



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE  
IL-17 (TH17) NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA: EFEITO  
DO TRATAMENTO COM IL-17 E IL-23 SOBRE A ATIVIDADE  
FUNGICIDA E CAPACIDADE MIGRATÓRIA DE NEUTRÓFILOS

Munir Regini Paião

Campinas - 2012







---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE  
IL-17 (TH17) NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA: EFEITO  
DO TRATAMENTO COM IL-17 E IL-23 SOBRE A ATIVIDADE  
FUNGICIDA E CAPACIDADE MIGRATÓRIA DE NEUTRÓFILOS

Munir Regini Paião

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas - UNICAMP para  
obtenção de título de Mestre em  
Ciências Médicas, área de concentração  
em Ciências Biomédicas. Sob  
orientação do Prof. Dr. Ronei Luciano  
Mamoni e Coorientação da Profa. Dra.  
Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Campinas - 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

P152a      Paião, Munir Regini, 1983 -  
Avaliação da participação de células produtoras de IL-17 (TH17) na paracoccidioidomicose humana: efeito do tratamento com IL-17 e IL-23 sobre a atividade fungicida e capacidade migratória de neutrófilos. / Munir Regini Paião. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Ronei Luciano Mamoni  
Coorientador: Maria Heloisa de Souza Lima Blotta  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Citocinas. 3. Inflamação. 4. Moléculas de Adesão Celular. 5. Migração Celular. I. Mamoni, Ronei Luciano. II. Blotta, Maria Heloisa de Souza Lima. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. VI. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Evaluation of the participation of IL-17 producing Tcells (TH17) in human paracoccidioidomycosis: effect of the treatment with IL-17 and IL-23 on fungicidal activity and migratory capacity of neutrophils

**Palavra-chave em inglês:**

*Paracoccidioides brasiliensis*

Cytokines

Inflammation

Adhesion Molecules

Cellular Migration

**Área de Concentração:** Ciências Biomédicas

**Titulação:** Mestre em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Ronei Luciano Mamoni [Orientador]

Sandro Rogério de Almeida

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

**Data da defesa:** 30-01-2012

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

---

# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

## Munir Regini Paião

---

---

Orientador: Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni

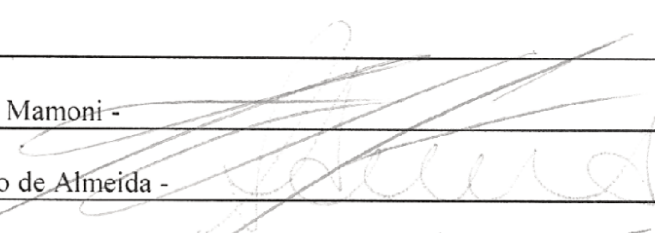
Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta

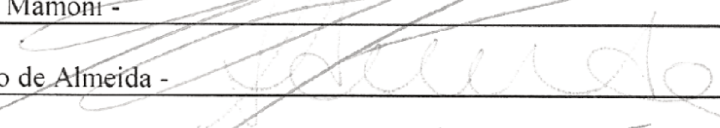
---

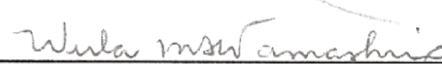
---

### Membros:

---

1. Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni - 

2. Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida - 

3. Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro - 

---

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 30/01/2012

---



Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) .



## ***DEDICATÓRIA***

A Deus, pela sua presença e amor incondicional e aos meus pais, pela educação dada através de seus padrões de ética, de moral e de religiosidade, e que sempre foram fundamentais para minha formação.

Sem eles, nada disso seria possível.





## AGRADECIMENTOS

---

A Deus por ter me dado saúde e motivação para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as necessidades.

À minha família, em especial meu pai, minha mãe e irmã, que são e sempre serão meus melhores amigos, os quais amo muito pelo carinho, paciência e incentivo. Sempre me apoiando em meus estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni, por acreditar em mim, me orientar no projeto de maneira incomparável a qualquer outra pessoa que já conheci na pesquisa, por suas críticas, sua ética, sendo deste modo, um exemplo de profissional a ser seguido como modelo e ser respeitado por sua inteligência, conhecimento e acima de tudo sua humildade.

À Dra. Maria Heloísa Souza Lima Blotta, que me recebeu em seu laboratório desde a época de graduação. Sendo minha coorientadora nesse trabalho, sem dúvida, uma pessoa que contribuiu para o meu crescimento profissional.

Aos amigos próximos e também distantes que fizeram parte de diversos momentos ao longo do trabalho. Sempre lembrarei por terem feito parte dessa importante fase de minha vida.

À Rosiane Maria da Silva pela realização das reações de imunohistoquímica descritas nessa dissertação.

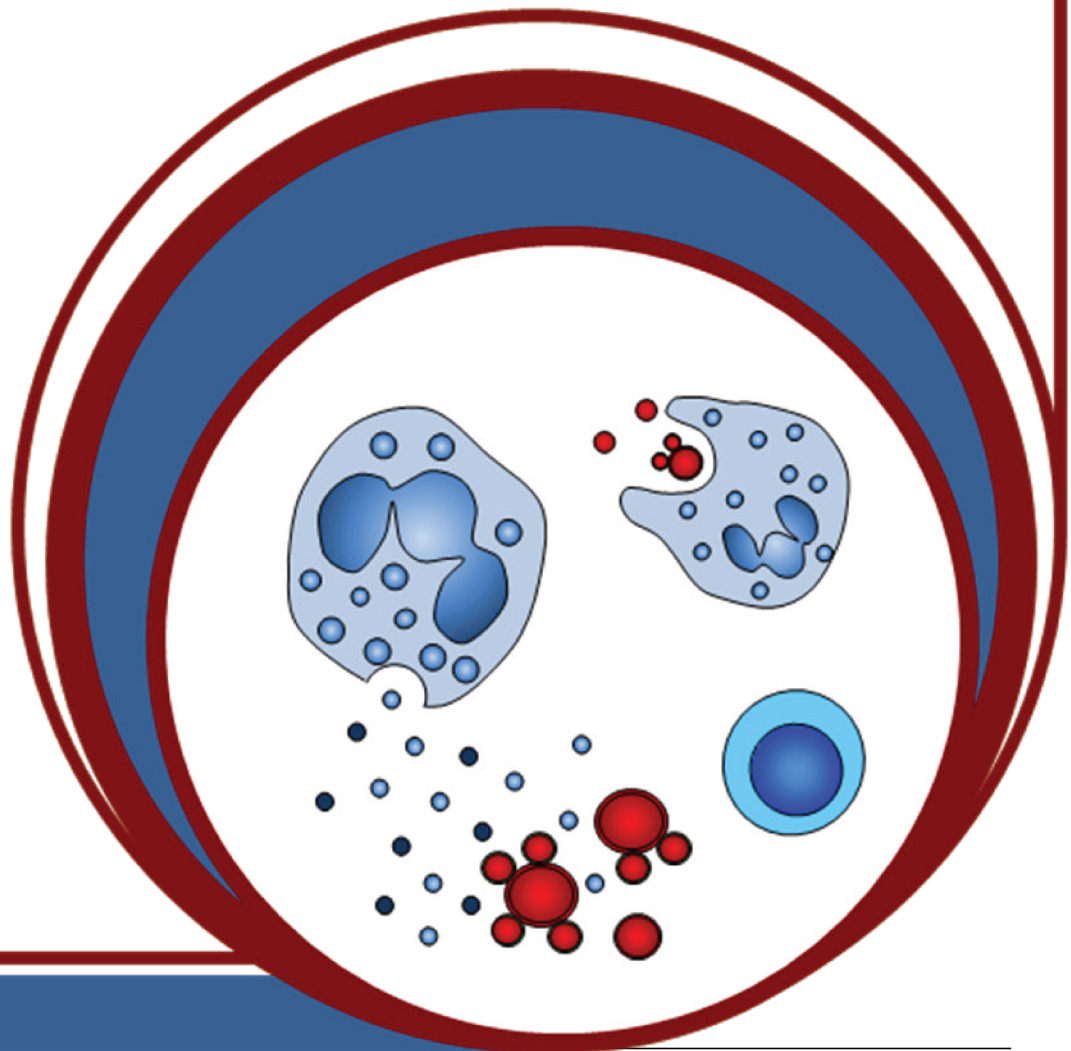
Aos meus colegas de laboratório: Carol, Larissa, Fernanda, Marcela, Eliane, Rosiane, Fábio e Rômulo que me ensinaram as técnicas essenciais para a realização do trabalho, pelo convívio, amizade e participação direta nesse

trabalho, me ajudando em todos os momentos. Aos colegas do CIPOI: Marcinha, Carol e Ângelo pela ajuda e permissão do uso de alguns equipamentos de seus laboratórios. A Luzia e Edson, por todas as vezes que me cederam os fungos para os experimentos.

Aos membros da banca de avaliação: Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro, Dr. Sandro Rogério de Almeida e Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto pelas correções e sugestões de modificação, que contribuíram para a melhoria desse trabalho.

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

# ***RESUMO***



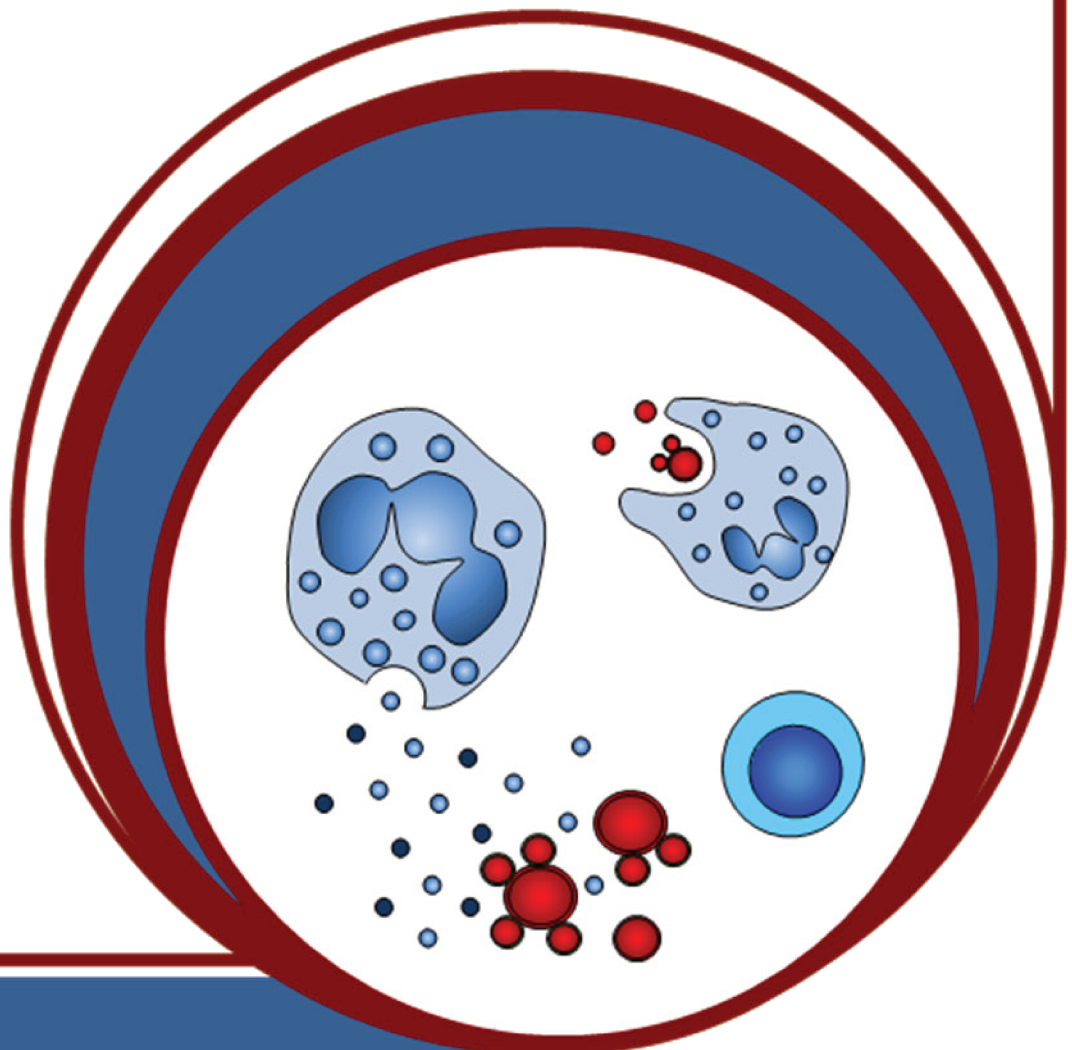


## RESUMO

A participação de células produtoras de IL-17 (Th17) na resposta imunológica contra infecções causadas por fungos tem sido recentemente objeto de grande interesse. A principal função da IL-17 é a ativação e atração de neutrófilos para o local de infecção. Lesões de pacientes com paracoccidioidomicose (PCM), a micose sistêmica mais importante no Brasil, são caracterizadas por um infiltrado inflamatório rico em neutrófilos. Entretanto, neutrófilos de pacientes com PCM apresentam uma resposta fungicida diminuída, quando comparada à observada em indivíduos saudáveis. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do tratamento com IL-17 e IL-23 sobre a atividade fungicida, bem como sobre a capacidade migratória e inflamatória de neutrófilos. Neutrófilos de indivíduos saudáveis e de pacientes com a forma adulta multifocal da doença foram isolados e estimulados com citocinas recombinantes (rh-IL17 e/ou rh-IL23). Após o estímulo as células foram avaliadas quanto a expressão de receptores de quimiocinas (CXCR1 e CXCR2) e moléculas de adesão (CD54 e CD62L). Os neutrófilos também foram avaliados quanto a sua capacidade de adesão em Células Endoteliais Pulmonares Humanas (HLEC), sua resposta migratória a diferentes concentrações de CXCL8 e sua capacidade fungicida, e sobre a produção de  $H_2O_2$ , matriz metaloproteinase 9 (MMP-9) e citocinas inflamatórias (IL-6,  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$ ). Os resultados demonstraram que células estimuladas com IL-17 e/ou IL-23 apresentaram uma expressão aumentada de receptores de quimiocina e moléculas de adesão, associadas com uma capacidade aumentada de adesão e migração. Além disso, observamos que neutrófilos estimulados com ambas as citocinas exibiram uma

atividade antifúngica diminuída relacionada com produção diminuída de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ao lado de uma produção aumentada de MMP-9, IL-6 e IL-1 $\beta$ . Os dados obtidos nos permitem concluir que citocinas relacionadas à resposta Th17 (IL-17 e IL-23) podem desempenhar um papel importante na contenção da infecção causada pelo *P. brasiliensis*, uma vez que predominam em sua forma mais branda e localizada, a forma adulta. Essas citocinas poderiam atuar de forma semelhante àquela observada em outras infecções fúngicas, induzindo uma resposta inflamatória local e ativando células do sistema imunológico inato. Apesar de sua importância, a produção crônica dessas citocinas, e sua atuação sobre os neutrófilos, podem induzir uma resposta inflamatória exacerbada que em última instância seria responsável pela destruição tecidual observada principalmente nas formas crônicas da doença.

# ***ABSTRACT***







## ABSTRACT

The participation of IL-17 producing cells in the immune response to fungi has been recently described. The main function of IL-17 is the activation and attraction of neutrophils to infection sites. Lesions of patients with paracoccidioidomycosis (PCM), the most important systemic mycosis in Brazil, are characterized by an inflammatory infiltrate rich in neutrophils, that shows an impaired fungicidal activity when compared to cells from healthy individuals. The aim of this study was to evaluate the effect of IL-17 and IL-23 on the fungicidal activity, as well as on the migratory and inflammatory ability of neutrophils. Neutrophils from healthy controls and patients with the multifocal adult form of PCM were isolated and stimulated with rhIL-17 and/or rhIL-23. Stimulated cells were evaluated for their expression of chemokine receptors (CXCR1 and CXCR2), and adhesion molecules (CD54 and CD62L), as well as, for their capacity of adhesion on Human Lung Endothelial Cells (HLEC) and for their migratory ability in response to CXCL8. We also evaluated the effect of these cytokines treatment on fungicidal activity and on the production of  $H_2O_2$ , matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and inflammatory cytokines (IL-6, TNF-alpha and IL-1-beta). Neutrophils exposed to IL-17 and/or IL-23 increased their expression of CXCR1 and CXCR2 and adhesion molecules, which were associated with an increased adhesive and migratory capacity. Furthermore, the treatment of neutrophils with IL-17 and IL-23 had a suppressive effect on their fungicidal activity, characterized by a diminished production of  $H_2O_2$ , but increased their production of MMP-9 and inflammatory cytokines. These data indicate that Th17 related cytokines (IL-17 and IL-23) can participate in the initial

resistance to the infection caused by *P. brasiliensis*, once they are predominant in the milder and localized form of the disease, the adult form. As in other fungal infections, IL-17 (and IL-23) can induce a local inflammatory response and the activation of innate immune cells. However, when chronically produced these cytokines can induce an exacerbated inflammatory response, mainly acting on neutrophils, which can be responsible for the tissue damage observed in the chronic form of the disease.

| <b>Fig.</b> | <b>Descrição</b>                                                                                                                                  | <b>Página</b> |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 3.1         | Exemplos de curvas-padrão obtidas nos experimentos de adesão de neutrófilos com liberação de cromo.....                                           | 61            |
| 3.2         | Zimografia para determinação da atividade gelatinolítica da MMP-9 produzida por neutrófilos estimulados com IL-17 e/ou IL-23 ou IFN- $\gamma$ ... | 66            |
| 4.1         | Quantificação relativa da expressão do RNAm para IL-17A e ROR $\gamma$ T por CMSP de indivíduos com PCM ativa e controles normais.....            | 78            |
| 4.2         | Avaliação da produção de IL-17 por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose ativa e de controles.....     | 79            |
| 4.3         | Análise por imuno-histoquímica da expressão de IL-17 em lesões de mucosa oral e de linfonodo de pacientes com paracoccidiodomicose.....           | 80            |
| 4.4         | Análise por imuno-histoquímica da expressão de CD15 em lesões de mucosa oral e linfonodos de pacientes com paracoccidiodomicose.....              | 82            |
| 4.5         | Quantificação relativa da expressão do RNAm para IL17RA em neutrófilos.....                                                                       | 83            |
| 4.6         | Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência para a marcação com IL17R em neutrófilos.....                               | 85            |
| 4.7         | Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos IL23R <sup>+</sup> ..                                                               | 87            |

|      |                                                                                                                                                                                                  |     |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.8  | Análise da fosforilação das proteínas ERK 1/2, JNK 1/2 e p38 em neutrófilos de indivíduos controle.....                                                                                          | 89  |
| 4.9  | Quantificação relativa da expressão do RNAm para CD54 (ICAM-1) e CD62L em neutrófilos.....                                                                                                       | 90  |
| 4.10 | Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos CD54 <sup>+</sup> .....                                                                                                            | 91  |
| 4.11 | Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos CD62L <sup>+</sup> .....                                                                                                           | 92  |
| 4.12 | Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células HLEC CD54 <sup>+</sup> , CD62P <sup>+</sup> , CD62E <sup>+</sup> , CD11a <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> ou CD106 <sup>+</sup> ..... | 94  |
| 4.13 | Análise por microscopia de fluorescência da adesão de neutrófilos de indivíduos controle sobre células endoteliais (HLEC).....                                                                   | 96  |
| 4.14 | Análise por microscopia de fluorescência da adesão de neutrófilos de indivíduos controle sobre células endoteliais (HLEC).....                                                                   | 97  |
| 4.15 | Quantificação do número de neutrófilos aderidos por campo observados nos ensaios de adesão analisados por imunofluorescência.....                                                                | 98  |
| 4.16 | Quantificação do número de neutrófilos aderidos observados nos ensaios de adesão analisados por liberação de cromo.....                                                                          | 99  |
| 4.17 | Quantificação relativa da expressão do RNAm para CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos.....                                                                                                               | 100 |
| 4.18 | Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos CXCR1 <sup>+</sup> .....                                                                                                           | 101 |

|      |                                                                                                                                        |     |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.19 | Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos CXCR2 <sup>+</sup> .....                                                 | 103 |
| 4.20 | Análise por imuno-histoquímica da expressão de CXCL8 em lesões de mucosa oral de pacientes com a FA da paracoccidioidomicose.....      | 104 |
| 4.21 | Análise da capacidade migratória de neutrófilos estimulados com IL-17 e/ou IL-23 em resposta à CXCL8.....                              | 105 |
| 4.22 | Análise da atividade fungicida de neutrófilos de controles normais e pacientes com PCM.....                                            | 107 |
| 4.23 | Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos positivos para DHR-123.....                                              | 109 |
| 4.24 | Quantificação relativa da expressão do RNAm para matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) em neutrófilos.....                                 | 111 |
| 4.25 | Análise da produção de MMP-9 em sobrenadantes de cultura de neutrófilos.....                                                           | 112 |
| 4.26 | Análise da atividade gelatinolítica de MMP-9 produzida por neutrófilos após o estímulo com IL-17 e/ou IL-23 ou com IFN- $\gamma$ ..... | 113 |
| 4.27 | Análise da produção de IL-1 $\beta$ em sobrenadantes de cultura de neutrófilos.....                                                    | 115 |
| 4.28 | Análise da produção de IL-6 em sobrenadantes de cultura de neutrófilos.....                                                            | 116 |
| 4.29 | Análise da produção de TNF- $\alpha$ em sobrenadantes de cultura de neutrófilos.....                                                   | 117 |
| 8.1  | "Dot-plots" representativos dos resultados da separação de neutrófilos                                                                 |     |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| por gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque e separação<br>imunomagnética.....                                               | 159 |
| 8.2 "Dot-plots" representativos da produção de $H_2O_2$ por neutrófilos<br>estimulados com IL-17, IL-23 e IFN- $\gamma$ ..... | 161 |

- **BSA:** Soroalbumina Bovina
- **cDNA:** Ácido Desoxiribunucleico complementar
- **CFSE:** "Carboxyfluorescein succinimidyl ester"
- **CMNs:** Células Mononucleares
- **CMSP:** Células Mononucleares do Sangue Periférico
- **CTL:** Linfócito citotóxico
- **DEPC:** Dietilpirocarbonato
- **DHR:** Dihidrorodamina-123
- **ELISA:** Ensaio Imunoenzimático de absorção
- **FA:** Forma Adulta (crônica) da paracoccidioidomicose
- **FJ:** Forma Juvenil (aguda) da paracoccidioidomicose
- **GM-CSF:** Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- **gp43:** glicoproteína de 43 kDa - antígeno imuno-dominante produzido pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrogênio
- **HLEC:** Células Endoteliais Pulmonares Humanas
- **HTT:** Testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo tardio
- **ICAM-1:** Molécula de Adesão Intercelular-1 (CD54)
- **IFN:** Interferon
- **Ig:** Imunoglobulina
- **IL-:** Interleucina

- **IMF:** Intensidade de Fluorescência Média
- **LPS:** Lipopolissacarídeo
- **MMP:** Matriz metaloproteinase
- **NO:** Óxido Nítrico
- **Pb18:** cepa de alta virulência do fungo *P. brasiliensis*
- **Pb265:** cepa de baixa virulência do fungo *P. brasiliensis*
- **PBS:** Salina Tamponada com Fosfato
- **PCM:** Paracoccidioidomicose
- **PHA:** Fitohemaglutinina
- **PI:** Paracoccidioidomicose-infecção
- **PMN:** Células Polimorfonucleares
- **qRT-PCR:** Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real
- **RNA<sub>m</sub>:** Ácido Ribonucleico (RNA) mensageiro
- **RIOS:** Reativos Intermediários de Oxigênio
- **SBF:** Soro Bovino Fetal
- **SDS:** Dodecil Sulfato de Sódio
- **sICAM-1:** Molécula de Adesão Intercelular-1 Solúvel
- **sTNF-R:** Receptor solúvel para o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )
- **TGF:** Fator de Transformação de Crescimento
- **Th:** Linfócito T do tipo auxiliar ("helper")
- **TNF:** Fator de Necrose Tumoral
- **UFC:** Unidade Formadora de Colônia



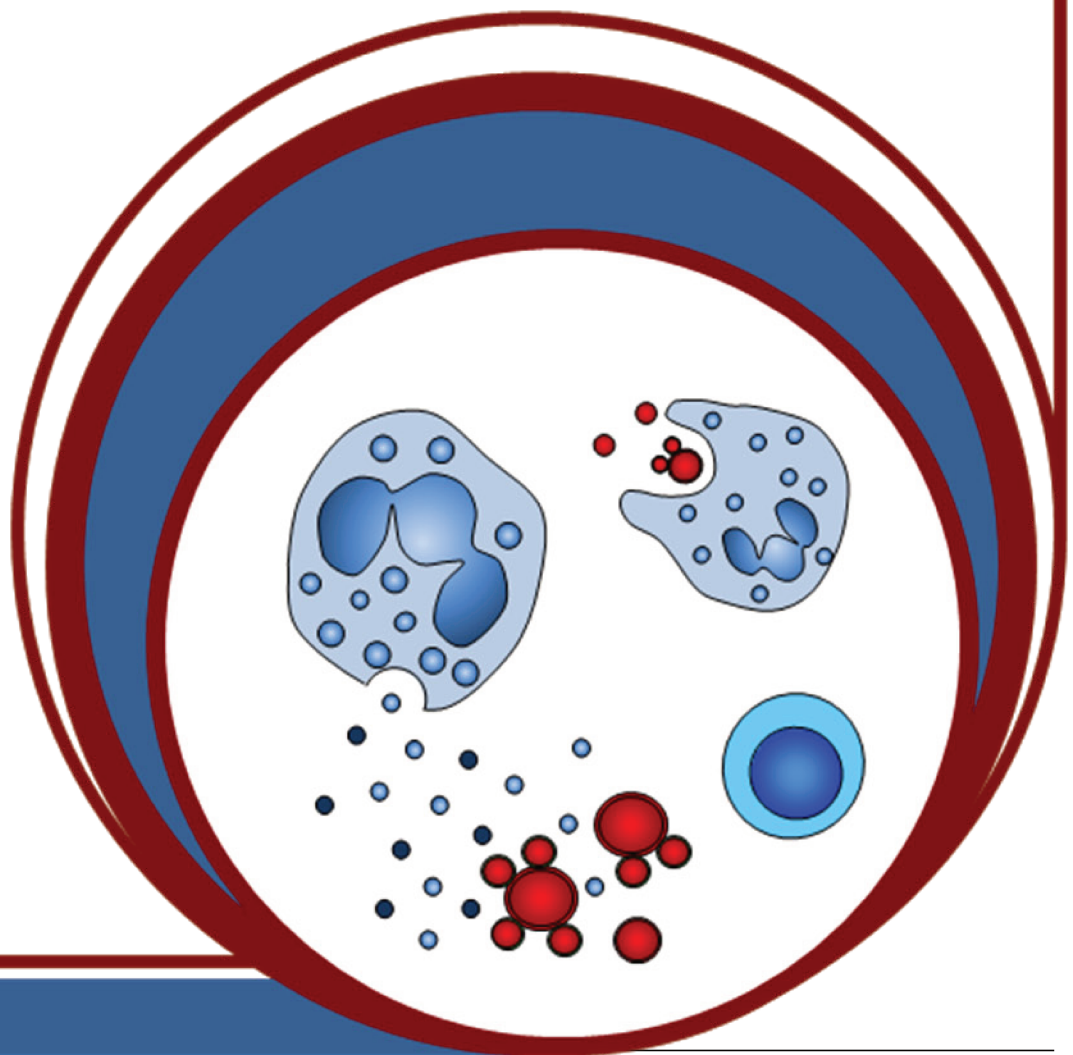
|                                                                                                                                                                                            |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RESUMO.....                                                                                                                                                                                | xiii |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                              | xvii |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                                         | 31   |
| 2. OBJETIVOS.....                                                                                                                                                                          | 45   |
| 2.1. Objetivo geral.....                                                                                                                                                                   | 47   |
| 2.2. Objetivos específicos.....                                                                                                                                                            | 47   |
| 3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                                     | 49   |
| 3.1. Casuística.....                                                                                                                                                                       | 51   |
| 3.2. Análise por imuno-histoquímica de lesões de mucosa oral de<br>pacientes com paracoccidiodomicose.....                                                                                 | 52   |
| 3.3. Obtenção de leveduras de <i>P. brasiliensis</i> .....                                                                                                                                 | 53   |
| 3.4. Obtenção de células mononucleares (CMNs) e<br>polimorfonucleares (PMNs) do sangue periférico.....                                                                                     | 53   |
| 3.5. Estimulação de CMNs para avaliação da cinética de produção do<br>RNAm para citocinas e para a produção de IL-17.....                                                                  | 55   |
| 3.6. Análise do efeito da IL-17 e IL-23 sobre a capacidade fungicida<br>de neutrófilos obtidos de sangue periférico de pacientes com a<br>doença ativa e indivíduos do grupo controle..... | 55   |
| 3.7. Estimulação de neutrófilos com citocinas recombinantes (IL-17<br>e/ou IL-23 e IFN- $\gamma$ ).....                                                                                    | 56   |
| 3.8. Cultivo e manutenção de linhagem de células endoteliais                                                                                                                               |      |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| pulmonares humanas (HLEC - Human Lung Endothelial Cells) ..                                                                                     | 57 |
| 3.9. Teste de adesão de neutrófilos por imunofluorescência.....                                                                                 | 58 |
| 3.10. Teste de adesão de neutrófilos por liberação de cromo.....                                                                                | 60 |
| 3.11. Imunofluorescência para análise de células por citometria de<br>fluxo.....                                                                | 61 |
| 3.12. Determinação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por neutrófilos.....                                                            | 62 |
| 3.13. Análise da capacidade migratória de neutrófilos em resposta à<br>CXCL8.....                                                               | 63 |
| 3.14. Análise da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e<br>TNF- $\alpha$ ) e MMP-9 por neutrófilos e de IL-17 por CMSP..... | 64 |
| 3.15. Análise da atividade gelatinolítica de MMP-9 (zimografia) .....                                                                           | 64 |
| 3.16. Reações de PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....                                                                                               | 66 |
| 3.16.1. Extração de RNA.....                                                                                                                    | 66 |
| 3.16.2. Síntese de cDNA.....                                                                                                                    | 67 |
| 3.16.3. Protocolo de qRT-PCR.....                                                                                                               | 68 |
| 3.17. Western-blotting / imunoblot.....                                                                                                         | 70 |
| 3.17.1. Preparação do lisado de neutrófilos.....                                                                                                | 70 |
| 3.17.2. SDS-PAGE e western-blotting.....                                                                                                        | 71 |
| 3.17.3. Imunoblot.....                                                                                                                          | 72 |
| 3.18. Análise estatística.....                                                                                                                  | 73 |
| 4. RESULTADOS.....                                                                                                                              | 75 |
| 4.1. Análise da cinética de expressão do RNAm para IL-17 e ROR $\gamma$ t<br>por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de           |    |

|                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| pacientes com paracoccidioidomicose (FA e FJ) e controles por qRT-PCR.....                                                                 | 77  |
| 4.2. Análise da produção de IL-17 no sobrenadante de cultura de CMSPs de pacientes com paracoccidioidomicose (FA e FJ) e controles.....    | 78  |
| 4.3. Análise da expressão de IL-17 em biópsias de lesões de pacientes com paracoccidioidomicose (FA e FJ) .....                            | 79  |
| 4.4. Análise da presença de neutrófilos em lesões de pacientes com a FA e FJ da paracoccidioidomicose.....                                 | 81  |
| 4.5. Análise da expressão (RNAm e proteína) dos receptores de citocinas IL17R e IL23R por neutrófilos.....                                 | 83  |
| 4.6. Análise do efeito do tratamento com IL-17 e/ou IL-23 sobre a ativação dos neutrófilos.....                                            | 88  |
| 4.7. Análise da expressão (RNAm e proteína) das moléculas de adesão (CD54 / ICAM-1 e CD62L) por neutrófilos.....                           | 90  |
| 4.8. Análise do efeito do tratamento com citocinas (IL17, IL23 e IFN- $\gamma$ ) sobre a adesão de neutrófilos em células endoteliais..... | 93  |
| 4.9. Análise da expressão (RNAm e proteína) dos receptores de quimiocina CXCR1 e CXCR2 por neutrófilos.....                                | 99  |
| 4.10. Análise da expressão de CXCL8 (IL-8) em lesões de pacientes com paracoccidioidomicose (FA).....                                      | 104 |
| 4.11. Análise da capacidade migratória de neutrófilos tratados com IL-17 e/ou IL-23 em resposta a CXCL8.....                               | 105 |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.12. Análise do efeito da IL-17, IL-23 e IFN- $\gamma$ sobre a capacidade fungicida de neutrófilos.....                   | 106 |
| 4.13. Análise da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por neutrófilos tratados com IL-17, IL-23 e IFN- $\gamma$ ..... | 108 |
| 4.14. Análise da expressão (RNA <sub>m</sub> e proteína) de matriz metaloproteinase- 9 (MMP-9) por neutrófilos.....        | 110 |
| 4.15. Análise da produção de IL1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ por neutrófilos estimulados com IL17 e/ou IL23.....        | 114 |
| 5. DISCUSSÃO.....                                                                                                          | 119 |
| 6. CONCLUSÕES.....                                                                                                         | 131 |
| 7. BIBLIOGRAFIA.....                                                                                                       | 135 |
| 8. APENDICE.....                                                                                                           | 155 |
| 8.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....                                                                           | 157 |
| 8.2. Análise da separação de neutrófilos por gradiente de densidade e separação imunomagnética.....                        | 159 |
| 8.3. Análise da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por neutrófilos por citometria de fluxo.....                     | 161 |

# ***INTRODUÇÃO***





## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as micoses sistêmicas, a paracoccidioidomicose (PCM) é a que apresenta maior importância em nosso meio. Causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, encontra-se restrita aos países da América Latina, sendo endêmica em algumas regiões do Brasil [1, 2]. A infecção provavelmente ocorre por meio da inalação de propágulos do fungo que se depositam nos pulmões causando lesões locais, ou que podem se disseminar via corrente sanguínea ou linfática para diversos órgãos como: fígado, baço, glândulas suprarrenais, medula óssea, mucosas e pele [1, 3].

