0716	DAKO
Monoclonais de camundongo anti-célula T humana, CD45RO	1:100	UCHL1	M0742	DAKO
Monoclonais de camundongo anti-célula B humana, CD20	1:100	L26	M0755	DAKO
Monoclonais de camundongo anti-célula B humana, CD75	1:100	JCB117	M7050	DAKO
Policlonais de camundongo anti-célula T humana, CD25	1:100	M19	H2203	Santa Cruz
Policlonais de camundongo anti-célula T humana, CTLA-4	1:100	C19	K1104	Santa Cruz

Posterior às lavagens consecutivas com PBS-BSA a 1%, procedeu-se à revelação da reação utilizando o substrato 3.3'-Diaminobenzidina pronto para uso (KIT DAKO). A revelação foi feita, por 15 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada por duas vezes, as lâminas foram incubadas por mais 10 minutos em água destilada, desidratadas com álcoois (95° e 100° GL), passadas em xilol (3 vezes) e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

3.3 Análise dos Resultados

3.3.1 Análise Morfológica da Lesão

As lâminas submetidas à coloração de rotina (HE) foram avaliadas quanto à presença de micro-abscessos, morfologia e distribuição dos granulomas, bem como as

características gerais do infiltrado inflamatório, ou seja, foi feita análise semi-quantitativa de histiócitos, células gigantes, linfócitos, neutrófilos e granulomas.

3.3.2 Análise Quantitativa das Células CD4⁺, CD8⁺, CD45RO⁺, CD3⁺, CD20⁺, CD75⁺, CD25⁺, CTLA-4⁺

Para esta contagem, foi utilizado um microscópico binocular AXIOLAB-ZEISS associado a ocular com retículo de integração quadrado em forma de rede (CARL ZEISS-474068000000-Netzmikrometer 12,5x). Foram selecionados 3 campos no sítio inflamatório das lesões, envolvendo principalmente os granulomas. Todas as amostras foram examinadas sob a objetiva de 100x, utilizando óleo de imersão: a área ocupada pelo retículo neste aumento correspondia a 0,015625mm². Os valores obtidos foram demonstrados como o número de células positivas/mm², considerando o máximo de 1000 células. Assim, a soma das células em 3 campos considerando até 1000 células foi corrigida para 1mm², sendo que o número máximo de células foi de 64000/mm².

Os fenótipos celulares considerados como relevantes foram associados aos marcadores positivos de linfócitos T. Os dados foram submetidos a testes estatísticos (Análise de Variância (ANOVA) e Teste t de Student). Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização microscópica dos espécimes selecionados

4.1.1 Casos de Paracoccidioidomicose

A análise microscópica das biópsias pulmonares (pacientes 2 a 4) revelou, no parênquima pulmonar, um infiltrado inflamatório crônico constituído por granulomas, células mononucleares, microabscessos neutrofílicos e células gigantes multinucleadas.

Nas duas biópsias de linfonodo (pacientes 1 e 5) foram observados granulomas frouxos constituídos por agregados de células epitelióides e por células gigantes multinucleadas do tipo Langhans. Os granulomas analisados não apresentaram necrose central e estavam envolvidos por infiltrado de linfócitos, histiócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e fibroblastos, com exceção de apenas um caso (paciente 3), que foi observado uma extensa área de necrose com focos de tecido de granulação e fibrose. Todos os cortes analisados apresentaram estruturas fúngicas com brotamentos múltiplos compatíveis com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. (Tabela 2 e figura 1)

Tabela 2: Análise semi-quantitativa dos achados histológicos nos pacientes com Paracoccidioidomicose.

Paciente com PCM	Histiócitos	Células gigantes	Linfócitos	Neutrófilos	Granulomas	Fungos
1	+++	+++	+++	++	+	+
2	+++	+++	++	+++	+++	++++
3	++	++++	+++	++	++	+++
4	+++	++	+++	++	++	+++
5	++	+++	++	-	++	++

Legenda: - (ausência); + (raros); ++ (alguns); +++ (vários); ++++ (numerosos)
1 e 5 - biópsias de linfonodo; 2 a 4 - biópsias de pulmão

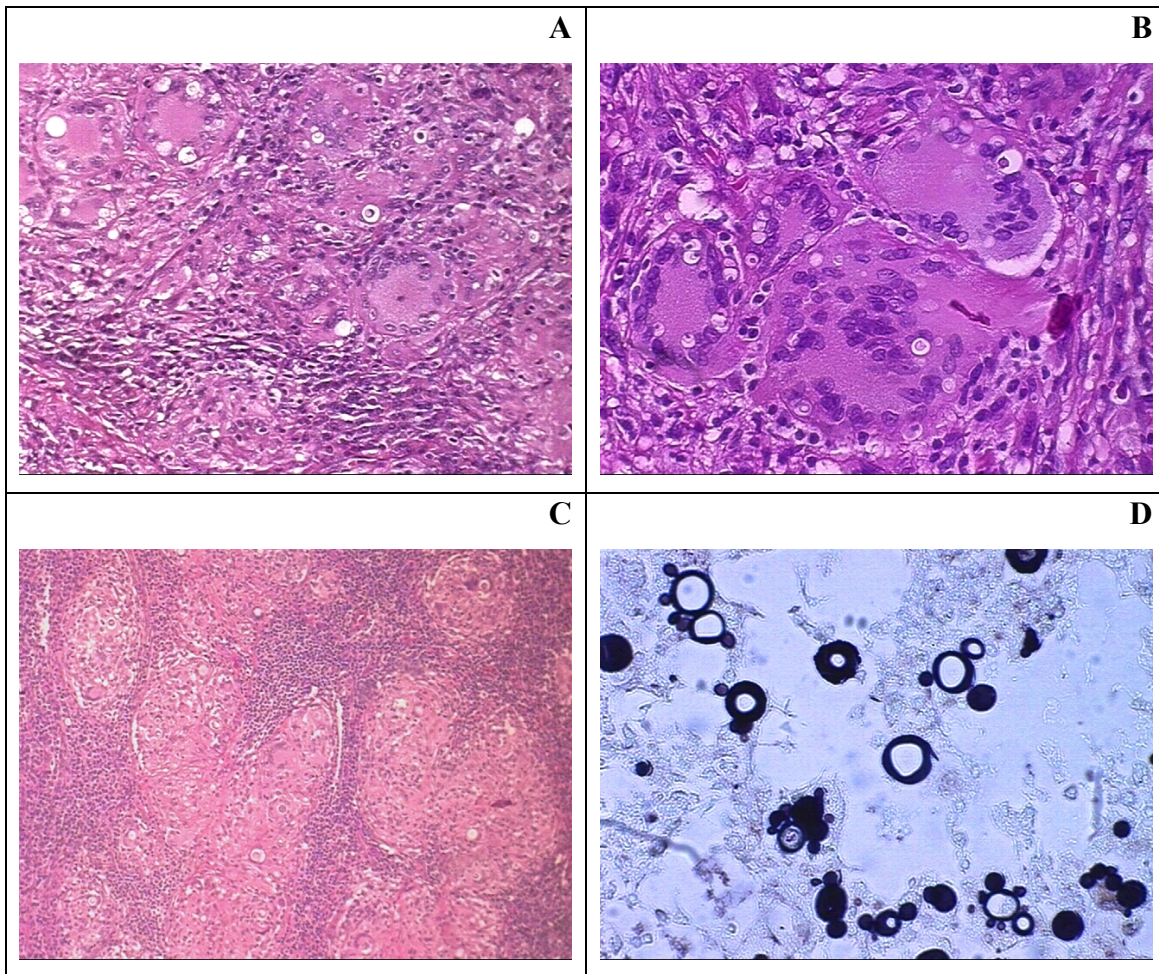


Figura 1: Fotomicrografia de lesões de pacientes com paracoccidioidomicose do tipo pulmonar (**A e B**) apresentando granulomas com presença de células gigantes multinucleadas e leveduras de fungo no seu interior; granulomas epitelióides confluentes de linfonodo (**C**) e leveduras de fungo com brotamentos múltiplos (**D**). (**A, B, C** foram coradas com HE e **D** foi corada pelo método de Grocott. Os aumentos originais de 200x para **A**, 400x para **B e D** e 100x para **C**).