A infecção pelo *P. brasiliensis* pode ter três resultados: 1) a PCM-infecção (PI), comum em indivíduos que residem ou trabalham em áreas endêmicas e que entram em contato com o fungo, mas que não desenvolvem sinais clínicos da doença; 2) a forma juvenil (FJ) mais comum em crianças e jovens de ambos os sexos, e caracterizada pelo acometimento dos linfonodos, fígado, baço e disfunção na medula óssea; e 3) a forma adulta (FA) ou crônica que acomete majoritariamente homens adultos entre 30 e 60 anos. A forma adulta apresenta manifestações clínicas que variam desde lesões pulmonares isoladas (forma unifocal) ao acometimento sistêmico (forma multifocal), com lesões na pele e mucosas [1, 3, 4]. Em relação às duas formas da doença, em ambos os casos a imunidade celular apresenta-se comprometida, e a ausência de intervenção por meio de terapia específica leva a altas taxas de mortalidade, principalmente em crianças [3, 5, 6].

O desenvolvimento de modelos experimentais da infecção pelo *P. brasiliensis* permitiu compreender de forma mais clara a relação entre a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro e as diferentes manifestações da paracoccidioidomicose [7]. Camundongos suscetíveis (linhagem B10.A) apresentam resposta imune celular deprimida, evidenciada pela proliferação de linfócitos e reação de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT) diminuídas frente a estímulos com antígenos do fungo [5]. Além disso, produzem preferencialmente citocinas do tipo Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10, e anticorpos das classes IgG1 e IgA [8-11]. Após a infecção esses camundongos apresentam disseminação do fungo por todo organismo, evidenciando a sua incapacidade para o controle da mesma. Por outro lado, nos camundongos resistentes (linhagem A/Sn – A/J) a resposta imunológica celular é preservada, com linfoproliferação e testes de HTT positivos e produção de citocinas do tipo Th1 como o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), assim como produção de anticorpos da classe IgG2a [8-10].

Esses achados no modelo experimental encontram paralelo na doença humana. Indivíduos apresentando a FJ da PCM apresentam uma resposta predominantemente T-"helper" do tipo 2 (Th2), com produção aumentada (*in vitro*) de citocinas supressoras da resposta imune celular como a interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-10, o fator de transformação de crescimento-beta (TGF- $\beta$ ) e baixa produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  [12-16]. Esses indivíduos também produzem quantidades elevadas de anticorpos específicos com predominância dos isotipos IgG4, IgE e IgA, cuja mudança de classe é regulado por citocinas Th2 como a IL-4



e pelo TGF- $\beta$  assim como número elevado de eosinófilos na circulação e infiltrando as lesões [13, 17-21]. Já os indivíduos com a FA desenvolvem uma resposta mista, que resulta em diferentes apresentações clínicas da doença, produzindo citocinas do tipo Th1 como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 e quantidades variáveis de IL-10 e IL-4 [14-16]. Quanto à resposta imune humoral, produzem menores níveis de anticorpos quando comparados a indivíduos com a forma juvenil, com predomínio das classes IgG1 e IgG2 [13, 17, 18]. Já os indivíduos apresentando a PCM-infecção não apresentam sinais clínicos de doença e tampouco produzem anticorpos específicos, mas desenvolvem resposta celular vigorosa contra antígenos do fungo e produzem quantidades elevadas de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  e níveis basais de IL-4, IL-5 e IL-10 [14-16].

Os dados expostos acima indicam que a resposta imunológica efetiva, com participação de células Th1, é de extrema importância para a resistência e o controle da infecção causada pelo *P. brasiliensis*, destacando-se o papel do IFN- $\gamma$  nessa proteção. Entretanto, apesar do balanço entre as respostas Th1 e Th2 explicarem muitas das diferenças marcantes entre as formas clínicas da doença e a PCM-infecção, alguns fatos ainda permanecem sem explicação. Resultados intrigantes, tanto na doença humana quanto experimental, têm mostrado que a resposta inflamatória exacerbada, principalmente na fase inicial da infecção, está relacionada a formas mais graves da paracoccidioidomicose e pior controle da doença por parte do hospedeiro [22-24]. Camundongos suscetíveis (linhagem B.10) à infecção pelo *P. brasiliensis*, quando infectados por via intratraqueal, apresentam uma resposta imunológica inicial caracterizada pela grande produção

de mediadores inflamatórios (em teoria relacionada a uma resposta Th1) e pelo infiltrado de grande número de neutrófilos. Por outro lado, camundongos resistentes, produzem quantidades moderadas desses mediadores e menor infiltrado inflamatório [25].

Recentemente, linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IL-17 foram identificados como sendo uma subpopulação com origem distinta dos linfócitos Th1 e Th2, sendo denominados de Th17 [26, 27]. Essas células foram identificadas por apresentar um papel de grande importância em doenças autoimunes como a esclerose múltipla (e seu modelo experimental – encefalomielite autoimune experimental), a artrite reumatóide e as doenças inflamatórias intestinais [28, 29].

A diferenciação de células T nas diversas subpopulações é regulada principalmente pela presença de certas citocinas produzidas no ambiente onde ocorre a apresentação do antígeno. A interação dessas citocinas com seus receptores leva a sinalização intracelular específica, e posterior ativação de fatores de transcrição que são característicos de cada uma dessas subpopulações [30, 31]. Assim, células Th1 se diferenciam quando citocinas como a IL-12 e IFN- $\gamma$  estão presentes no meio, as quais levam à ativação de fatores de transcrição como a STAT-1, STAT-4 e T-bet. As células Th2 se diferenciam na presença de IL-4, que sinaliza via STAT-6 e GATA-3 [30-32]. De maneira geral as células Th17 se diferenciam na presença de TGF- $\beta$  e IL-6, sendo que outras citocinas inflamatórias como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  podem ter efeitos adicionais [31, 33-37]. Além dessas citocinas, também é importante a presença de IL-23 que promove a

sobrevivência e a diferenciação adicional dessas células. A diferenciação de células Th17 ocorre por meio da sinalização via STAT-3 e ROR $\gamma$ t [35-38].

Apesar de terem sido inicialmente descritas na resposta imunológica em doenças autoimunes, atualmente a participação de células Th17 também tem sido descrita tanto na resistência como na suscetibilidade a doenças infecciosas causadas por bactérias, protozoários e fungos [39-45]. Na tuberculose pulmonar humana, foi demonstrada uma diminuição da quantidade de células Th17 na circulação periférica em comparação ao observado em indivíduos saudáveis, situação revertida após o tratamento efetivo [46-48]. A presença de células Th17 e a produção local de IL-17 nos pulmões aparentemente estimula as células epiteliais, macrófagos e células endoteliais a produzirem citocinas e quimiocinas inflamatórias como a CXCL8, IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-6 e de peptídeos com ação antibacteriana como as defensinas, induzindo o acúmulo de neutrófilos e de outras células inflamatórias, que desempenham papel importante no controle da doença [41]. No modelo experimental da tuberculose, a produção de IL-17 também leva a uma resposta favorável, participando de forma importante para a formação do granuloma, e estimulando a produção de quimiocinas inflamatórias como a CXCL9 e CXCL10, o que levaria ao recrutamento secundário de células Th1 e ao aumento da produção de outras citocinas pró-inflamatórias como o IFN- $\gamma$  [49-52]. Na infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi* a IL-17 foi relacionada à indução da resposta imunológica, principalmente através da estimulação para a produção de IFN- $\gamma$  e outras citocinas [45].

Após a sua descrição, a participação das células Th17 na resposta imunológica a doenças causadas por fungos começou a ser bastante estudada, e a IL-17 foi apontada como uma das principais citocinas que promovem a resistência a esses agentes patogênicos [43, 53-55]. No modelo experimental da infecção causada pelo *Pneumocystis jiroveci* (*carinii*), a produção de IL-17 e IL-23, foi apontada como sendo importante na resposta protetora [56]. Na infecção experimental por *Histoplasma capsulatum*, Heninger et al (2006)[57] relataram a presença de células produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-17 no granuloma formado em resposta ao fungo, e que a IL-17 é necessária para a sua formação. Na infecção pelo *Cryptococcus neoformans*, a presença de IL-23, e consequentemente de IL-17, foi relacionada à resistência à doença por meio da indução de citocinas inflamatórias como IL-1 e IL-6 [49]. Em relação à infecção por *Candida albicans*, existem trabalhos com resultados contraditórios, sendo que alguns apontam para a participação dessas células na resistência, e outros na suscetibilidade à infecção [48, 54, 58-62]. Em um trabalho publicado por Zelante *et al.* (2007), os autores também verificaram que a IL-17 pode influenciar na suscetibilidade à infecção por *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus*, e que nas duas infecções esta citocina induz o aumento da atividade inflamatória na resposta inicial, que em última instância resulta em uma resposta celular deficiente, e em uma atividade fungicida de neutrófilos bastante reduzida [54].

Em doenças inflamatórias do trato respiratório, a produção de IL-17 é apontada como uma das principais citocinas efetoras no recrutamento de neutrófilos [63-65]. Neutrófilos são células de origem mielóide, que constituem a

maioria dos leucócitos presentes na circulação. Essas células, juntamente com os macrófagos, são as primeiras a serem recrutadas para o sítio de infecção durante a resposta inflamatória, e têm como função principal a ingestão dos micro-organismos (fagocitose) e posterior destruição dos mesmos. Para a destruição dos patógenos os neutrófilos, após sua ativação, produzem grandes quantidades de substâncias chamadas de Reativos Intermediários de Oxigênio (RIOs), assim como de óxido nítrico (NO). Além dos RIOs, os neutrófilos também produzem e liberam no sítio inflamatório uma série de enzimas proteolíticas como elastases, catepsina-G e matriz-metaloproteinases (MMPs). Essas enzimas podem levar à destruição dos tecidos do hospedeiro, sendo responsáveis por muitas das imunopatologias observadas em processos inflamatórios crônicos [66, 67].

Como mencionado, a infecção pulmonar experimental pelo *P. brasiliensis* leva ao recrutamento de neutrófilos ao pulmão [25, 68]. A análise do lavado bronco alveolar de pacientes com a forma pulmonar da paracoccidioidomicose mostra um aumento do influxo de neutrófilos para esse compartimento [69, 70]. A presença dessas células também é característica de lesões causadas pelo *P. brasiliensis* em outros órgãos e tecidos [1, 71].

A migração de células do sistema imunológico para o sítio inflamatório é um fenômeno complexo, caracterizado pela participação de diversas moléculas de adesão e pela produção de quimiocinas e pela expressão de seus receptores. Neutrófilos expressam diversos receptores de quimiocinas, sendo os principais aqueles relacionados à ação da quimiocina CXCL8 (IL-8). Quimiocinas são citocinas que induzem a migração dirigida de subpopulações de leucócitos para os locais de inflamação. As quimiocinas são proteínas estruturalmente relacionadas

ou homólogas e podem ser subdivididas em quatro subfamílias: CXC (ou  $\alpha$ ) nas quais as duas primeiras cisteínas da molécula são separadas por um aminoácido, CC (ou  $\beta$ ) nas quais as duas primeiras cisteínas são adjacentes, CX<sub>3</sub>C (ou  $\gamma$ ) com três aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas e C (ou  $\delta$ ) nas quais falta uma das cisteínas [72-74]. As quimiocinas do tipo CXC que contém a sequência ácido glutâmico-leucina-arginina (denominadas de ERL), precedendo a sequência CXC, são quimiotáticas para neutrófilos (como por exemplo a CXCL8/IL-8) e aquelas que não contêm esta sequência atuam sobre linfócitos (como por exemplo a CXCL9 (Mig) e CXCL10 (IP-10), entre outras) [73]. A ação das quimiocinas se dá por meio de sua ligação a receptores específicos, presentes na superfície das células [75]. A expressão diferencial desses receptores nas diversas fases da resposta imunológica é que irá controlar a migração dos leucócitos entre os diversos locais de atuação. Existem dois receptores capazes de responder à CXCL8: o CXCR1 e o CXCR2, ambos expressos por neutrófilos. Os receptores de quimiocina CXCR1 e CXCR2 são expressos principalmente em células de origem mielóide, como PMNs e monócitos, mas também podem ser expressos por outras células como: linfócitos T CD8<sup>+</sup>, mastócitos, células endoteliais e epiteliais. O CXCR1 liga-se apenas à IL-8, por outro lado o CXCR2 é ligante para IL-8, entre outros [73] [76].

Além das quimiocinas e seus receptores, a migração dos leucócitos envolve a participação coordenada de um grande número de moléculas expressas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais denominadas coletivamente de moléculas de adesão. A grande maioria das moléculas de adesão pode ser

agrupada em duas famílias principais: as integrinas e as selectinas, expressas tanto na superfície do endotélio vascular como na membrana dos leucócitos [77-79]. Integrinas do tipo  $\beta 2$ , especialmente CD11a/CD18 (LFA-1) e seu ligante a molécula da superfamília da imunoglobulinas CD54 (ICAM-1) são implicadas na migração de leucócitos, apresentação de antígenos, fagocitose e produção de RIOs. A expressão das moléculas de adesão na superfície celular depende da estimulação por citocinas inflamatórias como o  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-6}$ , e também pode ser induzida por alguns produtos bacterianos como o LPS [80]. Em trabalho realizado por Roussel *et al.* (2010) [81] foi demonstrado que a  $\text{IL-17}$  apresenta-se como potente ativadora do endotélio *in vivo*, promovendo o recrutamento de neutrófilos para locais inflamatórios. As células endoteliais expressam receptores para  $\text{IL-17}$  e, deste modo, respondem de maneira rápida quando estimuladas com a citocina, produzindo moléculas quimiotrativas para neutrófilos além de moléculas de adesão envolvidas no extravasamento de leucócitos. A  $\text{IL-17}$ , desse modo, participa ativamente na migração de leucócitos (principalmente de neutrófilos) tanto *in vivo* quanto em testes *in vitro*.

A adesão leucocitária apresenta diferentes etapas: Inicialmente, os leucócitos aderem fracamente à parede dos vasos sanguíneos devido a interações fracas entre selectinas expressas nas células endoteliais e seus ligantes, nesse estágio ocorre o rolamento dos leucócitos [82]. Dentre as selectinas, pode-se destacar a L-selectina (CD62L), uma glicoproteína transmembrana que interage com ligantes presentes no endotélio [77]. Suas ações contribuem tanto nos primeiros eventos adesivos, bem como as fases posteriores da quimiotaxia e

migração celular [83]. Em seguida ocorre à adesão firme mediada por integrinas [82]. O ICAM-1 (CD54) é uma molécula de adesão celular da família das imunoglobulinas expressa por diversos tipos celulares, incluindo leucócitos e células endoteliais. Sua expressão pode ser induzida através de citocinas como o TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , e inibida por glucocorticóides. Dentre seus ligantes, podem se destacar os receptores de integrina ligada à membrana LFA-1 e Mac-1 em leucócitos. A molécula de CD54 desempenha um papel importante na resposta imune inata e adaptativa, já que está envolvida na migração de leucócitos para locais de inflamação, assim como na interação de células apresentadoras de antígenos e células T [84]. Em trabalho realizado anteriormente por nosso grupo, demonstramos que células mononucleares do sangue periférico de indivíduos de ambas as formas clínicas da paracoccidioidomicose (FJ e FA) apresentam uma expressão aumentada de CD54 (ICAM-1), em relação aos indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção [15].

Apesar da presença de grande número de neutrófilos nos pulmões e nas lesões de pacientes com PCM, estudos realizados *in vitro* indicam que neutrófilos de pacientes com a doença ativa, assim como de camundongos suscetíveis à infecção, apresentam capacidade fungicida diminuída contra células do fungo, em comparação a indivíduos normais ou a camundongos resistentes. Essa característica aparentemente está relacionada com a diminuição na capacidade de produção de reativos intermediários de oxigênio como o peróxido de hidrogênio [25, 85, 86]. Em um estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2007) [87] neutrófilos de indivíduos saudáveis quando incubados com IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e GM-CSF

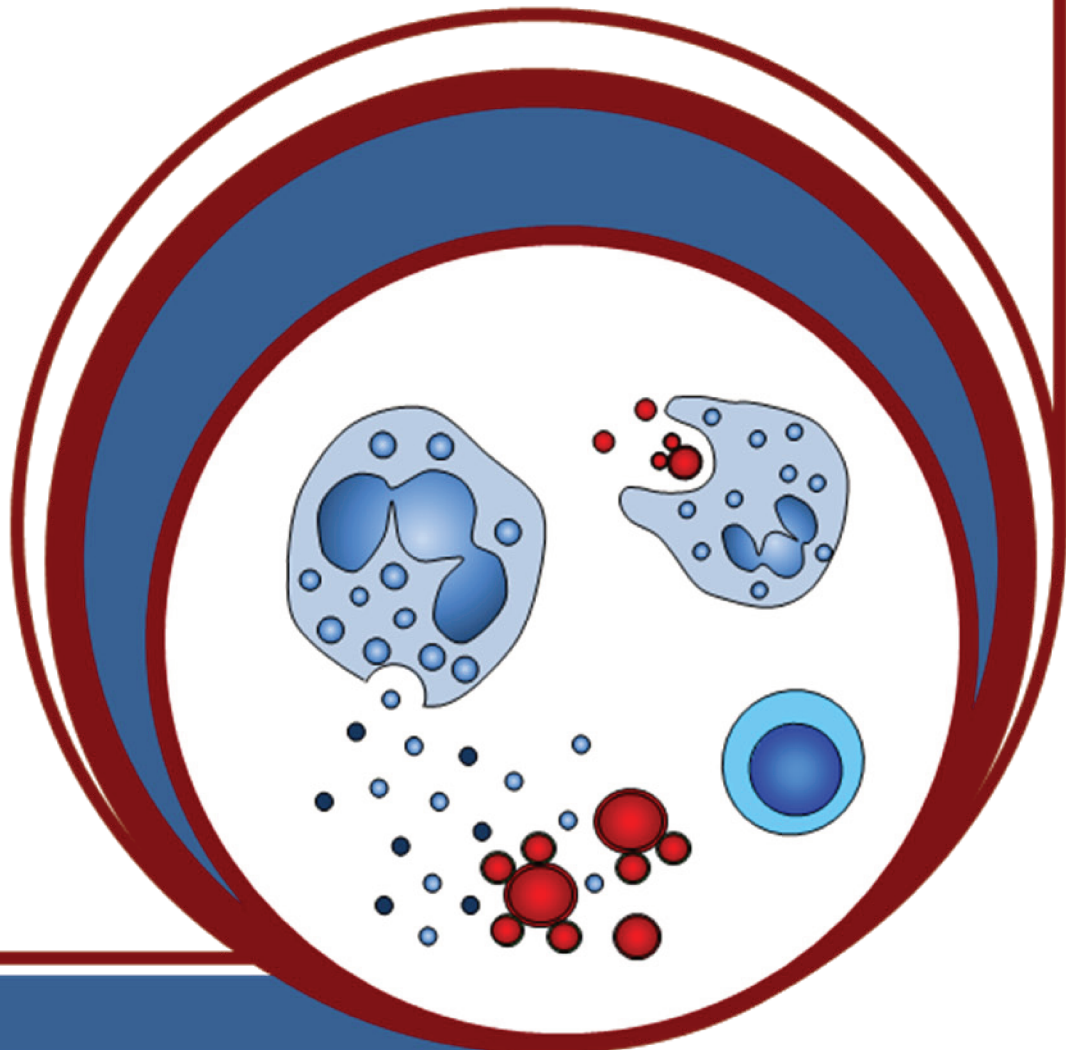


apresentaram efeito fungicida eficiente contra a cepa Pb18 do *P. brasiliensis*, mostrando desta maneira a importância das citocinas no processo da ativação dos neutrófilos. Outros trabalhos também demonstram a ativação dos neutrófilos por citocinas como o IFN- $\gamma$ , enquanto que a presença de IL-10 suprime essa resposta [88]. Nesse contexto, a atividade fungicida de PMNs após a ativação é dependente da produção de reativos intermediários de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ânion superóxido. No modelo experimental, McEwen *et al.* (1987) [89] também demonstraram que a atividade fungicida de PMNs está relacionada com a liberação de reativos de oxigênio, sendo que neutrófilos de camundongos resistentes à PCM apresentaram produção de níveis maiores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se comparados aos camundongos susceptíveis à doença.

Como mencionado, os estudos que abordam a participação de células Th17 na resposta imunológica nas infecções fúngicas ainda são incipientes, e não existem trabalhos (experimentais ou em humanos) que mostrem a sua participação na resposta imunológica ao *P. brasiliensis*. Diversos trabalhos demonstraram que a resposta adaptativa associada à resistência e à suscetibilidade à paracoccidiodomicose é relacionada às respostas Th1 e Th2 respectivamente [90], contudo, algumas características, como o fato de haver a presença de infiltrado inflamatório, tanto no pulmão como em outros tecidos, com um grande número de neutrófilos com atividade fungicida diminuída, não são explicadas por esse modelo. Nos últimos anos, a participação de células produtoras de IL-17 (Th17) na resposta imunológica a infecções fúngicas tem sido

bastante estudada, sendo considerada de grande importância para a contenção desses patógenos, sobretudo por sua função como citocina pró-inflamatória, atuando na ativação e migração de neutrófilos. Tendo isso em vista, temos como hipótese que as células Th17 podem participar da resposta imunológica ao *P. brasiliensis* e são responsáveis, pelo menos em parte, pelo descontrole da resposta inflamatória, por meio da ativação e recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção.

# ***OBJETIVOS***





## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

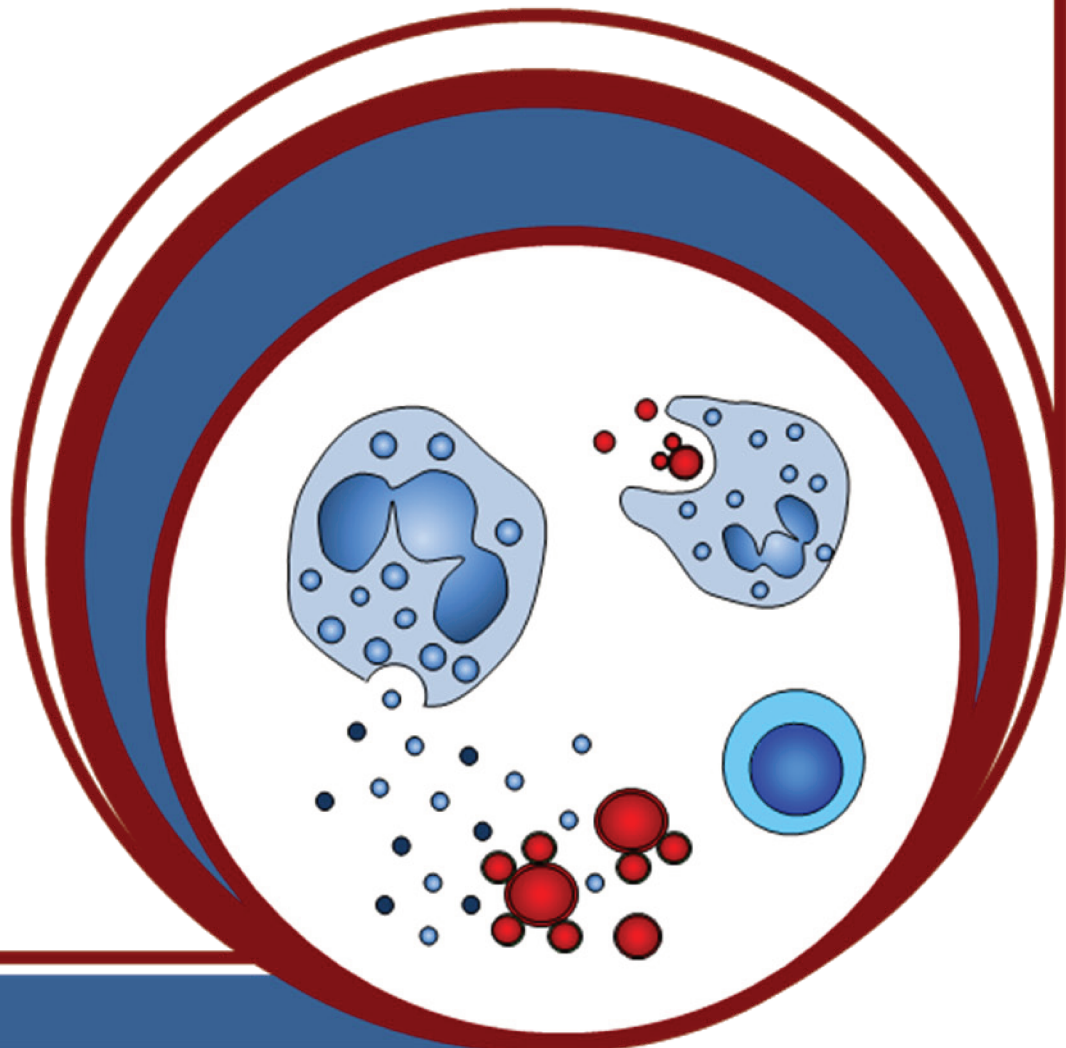
Avaliar se a presença de IL-17 e IL-23 altera a capacidade fungicida, migratória e inflamatória de neutrófilos humanos obtidos de indivíduos com paracoccidioidomicose e de controles normais.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Avaliar se a presença de IL-17 e/ou IL-23 afeta a capacidade fungicida de neutrófilos contra cepas de alta virulência (Pb18) e de baixa virulência (Pb265) de *P. brasiliensis*.
- Avaliar se a presença de IL-17 e IL-23 leva a alteração na expressão de moléculas de adesão (CD54 e CD62L) e de receptores de quimiocinas (CXCR1 e CXCR2) por neutrófilos.
- Avaliar se a presença de IL-17 e IL-23 altera a capacidade de adesão em células endoteliais e de migração de neutrófilos em resposta à CXCL8.
- Avaliar o efeito da presença de IL-17 e IL-23 sobre a produção de reativos intermediários de oxigênio, de matrix-metaloproteinase-9 (MMP-9) e de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) por neutrófilos.



# ***MATERIAIS E MÉTODOS***







### 3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Casuística

Para a realização dos diversos experimentos descritos foi utilizado um número variável de amostras de sangue (descrito em cada um dos gráficos dos resultados), obtidas de controles normais e pacientes com a forma adulta multifocal (FA) ou com a forma juvenil (FJ) da paracoccidioidomicose.

Os indivíduos do grupo controle foram recrutados na zona endêmica de Campinas, anteriormente identificados por apresentarem teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio negativo à gp43 (antígeno imunodominante do *P. brasiliensis*) e não apresentavam no momento da coleta nenhum sintoma de qualquer doença em atividade. Pacientes com paracoccidioidomicose foram selecionados no ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP, foram incluídos somente pacientes apresentando doença ativa antes do início (pós-diagnóstico) ou no máximo com um mês de tratamento, que ainda apresentavam sintomas e exames laboratoriais compatíveis com paracoccidioidomicose em atividade. Os pacientes foram classificados quanto à forma clínica conforme os critérios estabelecidos por Franco *et al.* (1987)[4]. Cada indivíduo foi informado sobre sua participação na pesquisa, assinando um termo de consentimento pós-informação, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (ver apêndice).

Para a análise dos tecidos por imuno-histoquímica foram utilizados tecidos de biópsias obtidas para fim diagnóstico (mucosa oral ou linfonodos), fixadas e

embebidas em parafina, arquivadas no setor de Anatomia Patológica do HC da UNICAMP.

### **3.2. Análise por imuno-histoquímica de lesões de mucosa oral e de linfonodos de pacientes com paracoccidioidomicose**

Foram analisados 10 amostras diferentes de pacientes com a FA (mucosa oral – FA multifocal) e 10 amostras diferentes de pacientes apresentando a FJ da PCM (linfonodos). As lesões incluídas no estudo foram aquelas que apresentavam leveduras de *P. brasiliensis*.

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes sequenciais em micrótomo com espessura de 3-5  $\mu\text{m}$ , e as lâminas foram submetidas à desparafinização por banhos sequenciais em xilol e etanol. Após a desparafinização, os tecidos foram submetidos à recuperação antigênica.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram submersas em tampão de recuperação (EDTA pH 9,3) em recipientes adequados e submetidos a aquecimento em panela de vapor a 95°C por 30 minutos. Após o aquecimento as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente. Após a recuperação antigênica, os cortes foram submetidos à marcação com anticorpos específicos (anti-IL17, anti-CD15 e anti-CXCL8). Os anticorpos foram titulados para otimizar a marcação e evitar ligações inespecíficas (dados não mostrados). As etapas de bloqueio de peroxidase endógena, de adição do anticorpo secundário e revelação foram feitas com reagentes fornecidos com o “kit” do sistema NovoLink (Max Polymer Detection System – Novocastra Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a realização da marcação, os tecidos foram contra-corados com hematoxilina e as lâminas montadas em entelan.

### **3.3. Obtenção de leveduras de *P. brasiliensis***

Culturas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* da cepa de alta virulência Pb18 e da cepa de baixa virulência Pb265 foram mantidas em estufa a 36°C em meio Fava-Netto por 7 dias. Após esse período o crescimento do tubo foi lavado em PBS estéril e para a obtenção de células individuais a suspensão de leveduras foi agitada em vórtex em tubos de 50 mL contendo esferas de vidro de 4mm de diâmetro por 5 minutos. Após a agitação os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C para a deposição das células não desagregadas e o sobrenadante transferido para outro tubo, a partir do qual o número de células leveduriformes viáveis foi determinado por contagem em hematocítômetro na presença de verde de Janus. Foram utilizadas suspensões contendo mais que 85% de células viáveis. O número de leveduras utilizado em cada experimento foi acertado conforme a necessidade.

### **3.4. Obtenção de células mononucleares (CMNs) e polimorfonucleares (PMNs) do sangue periférico**

O sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose apresentando a doença ativa, assim como de indivíduos do grupo controle, foi coletado em tubos contendo heparina sódica (40-50mL).

Para a separação das frações de células mononucleares (CMNs) e de polimorfonucleares (PMNs) as amostras foram centrifugadas sobre uma solução

de ficoll-hypaque - Sigma (Ficoll-Paque Plus - GE HealthCare, densidade 1,077 - 400 g por 30 minutos a temperatura ambiente), sendo as frações de células mononucleares (CMNs – anel sobre a solução de ficoll-hypaque) e de polimorfonucleares (PMNs – parte superior da camada de hemácias) transferidas para outros tubos tipo falcon de 15 mL. As CMNs foram então submetidas a duas lavagens com meio RPMI (300 g por 10 minutos a 4°C), enquanto que as PMNs foram ressuspensas em tampão de lise de hemácias e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Após a lise das hemácias, as PMNs foram submetidas à nova separação sobre ficoll-hypaque com densidade de 1,119 (Histopaque - Sigma - 400 g por 30 minutos a temperatura ambiente) e depois a duas lavagens com RPMI (300 g por 10 minutos a temperatura ambiente). Após a lavagem, as CMNs e PMNs tiveram seu número e viabilidade estimado (câmara de Neubauer e azul de Tripan) e utilizadas para realização de diferentes experimentos conforme descrito abaixo.

Após o procedimento de separação descrito acima mais de 90% das células PMNs obtidas eram de neutrófilos (figura 8.1 - Apêndice).

Para os experimentos de imunoblot realizados para confirmar o efeito direto das citocinas recombinantes sobre os neutrófilos, submetemos as PMNs, obtidas conforme descrito acima, a uma etapa adicional de separação imunomagnética com "beads" acopladas a anticorpos anti-CD16 (anti-CD16 "beads" - MACs - Miltenyi Biotec), seguindo as instruções do fabricante. Para garantir a pureza das preparações celulares, as amostras foram passadas 2 vezes por colunas. Após esse procedimento, obtivemos preparações celulares com pureza superior a 99% (ver figura 8.1 - Apêndice).

### **3.5. Estimulação de células mononucleares do sangue periférico para avaliação da cinética de produção do RNAm e da produção de IL-17**

Células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de pacientes apresentando a FA ou FJ da paracoccidiodomicose, e de indivíduos do grupo controle foram separadas por meio de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque conforme descrito acima. Após a obtenção das células, as mesmas foram contadas e ressuspendidas em meio RPMI suplementado ( $2 \times 10^6$  células/mL) e colocadas em placas de cultura de 24 wells. As células então foram mantidas sem estímulo ou estimuladas com PHA ( $10\mu\text{g/mL}$ ) por 0, 3, 6, 12, 24 ou 48 horas. Após cada período as células foram coletadas e utilizadas para extração do RNAm para detecção da produção do RNAm para IL-17 e ROR $\gamma$ t, e os sobrenadantes das culturas de 24 horas foram coletados e utilizados para dosagem de IL-17 por ELISA.

### **3.6. Análise do efeito da IL-17 e IL-23 sobre a capacidade fungicida de neutrófilos obtidos de sangue periférico de pacientes com a doença ativa e indivíduos do grupo controle.**

Os neutrófilos obtidos do sangue periférico de pacientes com a doença ativa foram avaliados quanto a sua capacidade fungicida contra duas cepas de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265). Para isso, 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de células ( $2 \times 10^6$  células/mL - obtidas conforme descrito acima) em RPMI suplementado com 10% soro AB, L-glutamina e gentamicina foram colocadas em placas de 96 cavidades com fundo em U, e desafiadas com 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão contendo  $4 \times 10^3$  células leveduriformes de *P. brasiliensis* (das cepas Pb18 e

Pb265 - razão fungo:neutrófilos de 1:50). As coculturas foram mantidas sem estímulo adicional ou então estimuladas com citocinas recombinantes (IL-23 - 100 ng/mL e IL-17 - 100 ng/mL, isoladamente ou em combinação ou IFN- $\gamma$  - 100ng/mL) por 4 e 24 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%). Após esse período as cavidades foram lavadas 3 vezes com 0,2 mL de água destilada estéril para lisar os neutrófilos. O volume do produto de cada cavidade foi completado para 2 mL e 100  $\mu$ L dessa suspensão foram plaqueados em meio Agar BHI suplementado com 4% de soro equino e 5% de fator de crescimento obtido de cultura da cepa Pb192 do *P. brasiliensis* e 1% de solução antibiótica estreptomicina+penicilina [91]. As placas foram seladas para evitar a desidratação e incubadas a 36°C por 5 a 30 dias durante os quais o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado. Como controle foi utilizado a mesma suspensão de leveduras de *P. brasiliensis*, submetida às mesmas condições descritas acima, com exceção da presença de neutrófilos. A atividade fungicida foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de atividade fungicida} = 1 - \frac{\text{Número de CFUs das placas experimentais}}{\text{Número de CFUs das placas controle}} \times 100$$

### **3.7. Estimulação de neutrófilos com citocinas recombinantes (IL-17 e/ou IL-23 e IFN- $\gamma$ ).**

Após a separação, os neutrófilos obtidos de pacientes com PCM ou indivíduos controle foram ressuspensos em meio RPMI suplementado ( $2 \times 10^6$  células/mL) e colocados em placas de 24 cavidades. As culturas foram mantidas

sem estímulo adicional ou então estimuladas com citocinas recombinantes (IL-23 - 100 ng/mL e IL-17 – 100 ng/mL, isoladamente ou em combinação ou com IFN- $\gamma$  - 100ng/mL) por 4 e 24 horas, a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%). Após o período de cultura o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até o momento do uso (dosagem de MMP-9, IL-1 $\beta$ 1, IL-6 e TNF- $\alpha$  por ELISA, ver abaixo). As células foram coletadas e parte delas submetida à imunofluorescência para análise da expressão de marcadores de superfície (citometria de fluxo – ver abaixo), a outra parte das células foi utilizada para a extração de RNA para análise posterior da expressão do RNA mensageiro por PCR em tempo real (qRT-PCR, ver abaixo). As condições de cultura de neutrófilos utilizados para os testes de adesão estão descritos abaixo.

### **3.8. Cultivo e manutenção de linhagem de células endoteliais pulmonares humanas (HLEC - Human Lung Endothelial Cells).**

Para os experimentos de adesão de neutrófilos, foram utilizadas células endoteliais pulmonares humanas (linhagem HLEC) [92], gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa do Instituto de Biologia da UNICAMP. As células foram expandidas em garrafas de cultura de 25 mm<sup>2</sup> em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de soro bovino fetal (DMEM-SBF), em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Ao atingirem 80-90% de confluência, as células foram coletadas com o auxílio de "cell-scrapper", centrifugadas e tiveram seu número e viabilidade determinados, sendo novamente ressuspensas em meio DMEM-SBF. As células foram transferidas para lâminas específicas para cultura com 8 divisões (Millicell

EZ slide - Millipore -  $1 \times 10^5$  células/cavidade), no caso de testes de adesão por imunofluorescência, ou então para placas de 24 cavidades ( $2 \times 10^5$  células/cavidade), nos testes de adesão por liberação de cromo. As lâminas e as placas foram então incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C, por 2 dias (tempo necessário para atingir novamente 90% de confluência). Após esse período, as células foram submetidas a uma lavagem para a remoção das células não aderidas e adicionado meio DMEM-SBF fresco contendo as citocinas recombinantes (IL-23 - 100 ng/mL, IL-17 – 100 ng/mL, ou com IFN- $\gamma$  - 100ng/mL). As lâminas ou placas foram novamente incubadas por um período adicional de 24 horas (para atingirem 100% de confluência). Após esse período o meio foi removido, as lâminas (ou placas) foram gentilmente lavadas com meio fresco para remoção das células não aderidas e utilizadas para os testes de adesão (ver descrição abaixo).

Para avaliar a expressão de moléculas de adesão pelas HLEC, as células foram cultivadas em placas de 6 cavidades até atingirem 80-90% de confluência e então estimuladas por 24 horas com as citocinas recombinantes. Após esse período o sobrenadante foi descartado, as células foram removidas da placa com o auxílio de "cell-scrappers" e submetidas à marcação de superfície com posterior análise por citometria de fluxo (ver abaixo).

### **3.9. Teste de adesão de neutrófilos - imunofluorescência.**

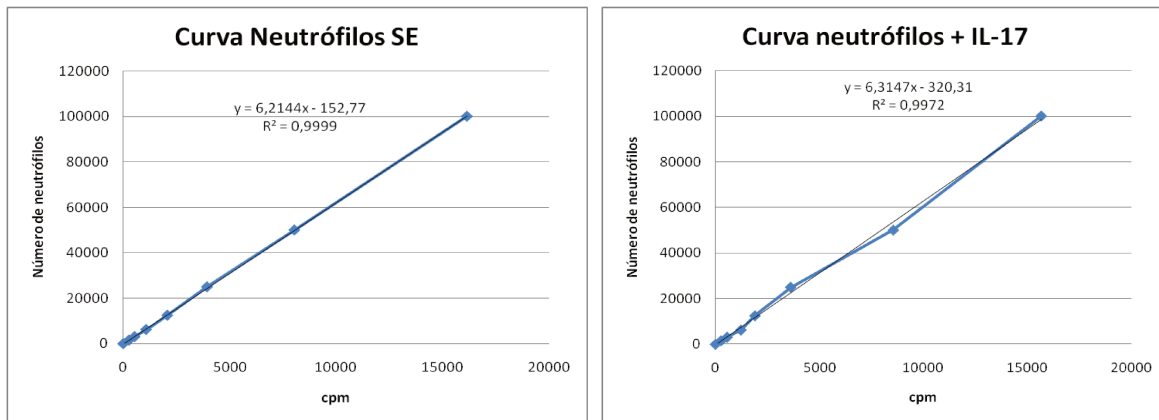
Para avaliar o efeito da IL17 sobre a capacidade de adesão dos neutrófilos às células endoteliais, os neutrófilos purificados como descrito acima foram



marcados com CFSE. Para isso, os neutrófilos foram transferidos para tubos do tipo falcon, ressuspensos em PBS estéril ( $5 \times 10^6$ /mL) e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente com  $1 \mu\text{M}$  de CFSE. Após a incubação, o volume dos tubos foi completado com meio RPMI contendo 10% de soro humano AB, e a seguir as células foram sedimentadas por centrifugação (10 minutos a 1250 RPM a  $4^\circ\text{C}$ ). Após 2 lavagens, parte dos neutrófilos foi mantida sem estímulo e outra parte estimulada com IL17 recombinante (100ng/mL) por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  (5%). Após a incubação os neutrófilos foram coletados e submetidos a lavagem (1200 RPM por 10 minutos). Após a lavagem as células foram contadas, ressuspensas em meio RPMI suplementado com soro humano AB e incubadas sobre lâminas específicas para cultura, nas quais células HLEC foram cultivadas (ver acima). Em cada cavidade da lâmina foram adicionados  $5 \times 10^5$  neutrófilos. Após 1 hora de incubação a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  (5%), as cavidades das lâminas foram lavadas gentilmente por 10 vezes (com meio de cultura a  $37^\circ\text{C}$ ) para desprender os neutrófilos não aderidos. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de formaldeído (2%) para fixação das células. As lâminas foram incubadas por 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , e então lavadas com PBS (10 vezes). Após a remoção das divisões, as lâminas foram cobertas com solução contendo o corante DAPI (marcação de núcleo celular), recobertas com lamínulas e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikkon), com filtros específicos para DAPI e CFSE. De cada cavidade (condição) foram fotografados 3 campos selecionados de maneira aleatória para posterior contagem do número de neutrófilos aderidos por campo.

### **3.10. Teste de adesão de neutrófilos - liberação de cromo.**

A adesão dos neutrófilos em células endoteliais também foi avaliada por meio de um teste de liberação de cromo. Para isso, após a separação, parte dos neutrófilos foi mantida sem estímulo e outra parte estimulada com IL17 recombinante (100ng/mL) por 24 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%). Após a incubação os neutrófilos foram coletados e submetidos a lavagem por centrifugação (1200 RPM 4°C por 10 minutos). Em seguida as células foram contadas e incubadas com cromato de sódio (7,4 mBq/1x10<sup>6</sup> células - Cr<sup>51</sup>-481mBq/mL – IPEN/CENEM-SP) diluído em meio RPMI suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e cromato de sódio por 75 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. A seguir as células foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com 2 mL de meio RPMI suplementado. As células foram novamente contadas e ressuspensas em meio RPMI suplementado e incubadas em placas de 24 cavidades nas quais células HLEC foram cultivadas (ver acima). Em cada cavidade foram adicionados 2x10<sup>5</sup> neutrófilos. Após 1 hora de incubação a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%), as cavidades das placas foram lavadas gentilmente por 10 vezes para desprender os neutrófilos não aderidos, sendo então adicionados 0,2 mL de PBS-Triton X100 (10%) para a lise das células. Após homogeneização foram retirados 90 µL do sobrenadante, que foram transferidos para tubos apropriados. A leitura da liberação de cromo foi feita em contador gama (Gama 55008 - Bekman). Como forma de avaliação do número de neutrófilos aderidos, para cada experimento foi elaborada uma curva padrão com um número conhecido de neutrófilos marcados com cromo (figura 3.1).



**Figura 3.1** - Exemplos de curvas-padrão obtidas nos experimentos de adesão de neutrófilos com liberação de cromo. As curvas foram elaboradas com 7 pontos iniciando-se em  $1 \times 10^5$  neutrófilos até  $1,5 \times 10^3$  neutrófilos. A emissão de radioatividade (cpm) foi então "plotada" contra o número de neutrófilos, obtendo-se uma fórmula por meio de regressão linear (destacada no gráfico), a qual foi utilizada para calcular o número de neutrófilos aderido em cada cavidade da placa.

### 3.11. Imunofluorescência para análise de células por citometria de fluxo.

Células (neutrófilos e HLEC) estimuladas conforme descrito nos itens anteriores foram distribuídas ( $2 \times 10^5$  células/cavidade) em placa de 96 cavidades com fundo em U. Para cada tipo celular foi adicionado um conjunto de anticorpos para marcação de superfície. **Neutrófilos:** anti-CXCR1 (FITC), anti-CXCR2 (PE), anti-IL23R (PercP-Cy5), anti-IL17RA (APC), anti-CD16 (APC-Cy7), anti-CD62L (FITC) e anti-CD54 (PE). **HLEC:** CD54 (FITC), CD62E (PE), CD62P (PE-Cy5), CD11b (APC-Cy7), CD11a (FITC), CD106 (PE). As células foram incubadas com o respectivo conjunto de anticorpos diluídos em 20  $\mu$ L de PBS-BSA (0,1%)-Azida sódica (0,2mM) (PBS-B-A), por 30 minutos a 4°C no escuro. Após este período

foram adicionados 150  $\mu$ L de PBS-B-A, centrifugando-se por 10 minutos a 1250 RPM a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e as células ressuspensas (vórtex) adicionando-se 200  $\mu$ L de tampão PBS-B-A, seguido de nova centrifugação (10 minutos a 1200 RPM, 4°C). Em seguida as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de formaldeído 2%, e incubadas à temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. Após serem transferidas para tubos apropriados e o volume completado para 300  $\mu$ L de formaldeído 2%, as leituras foram feitas em citômetro de fluxo (FACScanto/Becton & Dickson). A análise dos resultados foi feita em programa específico (FCSExpress –De Novo Software), sendo analisada a porcentagem de células positivas e/ou a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada marcador.

### **3.12. Determinação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos.**

A avaliação do efeito do tratamento com IL17 e/ou IL23 e IFN- $\gamma$  sobre a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* foi realizada por meio de citometria de fluxo empregando-se a marcação com dihidrorodamina-123 (DHR-123) [93]. Para isso, neutrófilos obtidos do sangue periférico de indivíduos controle, conforme descrito acima, foram incubados na presença de citocinas recombinantes (IL-23 - 100 ng/mL, IL-17 – 100 ng/mL ou com IFN- $\gamma$  - 100ng/mL) por 24 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%). Após a incubação os neutrófilos foram coletados e submetidos a lavagem. Após a lavagem as células foram contadas e ressuspensas em PBS estéril (5x10<sup>6</sup> células/mL) e incubadas com 4 $\mu$ M de DHR-123 (Invitrogen - Molecular Probes) por

30 minutos no escuro. Após a incubação as células foram lavadas 2 vezes com meio RPMI e incubadas com células leveduriformes de *P. brasiliensis* das cepas Pb18 ou Pb265 (razão 10 neutrófilos para cada levedura) por 1 hora a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> (5%). Como controle positivo os neutrófilos foram estimulados com PMA (50ng/mL - 1 hora). Após o período de incubação os neutrófilos foram coletados e analisados por citometria de fluxo para análise da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **3.13. Análise da capacidade migratória de neutrófilos em resposta à CXCL8**

Para avaliar a capacidade migratória de neutrófilos foram realizados testes de quimiotaxia. Os neutrófilos de indivíduos controle foram estimulados por 24 horas com citocinas recombinantes (IL-23 - 100 ng/mL e/ou IL-17 – 100 ng/mL). Após esse período as células foram coletadas, contadas e tiveram a viabilidade estimada com azul de tripan. As células foram então ressuspensas em meio RPMI suplementado e colocadas na câmara superior ( $5 \times 10^5$  células) de uma placa específica para quimiotaxia (Millipore Multiscreen Plate - MAMIC35 - com membrana de 3 µm). Na câmara inferior da placa foi adicionado meio RPMI contendo diferentes concentrações de CXCL8 recombinante (0 a 20 ng/mL). As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>, após esse período as células da câmara superior foram removidas por meio da aplicação de "swabs". As placas foram centrifugadas, e as células foram coletadas por meio da lavagem das cavidades inferiores (2x) com tampão PBS contendo 1% de BSA. Após centrifugação, as células foram submetidas à imunofluorescência com anticorpo anti-CD16 (APC-Cy7), como descrito acima e ressuspensas em 100 µL de

formaldeído a 2%. O número de células em cada tubo foi avaliado pela aquisição de 100  $\mu$ L da suspensão de células em citômetro de fluxo, sendo o número absoluto convertido em células/mL.

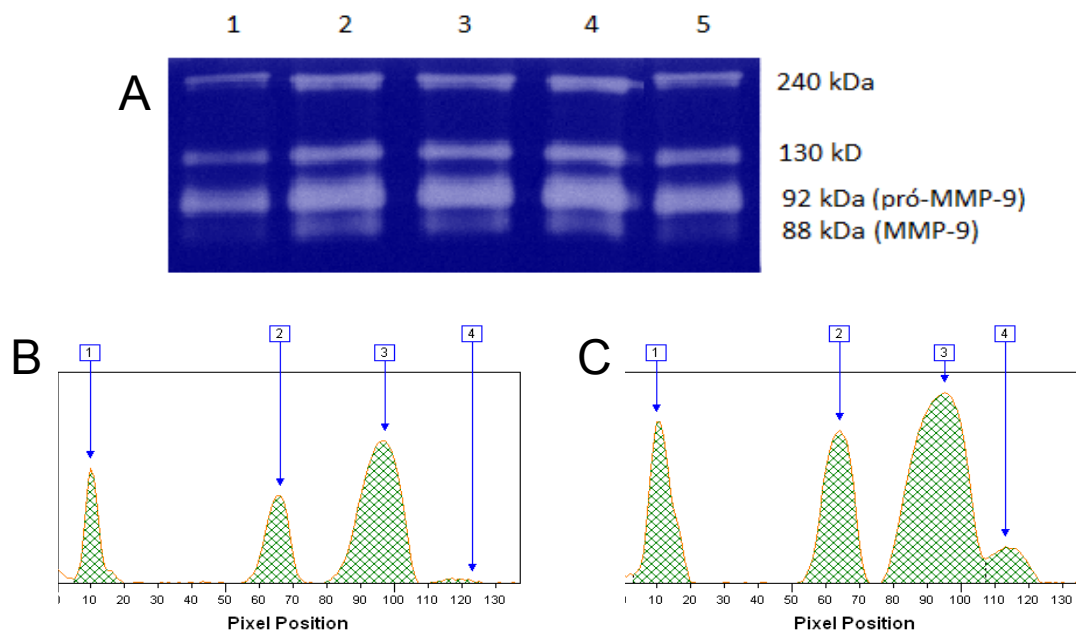
#### **3.14. Análise da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e MMP-9 por neutrófilos e de IL-17 por CMSP.**

Para avaliar a produção de matriz-metaloproteinase-9 (MMP-9), IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  por neutrófilos e de IL-17 por CMSP foram feitas culturas nas condições experimentais descritas acima, e o sobrenadante foi avaliado por meio de ELISA ("kits" DuoSet – R&D Systems), conforme as instruções do fabricante.

#### **3.15. Análise da atividade gelatinolítica de MMP-9 (zimografia)**

A avaliação da atividade gelatinolítica de metaloproteinases foi feita por meio de teste de zimografia. Para isso, neutrófilos obtidos conforme descrito acima foram incubados por 24 horas com citocinas recombinantes (IL-17 – 100 ng/mL e/ou IL-23 - 100 ng/mL ou com IFN- $\gamma$  - 100ng/mL). Após esse período o sobrenadante das culturas foi coletado e as células utilizadas para preparação de lisado. O lisado foi feito por meio da adição de 100  $\mu$ L/1x10<sup>6</sup> células de tampão de extração (Tris - 100 mM - pH 7,6; NaCl - 200 mM; CaCl<sub>2</sub> - 100 mM e TritonX-100 - 1%) seguido de homogeneização e incubação em gelo por 30 minutos. Após a incubação os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 g a 4°C para a remoção dos restos celulares e o sobrenadante transferido para outro tubo e armazenado a -80°C até o momento do uso. Para a separação das frações

protéicas dos lisados de células obtidos conforme descrito acima, os mesmos foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida-bisacrilamida (7% - 0,75mm de espessura) contendo 1% de gelatina tipo A obtida de pele suína (Sigma-Aldrich), na presença de SDS. Cada um dos lisados foi aplicado em um poço diferente e submetido à eletroforese em cuba vertical (BioRad), à voltagem constante de 100V, por aproximadamente 2 horas. Para a determinação do peso molecular das bandas foi utilizado um padrão de peso molecular. Após a eletroforese, os géis foram lavados por 1 hora (2 trocas) com solução a 2,5% de Triton-X-100 para remoção do SDS. Após as lavagens os géis foram incubados por 24 horas a 37°C em tampão Tris-HCl (10mM - pH 7,5) contendo 5mM de  $\text{CaCl}_2$  e 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Os géis então foram corados com "Comassie Blue" e analisados em equipamento de análise de imagem (ImageQuant 350 - GE LifeScience). A avaliação da formação de bandas após a captura da imagem foi realizada com o software ImageQuant TL. Os resultados foram expressos como área de cada banda (figura 3.2).



**Figura 3.2** - Zimografia para determinação da atividade gelatinase da MMP-9 produzida por neutrófilos estimulados com IL-17 e/ou IL-23 ou IFN- $\gamma$ . **A)** Gel representativo dos resultados obtidos, com a análise do lisado de neutrófilos mantidos sem estímulo (linha 1) ou estimulados por 24 horas com IL-17 (linha 2), IL-23 (linha 3), IL-17+IL-23 (linha 4) ou IFN- $\gamma$  (linha 5). **B e C)** Exemplo do resultado da análise realizada pelo software ImageQuant TL, no qual se pode observar a área (em pixels - hachurado verde) das bandas de 240 kD (1), 130 kd (2), 92k Da (3) e 88 kDa (4) de amostras sem estímulo (**B**) e estimuladas com IL-17 (**C**).

### 3.16. Reações de PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

#### 3.16.1.Extração de RNA

A extração do RNA total de amostras obtidas foi realizada por meio da técnica utilizando Trizol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Após a extração as amostras foram quantificadas por meio da leitura em



espectrofotômetro (NanoDrop) a 260 nm. A pureza do RNA obtido foi inferida pela razão entre as absorbâncias obtidas a 260 nm e 280 nm, que deveria estar próxima de 2.

### **3.16.2.Síntese de cDNA**

Antes da síntese do cDNA, as amostras de RNA obtidas foram submetidas ao tratamento com DNase para a remoção de possíveis cadeias de DNA genômico contaminante. Para tanto, 1µg de RNA total foi diluído em água DEPC em um volume final de 25,6 µL e foram acrescentados 4,1 µL de um “mix” contendo 3,1µL de tampão 10x concentrado e 1µL de DNase humana I (Ambion). A seguir as amostras foram incubadas a 37°C durante 30 minutos para a remoção do DNA. Após essa incubação, foi adicionado a cada tubo 0,3µL de EDTA pH 8.0 - 0,5M e as amostras foram incubadas a 75°C por 10 minutos para inativação da atividade enzimática da DNase.

Para a síntese do cDNA, ao RNA tratado foi adicionado 1µL de oligo dT<sub>16</sub> e 1µL de “primers” randômicos (ambos Applied Biosystems). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos e resfriada rapidamente em gelo. A seguir foram adicionados 18 µL de um “mix” composto por: 10 µL de tampão de síntese; 2,5 µL de dNTP (10mM); 5 µL de DTT (0,1M) e 0,5 µL de superscript R/T III (200U/µL - (Invitrogen)). A mistura foi então incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, e a seguir a 40°C por 50 minutos. A atividade enzimática foi inativada incubando-se a 90°C por 5 minutos, seguido por incubação a 4°C por 5 minutos. A mistura foi centrifugada rapidamente, adicionando-se 1 µL de RNase humana, incubando-se

a 37°C por 20 minutos, para a eliminação das moléculas restantes de RNA. Após a síntese, as amostras de cDNA foram quantificadas por meio da leitura em espectrofotômetro (NanoDrop) a 260 nm. As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

### **3.16.3. Protocolo de qRT-PCR**

O qRT-PCR foi realizado em equipamento de análise em tempo real StepOne (Applied Biosystems, California, USA) utilizando metodologia com corante intercalante SybrGreen. Em cavidades de placas de 100µL foram adicionados 3 µL de cDNA (contendo 300ng de cDNA obtido conforme descrito acima ou de água no caso do controle negativo), 1 µL do primer sense e 1 µL do primer anti-sense previamente diluídos na concentração de 80 pM/reação (tabela I) e 5 µL do “master mix”, contendo dNTP, Taq polimerase, MgCl<sub>2</sub>, SybrGreen, e tampão (Absolute SYBRGreen RT-PCR mix, Applied Biosystems). As placas foram seladas e colocadas no aparelho de PCR em tempo real e submetidas a 40 ciclos de amplificação: 95°C por 15 segundos, seguido de um período de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Para avaliar a especificidade dos primers utilizados, em cada reação foi elaborada uma curva de “melting” (aquecimento gradual da amostra amplificadas de 60°C a 95°C, com incremento de 0,3°C) na qual foi possível observar a dissociação dos produtos de amplificação. Os resultados foram analisados quanto à expressão do gene de interesse de cada amostra, utilizando como gene normalizador o GAPDH e como amostra de referência o cDNA obtido a partir do RNA de um “pool” de CMSPs

(não estimuladas) ou de neutrófilos (ex vivo) obtidas de 5 controles normais. Os resultados foram expressos como concentração relativa calculada conforme descrito por Pfaffl (2001)[94] utilizando as eficiências de amplificação de cada “primer”, conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta\text{Ct gene Alvo}}}{(E_{\text{gene referência}})^{\Delta\text{Ct gene referência}}}$$

Onde  $E_{\text{gene alvo}}$  é a eficiência de amplificação da reação com o primer de interesse;  $E_{\text{gene referência}}$  é a eficiência de amplificação da reação com o primer do gene normalizador;  $\Delta\text{Ct gene alvo}$  é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o primer do gene de interesse (p.e. pool de neutrófilos não estimulados) menos o Ct de amostra para o mesmo gene;  $\Delta\text{Ct gene referência}$  é igual ao valor de Ct de uma amostra controle amplificada com o primer do gene normalizador (p.e. pool de neutrófilos não estimulados) menos o Ct de amostra para o mesmo gene.

**Tabela I:** Sequência dos “primers” que foram utilizados no qRT-PCR. Desenhados com o auxílio do programa PrimerExpress (Applied).

| Primer                         | Sequência (5'→3')                                      | Eficiência |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------|------------|
| <b>GAPDH</b>                   | F-CCACATCGCTCAGACACCAT<br>R-GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT | 102,7      |
| <b>IL17A</b>                   | F-AATCTCCACCGCAATGAGGA<br>R-ACGTTCCCATCAGCGTTGA        | 98,4       |
| <b>ROR<math>\gamma</math>t</b> | F-AGAGGGACTCCTTGCCTCTC<br>R-CAGCATCTGCTCACTTCCAA       | 99,7       |
| <b>IL-17R</b>                  | F-CTACTATGTGGCGGGCATT<br>R-TCGGCACTAGCGGTAAAGTT        | 103,7      |
| <b>CXCR1</b>                   | F-TCCTGCCTCACACCTTTGG<br>R-ACGCAGGGTGAATCCATAGC        | 100,9      |
| <b>CXCR2</b>                   | F-TGCTGTTCTGCTACGGATTCA<br>R-ATGGCCCGGTGCTTCTG         | 99,7       |
| <b>CD62L</b>                   | F-CAAGATGCAGGCAAATGGA<br>R-GGCTGGCAAGAAGCTGTGTAA       | 97,1       |
| <b>CD54</b>                    | F-GCCAGGAGACACTGCAGACA<br>R-TGGCTTTGTCAGAATCACGTT      | 104,6      |
| <b>MMP-9</b>                   | F-ACGCACGACGTCTTCCAGTAC<br>R-TCCGGGAACTCATGCG          | 102,9      |

### 3.17. Western-blotting / imunoblot

#### 3.17.1. Preparação do lisado de neutrófilos

Para confirmar a atividade direta das citocinas recombinantes na ativação dos neutrófilos, as células purificadas (> 99% de pureza) foram estimuladas por 1 hora com as citocinas recombinantes (IL17 e/ou IL23 - 100 ng/mL de cada). Após o estímulo, as células foram coletadas, transferidas para tubos eppendorf de 1,5

mL, centrifugadas (sendo o sobrenadante completamente removido) e as células foram lisadas em tampão RIPA (PBS-Igepal (1%)-deoxicolato de sódio (0,5%)-SDS (0,1%) gelado, acrescido no momento do uso de inibidores de protease (aprotinina a 50 KIU/mL, PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) a 100µg/mL e ortovanadato de sódio – Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> a 1mM) e de inibidores de fosfatase (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 - Sigma). Após 30 minutos de incubação em gelo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 g a 4°C para a remoção dos restos celulares e o sobrenadante transferido para outro tubo. Após esse procedimento, a quantidade de proteína obtida em cada amostra foi avaliada pelo método de Lowry conforme instruções do fabricante do reagente (BioAgency). As amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

### **3.17.2. SDS-PAGE e western-blotting**

Para a separação das frações protéicas dos lisados de células obtidos conforme descrito acima, os mesmos foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida-bisacrilamida (10% - 0,75mm de espessura) na presença de SDS. Em cada poço foram aplicados 50 µg de proteína total. Antes da eletroforese os lisados foram diluídos para a concentração de uso em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8-glicerol (25%)-SDS (0,5%)-azul de bromofenol-mercaptoetanol (10%)) e desnaturados por aquecimento em banho-maria a 99°C por 5 minutos. Cada um dos lisados foi aplicado em um poço diferente e submetido à eletroforese em cuba vertical (BioRad), à voltagem constante de 100V, por aproximadamente 90 minutos. Para a determinação do peso molecular das bandas marcadas no

imunoblot foi utilizado um padrão de peso molecular, reconhecido pelo anticorpo secundário utilizado na técnica (Cruz Marker – Santa Cruz). Após a eletroforese, os géis foram utilizados para a transferência (western-blotting) das frações protéicas para membranas de PVDF – (Polyvinylidene fluoride - poros de 0,22µm – Bio Rad) por meio de eletroforese em voltagem constante de 100 V por 1 hora. Após a transferência as membranas foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

### **3.17.3. Imunoblot**

Após os procedimentos descritos acima, as membranas foram submetidas à reação de imunoblot, utilizando-se anticorpos específicos (para proteínas não fosforiladas e fosforiladas) previamente titulados. Para o imunoblot as membranas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com salina tamponada com Tris (TBS) adicionada de 1% (peso/volume) de BSA e 0,05% de Tween 20. Após lavagem as membranas foram incubadas por uma noite com anticorpos contra proteínas fosforiladas (anti-pERK, anti-pp38 ou anti-pJNK) diluídos em TBS-Tween-20 (0,05%)-BSA 1%, sob agitação constante. Após a incubação as membranas foram transferidas para cassetes plásticos e a reação foi realizada no equipamento Snap-ID (Millipore). As membranas foram lavadas e foi adicionado o anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Santa Cruz Biotechnology) diluído em TBS-T-BSA por 60 minutos a temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas e mergulhadas em solução contendo Luminol (Santa Cruz Biotechnology) por 1 minuto, após o qual o excesso de tampão foi retirado. Após a

revelação, as membranas foram fotografadas e analisadas por equipamento específico para análise de quimioluminescência (ImageQuant 350 GE Life Science). A avaliação da formação de bandas específicas foi realizada após a captura da imagem utilizando o software ImageQuant TL. Após a reação com anticorpos fosforilados foi realizada a remoção dos anticorpos da primeira reação de imunoblot (“stripping”) por meio de duas lavagens em tampão TBS contendo 10% SDS e 1% v/v de Tween 20 (pH 2,2) por 10 minutos cada a temperatura ambiente, seguidas por lavagens em PBS e TBS contendo 0,05% Tween 20. Após as lavagens as membranas foram novamente incubadas com o tampão de bloqueio e foram submetidas à marcação com anticorpos contra as proteínas não fosforiladas (anti-ERK, anti-p38 ou anti-JNK). Após essa etapa e novo “stripping” as membranas foram submetidas à nova marcação para detecção de actina (controle endógeno) com o intuito de garantir maior precisão na análise dos resultados obtidos. As etapas de incubação com anticorpo secundário e revelação foram idênticas as descritas para as proteínas fosforiladas.

Após a aquisição das imagens, as mesmas foram analisadas com o intuito de semi-quantificar a fosforilação sofrida pelas proteínas em cada amostra. A semi-quantificação foi feita em software específico (ImageQuant TL – GE Life Sciences), por meio da estimativa do volume (em pixels) da banda obtida com o anticorpo anti-proteína fosforilada.