4.1.2 Casos de Tuberculose

A análise microscópica das oito biópsias pulmonares (pacientes de 1 a 8) apresentou parênquima pulmonar com reação inflamatória granulomatosa, células epitelióides e células gigantes multinucleadas dispostas em paliçada ao redor da necrose central. As três biópsias de linfonodos (pacientes de 9 a 11) revelaram granulomas caseosos constituídos por células epitelióides e gigantes multinucleadas com infiltrado de linfócitos, histiócitos e plasmócitos. Em todos os casos analisados não foram evidenciados bacilos nas lesões. (Tabela 3 e Figura 2).

Tabela 3: Análise semi-quantitativa dos achados histológicos nos pacientes com Tuberculose.

Paciente com TB	Histiócitos	Células gigantes	Linfócitos	Neutrófilos	Granulomas
1	++	++	++	+	++
2	+++	++	+++	+	+++
3	++	+++	++	-	+++
4	++	++	+++	-	+++
5	++	++	++	-	++
6	+	+++	+	-	+++
7	+++	+++	+++	-	++
8	++	+++	+++	-	+++
9	++	++	++	-	++
10	++	++	++	-	++
11	+++	++	+++	+	+++

Legenda: - (ausência); + (raros); ++ (alguns); +++ (vários); ++++ (numerosos)
1 a 8 - biópsias de pulmão; 9 a 11 - biópsias de linfonodo

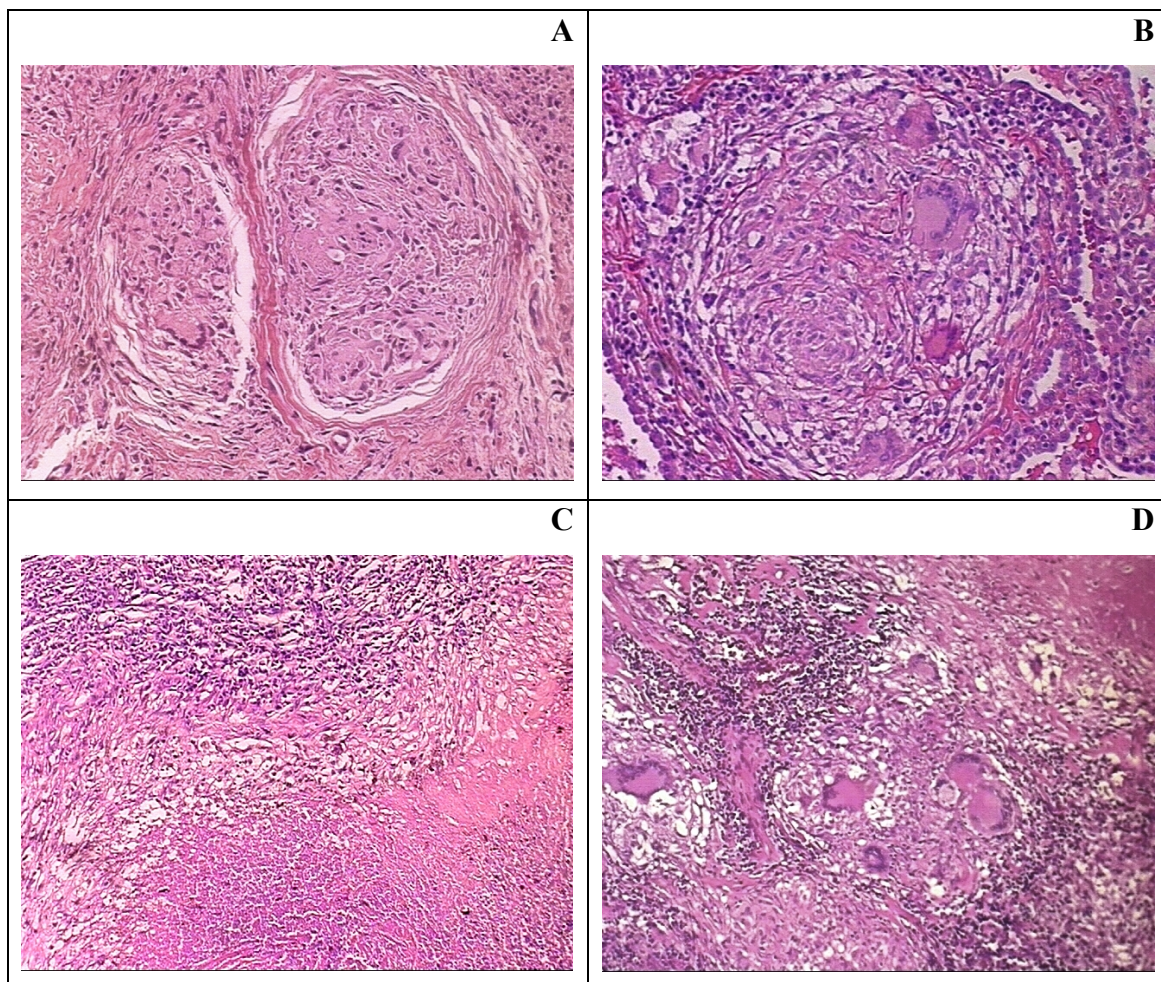


Figura 2: Fotomicrografia de lesões de pacientes com tuberculose pulmonar apresentando granulomas epitelióides com células gigantes multinucleadas (A e B); granuloma pulmonar com necrose caseosa central com paliçada de histiócitos (C) e infiltrado de células mononucleares com células gigantes multinucleadas em linfonodo (D). (A, B, C e D foram coradas com HE. Os aumentos originais de 200x para A e B, 100x para C e D).

4.1.3 Casos de Sarcoidose

Em todos os casos de Sarcoidose foram observados granulomas compactos e confluentes constituídos por células epitelióides e gigantes multinucleadas. Estes granulomas não apresentaram necrose central e estavam envolvidos por infiltrado de linfócitos. Em apenas um caso (Sarcoidose 3) foi possível observar células gigantes multinucleadas contendo corpos asteróides no seu interior. (Tabela 4 e Figura 3)

Tabela 4: Análise semi-quantitativa dos achados histológicos nos pacientes com Sarcoidose.

Pacientes com Sarcoidose	Histiócitos	Células gigantes	Linfócitos	Neutrófilos	Granulomas
1	+	+	++	-	+++
2	+	+	++	-	++++
3	+	+++	++	-	++

Legenda: - (ausência); + (raros); ++ (alguns); +++ (vários); ++++ (numerosos)

1 a 3 - biópsias de linfonodo

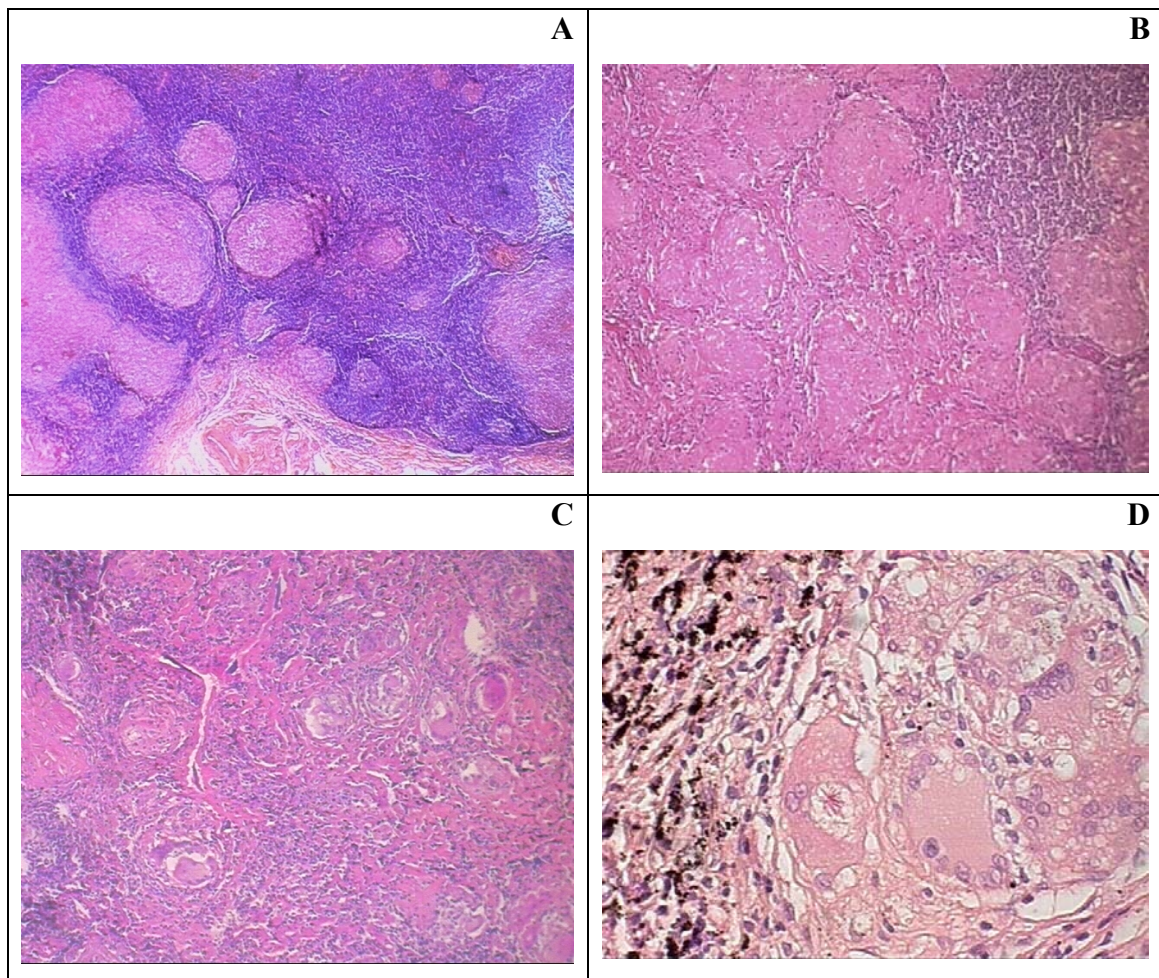


Figura 3: Fotomicrografia de lesões de pacientes com sarcoidose apresentando granulomas epitelióides confluentes (A, B, C) e célula gigante com corpo asteróide (D). (A, B, C, D foram coradas com HE. Os aumentos originais de 100x para A e B, 200x para C e 400x para D).

4.2 Descrição quantitativa da imunomarcção das amostras de Paracoccidioidomicose, Tuberculose e Sarcoidose

A análise quantitativa da intensidade de imunomarcção revelou uma intensa expressão de células por mm^2 , na maioria dos casos, para os marcadores celulares CD8^+ , CD20^+ , CD75^+ , CD3^+ e CD45RO^+ nas amostras de PCM (Tabela 5 e Figuras 4 e 7A), TB (Tabela 6 e Figuras 5 e 7B) e Sarcoidose (Tabela 7 e Figuras 6 e 7C). A expressão do CTLA-4 foi variável e estava relacionado com o tecido analisado (Figura 8).

Tabela 5: Número de células positivas para marcadores celulares por mm² em pacientes com Paracoccidioidomicose.

Paciente com PCM	CD4	CD8	CD25	CTLA-4	CD20	CD75	CD3	CD45RO
1	128	256	0	1472	7680	8960	11840	0
2	18240	1600	1856	1280	57088	33920	11840	64000
3	0	1216	0	640	64000	64000	54848	64000
4	0	10496	0	4416	64000	64000	3648	64000
5	64000	44160	1600	0	3648	64000	64000	64000

Soma dos 3 campos analisados/mm²

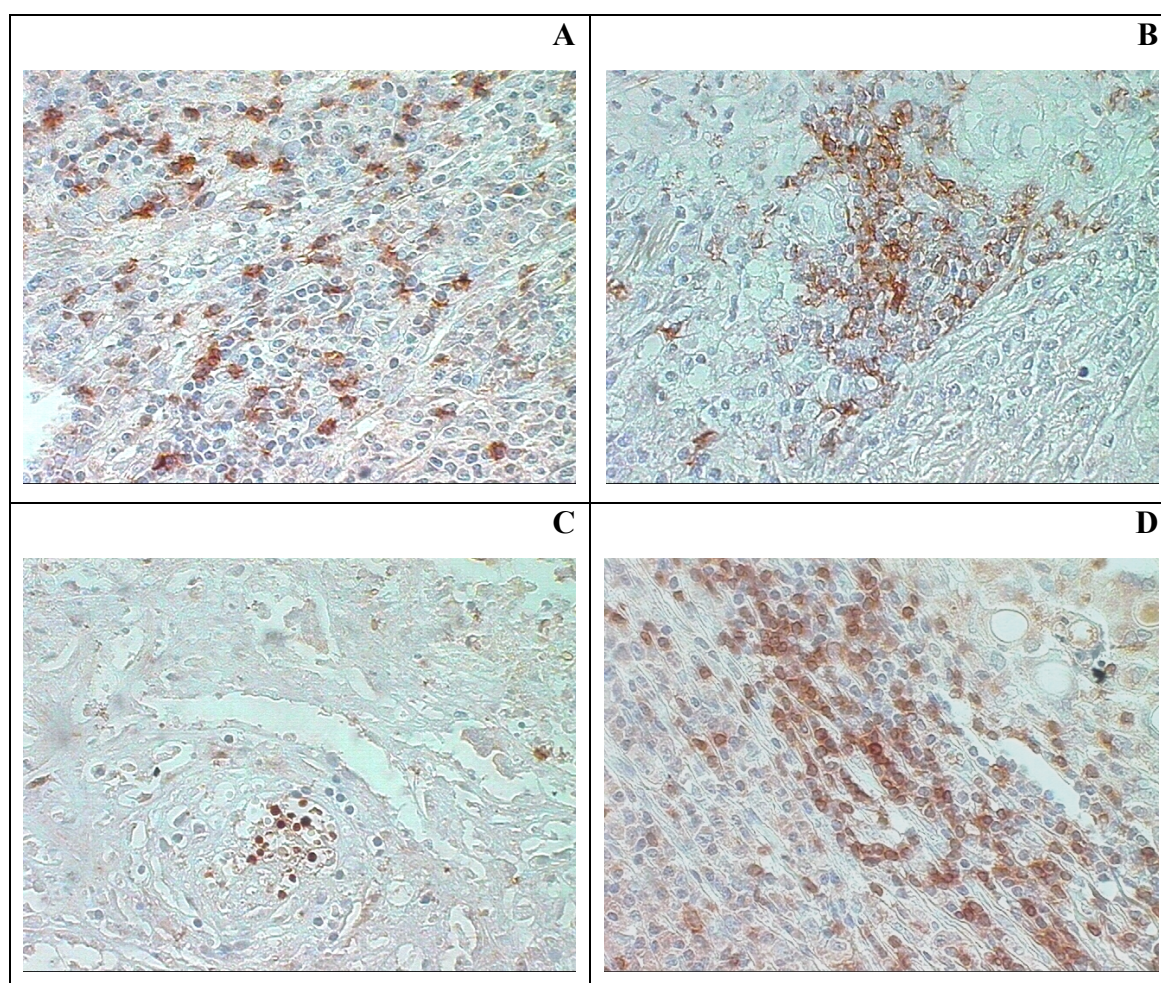


Figura 4: Análise imuno-histoquímica dos granulomas das lesões de pacientes com paracoccidioidomicose, para os marcadores CD8 (A), CD25 (B), CTLA-4 (C) e CD3 (D). (Os aumentos originais de 400x para A,B,C e D)

Tabela 6: Número de células positivas para marcadores celulares por mm² em pacientes em pacientes com Tuberculose.

Paciente com TB	CD4	CD8	CD25	CTLA-4	CD20	CD75	CD3	CD45RO
1	0	64000	192	11392	33920	0	64000	9792
2	0	64000	0	0	384	8768	48512	64000
3	0	9984	0	0	4544	3776	64000	64000
4	0	512	0	0	768	0	0	11520
5	960	19840	320	1024	11904	14080	18560	46720
6	1344	2496	320	512	640	1088	8128	4032
7	1216	2624	2048	1152	56768	36032	20480	11456
8	128	23168	320	128	36736	26688	1344	3008
9	512	14400	3328	2240	56960	64000	43840	54848
10	0	2432	0	1920	64000	64000	64000	54400
11	10368	64000	5184	8448	64000	64000	64000	64000