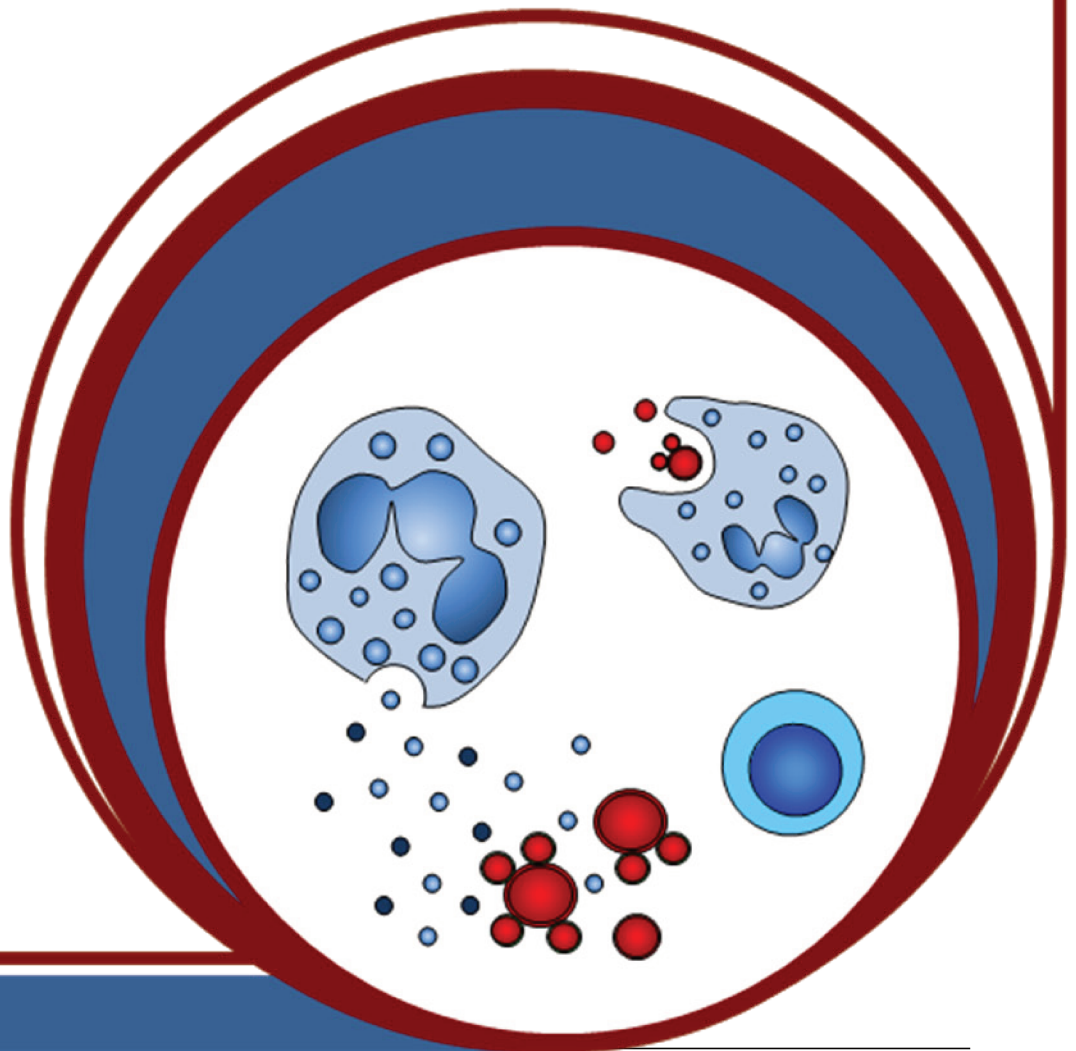
### **3.18. Análise estatística**

Para avaliar se a distribuição dos dados permitia o uso de testes paramétricos, os mesmos foram primeiramente avaliados pelo teste estatístico de

Kolmogorof-Smirnoff, o qual demonstrou que os dados apresentavam distribuição normal. Os resultados foram então analisados com testes paramétricos e estão representados como média  $\pm$  SEM. Para a comparação dos diferentes parâmetros (estímulos) dentro de um mesmo grupo foi utilizado o teste de ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. Para a comparação de um mesmo parâmetro em grupos diferentes (pacientes vs. controle) foi utilizado o teste  $t$  de Student. Foram considerados significativos resultados com  $p \leq 0,05$ .



# ***RESULTADOS***



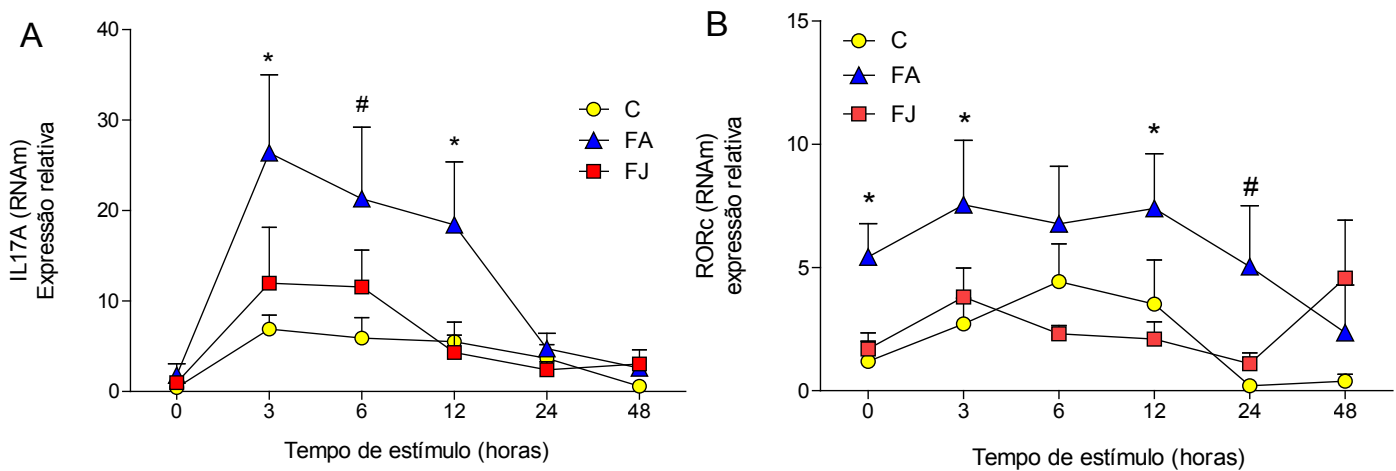


## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Análise da cinética de expressão do RNAm para IL-17 e ROR $\gamma$ t por células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com paracoccidioidomicose (FA e FJ) e controles por qRT-PCR.**

Em um primeiro momento decidimos analisar a cinética de produção do RNAm para IL-17 e ROR $\gamma$ t (o fator de transcrição característico de células Th17) por células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de pacientes apresentando a forma adulta (FA) ou juvenil (FJ) da PCM após o estímulo com PHA (figura 4.1). Os resultados da análise da cinética de expressão do RNAm para IL-17 demonstrou diferenças marcantes entre os grupos analisados (FA e FJ da PCM e controles). Células de pacientes com a FA da PCM apresentaram maior expressão quando comparadas às células dos dois outros grupos, atingindo pico de produção após 3 horas de estímulo, que permaneceu elevada até 12 horas, após esse período os níveis foram similares (figura 4.1A).

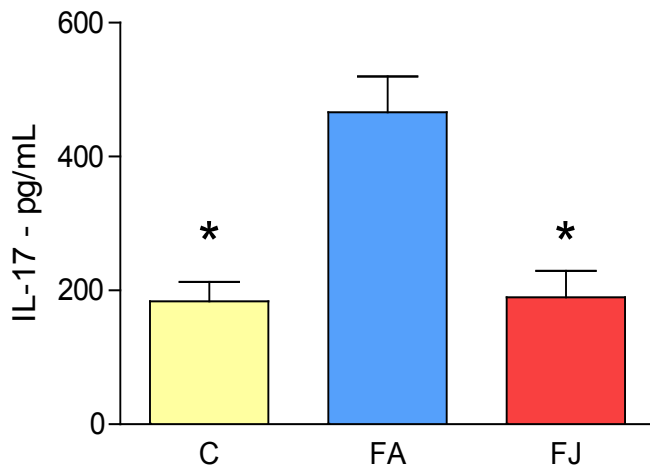
A análise da expressão do RNAm para Rorc (ROR $\gamma$ t) demonstrou que existe uma produção mais heterogênea, contudo, pudemos observar que a maior expressão ocorre em células de pacientes com a FA da paracoccidioidomicose, tanto em células não estimuladas como após o estímulo (figura 4.1B).



**Figura 4.1:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para IL-17A (**A**) e ROR $\gamma$ t (RORc - **B**) por células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa (forma adulta – FA e forma juvenil - FJ) e controles (C) não estimulados (0) e estimulados por 3, 6, 12, 24 e 48 horas com PHA (10 $\mu$ g/mL). Resultados expressos como média  $\pm$  SEM. Análise estatística: ANOVA com pós-teste de Tukey: \*  $p \leq 0.05$  em relação às CMSPs dos grupos controle (C) e pacientes com a FJ; #  $p \leq 0.05$  em relação às CMSPs de indivíduos controle (C).

#### 4.2. Análise da produção de IL-17 no sobrenadante de cultura de CMSPs de pacientes com paracoccidiodomicose (FA e FJ) e controles

Em relação à produção de IL-17, nossos resultados demonstraram que células de pacientes com a FA apresentam uma maior produção dessa citocina em relação aos outros grupos analisados (figura 4.2).



**Figura 4.2:** Avaliação da produção de IL-17 por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com PCM ativa (forma adulta – FA - n=25 e forma juvenil – FJ - n = 8) e de controles (C - n = 21). A dosagem de IL-17 foi realizada por ELISA (DuoSet

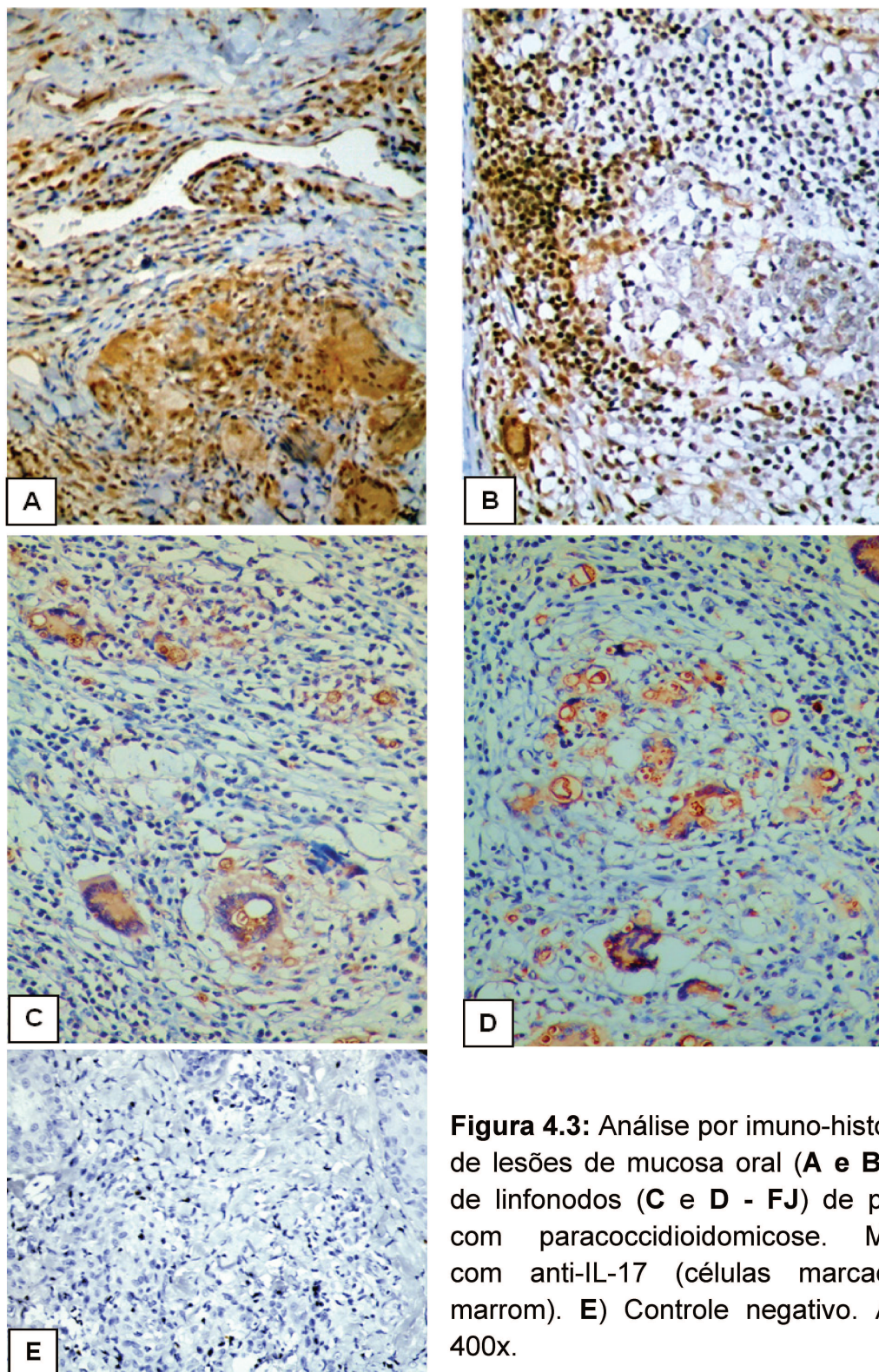
– R&D System) em sobrenadantes de cultura de CMSP estimuladas por 24 horas com PHA (10 $\mu$ g/mL). Teste estatístico: ANOVA, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células de pacientes com a FA da PCM.

#### 4.3. Análise da expressão de IL-17 em biópsias de lesões de pacientes com paracoccidioidomicose (FA e FJ)

Como pode ser observado nas micrografias abaixo, a análise por imuno-histoquímica das lesões de mucosas (FA - figuras 4.3A e B) e de linfonodos (FJ - figura 4.3C e D) demonstrou que em ambas as formas clínicas da PCM foi possível detectar a presença de células produtoras de IL-17. Embora os tecidos analisados nas duas formas clínicas sejam diferentes (mucosa-oral e linfonodos), não permitindo dessa forma uma comparação quantitativa direta, o número de células produtoras dessa citocina foi aparentemente maior nas lesões de mucosa (FA). Além disso, foi possível observar que nas lesões de pacientes com a FA (lesões de mucosa) diversos tipos celulares foram positivos para IL-17 (linfócitos, células epiteliais, macrófagos e células gigantes), enquanto que nas lesões de



pacientes com a FJ (linfonodos) a produção de IL-17 foi detectada principalmente em macrófagos e células gigantes.

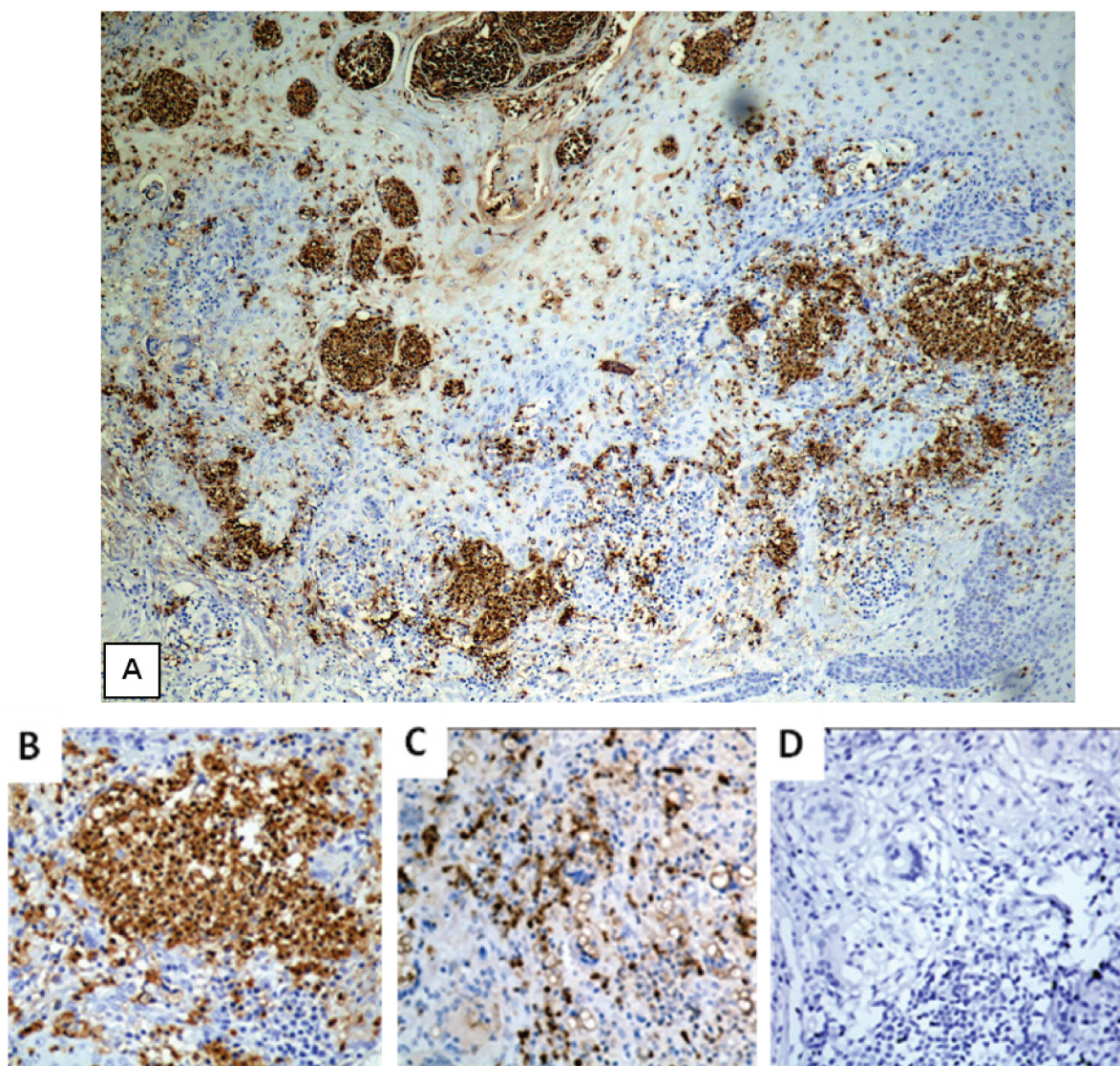


**Figura 4.3:** Análise por imuno-histoquímica de lesões de mucosa oral (A e B - FA) e de linfonodos (C e D - FJ) de pacientes com paracoccidioidomicose. Marcação com anti-IL-17 (células marcadas em marrom). E) Controle negativo. Aumento 400x.

#### **4.4. Análise da presença de neutrófilos em lesões de pacientes com a FA e FJ da paracoccidioidomicose**

Como mencionado, a IL-17 atua principalmente por meio da ativação de neutrófilos e a atração dessas células para os locais de infecção. Por meio da análise imuno-histoquímica, pudemos observar que em grande parte das biópsias de mucosa oral de pacientes com a FA da PCM há um grande infiltrado inflamatório, muitas vezes com a presença de abscessos compostos por neutrófilos (células CD15<sup>+</sup> - figura 4.4A). Também foi possível observar que esses abscessos ocorrem em locais onde há grande número de leveduras de *P. brasiliensis*, com a ocorrência de áreas de necrose (figura 4.4B). Nas lesões de linfonodo de pacientes com a FJ, também observamos a presença de neutrófilos, porém em número menor, em áreas esparsas ao redor de regiões ricas em células leveduriformes de *P. brasiliensis* (figura 4.4C).





**Figura 4.4:** Análise por imuno-histoquímica de células CD15<sup>+</sup> (neutrófilos) em lesões de mucosa oral e linfonodos de pacientes com paracoccidioidomicose. **A e B)** Lesão de mucosa oral de pacientes com a FA da PCM (aumento de 100 e 400 x respectivamente). **C)** Lesão de linfonodo de paciente com a FJ da PCM (aumento 400 x). **D)** Controle negativo.

Esses resultados nos levaram a concluir que a IL-17 pode ser importante principalmente na resposta inflamatória observada em pacientes com a FA da

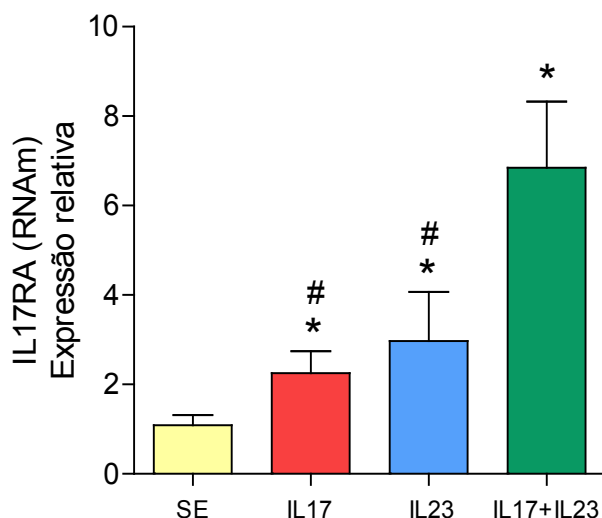


paracoccidioidomicose. Por esse motivo, no restante do trabalho utilizamos células obtidas de pacientes apresentando essa forma clínica da doença.

#### **4.5. Análise da expressão (RNAm e proteína) dos receptores IL17RA e IL23R por neutrófilos.**

Devido ao fato de termos observado que lesões de pacientes com a FA da PCM apresentam um infiltrado com grande número de neutrófilos e grande produção de IL17A, decidimos analisar a expressão dos receptores de IL-17 (IL17RA) e IL-23 (IL-23R) pelos neutrófilos, não tratados e após o estímulo com as citocinas recombinantes.

Quando analisamos a expressão relativa do RNAm para o receptor de IL-17 (IL17RA) observamos que o tratamento com IL-17 ou IL-23 isoladamente aumenta a quantidade de RNAm nas células, e que o tratamento com as duas citocinas recombinantes associadas apresentou um efeito sinérgico na expressão desse RNAm (figura 4.5).

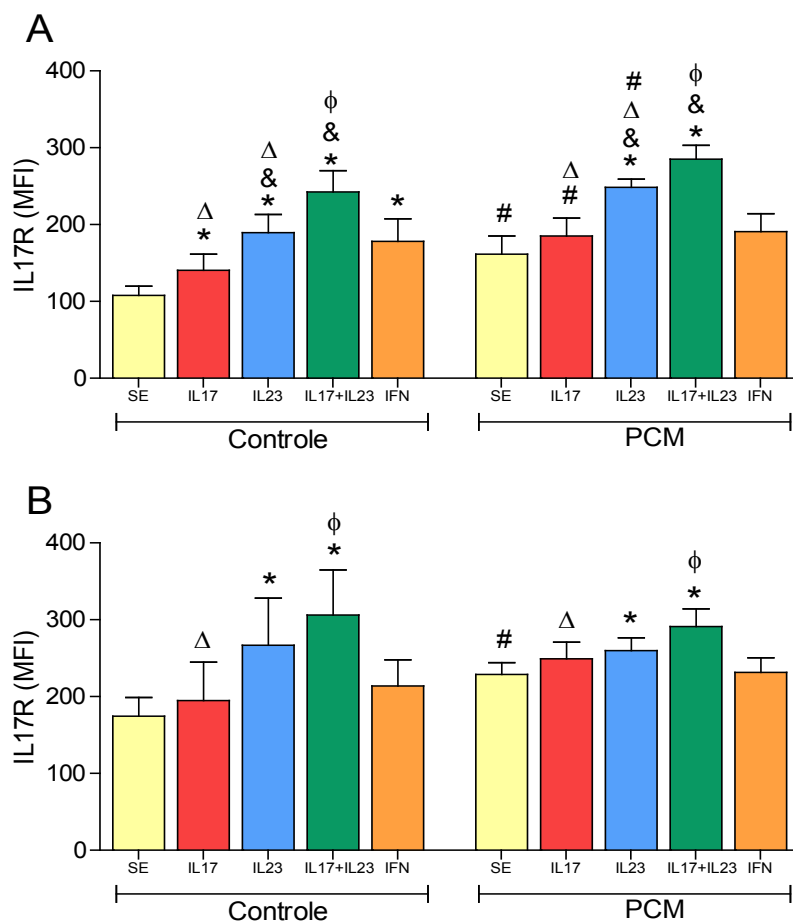


**Figura 4.5 (página anterior):** Quantificação relativa da expressão do RNAm para IL17RA em neutrófilos de indivíduos com paracoccidiodomicose ativa (FA - n=10) após 4 horas de cultura sem estímulo (SE) ou tratadas com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação. Teste estatístico: Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas; #  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23.

Em relação à expressão do IL17R nos neutrófilos pudemos observar que praticamente 100% das células expressam esse receptor tanto em células de pacientes com PCM, quanto de indivíduos do grupo controle, e que o tratamento com as citocinas recombinantes não altera esse perfil (dados não mostrados). Entretanto, quando analisamos a intensidade média de fluorescência para este receptor (MFI - relacionado ao número de moléculas expressas por cada célula individualmente), pudemos observar que o tratamento com IL-17 e/ou IL-23 leva a um aumento da expressão desse receptor nas células de pacientes e de controles (figura 4.6). É evidente também que a IL-23 tem um efeito superior em relação à IL-17, e que o tratamento com as duas citocinas combinadas apresenta um efeito sinérgico (figura 4.6A).

Quando comparamos a expressão desse receptor nos neutrófilos de pacientes com PCM e de indivíduos do grupo controle, observamos que esse receptor é mais expresso por células de pacientes, mesmo em neutrófilos não estimulados, e que após 4 horas de estimulação a expressão também foi maior nas células de pacientes (figura 4.6A), embora os níveis entre os dois grupos passem a ser similares após 24 horas de estímulo (figura 4.6B).

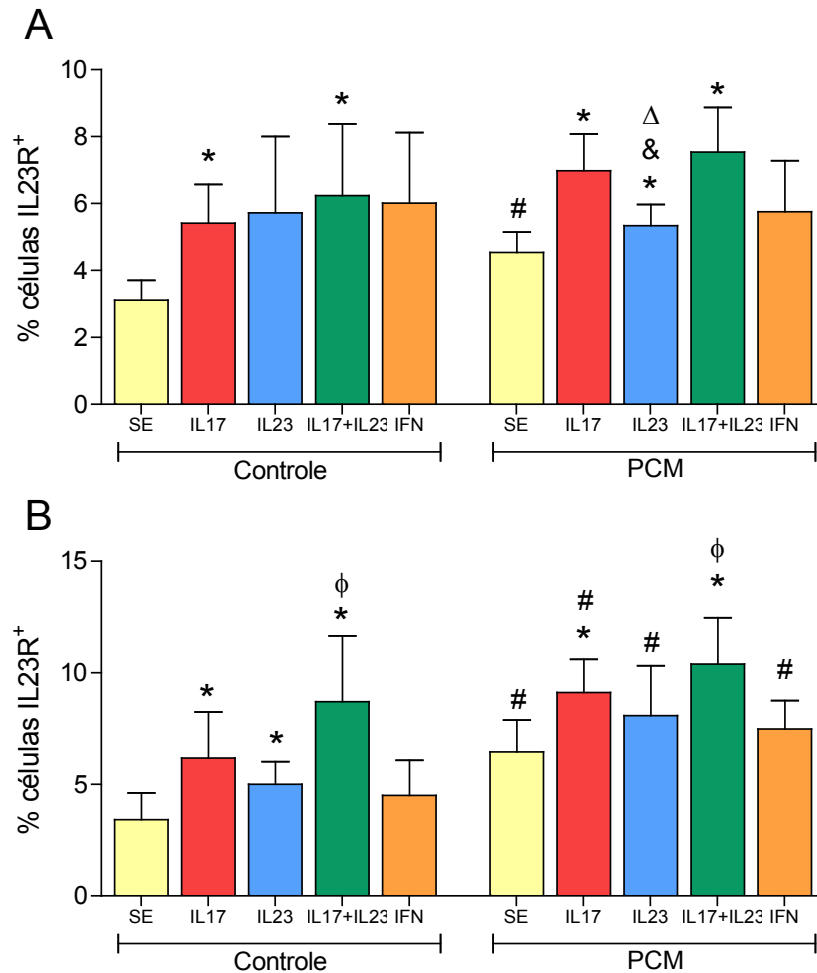
Em relação ao estímulo com IFN- $\gamma$  não observamos aumento significativo na expressão (exceto em neutrófilos do grupo controle após 4 horas de estímulo) (figura 4.6).



**Figura 4.6:** Análise por citometria de fluxo da intensidade média de fluorescência para a marcação com IL17R em neutrófilos de indivíduos com a FA da PCM (n=8) ou indivíduos do grupo controle (n=6). Os neutrófilos foram mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 horas (**A**) ou 24 horas (**B**) com IL-17 (100ng/mL) e/ou IL-23 (100ng/mL), e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas;  $\Delta$   $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23; &  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17;  $\phi$   $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IFN- $\gamma$ . **Comparação entre os grupos:** teste  $t$  : #  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos do grupo controle submetidas às mesmas condições.

Também avaliamos a expressão do RNAm para o receptor da IL-23 (IL23R) nos neutrófilos. Apesar de termos testado 3 pares de "primers" diferentes nas reações de qRT-PCR, com nenhum deles obtivemos resultados satisfatórios em relação à especificidade (dados não mostrados). Acreditamos que esta dificuldade esteja relacionada à existência de diversas variantes no RNAm para este receptor. Dessa forma não foram realizados experimentos quanto à expressão desse RNAm.

Apesar de não termos analisado a expressão do RNAm, a análise por citometria de fluxo mostrou que os neutrófilos expressam o receptor para IL-23, embora em pequena quantidade. Os resultados também demonstraram uma maior variação na expressão desse receptor, mas pudemos observar que uma maior porcentagem de neutrófilos do grupo de pacientes com PCM expressam o IL23R em relação às células de indivíduos do grupo controle, tanto em células não estimuladas quanto após 4 ou 24 horas de estímulo (figura 4.7). Também pudemos observar que o tratamento com IL-17 aumenta de maneira mais efetiva a frequência de células que expressam esse receptor, dados observados principalmente nos neutrófilos de pacientes (figura 4.7A). Não observamos contudo efeito sinérgico nos tratamentos, nem aumento de expressão quando as células foram tratadas com IFN- $\gamma$ .

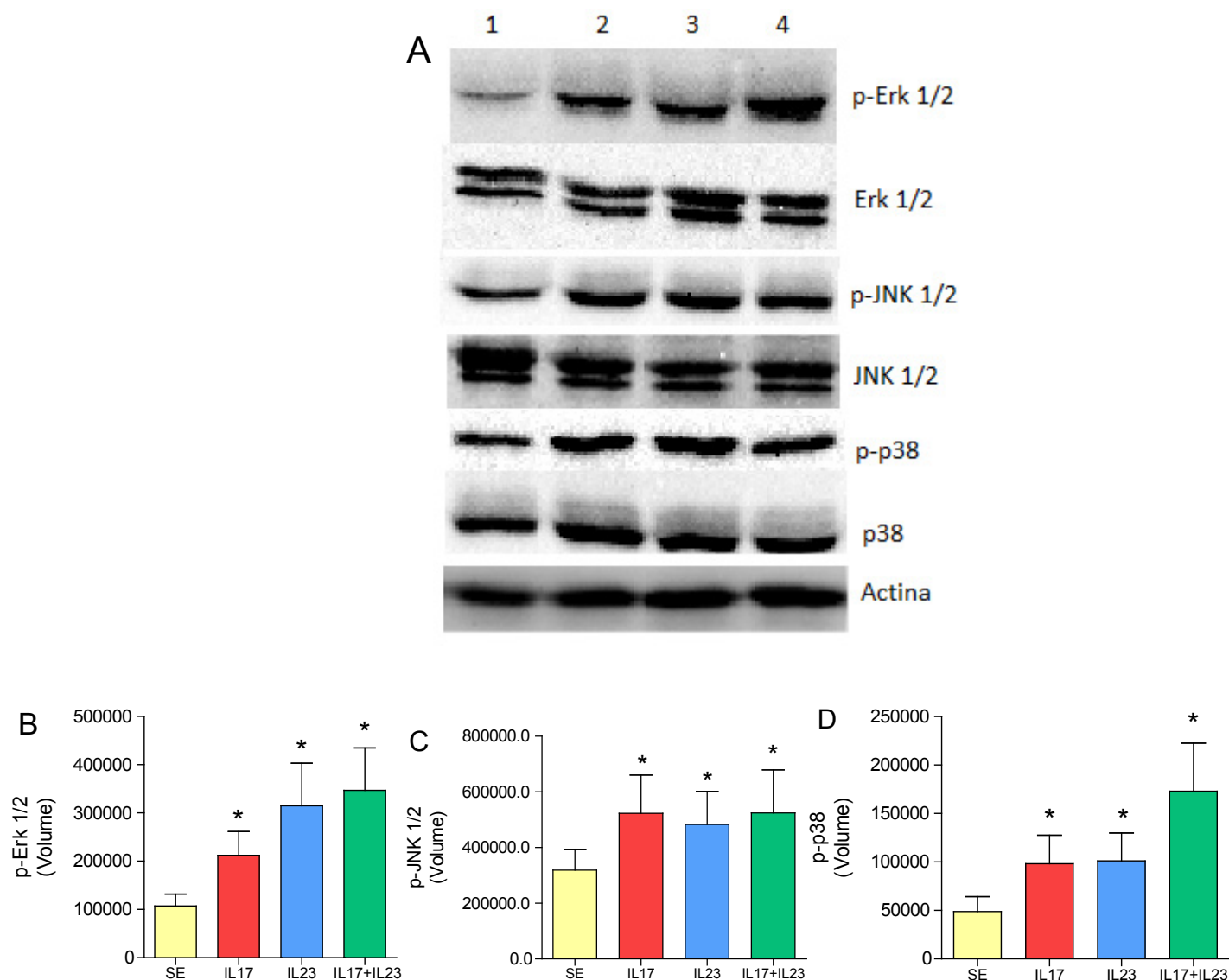


**Figura 4.7:** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos IL23R<sup>+</sup> de indivíduos com a FA da PCM (n=8) ou indivíduos do grupo controle (n=6). Os neutrófilos foram mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 horas (**A**) ou 24 horas (**B**) com IL-17 (100ng/mL) e/ou IL-23 (100ng/mL), e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas;  $\Delta$   $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL-17+IL-23; &  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL-17;  $\phi$   $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IFN- $\gamma$ . **Comparação entre os grupos:** teste  $t$ : #  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos do grupo controle submetidas às mesmas condições.

#### **4.6. Análise do efeito do tratamento com IL-17 e/ou IL-23 sobre a ativação dos neutrófilos.**

Ainda é controverso se a IL-17 e a IL-23 apresentam efeito direto sobre os neutrófilos ou se agem de maneira indireta. Para avaliarmos se o tratamento com IL-17 e/ou IL-23 apresenta efeito direto na ativação dos neutrófilos realizamos alguns experimentos com neutrófilos altamente purificados (>99% de pureza). Nesses experimentos analisamos a fosforilação de proteínas intracelulares envolvidas na sinalização dos receptores de IL17 (IL17RA) e IL-23 (IL23R). Os neutrófilos foram estimulados por 1 hora com as citocinas recombinantes, e analisados quanto à fosforilação das proteínas ERK 1/2, JNK 1/2 e p38.