Soma dos 3 campos analisados/mm²

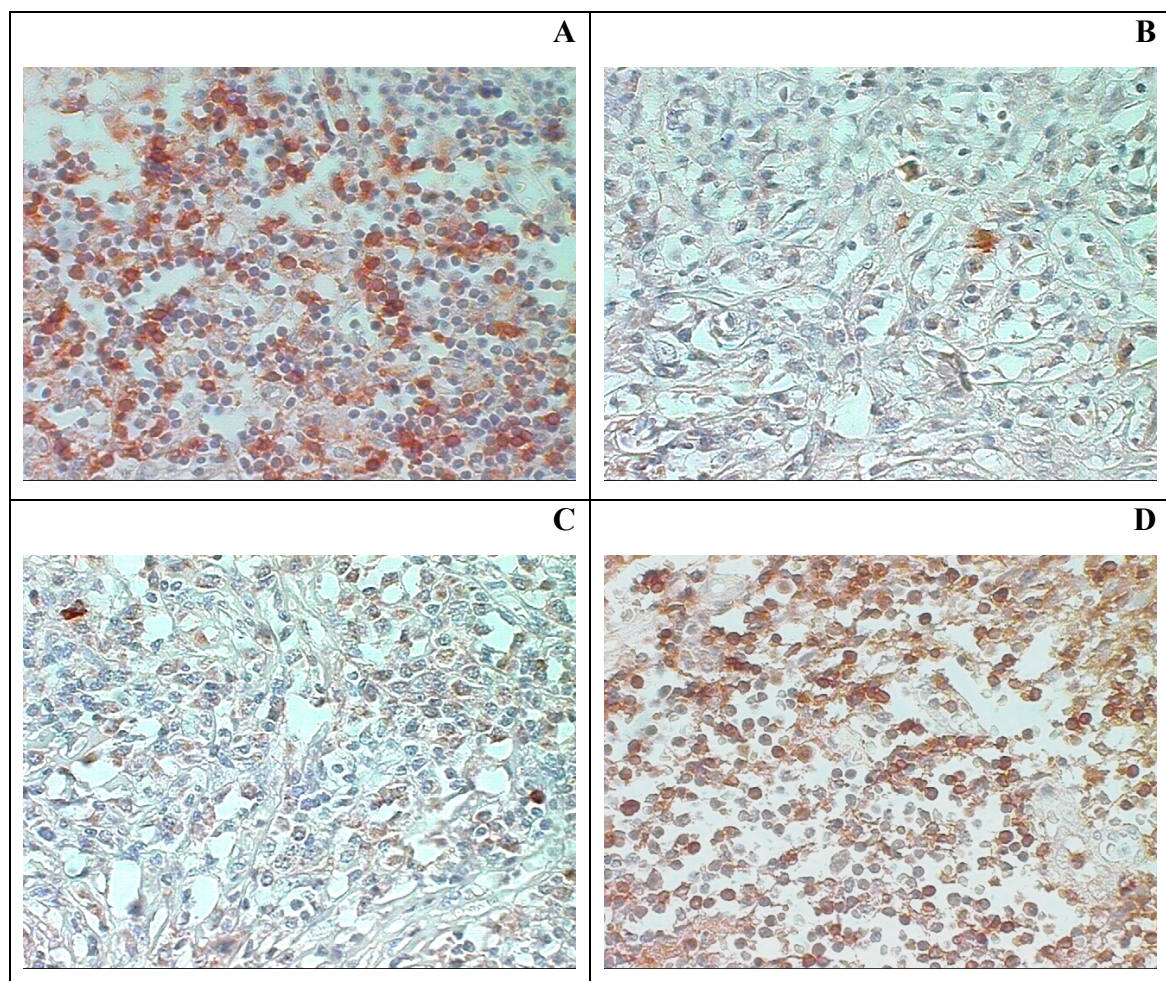


Figura 5: Análise imuno-histoquímica dos granulomas das lesões de pacientes com tuberculose, para os marcadores CD8 (A), CD25 (B), CTLA-4 (C) e CD3 (D). (Os aumentos originais de 400x para A,B,C e D)

Tabela 7: Número de células positivas para marcadores celulares por mm² em pacientes em pacientes em pacientes com Sarcoidose.

Pacientes com Sarcoidose	CD4	CD8	CD25	CTLA-4	CD20	CD75	CD3	CD45RO
1	0	54400	192	0	64000	64000	64000	59840
2	256	5888	0	0	17920	11392	5760	13440
3	0	3904	0	0	1408	384	7040	1600

Soma dos 3 campos analisados/mm²

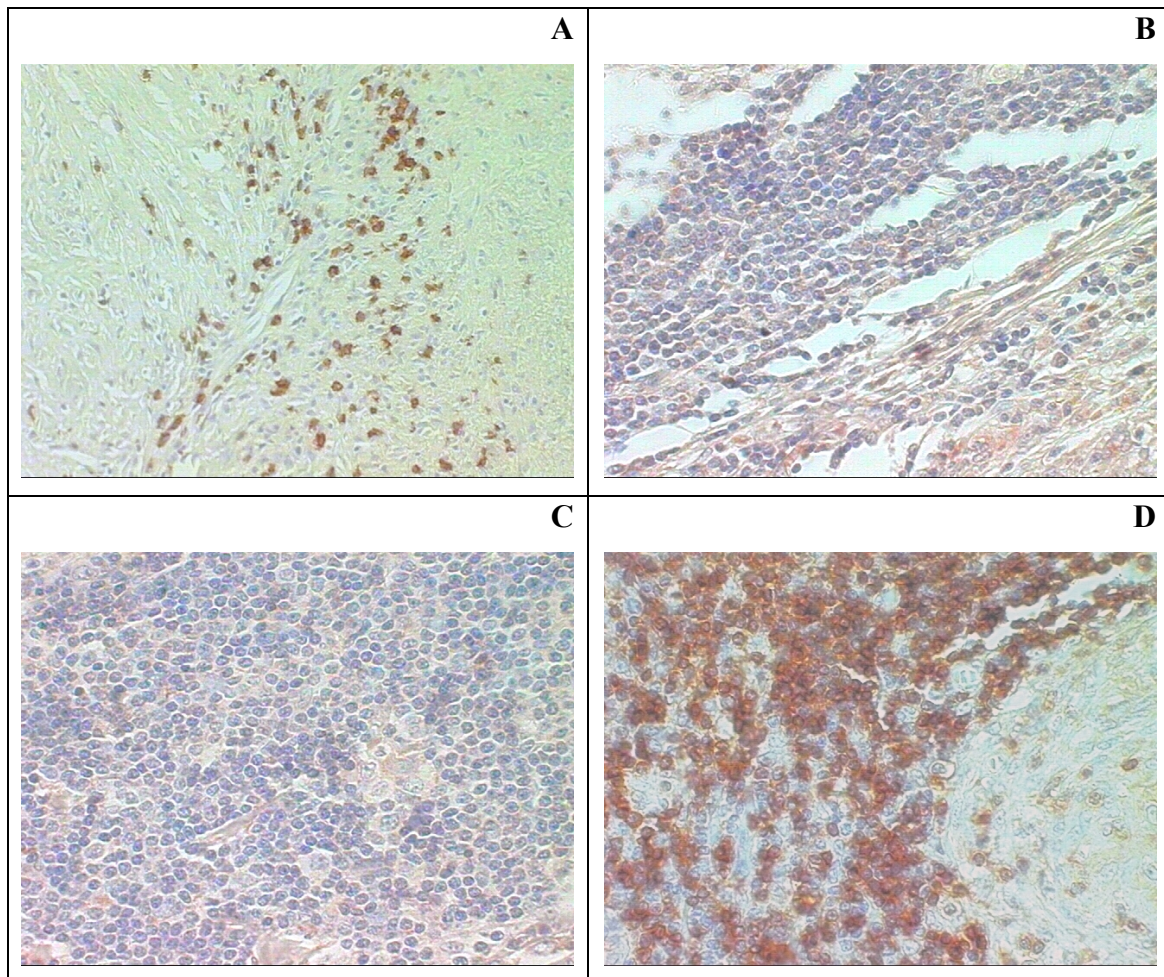


Figura 6: Análise imuno-histoquímica dos granulomas das lesões de pacientes com sarcoidose, para os marcadores CD8 (A), CD25 (B), CTLA-4 (C) e CD3 (D). (Os aumento originais de 400x para A,B,C e D)

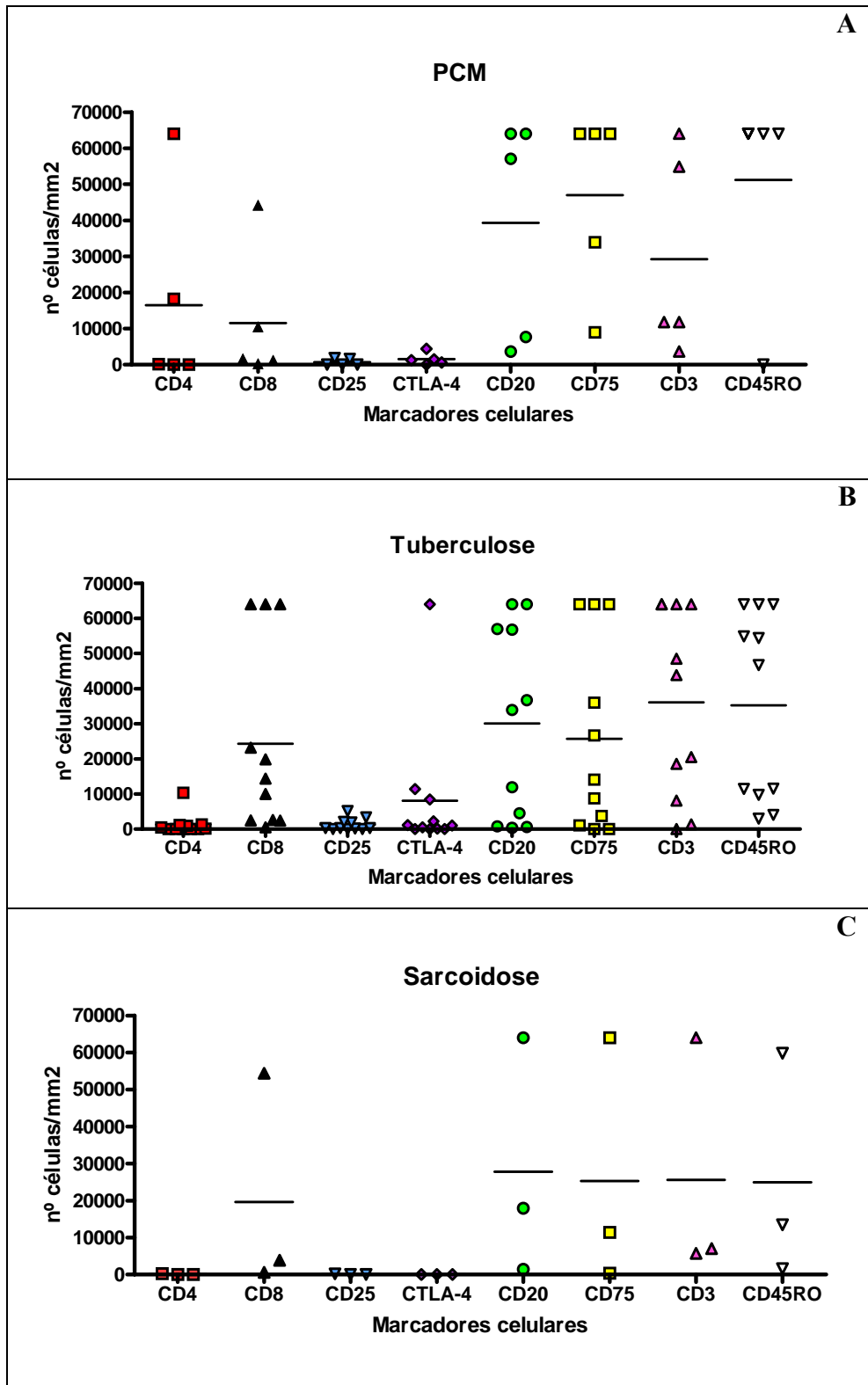


Figura 7: Análise comparativa da média de células por mm² em lesões de pacientes com paracoccidioidomicose (A), tuberculose (B) e sarcoidose (C). Os valores apresentados representam a soma dos 3 campos analisados/mm².

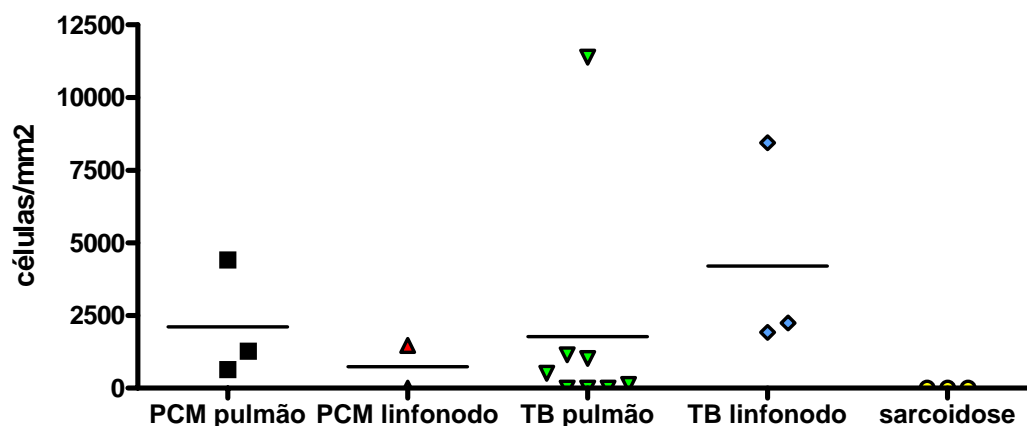


Figura 8: Análise comparativa da média de células por mm² em lesões de pacientes com paracoccidiodomicose, tuberculose e sarcoidose. Os valores apresentados representam a expressão de CTLA-4 com o tecido analisado.

4.3 - Análise comparativa dos diferentes tipos celulares nas lesões de Paracoccidiodomicose, Tuberculose e Sarcoidose

A análise imuno-histoquímica dos marcadores moleculares das doenças paracoccidiodomicose, tuberculose e sarcoidose, quando correlacionadas entre si, não revelaram expressão significativa em uma doença específica. Porém, ao comparar as células CD4⁺, com a expressão dos outros marcadores moleculares em cada doença isoladamente, foi possível observar na paracoccidiodomicose, que as células TCD4⁺ que apresentaram uma expressão dos marcador CD45RO (p = 0,0379) obtiveram maior correlação se comparados com os marcadores CD25 (p = 0,1306) e CTLA-4 (p = 0,1549).

O mesmo foi observado na tuberculose, onde o marcador CD45RO (p = 0,0007) foi mais significativo em células TCD4⁺ se comparados aos marcadores CD25 (p = 0,3326) e CTLA-4 (p = 0,1615). Assim, a correlação observada entre as células CD4⁺ e

CD45RO⁺ na paracoccidiodomicose e tuberculose, foi mais significativa se comparado com a sarcoidose, como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8: Teste t de Student entre a população de linfócitos CD4⁺ e os marcadores moleculares CD8, CD25, CTLA-4, CD20, CD75, CD3 e CD45RO.

Células CD4⁺	Paracoccidiodomicose	Tuberculose	Sarcoidose
CD25	p = 0,1306	p = 0,3326	p = 0,4422
CTLA-4	p = 0,1549	p = 0,1615	p = 0,2113
CD45RO	p = 0,0379	p = 0,0007	p = 0,1485

O marcador molecular CD75, específico de células B, tanto na Pbmicose (p = 0,0466) quanto na tuberculose (p = 0,0053), obteve uma correlação positiva com células CD4⁺. A mesma correlação pode ser observada para o marcador CD20. (Tabela 9)

Tabela 9: Teste t de Student entre a população de linfócitos CD4⁺ e os marcadores moleculares CD8, CD25, CTLA-4, CD20, CD75, CD3 e CD45RO.

Células CD4⁺	Paracoccidiodomicose	Tuberculose	Sarcoidose
CD20	p = 0,1909	p = 0,0022	p = 0,1388
CD75	p = 0,0466	p = 0,0053	p = 0,1644

As células que expressaram CTLA-4 obtiveram o mesmo perfil das células CD25⁺ na tuberculose e na paracoccidiodomicose. Ao comparar a expressão dos marcadores CD25 e CTLA-4, com as células CD3⁺ e CD45RO⁺, foi possível observar uma significativa correlação entre essas populações celulares, ao contrário do que

ocorreu com as populações de células CD4⁺ e CD8⁺. Especificamente na tuberculose, houve uma correlação entre as células CD4⁺ e CD8⁺ (p = 0,006). (Tabela 10)

Tabela 10: Teste t de Student entre a população de linfócitos CD25⁺ e CTLA-4⁺ com os marcadores moleculares CD4, CD8, CD20, CD75, CD3 e CD45RO.