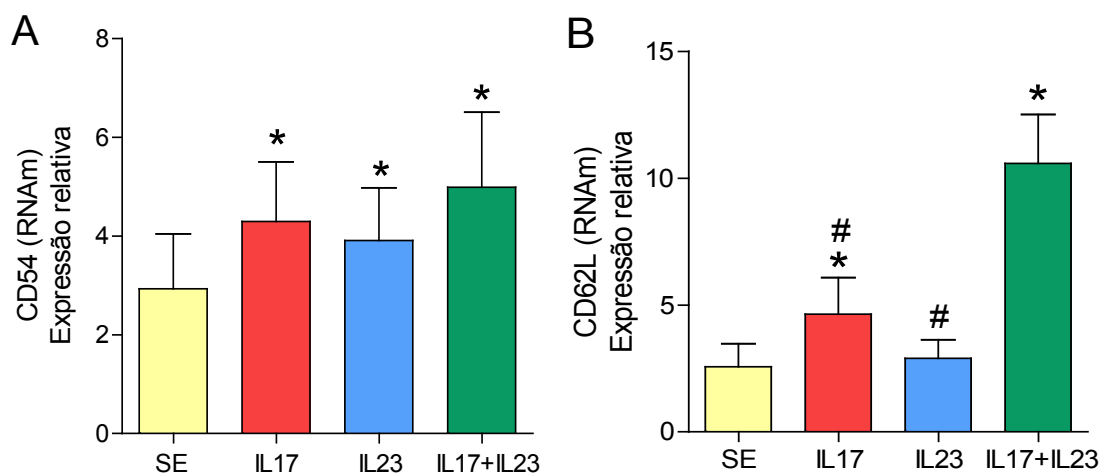
Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.8) neutrófilos tratados com IL-17 e/ou IL-23 apresentam fosforilação das proteínas ERK 1/2, JNK 1/2 e p38, sendo mais evidente a fosforilação da tirosina quinase ERK 1/2. Dessa forma podemos concluir que o tratamento com IL-17 e/ou IL-23 apresenta ação direta sobre os neutrófilos.



**Figura 4.8:** Análise da fosforilação das proteína ERK 1/2, JNK 1/2 e p38 em neutrófilos altamente purificados de indivíduos controle, após 1 hora de tratamento com as citocinas recombinantes IL17A e/ou IL23 (100 ng/mL de cada). **A** - Imagem representativa dos resultados obtidos, após 1 hora de tratamento: linha 1 = células sem estímulo, 2= células tratadas com IL-17, 3= células tratadas com IL-23, 4 = células tratadas com IL17+IL23. **B** a **D** – Análise semi-quantitativa da intensidade das bandas de p-ERK1/2 (**B**), p-JNK (**C**) e p-p38 (**D**). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  SEM do volume da banda obtida em três experimentos independentes. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas.

#### 4.7. Análise da expressão (RNAm e proteína) de moléculas de adesão (CD54/ICAM-1 e CD62L) por neutrófilos

A expressão do RNAm para as moléculas de adesão (CD62L e CD54) aumentou significativamente após o tratamento com IL-17 e IL-23 (figura 4.9). O efeito sinérgico das duas citocinas foi mais evidente sobre a expressão da selectina CD62L (figura 4.9B).

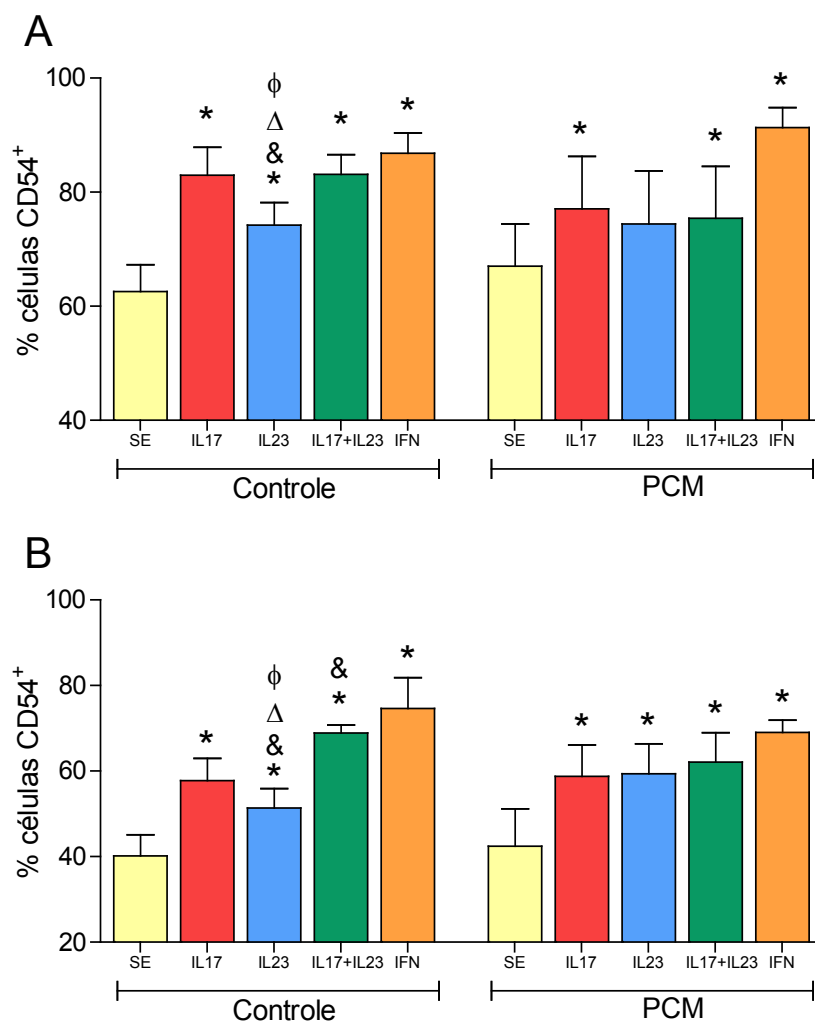


**Figura 4.9:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para CD54 (ICAM-1 - **A**) e CD62L (**B**) em neutrófilos de indivíduos com paracoccidioidomicose ativa (FA - n=10) após 4 horas de cultura sem estímulo (SE) ou tratadas com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas; #  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL-17+IL-23.

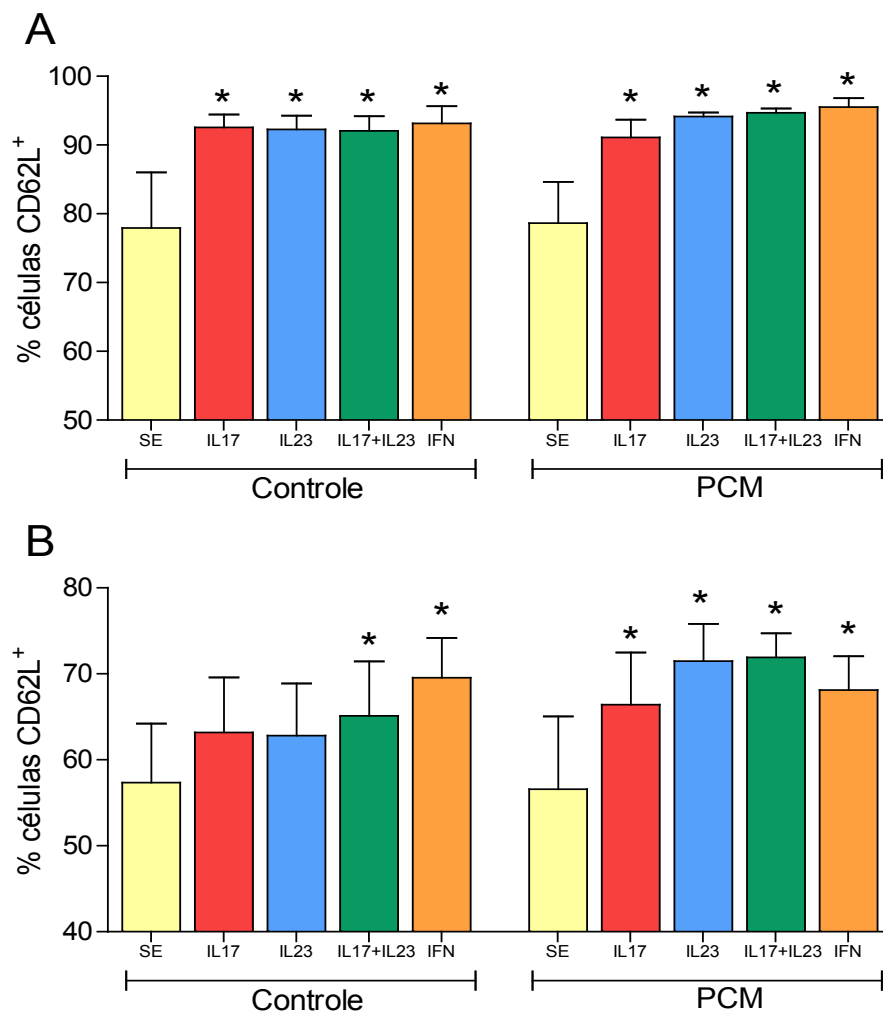
A análise por citometria de fluxo mostrou que não há diferenças significativas entre a porcentagem de neutrófilos que expressam CD54 (figura 4.10) ou CD62L (figura 4.11) entre os grupos de pacientes com PCM e o de indivíduos do grupo controle. Entretanto, pudemos observar que o tratamento com



IL-17 e/ou IL-23, leva a um aumento da porcentagem de células que expressam tanto CD54 quanto CD62L, nos dois grupos analisados. Também observamos um efeito superior do tratamento com IL-17 em relação ao tratamento com IL-23 no aumento da frequência de neutrófilos CD54<sup>+</sup> de pacientes (figura 4.10). Também foi possível notar que as maiores diferenças foram detectadas após 24 horas de estímulo em relação ao CD54 (figura 4.10), e após 4 horas de estímulo em relação ao CD62L (figura 4.11).



**Figura 4.10 (página anterior):** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos CD54<sup>+</sup> de indivíduos com a FA da PCM (n=8) ou indivíduos do grupo controle (n=6). Os neutrófilos foram mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 horas (**A**) ou 24 horas (**B**) com IL-17 (100ng/mL) e/ou IL-23 (100ng/mL), e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas;  $\Delta p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23;  $\& \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17;  $\phi p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IFN- $\gamma$ . **Comparação entre os grupos:** teste *t*: não foram observadas diferenças estatísticas.



**Figura 4.11 (página anterior):** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos CD62L<sup>+</sup> de indivíduos com a FA da PCM (n=8) ou indivíduos do grupo controle (n=6). Os neutrófilos foram mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 horas (**A**) ou 24 horas (**B**) com IL-17 (100ng/mL) e/ou IL-23 (100ng/mL), e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey.  $\leq 0,05$  em relação às células não estimuladas. **Comparação entre os grupos:** teste *t*: não foram observadas diferenças estatísticas.

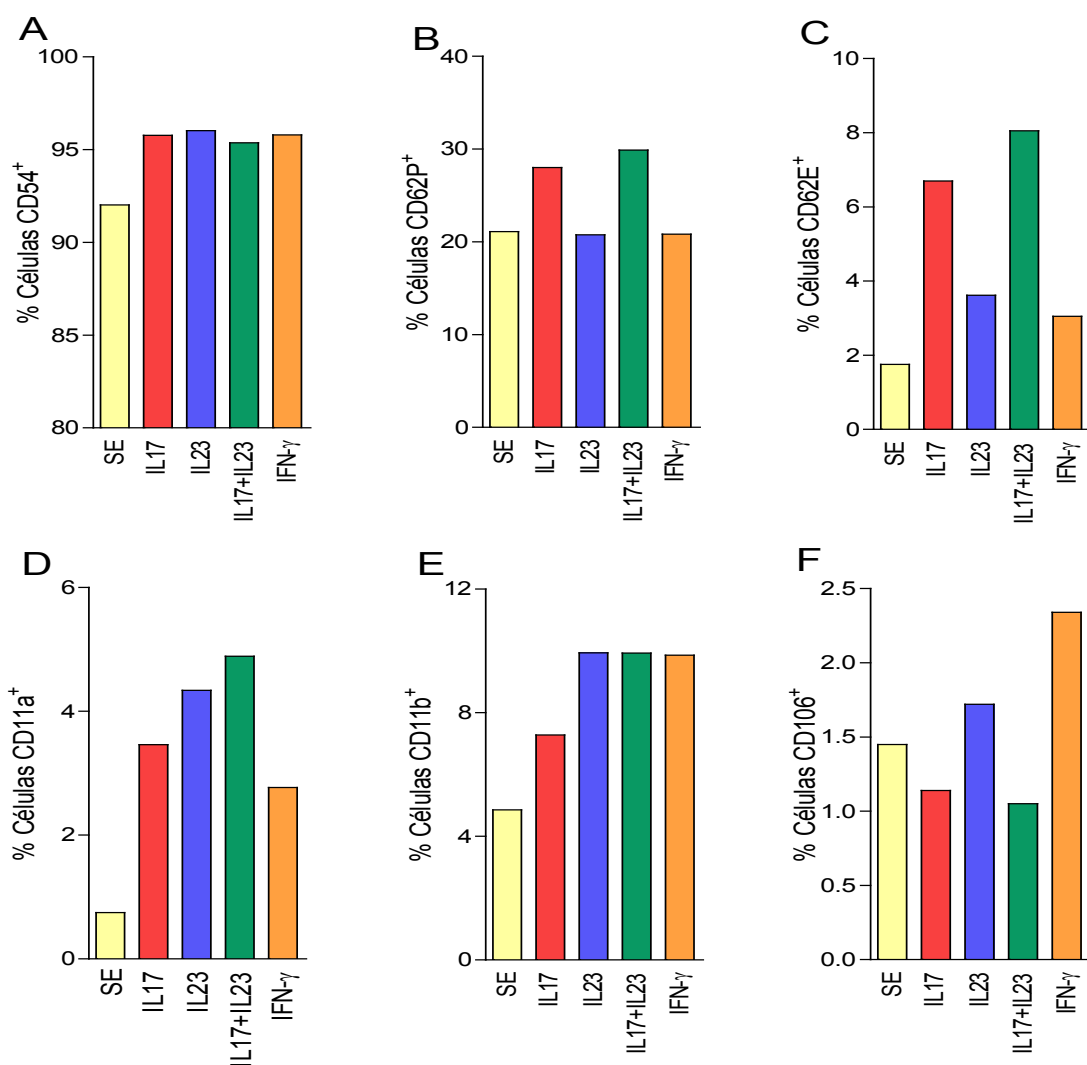
#### **4.8. Análise do efeito do tratamento com citocinas (IL17, IL23 e IFN- $\gamma$ ) sobre a adesão de neutrófilos em células endoteliais.**

Como pode ser observado nos experimentos descritos acima, neutrófilos estimulados com IL-17 e/ou IL-23 (principalmente a IL-17) aumentam a expressão de moléculas de adesão em sua superfície. Dessa maneira, decidimos investigar se o estímulo com IL-17 leva a um aumento na capacidade de adesão desses neutrófilos em células endoteliais, uma vez que essa etapa é crucial para a migração dos neutrófilos da corrente sanguínea para os tecidos infectados. Utilizamos nesses experimentos uma linhagem de células endoteliais pulmonares humanas (HLEC - "Human Lung Endothelial Cells"), uma vez que os pulmões são os principais órgãos afetados pela PCM.

Como a adesão de células no endotélio também dependem da expressão de moléculas de adesão por essas células, em um primeiro momento avaliamos por citometria de fluxo a expressão de algumas moléculas de adesão nas células HLEC, não estimuladas e após o estímulo com citocinas recombinantes (IL17 e/ou IL23 e IFN- $\gamma$ ). Pudemos observar que as células HLEC apresentam

constitutivamente uma alta expressão das moléculas de adesão CD54 (ICAM-1) e CD62P, e uma baixa expressão de outras moléculas (CD62E, CD11a, CD11b, CD106) (figura 4.12).

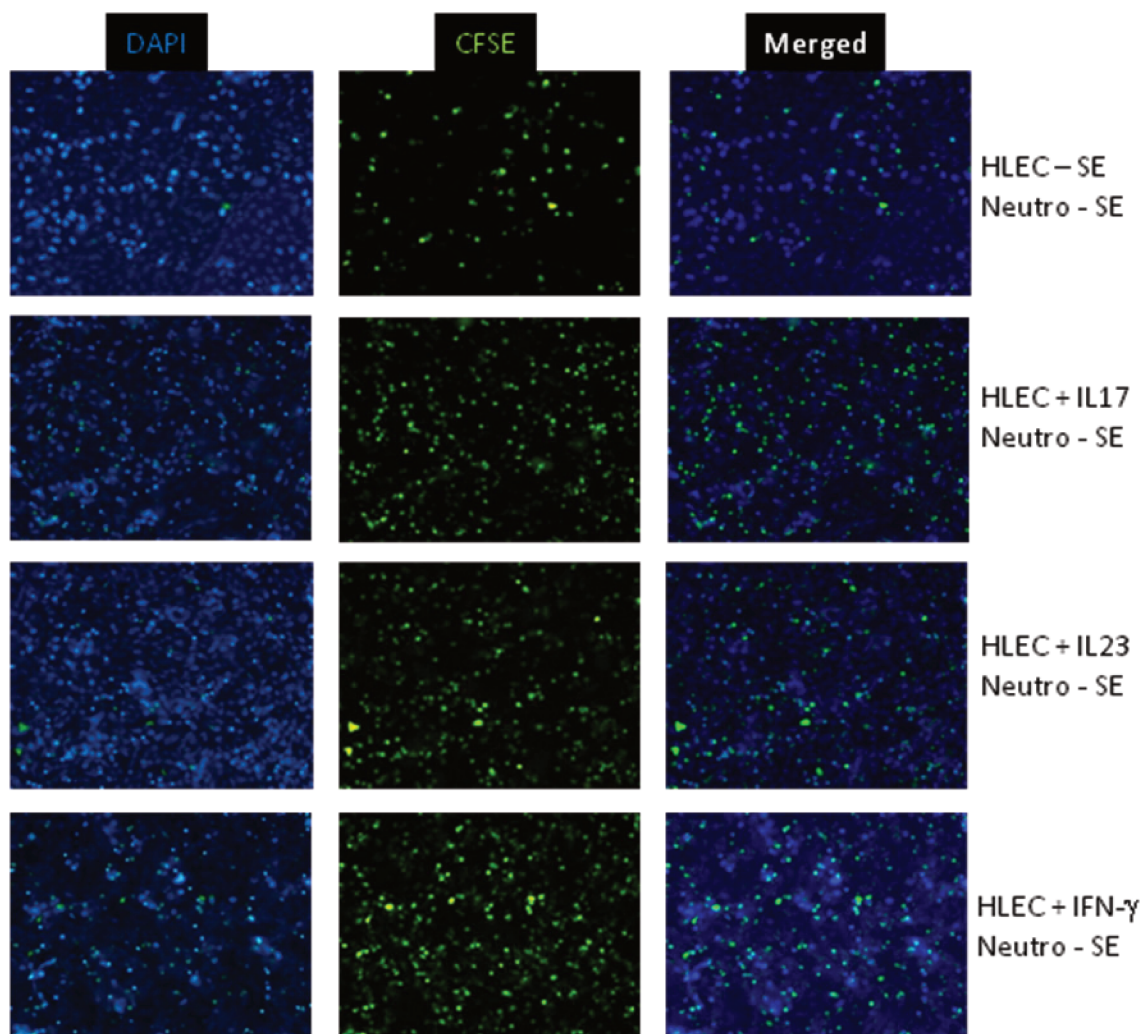
Após o estímulo (por 24 horas) com IL17 e/ou IL23, assim como o estímulo com IFN- $\gamma$  houve um aumento da frequência de células expressando todas as moléculas analisadas (figura 4.12). Dessa forma decidimos, para os ensaios de adesão, estimular as células endoteliais com as três citocinas.



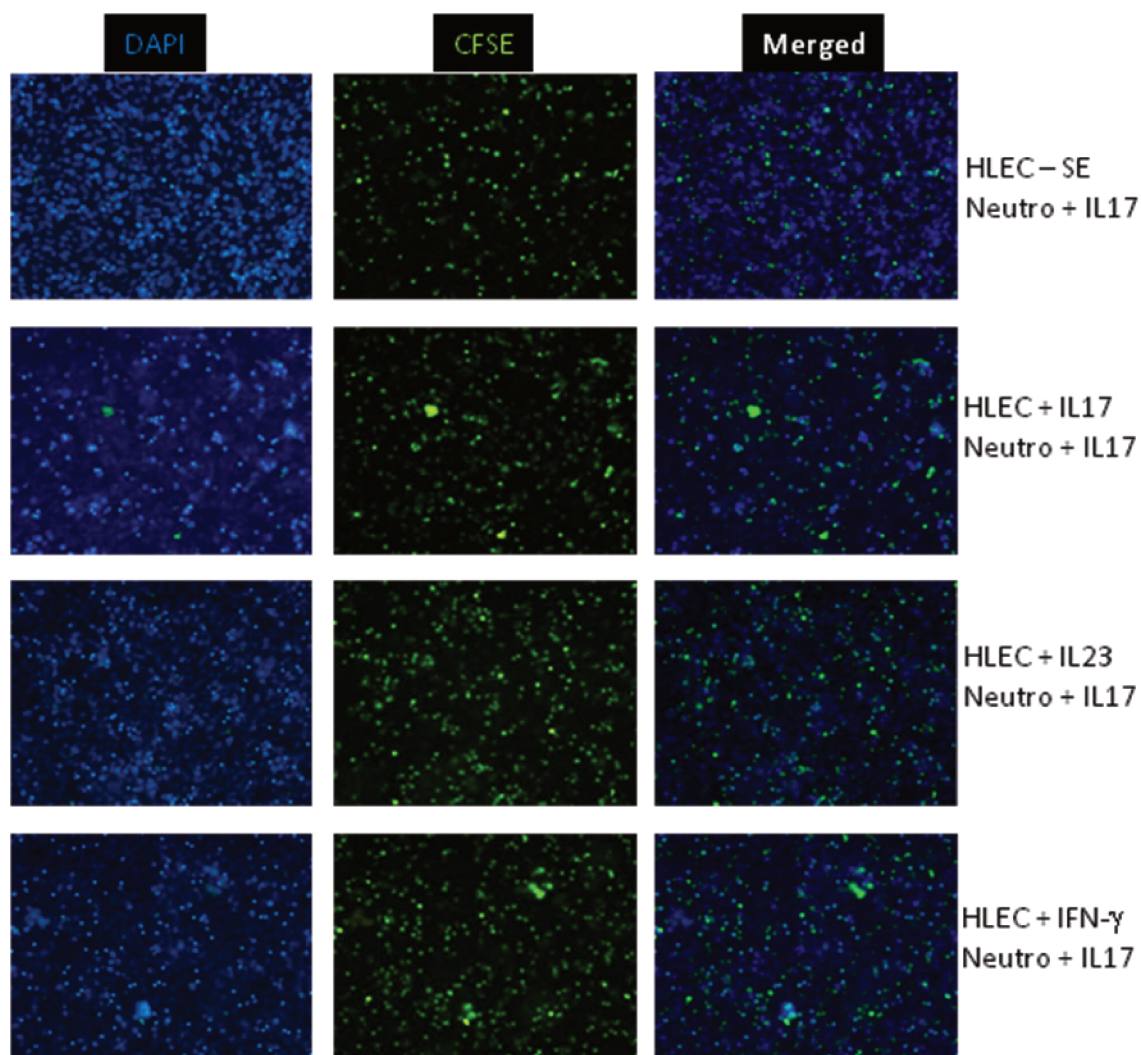
**Figura 4.12 (página anterior):** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de células HLEC CD54<sup>+</sup> (A), CD62P<sup>+</sup> (B), CD62E<sup>+</sup> (C), CD11a<sup>+</sup> (D), CD11b<sup>+</sup> (E) ou CD106<sup>+</sup> (F). As células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimulados por 24 horas com IL-17 (100ng/mL) e/ou IL-23 (100ng/mL), e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Os gráficos representam um de 3 experimentos realizados independentemente.

Os ensaios de adesão foram realizados utilizando-se duas metodologias para quantificar o número de neutrófilos aderidos: a imunofluorescência e a liberação de cromo.

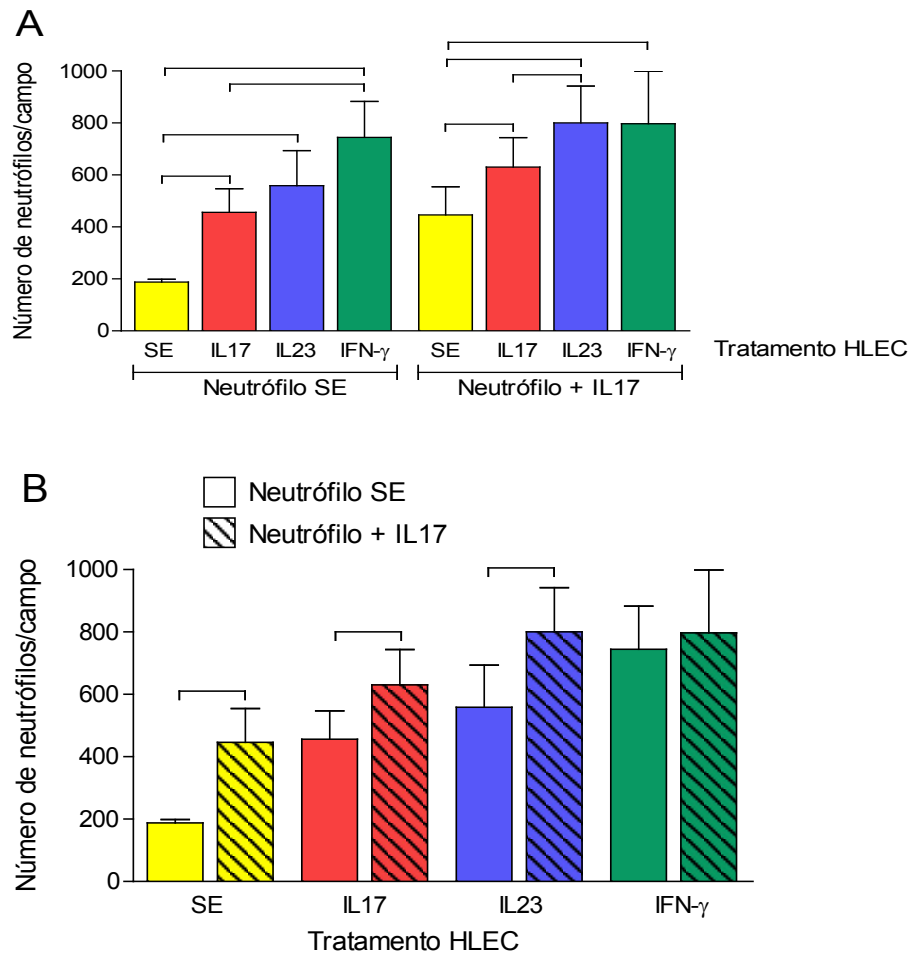
Pudemos observar que neutrófilos, mesmo não estimulados, são capazes de aderir às células endoteliais também não estimuladas. Contudo, quando as células endoteliais foram estimuladas com citocinas recombinantes, o número de neutrófilos aderidos foi superior (mesmo o de neutrófilos não estimulados). É interessante notar que células endoteliais estimuladas com IL-23 proporcionaram uma adesão um pouco superior às células endoteliais estimuladas com IL-17, e que o estímulo com IFN- $\gamma$  foi o mais efetivo (figuras 4.13 a 4.16). Além disso, quando realizamos os experimentos utilizando as células endoteliais estimuladas com diferentes citocinas e os neutrófilos estimulados com IL17, observamos um efeito adicional na adesão das células (figura 4.15B).



**Figura 4.13:** Análise por microscopia de fluorescência da adesão de neutrófilos de indivíduos controle não estimulados (SE) sobre células endoteliais (HLEC) estimuladas com diferentes citocinas (IL17, IL23 e IFN- $\gamma$ ) por 24 horas. As fotos são representativas de 5 experimentos independentes. Marcação nuclear com DAPI (esquerda), neutrófilos marcados com CFSE (centro) e combinação das fotos (direita). Aumento de 100X.

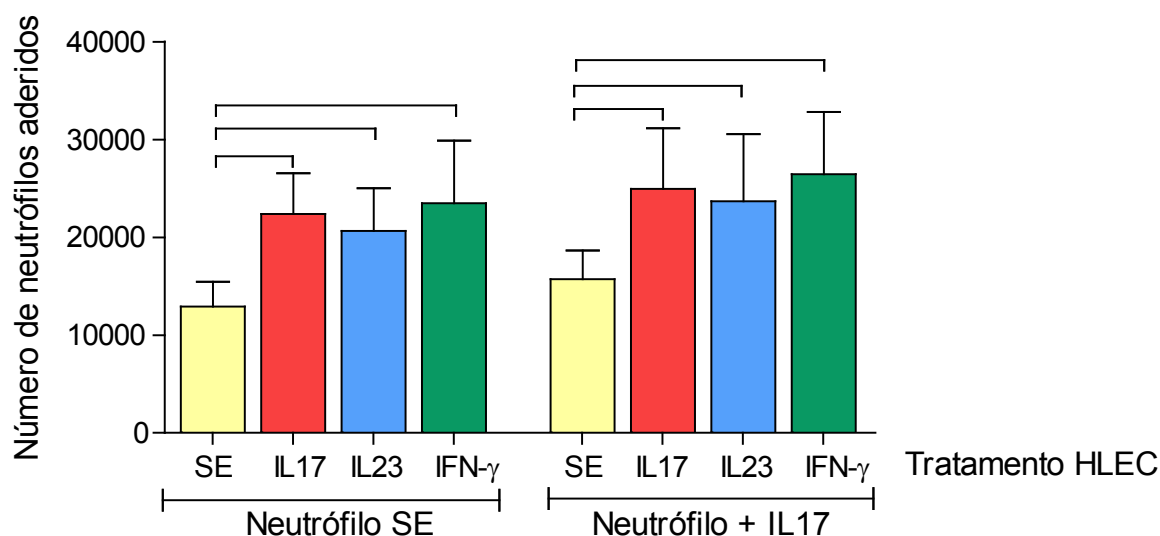


**Figura 4.14:** Análise por microscopia de fluorescência da adesão de neutrófilos de indivíduos controle estimulados com IL17 por 24 horas, em células endoteliais (HLEC) estimuladas com diferentes citocinas (IL17, IL23 e IFN- $\gamma$ ) por 24 horas. As fotos são representativas de 5 experimentos independentes. Marcação nuclear com DAPI (esquerda), neutrófilos marcados com CFSE (centro) e combinação das fotos (direita). Aumento de 100X.



**Figura 4.15:** Quantificação do número de neutrófilos aderidos por campo observados nos ensaios de adesão analisados por imunofluorescência. Neutrófilos de indivíduos controle (n=6) foram mantidos sem estímulo ou estimulados com IL17 (100ng/mL) por 24 horas. As células endoteliais (HLEC) foram estimuladas com diferentes citocinas (IL17, IL23 e IFN- $\gamma$ ) por 24 horas. Os neutrófilos foram incubados sobre as células HLEC por 1 hora. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM do número de neutrófilos observados em 3 campos diferentes em cada condição. Testes estatísticos - **A)** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. Os colchetes representam  $p \leq 0,05$  entre os diferentes tratamentos. **B)** Teste *t*: Os colchetes representam  $p \leq 0,05$  entre os experimentos realizados com neutrófilos não estimulados ou estimulados com IL17.



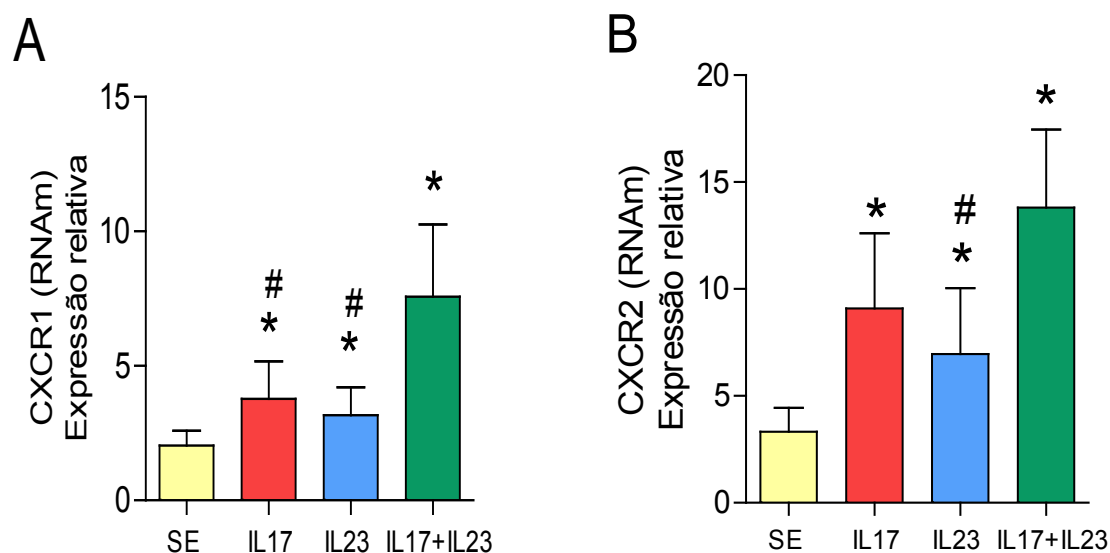


**Figura 4.16:** Quantificação do número de neutrófilos aderidos observados nos ensaios de adesão analisados por liberação de cromo. Neutrófilos de indivíduos controle (n=5) foram mantidos sem estímulo ou estimulados com IL17 (100ng/mL) por 24 horas. As células endoteliais (HLEC) foram estimuladas com diferentes citocinas (IL17, IL23 e IFN- $\gamma$ ) por 24 horas. Os neutrófilos foram então pulsados com cromato de sódio e incubados sobre as células HLEC por 1 hora. Os dados estão expressos como média  $\pm$  SEM do número de neutrófilos quantificados utilizando-se uma curva padrão com um número conhecido de neutrófilos marcados. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. Os colchetes representam  $p \leq 0,05$  entre os diferentes tratamentos.