Células CD25⁺ e CTLA-4⁺	Paracoccidiodomicose	Tuberculose	Sarcoidose
CD4	p ₁ = 0,1306	p ₁ = 0,3326	p ₁ = 0,4422
	p ₂ = 0,1549	p ₂ = 0,1615	p ₂ = 0,2113
CD8	p ₁ = 0,1272	p ₁ = 0,0072	p ₁ = 0,1620
	p ₂ = 0,1559	p ₂ = 0,0065	p ₂ = 0,1622
CD3	p ₁ = 0,0414	p ₁ = 0,0006	p ₁ = 0,1568
	p ₂ = 0,0509	p ₂ = 0,0005	p ₂ = 0,1570
CD45RO	p ₁ = 0,0080	p ₁ = 0,0007	p ₁ = 0,1474
	p ₂ = 0,0089	p ₂ = 0,0012	p ₂ = 0,1476

p₁ = referente ao marcado CD25

p₂ = referente ao marcador CTLA-4

Na Pbmicose, a expressão de CD8 juntamente com a população de células CD45RO⁺ (p = 0,0177), obteve maior significado se comparado com a expressão deste mesmo marcador na tuberculose (p = 0,1413), porém na tuberculose foram encontradas células CD8⁺CD25⁺ (p = 0,0072) e células CD8⁺CTLA-4⁺ (p = 0,0066). (Tabela 11)

Tabela 11: Teste t de Student entre a população de linfócitos CD8⁺ e os marcadores moleculares CD4, CD25, CTLA-4, CD20, CD75, CD3 e CD45RO.

Células CD8⁺	Paracoccidioidomicose	Tuberculose	Sarcoidose
CD25	p = 0,1272	p = 0,0072	p = 0,1620
CTLA-4	p = 0,1559	p = 0,0065	p = 0,1622
CD45RO	p = 0,0177	p = 0,1413	p = 0,1782

A expressão do marcador CD3 foi mais significativo entre as células CD25⁺ e CTLA-4⁺, contudo, na tuberculose as células CD4⁺ apresentaram relevância para sua expressão (p = 0,006) e na Pbmicose as células CD8⁺ apresentaram correlação positiva com o marcador CD3 (p = 0,0075). (Tabela 12)

Tabela 12: Teste t de Student entre a população de linfócitos CD3⁺ com os marcadores moleculares CD4, CD8, CD25, CTLA-4, CD20, CD75 e CD45RO.

Células CD3⁺	Paracoccidioidomicose	Tuberculose	Sarcoidose
CD4	p = 0,1537	p = 0,0006	p = 0,1580
CD8	p = 0,0075	p = 0,0872	p = 0,1396
CD25	p = 0,0414	p = 0,0006	p = 0,1568
CTLA-4	p = 0,0509	p = 0,0005	p = 0,1570

A correlação entre as células CD4⁺ e CD8⁺ foi observada apenas na Tuberculose (p = 0,0066) e não foi observada significância entre as células CD4⁺CD25⁺ com a expressão de CTLA-4, em nenhuma das doenças analisadas.

Na Sarcoidose não foi observada correlação significativa entre os marcadores celulares e também não foram observadas diferenças significativas entre a expressão dos mesmos, se comparados com as outras células.

Não foi observada a expressão específica de um marcador em isolado entre as três doenças analisadas. (Tabela 13)

Tabela 13: Expressão específica entre os marcadores moleculares CD4, CD8, CD25, CTLA-4, CD20, CD75, CD3 e CD45RO e as doenças Paracoccidioidomicose, Tuberculose e Sarcoidose.

Expressão específica	Paracoccidioidomicose / Tuberculose/ Sarcoidose
CD4	P = 0,1406
CD8	p = 0,6471
CD25	p = 0,5695
CTLA-4	p = 0,4974
CD20	p = 0,8075
CD75	p = 0,3531
CD3	p = 0,8085
CD45RO	p = 0,4074

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a presença das populações de linfócitos, através de diferentes marcadores celulares, incluindo as células T regulatórias em doenças granulomatosas crônicas como a Paracoccidioidomicose, Tuberculose e Sarcoidose.

A Paracoccidioidomicose, assim como outras doenças fúngicas, depende da interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro para evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando granulomatose crônica (DEFAVERI *et al*, 1989).

Foram encontradas nos granulomas de Pbmicose, subpopulações celulares de linfócitos $TC4^{+}CD45RO^{+}$ e uma maior correlação entre as células $CD8^{+}CD3^{+}CD45RO^{+}$ se comparadas às células $CD4^{+}$. O aumento da expressão de $CD45RO$ reflete a ativação celular em resposta a presença do fungo nos pulmões e, além disso, a maior expressão de grânulos citotóxicos pelos linfócitos T $CD8^{+}$ indica um potencial citolítico frente às células infectadas pelo fungo (CAVASSANI *et al*, 2006).

O controle desse tipo de infecção depende da resposta imune celular efetiva, geralmente associada ao tipo Th1, caracterizado pela síntese de citocinas que ativam macrófagos e linfócitos $TC4^{+}$ e $TC8^{+}$, resultando na formação de granulomas compactos. A organização desta resposta imune permite o controle da replicação do fungo, porém formas quiescentes podem persistir no interior do granuloma. Pacientes infectados que desenvolvem a doença apresentam depressão da resposta Th1, correlacionando sua gravidade (SHIKANAI-YASUDA *et al*. 2006).

Não foi possível observar a população de células $TC4^{+}CD25^{+}CTLA-4^{+}$ nas lesões de Pbmicose. Porém, Cavassani e colaboradores, observaram que células

TCD4⁺CD25⁺ que expressam CTLA-4 e outros marcadores incluindo o CD45RO estão acumuladas nas lesões induzidas por *Paracoccidioides brasiliensis* e que das células que exibem o fenótipo celular CD3⁺CD4⁺, cerca 3,5% destas células expressam CD25⁺.

A relação entre a imunidade celular e a evolução do granuloma na Pbmicosose é ainda evidenciada por estudos realizados sobre a infecção por *P. brasiliensis* em humanos ou experimentalmente induzida, nas quais ocorrem duas formas polares das manifestações clínicas da paracoccidioidomicose crônica: (1) a forma benigna, caracterizada por infecção localizada, baixo níveis de anticorpos específicos, resposta imune celular persistente com histopatologia apresentando granuloma epitelióide compacto com poucos fungos; (2) a forma severa, na qual ocorre uma infecção disseminada, altos níveis de anticorpos específicos, resposta imune celular deprimida apresentando inflamação granulomatosa confluyente e supurativa com uma área extensa de necrose e grande número de células fúngicas (LACAZ *et al.*, 1982; FRANCO *et al.*, 1993).

Assim, foi possível observar uma alta expressão de estruturas fúngicas sugestivas de *P. brasiliensis*, tanto nas biópsias de pulmão quanto nas biópsias de linfonodo, caracterizando a formação granulomatosa com predominância de um infiltrado neutrofílico.

A importância das subpopulações de linfócitos T infiltrados no granuloma foi avaliada por Utiel (1998). Camundongos tratados com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 apresentavam alterações no padrão granulomatoso. As lesões observadas nos animais tratados com anti-CD4 eram frouxas e difusas, com macrófagos e monócitos imaturos apresentando grande número de células fúngicas. Nos camundongos tratados com anticorpos anti-CD8, os granulomas apresentavam-se bem definidos e com fagócitos diferenciados e também apresentavam grande quantidade de fungo. Assim, sugeriu-se

que embora o granuloma possa resultar da interação do macrófago com constituintes do fungo, sua evolução é determinada pelos linfócitos T, sendo que os linfócitos CD4⁺ promoveriam a diferenciação e ativação dos fagócitos mononucleares e os linfócitos CD8⁺ contribuiriam para a eliminação do fungo. Um estudo posterior corroborou e complementou o trabalho de Utiel (1998), pois demonstrou que independentemente da susceptibilidade da linhagem do camundongo à infecção com o fungo (resistente ou suscetível), os linfócitos CD8⁺ estavam envolvidos na destruição e no controle da disseminação do fungo para tecidos extra pulmonar. Ademais, essas células parecem exercer um efeito na supressão da resposta DTH em animais suscetíveis, entretanto não foi observado efeito significativo na formação da lesão granulomatosa e na produção de anticorpos específicos, em nenhuma das linhagens analisada (CANO et al., 2000).

Com relação à tuberculose, os fenótipos celulares encontrados seguiram o mesmo padrão da paracoccidiodomicose. Células CD8⁺CD3⁺CD45RO⁺ obtiveram expressão significativa e ainda encontramos subpopulações de linfócitos TCD8⁺CD25⁺ e linfócitos TCD8⁺CTLA-4⁺.