#### 4.9. Análise da expressão (RNAm e proteína) dos receptores de quimiocina CXCR1 e CXCR2 por neutrófilos.

A análise quantitativa da expressão dos RNAs mensageiros para os receptores de quimiocina CXCR1 e CXCR2 por qRT-PCR demonstrou que o estímulo com IL-17 e/ou IL-23 leva ao aumento significativo desses RNAs em relação às células não estimuladas. Pudemos observar também que as duas

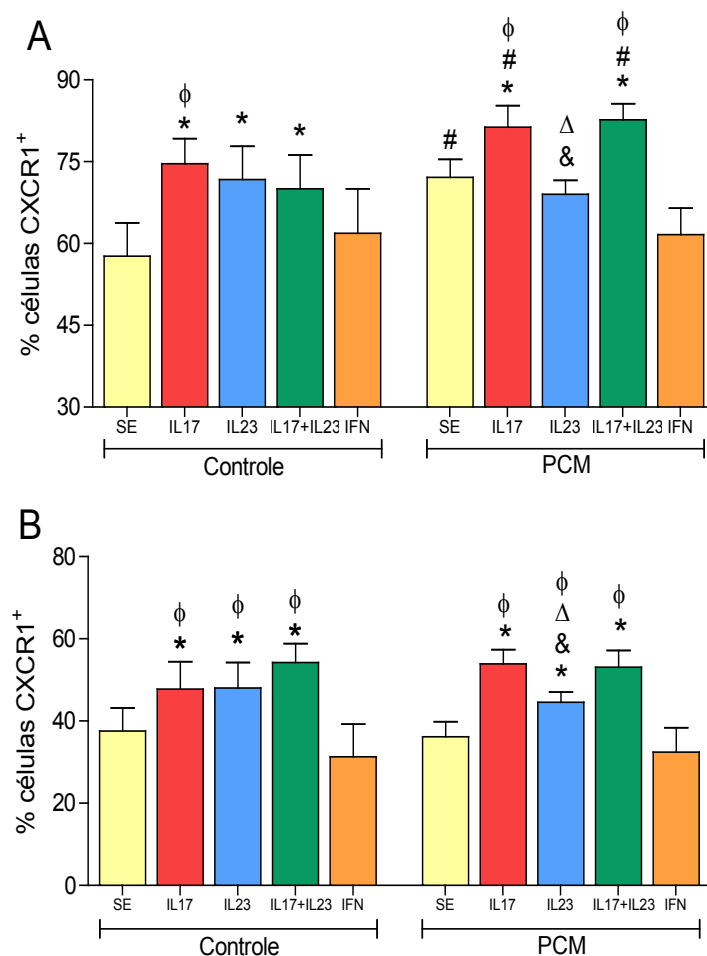
citocinas associadas apresentam efeito sinérgico sobre a expressão dos RNAs para os receptores de IL-8 nos neutrófilos (figura 4.17).



**Figura 4.17:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para CXCR1 (**A**) e CXCR2 (**B**) em neutrófilos de indivíduos com paracoccidioidomicose ativa (FA - n=10) após 4 horas de cultura sem estímulo (SE) ou tratadas com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas; #  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23.

Com o intuito de analisar se as diferenças observadas na expressão do RNAm refletem em diferenças na expressão de proteínas, analisamos o efeito do tratamento com IL-17 e IL-23 na expressão de superfície dos receptores de quimiocina (CXCR1 e CXCR2) por citometria de fluxo.

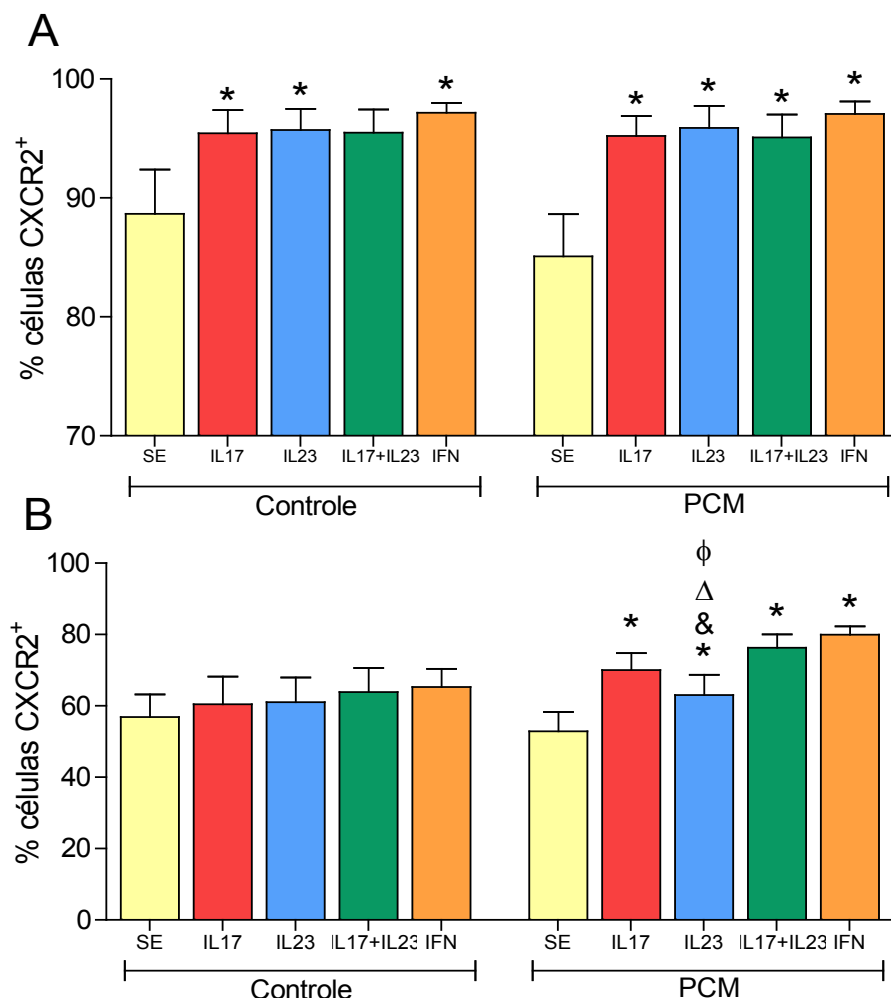
Na figura 4.18 é possível observar que o tratamento com IL17 e/ou IL23 (por 4 e 24 horas) levou a um aumento na porcentagem de neutrófilos expressando o receptor CXCR1, tanto no grupo de indivíduos controle, quanto no de pacientes com PCM. É interessante notar que o estímulo com IL23 só teve efeito sobre os neutrófilos de pacientes com PCM após 24 horas (figura 4.18B), e que há uma maior porcentagem de neutrófilos de pacientes com PCM expressando esse receptor após 4 horas de estímulo (figura 4.18A). Contudo, não observamos efeito sinérgico entre as citocinas, tampouco o estímulo com IFN- $\gamma$  apresentou efeito sobre a expressão desse receptor.



**Figura 4.18 (página anterior):** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos CXCR1<sup>+</sup> de indivíduos com a FA da PCM (n=8) ou indivíduos do grupo controle (n=6). Os neutrófilos foram mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 horas (**A**) ou 24 horas (**B**) com IL-17 (100ng/mL) e/ou IL-23 (100ng/mL), e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas;  $\Delta$   $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23;  $\&\leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17;  $\phi$   $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IFN- $\gamma$ . **Comparação entre os grupos:** teste  $t$  : #  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos do grupo controle submetidas às mesmas condições.

Em relação à expressão do CXCR2, observamos que após 4 horas de estímulo com IL17 e/ou IL23 e com IFN- $\gamma$  (figura 4.19A) ocorre um aumento na porcentagem de neutrófilos de pacientes e de indivíduos do grupo controle positivos para CXCR2, sem contudo haver diferenças entre os estímulos ou efeito sinérgico.

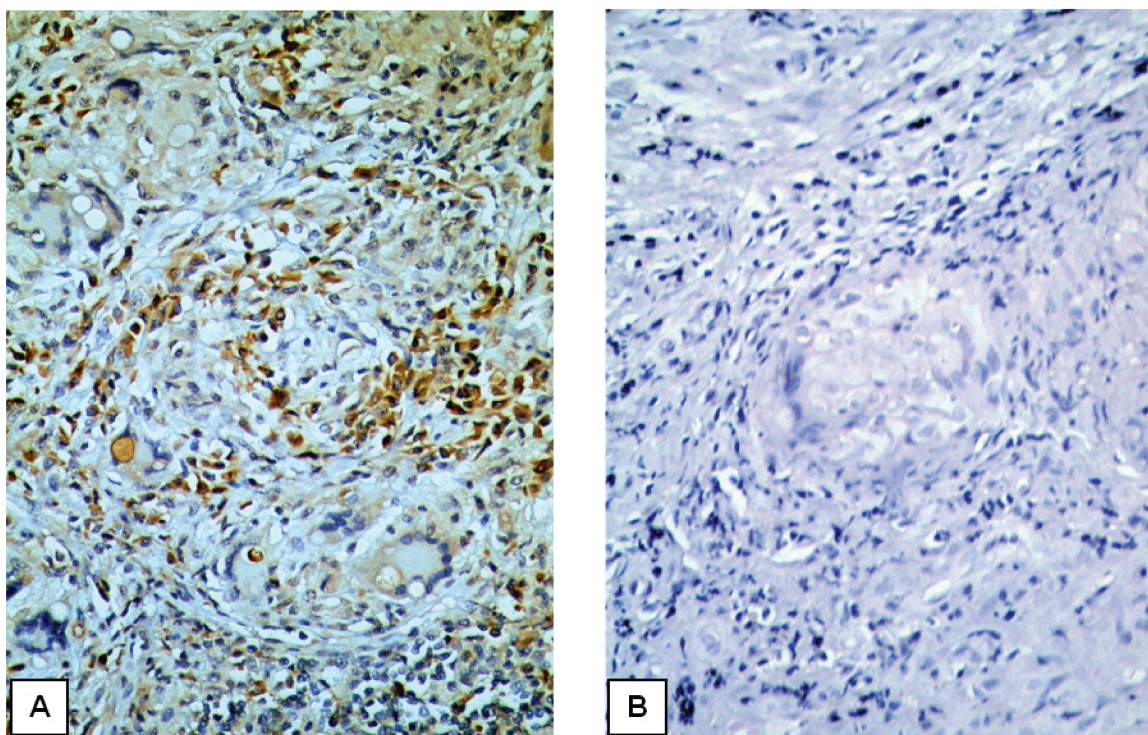
Também podemos observar que após 24 horas, a porcentagem de neutrófilos CXCR2<sup>+</sup> no grupo controle foi igual em todas as condições analisadas, enquanto que no grupo de pacientes com PCM as diferenças se mantiveram (figura 4.19B).



**Figura 4.19:** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos CXCR2<sup>+</sup> de indivíduos com a FA da PCM (n=8) ou indivíduos do grupo controle (n=6). Os neutrófilos foram mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 4 horas (**A**) ou 24 horas (**B**) com IL-17 (100ng/mL) e/ou IL-23 (100ng/mL), e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. . \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas;  $\Delta$   $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23; &  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17;  $\phi$   $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IFN- $\gamma$ . **Comparação entre os grupos:** teste  $t$  : #  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos do grupo controle submetidas às mesmas condições.

#### 4.10. Análise da expressão de CXCL8 (IL-8) em lesões de pacientes com paracoccidioidomicose (FA)

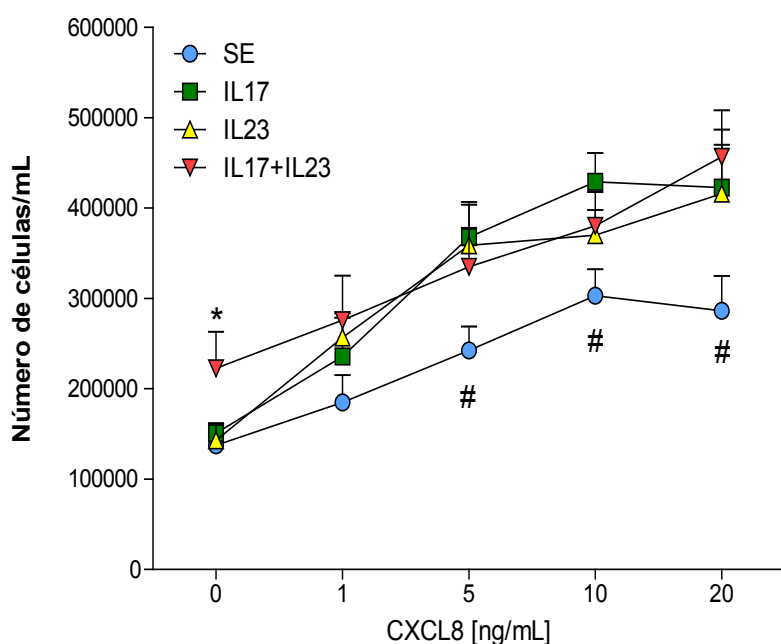
Como demonstrado acima, o tratamento de neutrófilos com IL-17 e/ou IL-23 levou a um aumento na expressão dos receptores para CXCL8 (CXCR1 e CXCR2) nos neutrófilos, por esse motivo decidimos investigar se nas lesões de pacientes com PCM da FA ocorre a produção dessa quimiocina. Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.20), em lesões de mucosa oral há a presença de grande número de células positivas para essa quimiocina (macrófagos e células gigantes principalmente).



**Figura 4.20:** Análise por imuno-histoquímica de lesões de mucosa oral de pacientes com a FA da paracoccidioidomicose. **A)** Marcação com anti-CXCL8 (células marcadas em marrom). **B)** Controle negativo. Aumento de 400x

#### 4.11. Análise da capacidade migratória de neutrófilos tratados com IL-17 e/ou IL-23 em resposta a CXCL8.

Realizamos em seguida um ensaio de migração no qual foram utilizadas diferentes concentrações de CXCL8. Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.21) o tratamento com IL-17 e com IL-23 (isoladas ou em combinação) levou a um aumento no número de neutrófilos que migram em resposta à presença de CXCL8. É interessante notar que as células tratadas com as duas citocinas combinadas, mesmo na ausência de CXCL8, apresentaram capacidade migratória superior aos outros estímulos utilizados.



**Figura 4.21:** Análise da capacidade migratória de neutrófilos estimulados com IL-17 e/ou IL-23 em resposta à CXCL8. Neutrófilos de indivíduos controle (n=7) foram mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 24 horas com IL-17

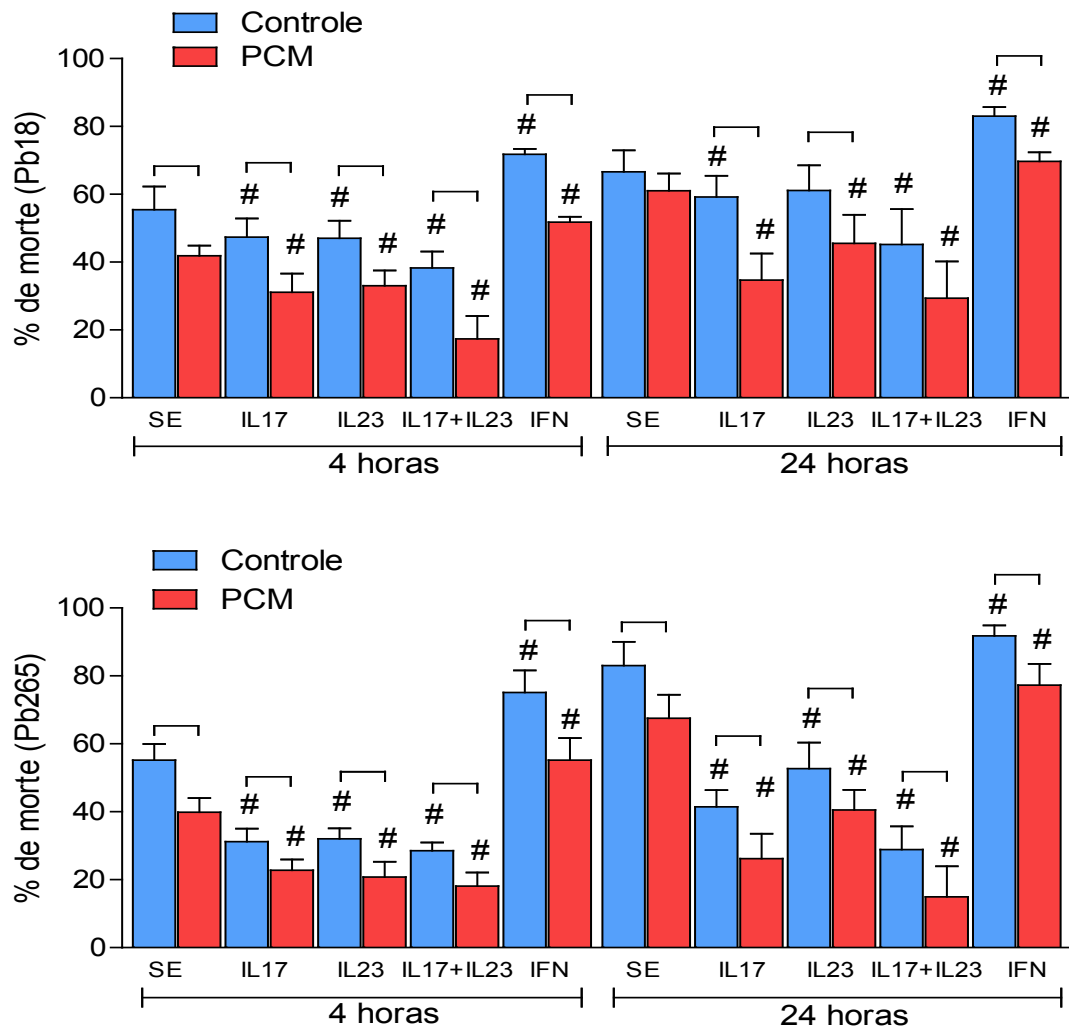
(100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL). As células foram então incubadas (4 horas) na presença de diferentes concentrações de CXCL8 (0 a 20 ng/mL). Os dados apresentados como média SEM do número de células/mL de meio. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas ou estimuladas com IL-17 ou IL-23; #  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL-17, IL-23 ou IL17+IL23.

#### **4.12. Análise do efeito da IL-17, IL-23 e IFN- $\gamma$ sobre a capacidade fungicida de neutrófilos.**

Para analisar o efeito do tratamento com IL-17 e/ou IL-23 e IFN- $\gamma$  sobre a capacidade fungicida de neutrófilos, as células obtidas de pacientes com PCM ativa ou de controles normais foram tratadas com as citocinas recombinantes por 4 horas e por 24 horas. Observamos que o tratamento com IL-17 e IL-23 apresenta um efeito supressor na capacidade fungicida dos neutrófilos de ambos os grupos. Este efeito foi observado tanto após 4 horas quanto após 24 horas de tratamento, e também em relação às duas cepas de *P. brasiliensis* utilizadas (figura 4.22). Pudemos observar que o tratamento combinado com IL-17 e IL-23 apresentou um efeito sinérgico na redução da atividade fungicida contra as cepas Pb18 e Pb265 (após 4 horas e 24 horas respectivamente). Também observamos que o tratamento com IL-17 teve efeito supressor superior ao efeito da IL-23, sobre a capacidade fungicida contra a cepa avirulenta (Pb265) após 24 horas de estímulo. O tratamento com IFN- $\gamma$ , ao contrário, aumentou a capacidade fungicida tanto contra a cepa Pb18 quanto contra a cepa Pb265.

A comparação entre a capacidade fungicida dos neutrófilos nos dois grupos (controles e pacientes), demonstrou que células de indivíduos controle apresentaram maior atividade contra as duas cepas do fungo (figura 4.22)





**Figura 4.22:** Análise da atividade fungicida de neutrófilos de controles normais e pacientes com PCM. Número de CFUs / mL de sobrenadante obtidas após co-culturas (4 horas e 24 horas) de células leveduriformes da cepa Pb18 (**A**) ou Pb265 (**B**) de *P. brasiliensis* (relação leveduras:células de 1:50) e neutrófilos de indivíduos com paracoccidioidomicose ativa (FA - n=6) e de controles normais (n=7) sem estímulo (S.Est.) ou após tratamento com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Resultados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: Teste *t* de Student: colchetes representam  $p \leq 0,05$  em relação aos dois grupos. ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey, #  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas (SE).

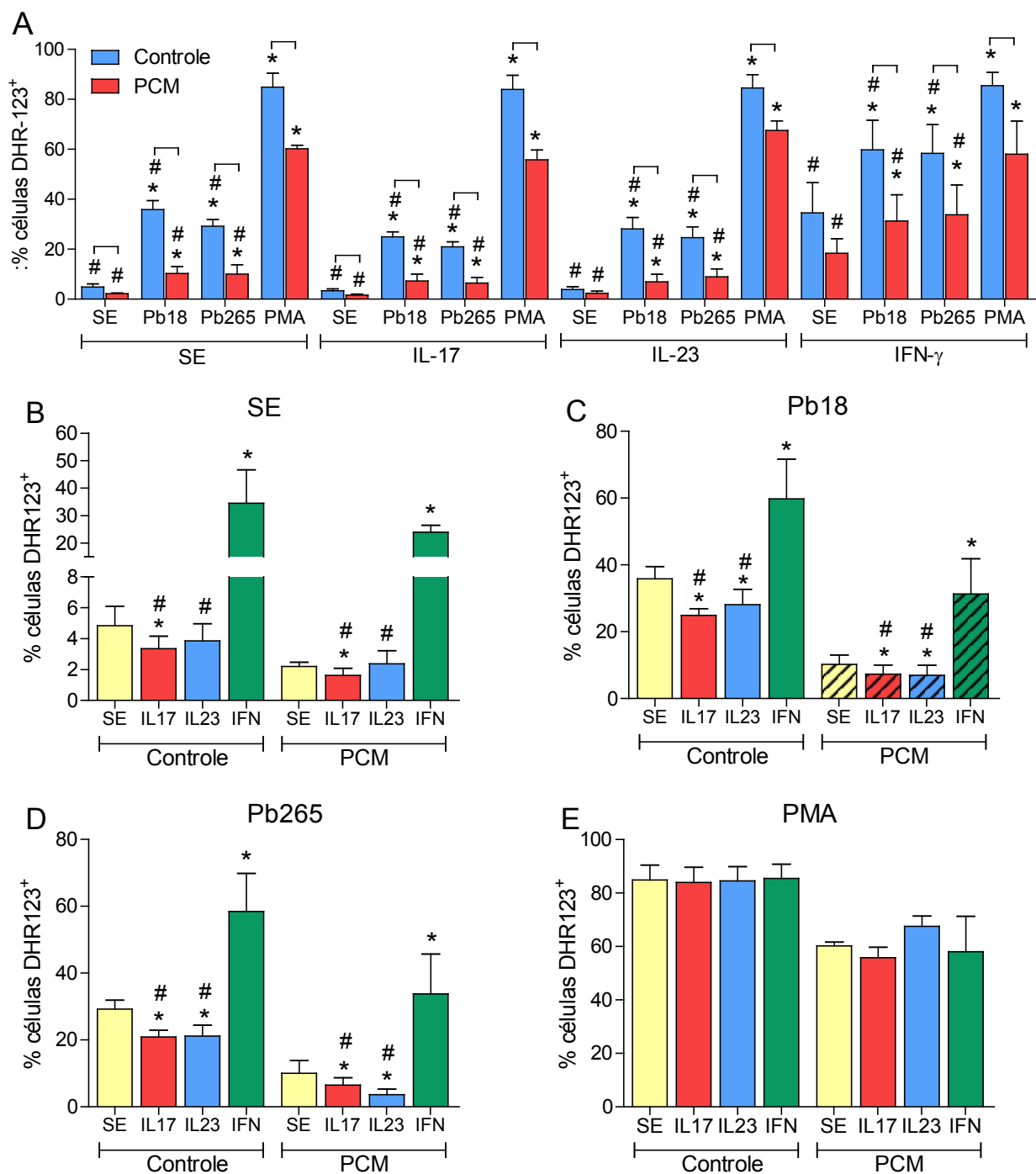
#### **4.13. Análise da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos tratados com IL-17, IL-23 e IFN- $\gamma$ .**

Como descrito acima, o tratamento de neutrófilos com citocinas recombinantes levou à diminuição (IL17 e/ou IL23) ou ao aumento (IFN- $\gamma$ ) da capacidade fungicida de neutrófilos. Para avaliar se esse efeito ocorre devido a alterações na capacidade de produção de reativos intermediários de oxigênio, analisamos por citometria de fluxo a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos estimulados com as cepas Pb18 e Pb265 de *P. brasiliensis* ou com PMA (controle positivo) após o tratamento com IL-17 ou com IL-23 (ver exemplo de análise na figura 8.2 - Apêndice).

Como pode ser observado na figura abaixo (figura 4.23), neutrófilos estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* são ativados e passam a produzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não havendo contudo diferenças significativas entre as duas cepas analisadas. O estímulo com PMA, como esperado, leva à uma grande produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 4.23A e 4.23E). A comparação entre células de pacientes e controles mostrou que neutrófilos de pacientes produzem quantidades significativamente menores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em todas as condições testadas (figura 4.23A).

Em relação ao tratamento com citocinas recombinantes, observamos que tanto o tratamento com IL17 como o tratamento com IL23 levou à uma diminuição significativa na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos não estimulados, e por aqueles estimulados com as células leveduriformes de *P. brasiliensis* (dados mais facilmente observado nas figuras 4.23B-D). Por outro lado, o tratamento dos

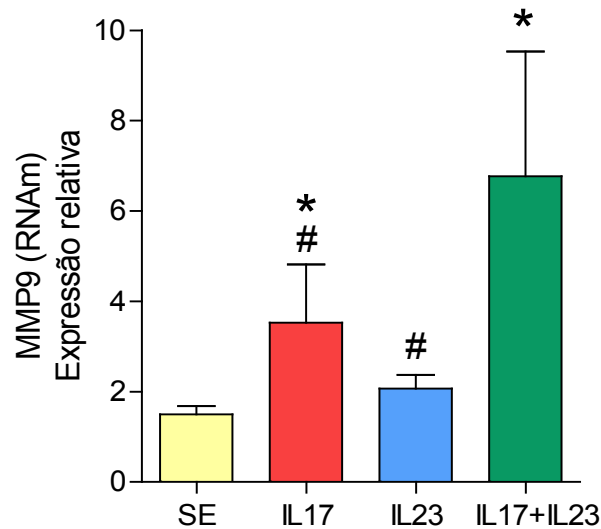
neutrófilos com IFN- $\gamma$ , levou ao aumento dessa produção. O tratamento com citocinas, contudo, não interferiu com a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por células estimuladas com PMA (figura 4.23E).



**Figura 4.23 (pagina anterior):** Análise por citometria de fluxo da porcentagem de neutrófilos positivos para DHR-123 (Dihidrorodamina). Neutrófilos de indivíduos do grupo controle (n=6) ou de pacientes com a FA da PCM (n=5) foram mantidos sem tratamento (SE) ou tratados com IL-17 (100ng/mL), IL-23 (100ng/mL) ou IFN- $\gamma$  (100ng/mL) por 24 horas, após esse período, foram estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265) ou com PMA (50ng/mL) por 1 hora. Resultados expressos como média  $\pm$  SEM. Teste estatístico: **A) Comparação entre diferentes condições em um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey - \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas; #  $p \leq 0,05$  em relação às células tratadas com PMA. **Comparação entre os grupos:** teste *t* - colchetes  $p \leq 0,05$ . **B-E)** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey - \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas; #  $p \leq 0,05$  em relação às células tratadas com IFN- $\gamma$ .

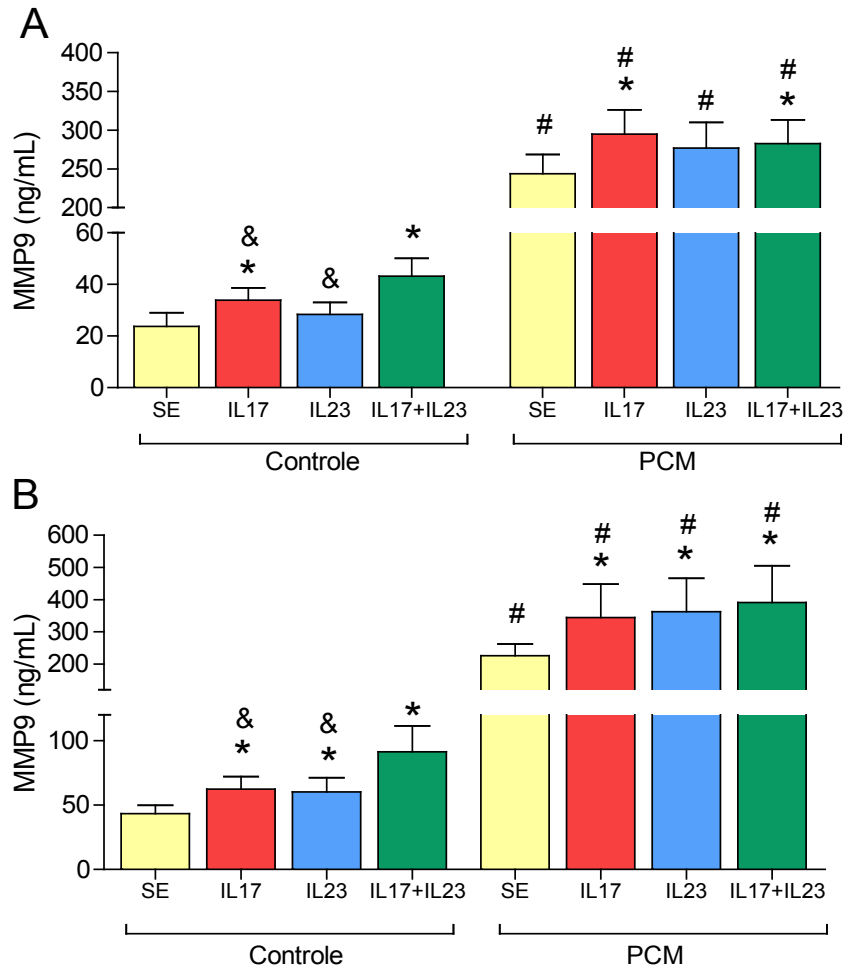
#### **4.14. Análise da expressão (RNAm e proteína) de matriz metaloproteinase- 9 (MMP-9) por neutrófilos.**

De maneira semelhante ao descrito para os demais RNAs mensageiros, pudemos observar que o tratamento com IL-17 e IL-23 também levou ao aumento de expressão do RNAm para a MMP-9, assim como houve um efeito sinérgico da combinação das duas citocinas (figura 4.24).



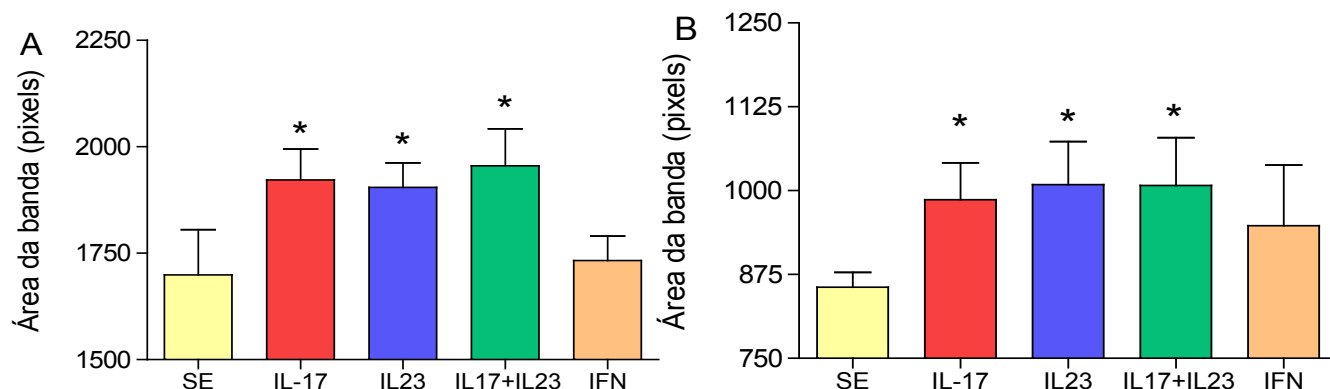
**Figura 4.24:** Quantificação relativa da expressão do RNAm para matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) em neutrófilos de indivíduos com paracoccidioidomicose ativa (FA - n=10) após 4 horas de cultura sem estímulo (SE) ou tratadas com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação. Teste estatístico: ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas; #  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23.

Quanto à produção de matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) pelos neutrófilos, pudemos observar que o estímulo com IL-17 e IL-23 (isoladas ou em combinação) levou ao aumento da produção e secreção dessa enzima nos sobrenadantes de culturas (4 horas e 24 horas), tanto por neutrófilos de pacientes com PCM, quanto por células de indivíduos do grupo controle (figura 4.25). É notável que os neutrófilos de pacientes estimulados ou sem estímulo produzem quantidades muito maiores de MMP-9 do que neutrófilos de indivíduos do grupo controle, nos dois tempos analisados (figura 4.25).



**Figura 4.25:** Análise da produção de MMP-9 em sobrenadantes de cultura de neutrófilos de pacientes com PCM (n=9) ou indivíduos controle (n=7), após 4 horas (**A**) ou 24 horas de cultura (**B**), sem estímulo (SE) ou tratadas com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação. Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. . \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas; &  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23. **Comparação entre os grupos:** teste  $t$  : #  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos do grupo controle submetidas às mesmas condições.

Também avaliamos a atividade gelatinolítica da MMP-9 produzida pelos neutrófilos estimulados com IL-17 e/ou IL-23 e com IFN- $\gamma$ . Conforme pode ser observado na figura abaixo (figura 4.26), o tratamento com IL-17 e/ou IL-23 aumentou significativamente a atividade gelatinolítica da MMP-9 produzida por neutrófilos. Contudo não observamos diferenças com o estímulo com IFN- $\gamma$ . Esse efeito foi observado tanto em relação à forma de pró-MMP (banda de 92 kDa - figura 4.26A), quanto à forma ativa de MMP-9 (banda de aproximadamente 88kDa - figura 4.26B).

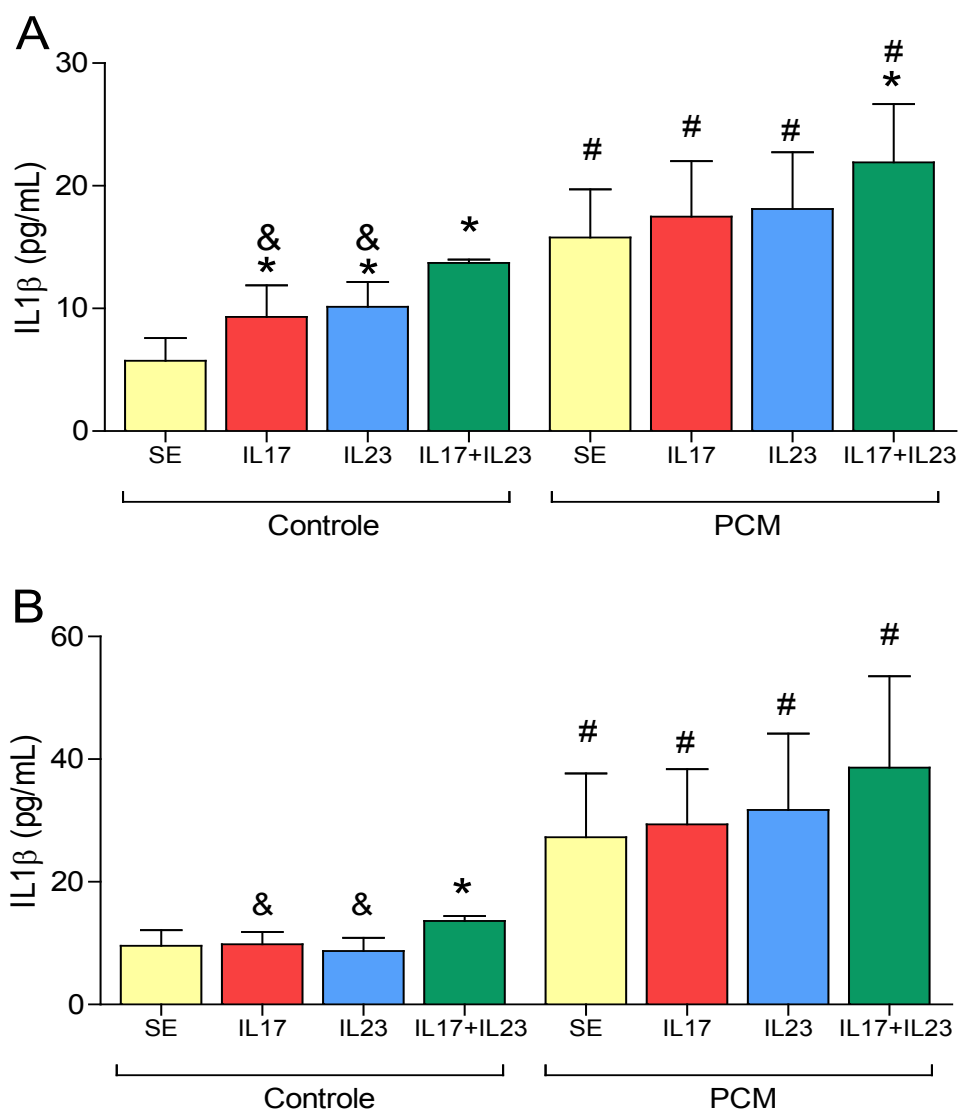


**Figura 4.26:** Análise da atividade gelatinase de MMP-9 produzida por neutrófilos após o estímulo com IL-17 e/ou IL-23 ou com IFN- $\gamma$ . Os neutrófilos de indivíduos controle (n=8) foram mantidos sem estímulo (SE) ou estimulados por 24 horas com IL-17 (100ng/mL) e/ou IL-23 (100ng/mL), e com IFN- $\gamma$  (100ng/mL). Após esse período as células foram lisadas e o lisado de células submetidos à zimografia com descrito em materiais e métodos. Os resultados estão expressos como a área das bandas formadas por cada amostra. **A)** Análise da área das bandas de 92kDa (pró-MMP9); **B)** Análise da área das bandas de 88kDa (MMP9) Teste estatístico - ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas.

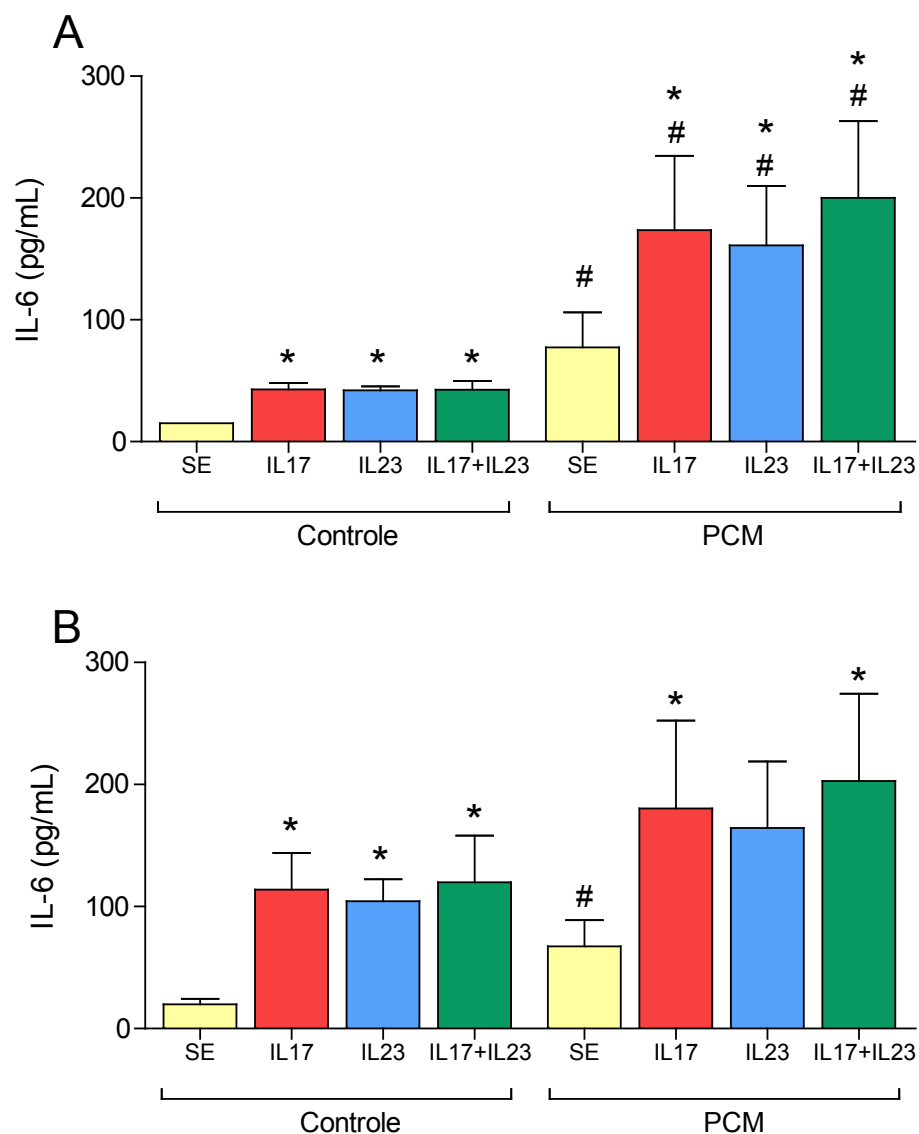
#### **4.15. Análise da produção de IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ por neutrófilos estimulados com IL17 e/ou IL23**

Os dados descritos acima demonstram que o tratamento dos neutrófilos com IL17 e/ou IL23 aumenta sua capacidade inflamatória (expressão de moléculas de adesão e de MMP-9), contudo diminuem sua capacidade fungicida. Decidimos então avaliar se neutrófilos estimulados com as citocinas recombinantes apresentavam alguma alteração em sua capacidade de produção das citocinas inflamatórias IL1- $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . A análise dos sobrenadantes de cultura por ELISA demonstrou que neutrófilos de pacientes com PCM produzem maior quantidade das citocinas inflamatórias, quando comparados a células de indivíduos do grupo controle (figuras 4.27 a 4.29), mesmo em células não estimuladas. Também observamos que o tratamento com IL17 e/ou IL23 não aumentou de maneira significativa a secreção de IL-1 $\beta$  (figura 4.26) e TNF- $\alpha$  (figura 4.28) pelos neutrófilos de pacientes. Contudo, os neutrófilos de indivíduos controle após estimulação com IL-17 e/ou IL-23 passaram a produzir maior quantidade de IL-1 $\beta$  (figura 4.27), IL-6 (figura 4.28), mas não de TNF- $\alpha$  (figura 4.29). O estímulo com IL-17 e IL-23 também induziu uma maior produção de IL-6 pelos neutrófilos de pacientes tanto após 4 horas quanto após 24 horas de estímulo (figura 4.28).

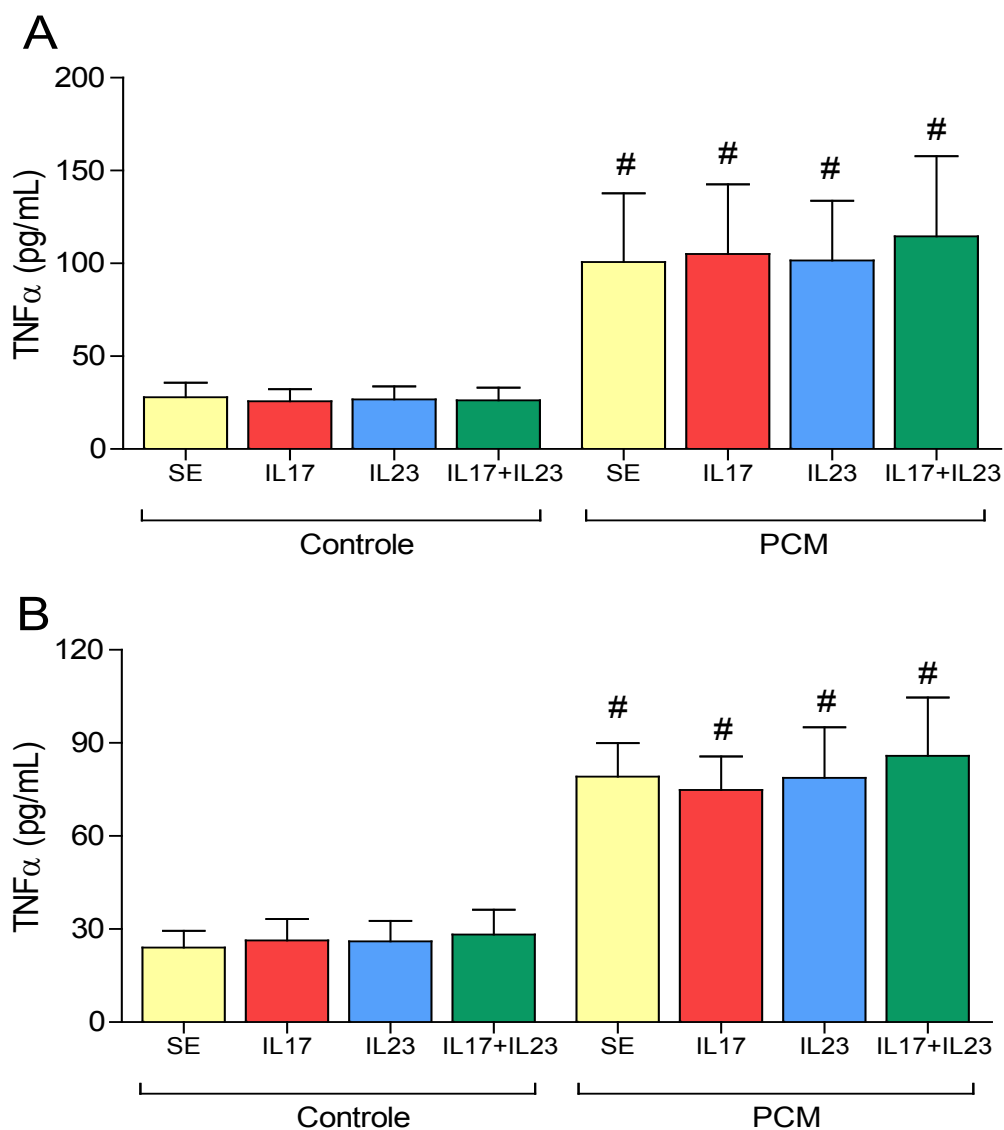




**Figura 4.27:** Análise da produção de IL-1 $\beta$  em sobrenadantes de cultura de neutrófilos de pacientes com PCM (n=9) ou indivíduos controle (n=7), após 4 horas (**A**) ou 24 horas de cultura (**B**), sem estímulo (SE) ou tratadas com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação. Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. . \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas; &  $p \leq 0,05$  em relação às células estimuladas com IL17+IL23. **Comparação entre os grupos:** teste  $t$ : #  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos do grupo controle submetidas às mesmas condições.



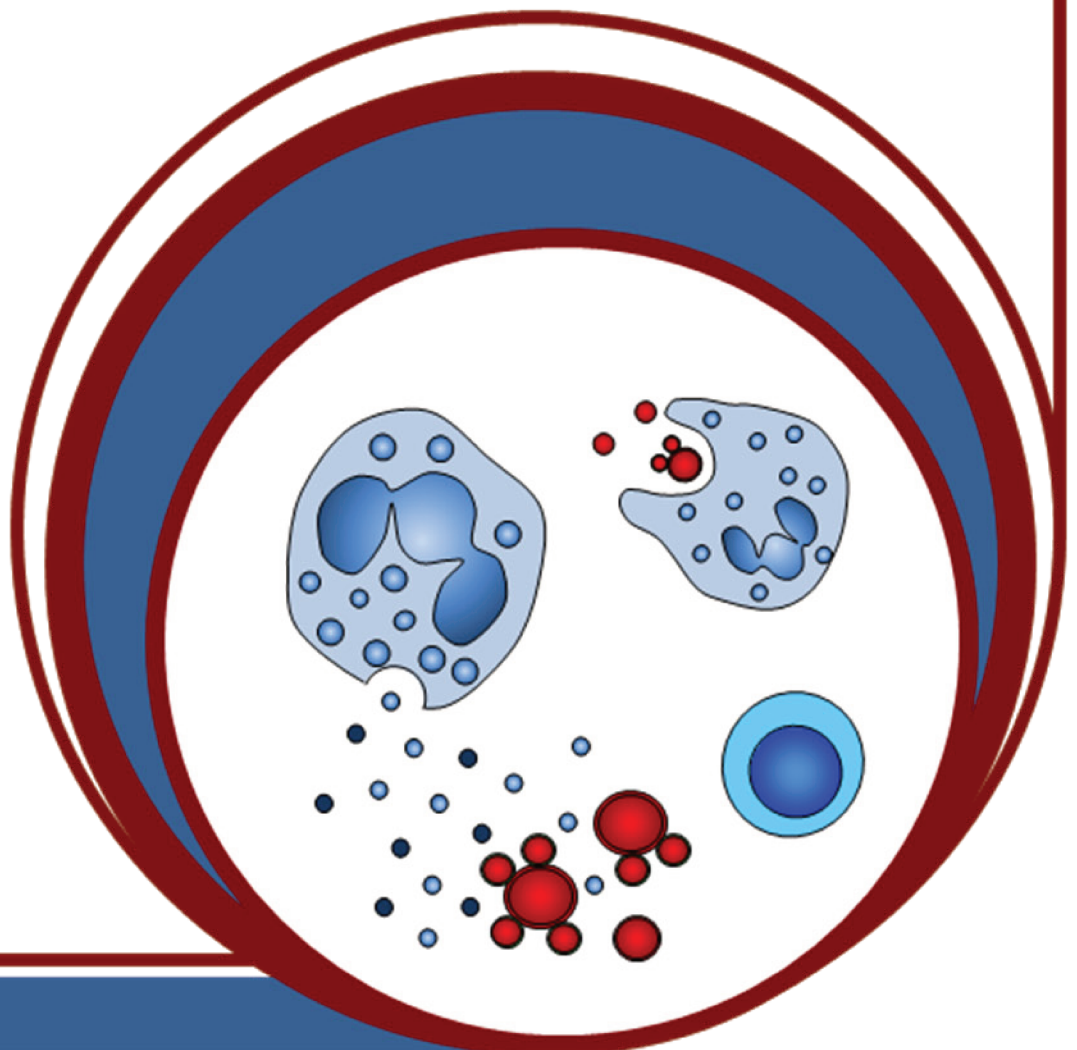
**Figura 4.28:** Análise da produção de IL-6 em sobrenadantes de cultura de neutrófilos de pacientes com PCM (n=9) ou indivíduos controle (n=7), após 4 horas (**A**) ou 24 horas de cultura (**B**), sem estímulo (SE) ou tratadas com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação. Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. . \*  $p \leq 0,05$  em relação às células não estimuladas. **Comparação entre os grupos:** teste *t*: #  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos do grupo controle submetidas às mesmas condições.



**Figura 4.29:** Análise da produção de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de cultura de neutrófilos de pacientes com PCM (n=9) ou indivíduos controle (n=7), após 4 horas (**A**) ou 24 horas de cultura (**B**), sem estímulo (SE) ou tratadas com IL-17 (100ng/mL) e IL-23 (100ng/mL) isoladamente ou em combinação. Testes estatísticos - **comparação entre os diferentes tratamentos dentro de um mesmo grupo:** ANOVA para amostras repetidas, com pós-teste de Tukey. Não foram observadas diferenças significativas. **Comparação entre os grupos:** teste *t* : #  $p \leq 0,05$  em relação às células dos indivíduos do grupo controle submetidas às mesmas condições.



# ***DISCUSSÃO***





## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos permitiram confirmar algumas das hipóteses levantadas inicialmente. Em relação à produção de IL-17, por meio da análise de cinética da produção de RNAm pudemos evidenciar que as células de pacientes com a FA apresentaram expressão precoce e sustentada dessa citocina, diferentemente do que ocorre nos outros grupos analisados. Além disso, o fator de transcrição Ror $\gamma$ t (Rorc) foi expresso em células dos pacientes com a FA não estimuladas, com manutenção da expressão em níveis superiores às células de pacientes com a FJ ou de controles. Também observamos que CMSP de pacientes com a FA produzem e secretam maiores quantidades de IL-17, do que os outros grupos de indivíduos analisados. Até recentemente não havia trabalhos descrevendo o papel da IL-17 e de citocinas relacionadas às células Th17 na Paracoccidioidomicose, contudo em 2011 um trabalho foi publicado por Pagliari e colaboradores descrevendo nas lesões de mucosa e pele de pacientes com a FA da PCM um grande número de células produtoras dessa citocina [95], fato confirmado em nosso trabalho.

Embora os dados encontrados não permitam chegar a conclusões definitivas, a resposta Th17 aparentemente predomina nos pacientes com a FA. Esses dados, tomados em conjunto com resultados anteriores, parecem indicar que na paracoccidioidomicose humana, os diferentes padrões de resposta imunológica celular levam a diferentes manifestações clínicas da doença. Assim, a resistência apresentada pelos indivíduos com paracoccidioidomicose-infecção seria mediada pelo predomínio de uma resposta Th1; as formas mais graves da

doença apresentadas por indivíduos com a forma juvenil, seriam mediadas por uma resposta Th2; enquanto que as formas mais brandas mas que apresentam resposta inflamatória crônica, característica de pacientes com a forma adulta, poderiam apresentar um predomínio da resposta Th17, associada a uma resposta Th1. Dessa forma, a resposta Th17 parece ser importante para a contenção da doença, uma vez que predomina nas formas mais brandas e localizadas da PCM (FA), exercendo um papel semelhante àquele observado em outras infecções fúngicas, induzindo uma resposta inflamatória local e ativando células do sistema imunológico inato [61, 96-98]. Entretanto, a produção crônica das citocinas associadas a esse tipo de resposta poderia apresentar como "efeito colateral" a exacerbação da resposta inflamatória, causando lesão tecidual [54, 99, 100].

A participação de células produtoras de IL-17 na resposta imunológica de pacientes com a FA pode explicar alguns fatos observados nessa forma da doença. Nossos dados também demonstraram que os neutrófilos podem ser encontrados em grande número nas lesões de pacientes com a FA da PCM, muitas vezes formando abscessos e em áreas apresentando necrose. A análise do lavado bronco alveolar de pacientes com a FA apresentando lesões pulmonares mostra um aumento do número de neutrófilos [69, 70, 101]. Trabalhos anteriores de nosso laboratório demonstraram que CMSP de pacientes com a forma adulta da doença, quando estimuladas *in vitro*, produzem quantidades elevadas de IL-12p40/p70, não sendo observado, contudo, aumento na produção de IFN- $\gamma$  [14, 15]. Além disso, estudo realizado por outro grupo com cultura de CMSP de pacientes com a forma adulta da PCM também demonstrou produção



diminuída dessa citocina, bem como a diminuição de um dos componentes de seu receptor, a cadeia IL-12R $\beta$ 2 [102]. Essa aparente contradição, talvez possa ser explicada quando se leva em consideração as características da IL-12 e das citocinas que compõe essa família de moléculas [103]. A IL-12 biologicamente ativa (IL-12p70) é uma proteína heterodimérica composta pelas subunidades p40 e a p35, e apresenta um receptor composto por duas subunidades: IL-12R $\beta$ 1 e IL12-R $\beta$ 2. A subunidade p40 é compartilhada com outra citocina a IL-23 (composta das subunidades p40 e p19), citocina que também compartilha uma das subunidades do receptor da IL-12 (IL-12R $\beta$ 1 em conjunto com a subunidade IL-23R) [103]. Devido a essa característica, os trabalhos que relatam a participação de IL-12 na resposta, tendo como base a detecção de IL-12p40 ou IL-12p40/p70 devem ser analisados com cautela, e muitas vezes a sua reavaliação demonstra que algumas das ações creditadas a IL-12 na verdade são exercidas pela IL-23 [104]. A sinalização da IL-23, assim como da IL-12, envolve a ativação de proteínas da família Janus quinase (JAK) e STAT, particularmente a JAK2 e STATs 1,3 e 5. Além disso, por meio da subunidade IL12R $\beta$ 1 e sua associação com a tirosina quinase 2 (TYK2), a IL-23 também pode atuar na ativação da via das MAP quinases (MAPK), com fosforilação das proteínas ERK 1/2, JNK (1/2) e p38, que em última instância atuam sobre o fator de transcrição AP-1 [105, 106].

A IL-23, assim como a IL-12, é produzida principalmente por células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas), apresenta atividades pró-inflamatórias, e inicialmente foi apontada como responsável pela indução da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, em particular a IL-17

por linfócitos T [103, 107]. O papel da IL-23 na ativação e manutenção de células T que expressam IL-17 ainda permanece controversa. Alguns trabalhos relatam que células T CD4<sup>+</sup> “naive” não expressam IL23R, consequentemente, entende-se que a IL-23 não exerce papel na diferenciação ou produção de IL-17 [108, 109]. Por outro lado, outros trabalhos demonstram que a administração de IL-23 mas não de IL-12, pode aumentar a expressão e produção de IL17 por células T efectoras [110]. Desse modo a IL-23 embora não seja essencial para a diferenciação, parece ser importante para a manutenção e sobrevivência das células Th17 [111, 112].

A IL-17, também denominada de IL-17A, foi descrita há mais de 10 anos [113] e faz parte de uma família de citocinas relacionadas composta de 6 membros (IL-17A-F), sendo produzida por linfócitos TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> ativados, T $\gamma\delta$  e neutrófilos [114, 115]. A IL-17 apresenta atividade inflamatória muito importante, principalmente por meio da ativação de macrófagos e outros tipos celulares (fibroblastos, células epiteliais e endoteliais) para a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como a IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-18, CXCL9 e CXCL10, estando também relacionada ao recrutamento de neutrófilos para o sítio onde é produzida, principalmente por meio da indução de grande produção de CXCL8 [114, 115]. O receptor para IL-17 é composto por duas subunidades: IL17RA de baixa afinidade e IL17RC de alta afinidade, e é expresso tanto por células do sistema imunológico (linfócitos, macrófagos, células dendríticas, células NK), como por células endoteliais e epiteliais. Após a sua ligação com o receptor, a IL-17 leva à fosforilação de inúmeras proteínas intracelulares (tirosinas-quinase), que

em última instância levam a ativação de fatores de transcrição como o NFκB e o AP-1. Dentre as tirosinas-quinase fosforiladas após a ligação da IL-17 estão ERK (1/2), JNK (1/2) e p38 [106]. Ainda não existe um consenso sobre a atuação direta da IL-17 nos neutrófilos, uma vez que essas células aparentemente não expressam a subunidade do receptor IL17RC. Contudo, já foi demonstrado que a IL-17 é capaz de atenuar os efeitos do GM-CSF [116] e aumentar a capacidade bactericida das células contra *Pneumococcus sp.* [117]. Neste trabalho, utilizando neutrófilos altamente purificados (>99% de pureza) demonstramos que o tratamento com IL-17, e também com IL-23, leva à fosforilação de proteínas intracelulares envolvidas na sinalização dos receptores da IL-17 e da IL-23.

Dentre os resultados encontrados em nosso trabalho, podemos destacar o fato de que o tratamento de neutrófilos com IL-17 e com IL-23 teve efeito supressor na atividade fungicida de neutrófilos, tanto para a cepa virulenta como para a cepa avirulenta do *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265 respectivamente). Esses resultados são similares àqueles encontrados por Zelante *et al.* (2007) em um estudo onde foi avaliada a resposta à infecção experimental por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Esses pesquisadores demonstraram que a presença de IL-17, leva a uma diminuição da capacidade fungicida dos neutrófilos, relacionada à diminuição da capacidade de produção de reativos intermediários de oxigênio [54, 100]. Nossos dados também demonstraram que a IL-17 e a IL-23 diminuem a capacidade de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos estimulados com células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Na paracoccidiodomicose humana, estudos realizados *in vitro* indicam que neutrófilos de pacientes com

paracoccidioidomicose ativa e de camundongos suscetíveis à infecção apresentam capacidade fungicida contra células do fungo diminuídas, em relação a indivíduos normais ou aos camundongos resistentes. Essa característica também está associada com a diminuição na capacidade de produção de reativos intermediários de oxigênio como o peróxido de hidrogênio [87, 118, 119].

Outro fato interessante observado foi o de que apesar de apresentarem capacidade fungicida diminuída, os neutrófilos estimulados com IL-17 e IL-23 apresentaram um aumento expressivo na produção do RNAm para os receptores de IL-8 (CXCR1 e CXCR2), também refletindo em uma maior expressão desses receptores na superfície das células, ao lado do aumento da expressão de moléculas de adesão (CD54 e CD62L – RNAm e proteína). Essa expressão aumentada pode contribuir para uma maior capacidade de migração desse tipo celular em resposta à produção de IL-8 (CXCL8) para os locais de infecção onde podem eventualmente contribuir para lesões causadas pelo *P. brasiliensis*.

Os resultados dos experimentos funcionais com os neutrófilos tratados com IL-17 e IL-23 confirmaram essa hipótese, uma vez que esse tratamento levou a um aumento da capacidade de adesão em células endoteliais, bem como de sua capacidade de migração em resposta à CXCL8. Como mencionado, a IL-17 apresenta atividade inflamatória muito importante, principalmente por meio da ativação de macrófagos e outros tipos celulares (fibroblastos, células epiteliais e endoteliais) para a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e de grande produção de CXCL8 [39, 120-122].

Além de promover a migração dos neutrófilos para o sítio de infecção, foi demonstrado que a CXCL8 inibe a apoptose de neutrófilos estimulados com

células leveduriformes de *P. brasiliensis*. Dessa forma os neutrófilos poderiam permanecer por maior tempo no local de infecção, contribuindo para a lesão tecidual observada em pacientes [123]. Peraçoli *et al.* (2003) demonstraram que monócitos de pacientes com PCM são capazes de produzir quantidades aumentadas de CXCL8 quando estimulados *in vitro* [124]. Em trabalho recente, Acorci-Valerio *et al* (2010) demonstraram que neutrófilos expostos à leveduras da cepa Pb18 de *P. brasiliensis* aumentam a produção de CXCL8 e IL-10, com o envolvimento do reconhecimento do fungo por TLR4 [125]. Por meio da análise feita com a técnica de imuno-histoquímica, pudemos demonstrar que nas lesões de pacientes com a FA da PCM há a produção dessa quimiocina, principalmente em macrófagos e células gigantes.

Também pudemos observar que os neutrófilos tratados com IL-17 e IL-23 produzem grandes quantidades de matriz metaloproteinase-9 (MMP-9 – RNAm e proteína). Esse dado também está de acordo com o descrito por Zelante *et al.* (2007) que reportaram resultados similares na infecção experimental causada por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* [54]. O aumento do número de neutrófilos e da produção de MMP-9 poderia ser associado à destruição tecidual observada em pacientes com paracoccidiodomicose. No modelo experimental da paracoccidiodomicose foi demonstrado que a infecção leva a um aumento da produção de MMP-9 e MMP-2 por células do infiltrado inflamatório, tanto em animais resistentes como em animais suscetíveis, sendo essa produção associada à disseminação do fungo [126]. Além disso, tem sido demonstrado que a atividade proteolítica da MMP-9 é importante para ativar outros mediadores inflamatórios e quimiocinas [127]. A clivagem da porção amino-terminal da CXCL8 por essa

enzima potencializa sua atividade quimiotática [128], induzindo uma maior migração de neutrófilos para o local de sua produção. A MMP-9 também pode atuar sobre outras quimiocinas como a CCL2 e a CXCL10 [129], envolvida na atração de monócitos e linfócitos, assim como pode atuar no processamento de IL-1 $\beta$  de maneira caspase-1 independente, levando ao aumento da resposta inflamatória local [130, 131].