Apesar de não ter sido observada população de células TCD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺, Kirman e colaboradores analisaram pacientes com tuberculose ativa que possuíam uma porcentagem mais elevada de células TCD25⁺ dentro da população de células TCD4⁺. Contudo, o que se demonstra, é que a expressão de CTLA-4 em pacientes com tuberculose é baixa, ou seja, sua expressão decresce em pacientes com doença ativa se comparados com pacientes reatores à tuberculina e saudáveis.

Uma infecção por fungos ou micobactérias não ocorre diretamente pelo reconhecimento dos linfócitos T citotóxicos, mas sim pela extrema participação dos linfócitos do tipo Th1 que fazem o reconhecimento nas células apresentadoras de antígenos e liberam citocinas estimuladoras de linfócitos T. Com a ativação dos

linfócitos Th1 ocorre também a estimulação para a formação de um clone de células de memória específico para o antígeno que vai permanecer sempre no organismo e se manifestar numa resposta imune secundária. Na Tuberculose, formas mais graves evoluem com o predomínio da resposta imunológica Th2, onde ocorre uma maior ativação de linfócitos B, hipergamaglobulinemia e altos títulos de anticorpos específicos, cuja magnitude se correlaciona com a gravidade e disseminação da doença. Isto fica indicado pela queda do número de linfócitos TCD4 nos pacientes graves (SHIKANAI-YASUDA *et al.* 2006). Estes dados podem justificar o aumento de linfócitos CD8 se comparados aos linfócitos CD4, especificamente na tuberculose.

Estudos prévios ainda demonstraram a importância de perfis distintos de citocinas produzidas e/ou induzidas por linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos na resposta inflamatória granulomatosa a patógenos intracelulares, sendo que um perfil dominado por citocinas tipo 1 promoveria a organização do granuloma enquanto citocinas do tipo 2 a sua neutralização (CHENSUE *et al.*, 1994; KUNKEL *et al.*, 1996).

Já os dados observados na sarcoidose, não foi possível obter uma correlação significativa com as subpopulações celulares, se comparados com os dados na paracoccidiodomicose e tuberculose. Porém, a coincidência histopatológica entre doenças fúngicas como paracoccidiodomicose e doenças granulomatosas como a sarcoidose conduz à pergunta se a sarcoidose está baseada em um agente etiológico infeccioso possivelmente não identificado. Na literatura não foi encontrado dados a respeito desta hipótese, exceto um estudo feito por Judd, em 1975, que descreve um exemplo de sarcoidose em preparações histológicas em que se tentou de mostrar possíveis agentes infecciosos. Entretanto, não foi demonstrado necrose nos granulomas que poderiam ser iniciados por micobactérias, fungos ou outros microrganismos (COSTABEL, 2007).

Miyara *et al* (2006) observaram que células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ se acumulam na periferia dos granulomas e no sangue periférico dos pacientes com sarcoidose ativa, contudo, ocorre um acúmulo de células TCD4⁺ do tipo Th1 e macrófagos no local da inflamação, principalmente nos pulmões.

Na sarcoidose, os macrófagos mostram uma expressão realçada com o complexo de histocompatibilidade do tipo II (MHC classe II) e outras moléculas acessórias co-estimulatórias, sendo que essa função acessória é mediada pela expressão de CD54 e CD80. Estes macrófagos reconhecem, processam e apresentam o antígeno aos linfócitos Th1 e após sua ativação liberam IL-12 que estimula a liberação de IFN- γ recrutando mais células T. As células T ativadas liberam por sua vez IL-2 e fatores quimiotáticos para monócitos, conduzindo um recrutamento adicional de macrófagos e monócitos para o local da inflamação (COSTABEL, 2007, CHEN, MOLLER, 2007).

O IFN- γ é importante para a transformação de macrófagos em células gigantes e citocinas próinflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α que são essenciais para a manutenção do granuloma, visto que a citocina IL-10, considerada anti-inflamatória é diminuída nos casos de sarcoidose (COSTABEL, 2007). A formação dos mecanismos adjacentes, a manutenção e a definição espontânea dos granulomas na sarcoidose são ainda mal compreendidas, representando um paradoxo imunológico não resolvido (MIYARA *et al.* 2006).

Foram observados poucos eosinófilos nos granulomas das três doenças analisadas. A expressão de eosinófilos varia de acordo com o tipo de doença e o patógeno relacionado, por exemplo, as células inflamatórias nos granulomas que atacam e destroem o miracídio na infecção por *Schistosoma mansoni*, causam reação inflamatória. Os vermes e ovos provocam reação de hipersensibilidade do tipo I, o que atrai os eosinófilos, que são as células inflamatórias mais relacionadas à defesa contra

metazoários. É bem conhecido que pacientes portadores de helmintíases intestinais tendem a apresentar eosinofilia sanguínea. Ocasionalmente estes eosinófilos podem ser numerosos, relacionados a um verme necrótico, porém não há informações se os vários tipos de granulomas, com morfologia variável conforme o tempo da infecção e conforme o órgão em que estão localizados, possuem correlação com maior ou menor atividade funcional deste tipo de célula (BOROS, 1986; CHENSUE et al., 1991).

Os granulomas analisados neste trabalho não apresentaram características específicas de células Treg CD4⁺. Porém, foi demonstrada a presença de uma outra subpopulação de células Treg CD8⁺.

Células T regulatórias CD8⁺ são expandidas por antígenos *in vivo* e podem ser detectadas em tecidos humanos infectados por patógenos, sendo implicadas em doenças infecciosas, particularmente nas infecções crônicas ou persistentes. O conhecimento deste tipo celular, se comparado com células Treg CD4⁺, ainda é escasso (JOOSTEN *et al.*, 2007).

A modulação espontânea ou regulação do granuloma é, em parte, mediada por células T CD4⁺ e CD8⁺. Alguns estudos demonstraram que, durante a fase crônica da infecção, a modulação da resposta granulomatosa é acompanhada por um aumento da atividade de células T supressoras CD8⁺ e diminuição de células T CD4⁺ (BOROS et al., 1975; BOROS, 1986).

As células CD8⁺CD25⁺CTLA-4⁺ foram observadas apenas na tuberculose, pois o *Mycobacterium tuberculosis*, pode induzir células Tregs durante a resposta Th1 promovendo a persistência da infecção. Assim, as infecções por micobactérias podem fornecer um modelo altamente relevante para descrever papéis imunoregulatórios em seres humanos (JOOSTEN *et al.*, 2007).

O grande número de marcadores celulares gerados contra moléculas presentes em linfócitos T permite identificar subpopulações de células efetoras, assim como, diferentes estágios de ativação e de maturação. O melhor marcador para linfócitos T totais é o CD3, uma vez que se refere a um complexo molecular associado aos receptores específicos (TCRs). Além de exclusivo de linfócitos T, encontra-se presente em todas as subpopulações de células T maduras. A caracterização de linfócitos CD3⁺, geralmente inclui a quantificação das subpopulações CD4⁺, comumente referida como auxiliar (Th = T helper) e CD8⁺, que apresenta propriedades citotóxicas (Tc) (JOOSTEN *et al.*, 2007). Deste modo, podemos observar a presença significativa de células CD3⁺CD45RO⁺ nas doenças analisadas.

Sendo assim, a presença de células CD45RO⁺ encontradas nos granulomas de paracoccidiodomicose e tuberculose, pode estar associada à gravidade do quadro destas doenças, pois a presença deste marcador modula a resposta inflamatória, mediada por citocinas e ativação de macrófagos (ALKIM *et al.*, 2007).

Em função de questões históricas, a atividade das células T regulatórias sempre foi associada exclusivamente ao controle da autoimunidade, em outras palavras, apenas um mecanismo adicional na manutenção da tolerância ao próprio. Entretanto, os avanços na caracterização dessas células – fenotípica e funcionalmente – vêm demonstrando que o seu papel é muito mais amplo do que se pensava. As células Tregs parecem estar relacionadas ao controle da resposta imune de uma forma mais ampla, modulando a amplitude da resposta, tanto na fase de expansão quanto na de constrição (ALMEIDA *et al.*, 2005; SAKAGUCHI, 2004). Essa atividade pode ser muito útil ao controlar a autorreatividade, por exemplo, mas pode também ser deletéria, ao impedir a eliminação completa de patógenos e promover a cronificação de doenças infecciosas (BELKAID *et al.*, 2002).

Apesar da dupla marcação $CD4^+CD25^+$ ser utilizada pela grande maioria dos pesquisadores como específica das células Treg, vários trabalhos têm demonstrado que células que não expressam a cadeia α do receptor da IL-2 (CD25), também podem ter atividades imunossupressoras.

Para compreender a possível importância da relação entre células reguladoras e doenças granulomatosas será necessário analisar os mecanismos imunológicos envolvidos, bem como os possíveis mecanismos de ação das várias células com função reguladora. Outras células, além das $CD4^+CD25^+$ com propriedades regulatórias, como por exemplo, as células $CD8^+CD28^-$, células NK, células $CD4^-CD8^-$ e células B têm sido implicadas em mecanismos de regulação (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2002). Portanto, uma análise adicional de outros marcadores de superfície será essencial para caracterizar outras subpopulações de células T regulatórias em humanos.

6. CONCLUSÕES

- Foram identificadas populações celulares com o fenótipo $CD3^+CD45RO^+$ tanto na Pbmicose quanto na Tuberculose;
- Os dados observados de Sarcoidose não apresentaram correlação significativa com as subpopulações celulares, se comparadas com a Pbmicose e Tuberculose;
- Não foram observadas células com o fenótipo $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$, porém na tuberculose foram encontradas células $CD8^+CD25^+CTLA-4^+$, principalmente nas lesões de linfonodo;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580p.
- Alkim C, Balci M, Alkim H, Dağlı U, Parlak E, Tezel A, Ülker A. The importance of peripheral immune cells in inflammatory bowel disease. **Turk J Gastroenterol**.2007; 18: 82-88.
- Almeida AR, Rocha B, Freitas AA, Tanchot C. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. **Semin Immunol**. 2005; 17:239-249.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**. 2002; 420:502-507.
- Bluestone JA, Tang Q. How do CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control autoimmunity? **Curr Opin Immunol**. 2005; 17:638-642.
- Bogliolo L, Brasileiro Filho G. *Patologia*. 6^a edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.
- Boros DL, Pelley RP & Warren KS. Spontaneous Modulation Of Granulomatous Hypersensitivity In Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.**, 114: 1437, 1975.
- Boros DL. Immunoregulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni **Ann. N.Y. Acad. Sci. USA**. 1986; V 465, p 313.
- Bras SL, Geha RS. IPEX and the role of FOXP3 in the development and function of human Tregs. **J Clin Invest**. 2006; 116: 1473-1475.
- Brito T & Franco MF. Granulomatous inflammation. **Rev Inst Med Trop**. 1994; 36: 185-192.
- Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: An update. **Clin Microbiol Rev**. 1993; 6:89-117. Review.
- Cano L E, Singer-Vermes LM, Costa TA, Mengel J O, Xidieh CF, Arruda C, *et al*. Depletion of CD8(+) T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infect Immun**. 2000; 68: 352-359.
- Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, Martinez R, Silva JS. Systemic and Local Characterization of Regulatory T Cells in a Chronic Fungal Infection in Humans. **J Immunol**. 2006; 177: 5811-5818.
- Chen ES, Moller DR. Expression profiling in granulomatous lung disease. **Proc Am Thorac Soc**. 2007; 4:101-7.

- Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. **Clin Immunol.** 2007; 123: 50-59.
- Chensue SW, Warmington K, Ruth J, *et al.* Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation: production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of TNF. **Am J Pathol.** 1994; 145:1105-1114.
- Costabel U. Sarcoidosis: clinical update. **Eur Respir J Suppl.** 2001;32:56s-68s.
- Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. **Curr Opin Immunol.** 2002; 14: 771-8.
- Defaveri J, Martin LC, Franco M. Histological and ultrastructural study of the inflammation evoked by *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in previously immunized mice. **Mycopathologia.** 1989;105:53-8.
- Essayag SM, Landaeta ME, Hartung C, Magaldi S, Spencer L, Suárez R, Garcia F, Pérez E. Histopathologic and histochemical characterization of calcified structures in hamsters inoculated with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses.** 2002;45:351-357.
- Fenhalls G, Stevens L, Bezuidenhout J, Amphlett GE, Duncan K, Bardin P, Lukey PT. Distribution of INF- γ , IL-4 and TNF- α protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. **Immunology.** 2002;105:325-35.
- Foussat A, Cottrez F, Brun U, Fournier N, Breitmayer JP, Groux H. A Comparative Study between T Regulatory Type 1 and CD4⁺CD25⁺T Cells in the Control of Inflammation. **J Immunol.** 2003; 171:5018-5026.
- Franco M, Peraçoli MTS, Soares AMVC *et al.* - Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr Top med Mycol.** 1993; 5: 115-149.
- Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T Cells Are Expanded in Blood and Disease Sites in Patients with Tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.** 2006; 173: 803-810.
- Joosten SA, van Meijgaarden K, Savage ND, Boer T, Triebel F, van der Wal A, Heer E, Klein MR, Geluk A, Ottenhoff THM. Identification of a human CD8⁺ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007;104:8029-34.
- Kunkel EJ, Jung U, Bullard DC, Norman KE, Wolitzky BA, Vestweber D, Beaudet AL, Ley K. Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. **J Exp Med.** 1996;183:57-65.
- Lacaz CS. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história. In: *Paracoccidioidomicose-Blastomicose sul-americana* (C. S. Lacaz, G. D. Del Negro, A. M. Fiorillo) 1982. pp. 1-9, São Paulo: Editora Sarvier – Edusp.

- McEween JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar MF, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induce by inhalation of conidia. **J Med Vet Mycol** 1987; 25: 165– 169.
- Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Kambouchner M, Valeyre D, Chapelon-Abric C, Debré P, Piette J-C, Gorochov G. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. **J Exp Med**. 2006; 203: 359-370.
- Moller DR .Potential etiologic agents in sarcoidosis. **Proc Am Thorac Soc**. 2007; 4:465-8.
- Nishioka T, Shimisu J, Iida R, Yamazaki S, Sakaguchi S. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T Cells and CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺T Cells in Aged Mice. **J Immunol**. 2006; 176: 6586-6593.
- Novelli MD, Corrêa L, Nacao M, Borra RC. PatoArteGeral. São Paulo : SDO, 1993. Apostila didática.
- Pillai V, Ortega SB, Wang CK, Karandikar NJ. Transient regulatory T-cells: A state attained by all activated human T-cells. **Clin Immunol**.2007; 123: 18-29.
- Pyzik M, Piccirillo CA. TGF-β1 modulates Foxp3 expression and regulatory activity in distinct CD4⁺ T cell subsets. **J Leukoc Biol**.2007; 82: 335-346.
- Quezada AS, Peggs KS, Curran MA, Allison JP. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. **J Clin Invest**. 2006; 116: 1935-1945.
- Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. **J Immunol**. 2002; 168: 4620-4627.
- Robbins, M. D. Patologia Estrutural e Funcional. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251 p.
- Romani, L. The T cell response against fungal infections. **Curr Opin Immunol**. 1997; 9: 484-490.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**. 2004; 22:531-562.
- Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2006;39:297-310.
- Teirstein AS, Judson MA, Baughman RP, Rossman MD, Yeager H Jr. The spectrum of biopsy sites for the diagnosis of sarcoidosis. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis**. 2005; 22:139-46.

- Utiel PV. Participação de células TCD4⁺ e células e TCD8⁺ na Paracoccidioidomicose experimental. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1998.
- Van Furth R. Origin and kinetics of monocytes and macrophages. **Sem Hematol.** 1970; v.7, p.125-130.
- Williams, G. T., W. J. Williams. Granulomatous inflammation-a review. **J Clin Pathol.** 1983; 36:723-733.
- Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. The Phenotypic Characterization of Naturally Ocurring Regulatory CD4⁺CD25⁺T Cells. **Cell Mol Immunol.** 2006;3:189-195.
- Zhang C, Zhang J, Tian Z. The regulatory effect of natural killer cells: do "NK-reg cells" exist? **Cell Mol Immunol.** 2006;3:241-54.

ANEXOS

Abreviações:

Treg: Células T regulatórias

Th1: Células T helper(auxiliares) tipo 1

Th2: Células T helper(auxiliares) tipo 1

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α

IFN- γ : Interferon γ

APC: Célula Apresentadora de Antígenos

CTL: Linfócitos Citolíticos

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

GITR: Receptor de Glucocorticóide induzido pelo Fator de Necrose Tumoral

TCR: Receptor de Linfócitos T

PCM: Paracoccidiodomicose

TB: Tuberculose