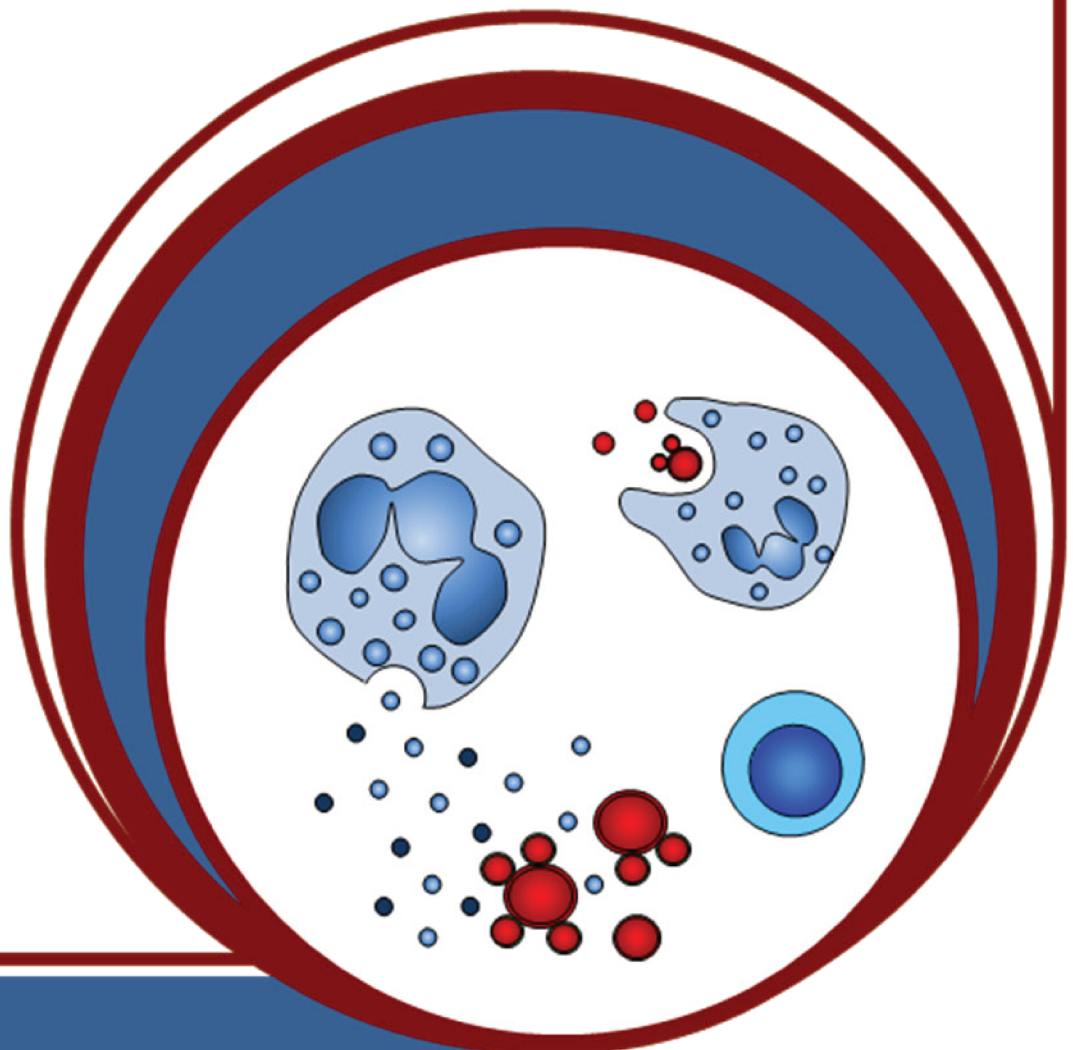
Nossos dados também demonstraram que neutrófilos estimulados com IL-17 ou IL-23 produzem uma maior quantidade de citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$  e IL-6) o que poderia contribuir para uma resposta inflamatória exacerbada no local da infecção. Também pudemos notar que neutrófilos de pacientes com PCM apresentam, mesmo sem estímulo, uma maior produção dessas citocinas. Além disso, observamos que os neutrófilos desses pacientes apresentaram uma maior expressão do receptor de IL-17 e IL-23 e a estimulação com tais citocinas eleva ainda mais a expressão desses receptores nessas células. Esses dados indicam que o ambiente inflamatório causado pela resposta à infecção seria responsável pela maior expressão desses receptores. Pacientes com paracoccidioidomicose ativa também apresentam uma produção aumentada de citocinas (IL-18, IL-12, IL-6), quimiocinas (CXCL9 e CXCL10) e outros marcadores inflamatórios (sICAM-1, sTNF-RI e sTNF-RII), quando comparados a indivíduos saudáveis ou com paracoccidioidomicose infecção, sendo que níveis mais elevados de alguns deles (IL-6, IL-8, IL-18 e TNFRII) foram encontrados nas formas mais graves da doença [13, 24].

Em conjunto nossos dados demonstram que apesar de poder ser importante para a resposta imunológica ao fungo, a IL-17 (assim como a IL-23) pode apresentar um papel deletério na PCM, gerando uma resposta inflamatória intensa que estaria envolvida na destruição tecidual característica da forma adulta da doença.





# ***CONCLUSÕES***



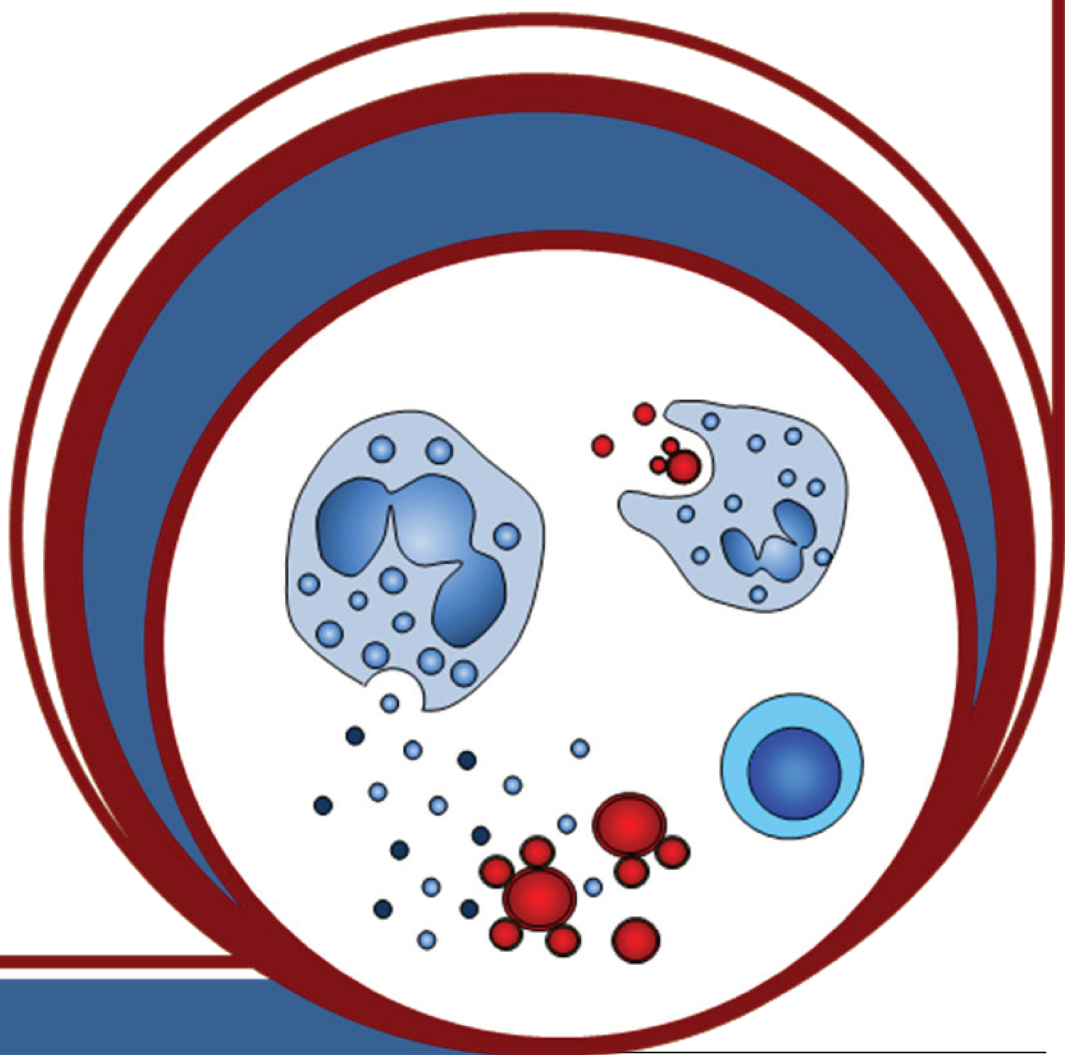


## 6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que citocinas relacionadas à resposta Th17 (IL-17 e IL-23) desempenham um papel importante na contenção da infecção causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, uma vez que predominam em sua forma mais branda e localizada, a forma adulta. Essas citocinas poderiam atuar de forma semelhante àquela descrita em outras infecções fúngicas, induzindo uma resposta inflamatória local e ativando células do sistema imunológico inato. Apesar de sua importância, nossos dados também demonstraram que neutrófilos tratados com IL-17 e/ou IL-23 apresentaram atividades migratória e inflamatória aumentadas, em associação a uma capacidade fungicida diminuída. Desse modo, a produção crônica dessas citocinas pode induzir uma resposta inflamatória exacerbada que em última instância seria responsável pela destruição tecidual observada principalmente na forma crônica da paracoccidioidomicose.



# ***BIBLIOGRAFIA***





## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Brummer, E., E. Castaneda, A. Restrepo. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol Rev, 1993, **6** (2):89-117.
2. Blotta, M.H., R.L. Mamoni, S.J. Oliveira, S.A. Nouer, P.M. Papaiordanou, A. Goveia, *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. Am J Trop Med Hyg, 1999, **61** (3):390-4.
3. Shikanai-Yasuda, M., F.Q. Telles Filho, R.P. Mendes, A.L. Colombo, M.L. Moretti. Consenso em paracoccidioidomicose. Rev Soc Bras Med Trop, 2006, **39** (3):297-310.
4. Franco, M., M.R. Montenegro, R.P. Mendes, S.A. Marques, N.L. Dillon, N.G. Mota. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. Rev Soc Bras Med Trop, 1987, **20** (2):129-32.
5. Castaneda, E., E. Brummer, D. Pappagianis, D.A. Stevens. Impairment of cellular but not humoral immune responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice. Infect Immun, 1988, **56** (7):1771-7.
6. Benard, G., M.J. Mendes-Giannini, M. Juvenale, E.T. Miranda, A.J. Duarte. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two Paracoccidioides brasiliensis glycoproteins that elicit strong humoral immune response. J Infect Dis, 1997, **175** (5):1263-7.

7. Calich, V.L., L.M. Singer-Vermes, A.M. Siqueira, E. Burger. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. Br J Exp Pathol, 1985, **66** (5):585-94.
8. Cano, L.E., L.M. Singer-Vermes, C.A. Vaz, M. Russo, V.L. Calich. Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns. Infect Immun, 1995, **63** (5):1777-83.
9. Cano, L.E., S.S. Kashino, C. Arruda, D. Andre, C.F. Xidieh, L.M. Singer-Vermes, *et al.* Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. Infect Immun, 1998, **66** (2):800-6.
10. Vaz, C.A., L.M. Singer-Vermes, V.L. Calich. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. Am J Trop Med Hyg, 1998, **59** (6):971-7.
11. Kashino, S.S., R.A. Fazioli, C. Cafalli-Favati, L.H. Meloni-Bruneri, C.A. Vaz, E. Burger, *et al.* Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production. J Interferon Cytokine Res, 2000, **20** (1):89-97.
12. Benard, G., C.C. Romano, C.R. Cacere, M. Juvenale, M.J. Mendes-Giannini, A.J. Duarte. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. Cytokine, 2001, **13** (4):248-52.



13. Mamoni, R.L., S.A. Nouer, S.J. Oliveira, C.C. Musatti, C.L. Rossi, Z.P. Camargo, *et al.* Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*, 2002, **40** (2):153-9.
14. Oliveira, S.J., R.L. Mamoni, C.C. Musatti, P.M. Papaioordanou, M.H. Blotta. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*, 2002, **4** (2):139-44.
15. Mamoni, R.L., M.H. Blotta. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, 2006, **35** (3-4):207-16.
16. Mamoni, R.L., M.H. Blotta. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*, 2005, **32** (1):20-9.
17. Baida, H., P.J. Biselli, M. Juvenale, G.M. Del Negro, M.J. Mendes-Giannini, A.J. Duarte, *et al.* Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, 1999, **1** (4):273-8.
18. Mamoni, R.L., C.L. Rossi, Z.P. Camargo, M.H. Blotta. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, **65** (3):237-41.
19. Kaminagakura, E., P.R. Bonan, J. Jorge, O.P. Almeida, C. Scully. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. *Oral Dis*, 2007, **13** (4):434-9.

20. Pereira, R.M., F. Bucarechi, M. Barison Ede, G. Hessel, A.T. Tresoldi. Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2004, **46** (3):127-31.
21. Wagner, J.M., M. Franco, G.M. Kephart, G.J. Gleich. Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **59** (1):66-72.
22. Pina, A., S. Bernardino, V.L. Calich. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J Leukoc Biol*, 2008, **83** (5):1088-99.
23. Calich, V.L., T.A. da Costa, M. Felonato, C. Arruda, S. Bernardino, F.V. Loures, *et al.* Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Mycopathologia*, 2008, **165** (4-5):223-36.
24. Corvino, C.L., R.L. Mamoni, G.Z. Fagundes, M.H. Blotta. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Immunol*, 2007, **147** (3):483-90.
25. Pina, A., P.H. Saldiva, L.E. Restrepo, V.L. Calich. Neutrophil role in pulmonary paracoccidioidomycosis depends on the resistance pattern of hosts. *J Leukoc Biol*, 2006, **79** (6):1202-13.
26. Harrington, L.E., P.R. Mangan, C.T. Weaver. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 2006, **18** (3):349-56.
27. Bettelli, E., T. Korn, V.K. Kuchroo. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*, 2007, **19** (6):652-7.

28. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, *et al.* Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 2005, **6** (11):1123-32.
29. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 2005, **6** (11):1133-41.
30. Weaver, C.T., R.D. Hatton, P.R. Mangan, L.E. Harrington. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 2007, **25** 821-52.
31. Zhou, L., M.M. Chong, D.R. Littman. Plasticity of CD4<sup>+</sup> T cell lineage differentiation. *Immunity*, 2009, **30** (5):646-55.
32. Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 2007, **13** (2):139-45.
33. Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, *et al.* Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, 2007, **8** (6):639-46.
34. O'Shea, J.J., S.M. Steward-Tharp, A. Laurence, W.T. Watford, L. Wei, A.S. Adamson, *et al.* Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect*, 2009, **11** (5):599-611.

35. Santarlasci, V., L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, V. Querci, R. De Palma, *et al.* TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol*, 2009, **39** (1):207-15.
36. Romagnani, S., E. Maggi, F. Liotta, L. Cosmi, F. Annunziato. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol*, 2009,
37. Romagnani, S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther*, 2008, **10** (2):206.
38. Yang, X.O., B.P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H.S. Kang, Y. Chung, *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, 2008, **28** (1):29-39.
39. Matsuzaki, G.,M. Umemura. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol*, 2007, **51** (12):1139-47.
40. Palm, N.W.,R. Medzhitov. Antifungal defense turns 17. *Nat Immunol*, 2007, **8** (6):549-51.
41. Khader, S.A.,A.M. Cooper. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine*, 2008, **41** (2):79-83.
42. Kelly, M.N., J.K. Kolls, K. Happel, J.D. Schwartzman, P. Schwarzenberger, C. Combe, *et al.* Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*, 2005, **73** (1):617-21.
43. Romani, L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*, 2011, **11** (4):275-88.

44. Feinen, B., A.E. Jerse, S.L. Gaffen, M.W. Russell. Critical role of Th17 responses in a murine model of *Neisseria gonorrhoeae* genital infection. *Mucosal Immunol*, 2010, **3** (3):312-21.
45. Miyazaki, Y., S. Hamano, S. Wang, Y. Shimanoe, Y. Iwakura, H. Yoshida. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 2010, **185** (2):1150-7.
46. Scriba, T.J., B. Kalsdorf, D.A. Abrahams, F. Isaacs, J. Hofmeister, G. Black, *et al.* Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response. *J Immunol*, 2008, **180** (3):1962-70.
47. Zenaro, E., M. Donini, S. Dusi. Induction of Th1/Th17 immune response by *Mycobacterium tuberculosis*: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. *J Leukoc Biol*, 2009, **86** (6):1393-401.
48. Curtis, M.M., S.S. Way. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*, 2009, **126** (2):177-85.
49. Kleinschek, M.A., U. Muller, S.J. Brodie, W. Stenzel, G. Kohler, W.M. Blumenschein, *et al.* IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J Immunol*, 2006, **176** (2):1098-106.
50. Khader, S.A., G.K. Bell, J.E. Pearl, J.J. Fountain, J. Rangel-Moreno, G.E. Cilley, *et al.* IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol*, 2007, **8** (4):369-77.

51. Umemura, M., A. Yahagi, S. Hamada, M.D. Begum, H. Watanabe, K. Kawakami, *et al.* IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*, 2007, **178** (6):3786-96.
52. Wozniak, T.M., A.A. Ryan, W.J. Britton. Interleukin-23 restores immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-12p40-deficient mice and is not required for the development of IL-17-secreting T cell responses. *J Immunol*, 2006, **177** (12):8684-92.
53. Huang, W., L. Na, P.L. Fidel, P. Schwarzenberger. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis*, 2004, **190** (3):624-31.
54. Zelante, T., A. De Luca, P. Bonifazi, C. Montagnoli, S. Bozza, S. Moretti, *et al.* IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*, 2007, **37** (10):2695-706.
55. Romani, L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol*, 2008, 1-15.
56. Rudner, X.L., K.I. Happel, E.A. Young, J.E. Shellito. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun*, 2007, **75** (6):3055-61.
57. Heninger, E., L.H. Hogan, J. Karman, S. Macvilay, B. Hill, J.P. Woods, *et al.* Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. *J Immunol*, 2006, **177** (5):3303-13.
58. Gaffen, S.L., N. Hernandez-Santos, A.C. Peterson. IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*. *Immunol Res*, 2011, **50** (2-3):181-7.

59. Liu, J.Z., M. Pezeshki, M. Raffatellu. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine*, 2009, **48** (1-2):156-60.
60. Lin, L., A.S. Ibrahim, X. Xu, J.M. Farber, V. Avanesian, B. Baquir, *et al.* Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS Pathog*, 2009, **5** (12):e1000703.
61. Conti, H.R., F. Shen, N. Nayyar, E. Stocum, J.N. Sun, M.J. Lindemann, *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med*, 2009, **206** (2):299-311.
62. Eyerich, K., S. Foerster, S. Rombold, H.P. Seidl, H. Behrendt, H. Hofmann, *et al.* Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22. *J Invest Dermatol*, 2008, **128** (11):2640-5.
63. Linden, A., H. Hoshino, M. Laan. Airway neutrophils and interleukin-17. *Eur Respir J*, 2000, **15** (5):973-7.
64. Ivanov, S., S. Bozinovski, A. Bossios, H. Valadi, R. Vlahos, C. Malmhall, *et al.* Functional relevance of the IL-23-IL-17 axis in lungs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, **36** (4):442-51.
65. Aujla, S.J., P.J. Dubin, J.K. Kolls. Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Exp Lung Res*, 2007, **33** (10):507-18.
66. Silva, M.T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J Leukoc Biol*, 2010, **87** (5):805-13.

67. Dale, D.C., L. Boxer, W.C. Liles. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 2008, **112** (4):935-45.
68. Vilani-Moreno, F., D. Fecchio, M.C. de Mattos, M. Moscardi-Bacchi, J. Defaveri, M. Franco. Study of pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells: resistant vs. susceptible mice. *Mycopathologia*, 1998, **141** (2):79-91.
69. Fornazim, M.C., A. Balthazar, R. Quagliato, Jr., R.L. Mamoni, C. Garcia, M.H. Blotta. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J*, 2003, **22** (6):895-9.
70. Calvi, S.A., A.M. Soares, M.T. Peracoli, M. Franco, R.L. Ruiz, Jr., J. Marcondes-Machado, *et al.* Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. *Microbes Infect*, 2003, **5** (15):1373-9.
71. Neworal, E.P., A. Altemani, R.L. Mamoni, I.L. Noronha, M.H. Blotta. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine*, 2003, **21** (5):234-41.
72. Adams, D.H.,A.R. Lloyd. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*, 1997, **349** (9050):490-5.
73. Rollins, B.J. Chemokines. *Blood*, 1997, **90** (3):909-28.
74. Rot, A.,U.H. von Andrian. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*, 2004, **22** 891-928.



75. Luster, A.D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 1998, **338** (7):436-45.
76. Stillie, R., S.M. Farooq, J.R. Gordon, A.W. Stadnyk. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. *J Leukoc Biol*, 2009, **86** (3):529-43.
77. Zarbock, A.,K. Ley. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol*, 2008, **172** (1):1-7.
78. Smith, C.W. 3. Adhesion molecules and receptors. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, **121** (2 Suppl):S375-9; quiz S414.
79. Zen, K.,C.A. Parkos. Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15** (5):557-64.
80. Gonzalez-Amaro, R.,F. Sanchez-Madrid. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol*, 1999, **19** (5-6):389-429.
81. Roussel, L., F. Houle, C. Chan, Y. Yao, J. Berube, R. Olivenstein, *et al.* IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J Immunol*, **184** (8):4531-7.
82. Wittchen, E.S. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci*, 2009, **14** 2522-45.
83. Grailer, J.J., M. Koder, D.A. Steeber. L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci*, 2009, **56** (3):141-7.
84. Lawson, C.,S. Wolf. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*, 2009, **61** (1):22-32.

85. Gohman-Yahr, M., A. Rothenberg, A. Bretana, G. Isturiz, R. Rosquete, E. Avila-Millan, *et al.* Digestion of killed *Paracoccidioides brasiliensis* by neutrophils. *Mycopathologia*, 1989, **106** (1):53-8.
86. Gohman-Yahr, M., J. Pereira, G. Isturiz, N. Vilorio, M. Carrasquero, N. Saavedra, *et al.* Relationship between digestive and killing abilities of neutrophils against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses*, 1992, **35** (11-12):269-74.
87. Rodrigues, D.R., L.A. Dias-Melicio, S.A. Calvi, M.T. Peracoli, A.M. Soares. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN-gamma, TNF-alpha and GM-CSF activated human neutrophils: role for oxygen metabolites. *Med Mycol*, 2007, **45** (1):27-33.
88. Costa, D.L., L.A. Dias-Melicio, M.J. Acorci, A.P. Bordon, E.G. Tavian, M.T. Peracoli, *et al.* Effect of interleukin-10 on the *Paracoccidioides brasiliensis* killing by gamma-interferon activated human neutrophils. *Microbiol Immunol*, 2007, **51** (1):73-80.
89. McEwen, J.G., V. Bedoya, M.M. Patino, M.E. Salazar, A. Restrepo. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol*, 1987, **25** (3):165-75.
90. Calich, V.L., C.A. Vaz, E. Burger. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Res Immunol*, 1998, **149** (4-5):407-17; discussion 499-500.
91. Restrepo, A.,B.E. Jimenez. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* Yeast Phase in a Chemically Defined Culture Medium. *J Clin Microbiol*, 1980, **12** (2):279-281.

92. Muanza, K., F. Gay, C. Behr, A. Scherf. Primary culture of human lung microvessel endothelial cells: a useful in vitro model for studying *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadherence. *Res Immunol*, 1996, **147** (3):149-63.
93. Elbim, C.,G. Lizard. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A*, 2009, **75** (6):475-81.
94. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29** (9):e45.
95. Pagliari, C., E.R. Fernandes, F.W. Stegun, W.L. da Silva, M.I. Seixas Duarte, M.N. Sotto. Paracoccidioidomycosis: Cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog*, 2011,
96. Romani, L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol*, 2008, **46** (6):515-29.
97. Zelante, T., A. De Luca, C. D'Angelo, S. Moretti, L. Romani. IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur J Immunol*, 2009, **39** (3):645-8.
98. Gaffen, S.L. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*, 2008, **43** (3):402-7.
99. Romani, L.,P. Puccetti. Controlling pathogenic inflammation to fungi. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2007, **5** (6):1007-17.
100. Zelante, T., S. Bozza, A. De Luca, C. D'Angelo, P. Bonifazi, S. Moretti, *et al*. Th17 cells in the setting of *Aspergillus* infection and pathology. *Med Mycol*, 2009, **47 Suppl 1** S162-9.

101. Boscardin, R.N., H. Brandao, A. Balla. Bronchoalveolar lavage findings in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia*, 1985, **23** (2):143-6.
102. Romano, C.C., M.J. Mendes-Giannini, A.J. Duarte, G. Benard. The role of interleukin-10 in the differential expression of interleukin-12p70 and its beta2 receptor on patients with active or treated paracoccidioidomycosis and healthy infected subjects. *Clin Immunol*, 2005, **114** (1):86-94.
103. Hunter, C.A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol*, 2005, **5** (7):521-31.
104. Cooper, A.M., A. Solache, S.A. Khader. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Curr Opin Immunol*, 2007, **19** (4):441-7.
105. Watford, W.T., B.D. Hissong, J.H. Bream, Y. Kanno, L. Muul, J.J. O'Shea. Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev*, 2004, **202** 139-56.
106. Canda-Sanchez, A., F.J. Salgado, A. Perez-Diaz, C. Varela-Gonzalez, P. Arias, M. Nogueira. IL-12-dependent activation of ERK1/2 in human T lymphoblasts. *Immunobiology*, 2009, **214** 187-196.
107. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, D.J. Cua. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*, 2006, **27** (1):17-23.
108. Veldhoen, M.,B. Stockinger. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol*, 2006, **27** (8):358-61.
109. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, **441** (7090):235-8.

110. Aggarwal, S., N. Ghilardi, M.H. Xie, F.J. de Sauvage, A.L. Gurney. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*, 2003, **278** (3):1910-4.
111. Annunziato, F., S. Romagnani. The transient nature of the Th17 phenotype. *Eur J Immunol*, 2010, **40** (12):3312-6.
112. Romagnani, S., E. Maggi, F. Liotta, L. Cosmi, F. Annunziato. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol*, 2009, **47** (1):3-7.
113. Yao, Z., S.L. Painter, W.C. Fanslow, D. Ulrich, B.M. Macduff, M.K. Spriggs, *et al.* Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol*, 1995, **155** (12):5483-6.
114. Gaffen, S.L., J.M. Kramer, J.J. Yu, F. Shen. The IL-17 cytokine family. *Vitam Horm*, 2006, **74** 255-82.
115. Kawaguchi, M., M. Adachi, N. Oda, F. Kokubu, S.K. Huang. IL-17 cytokine family. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, **114** (6):1265-73; quiz 1274.
116. Dragon, S., A.S. Saffar, L. Shan, A.S. Gounni. IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. *Mol Immunol*, 2008, **45** (1):160-168.
117. Lu, Y.J., J. Gross, D. Bogaert, *e. al.* Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. *PLoS Pathog*, 2008, **4** (9):
118. Meloni-Bruneri, L.H., A. Campa, D.S. Abdalla, V.L. Calich, H.L. Lenzi, E. Burger. Neutrophil oxidative metabolism and killing of *P. brasiliensis* after air pouch infection of susceptible and resistant mice. *J Leukoc Biol*, 1996, **59** (4):526-33.

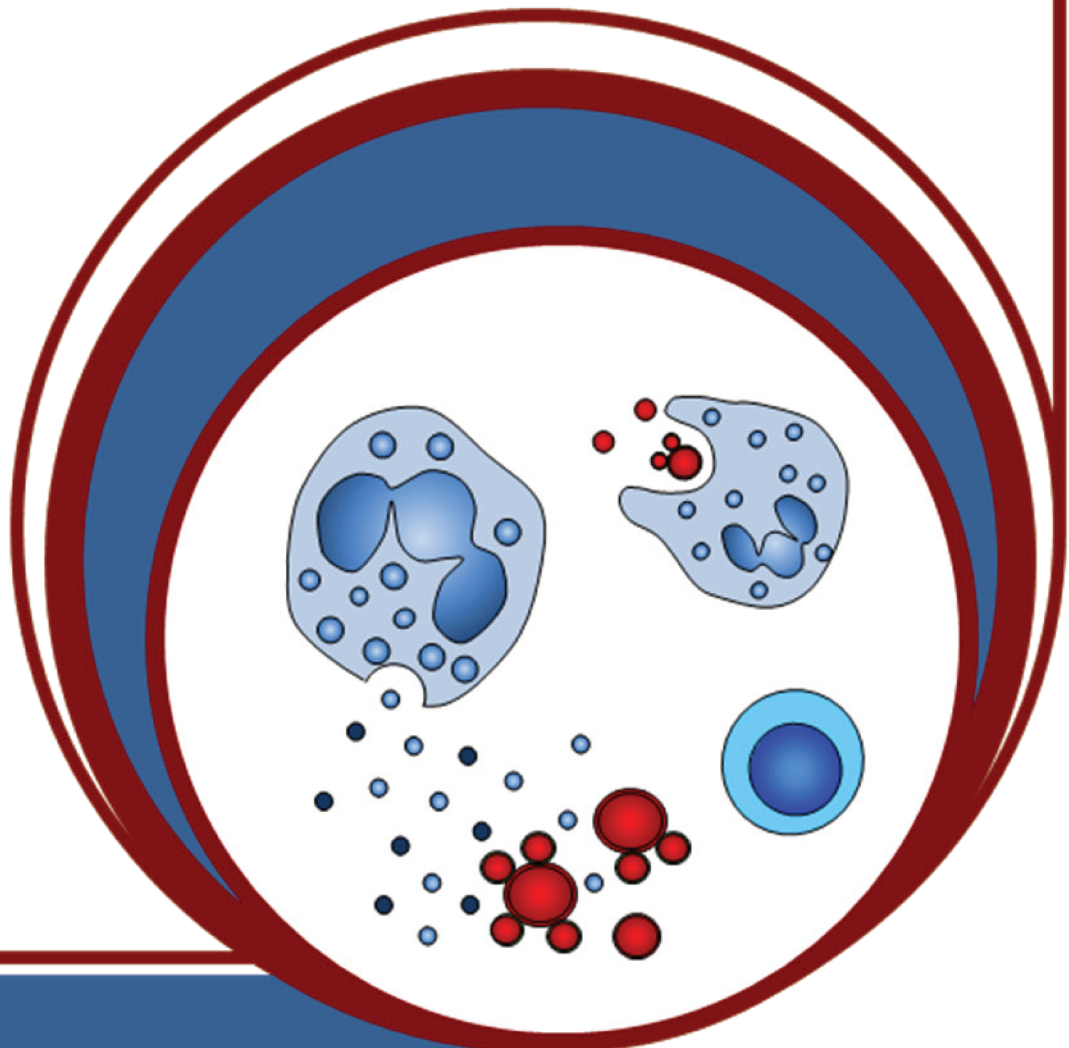
119. Moreira, A.P., L.A. Dias-Melicio, M.T. Peracoli, S.A. Calvi, A.M. Victoriano de Campos Soares. Killing of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells by IFN-gamma and TNF-alpha activated murine peritoneal macrophages: evidence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO effector mechanisms. *Mycopathologia*, 2008, **166** (1):17-23.
120. Miossec, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect*, 2009, **11** (5):625-30.
121. Traves, S.L., L.E. Donnelly. Th17 cells in airway diseases. *Curr Mol Med*, 2008, **8** (5):416-26.
122. Smith, E., A. Zarbock, M.A. Stark, T.L. Burcin, A.C. Bruce, P. Foley, *et al.* IL-23 is required for neutrophil homeostasis in normal and neutrophilic mice. *J Immunol*, 2007, **179** (12):8274-9.
123. Acorci, M.J., L.A. Dias-Melicio, M.A. Golim, A.P. Bordon-Graciani, M.T. Peracoli, A.M. Soares. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: role of interleukin-8. *Scand J Immunol*, 2009, **69** (2):73-9.
124. Peracoli, M.T., C.S. Kurokawa, S.A. Calvi, R.P. Mendes, P.C. Pereira, S.A. Marques, *et al.* Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*, 2003, **5** (5):413-8.
125. Acorci-Valerio, M.J., A.P. Bordon-Graciani, L.A. Dias-Melicio, M. de Assis Golim, E. Nakaira-Takahagi, A.M. de Campos Soares. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand J Immunol*, 2010, **71** (2):99-108.

126. Nishikaku, A.S., L.C. Ribeiro, R.F. Molina, B.P. Albe, S. Cunha Cda, E. Burger. Matrix metalloproteinases with gelatinolytic activity induced by *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Int J Exp Pathol*, 2009, **90** (5):527-37.
127. Opdenakker, G., P.E. Van den Steen, B. Dubois, I. Nelissen, E. Van Coillie, S. Masure, *et al.* Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol*, 2001, **69** (6):851-9.
128. Van den Steen, P.E., P. Proost, A. Wuyts, J. Van Damme, G. Opdenakker. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*, 2000, **96** (8):2673-81.
129. Denney, H., M.R. Clench, M.N. Woodroffe. Cleavage of chemokines CCL2 and CXCL10 by matrix metalloproteinases-2 and -9: implications for chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **382** (2):341-7.
130. Schonbeck, U., F. Mach, P. Libby. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol*, 1998, **161** (7):3340-6.
131. Ito, A., A. Mukaiyama, Y. Itoh, H. Nagase, I.B. Thogersen, J.J. Enghild, *et al.* Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*, 1996, **271** (25):14657-60.





# ***APÊNDICE***





## 8. APENDICE

### 8.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 21/12/10  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 1034/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).  
**CAAE:** 0809.0.146.000-10

#### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO:** “AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS PRODUTORAS DE IL-17 (TH17) NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE HUMANA: EFEITO DO TRATAMENTO COM IL-17 E IL-23 SOBRE A ATIVIDADE FUNGICIDA E CAPACIDADE MIGRATÓRIA DE NEUTRÓFILOS”.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Munir Regini Paião

**INSTITUIÇÃO:** Hospital das Clínicas/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 13/10/2010

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 21/12/11 (O formulário encontra-se no *site* acima).

#### II - OBJETIVOS

Avaliar a participação das células produtoras de IL-17 na paracoccidiodomicose humana e o seu efeito sobre a capacidade fungicida; avaliar se o tratamento com IL-17 e IL-23 altera a capacidade de migração de neutrófilos.

#### III - SUMÁRIO

A amostra se caracteriza por 3 grupos de pesquisa, segundo os seguintes critérios de inclusão: (I) aqueles com a doença ativa (DA), incluídos na amostra logo após o diagnóstico ou no início do seu tratamento (com um mês de tratamento no máximo); (II) pacientes já tratados (TT), que tenham finalizado o tratamento há pelo menos 3 meses e que não apresentem nenhum sintoma ou exame laboratorial indicativo da doença; (III) grupo controle. Os dois primeiros grupos incluem pacientes atendidos nos vários ambulatórios do HC e envolverão a forma juvenil e a adulta da doença. O último grupo será selecionado na zona endêmica de Campinas (fazendas e hortas em Barão Geraldo). Não há informação quanto ao N de indivíduos a comporem a amostra a não ser aquela que vem na Folha de Rosto (30 sujeitos).

#### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br



atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

## VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

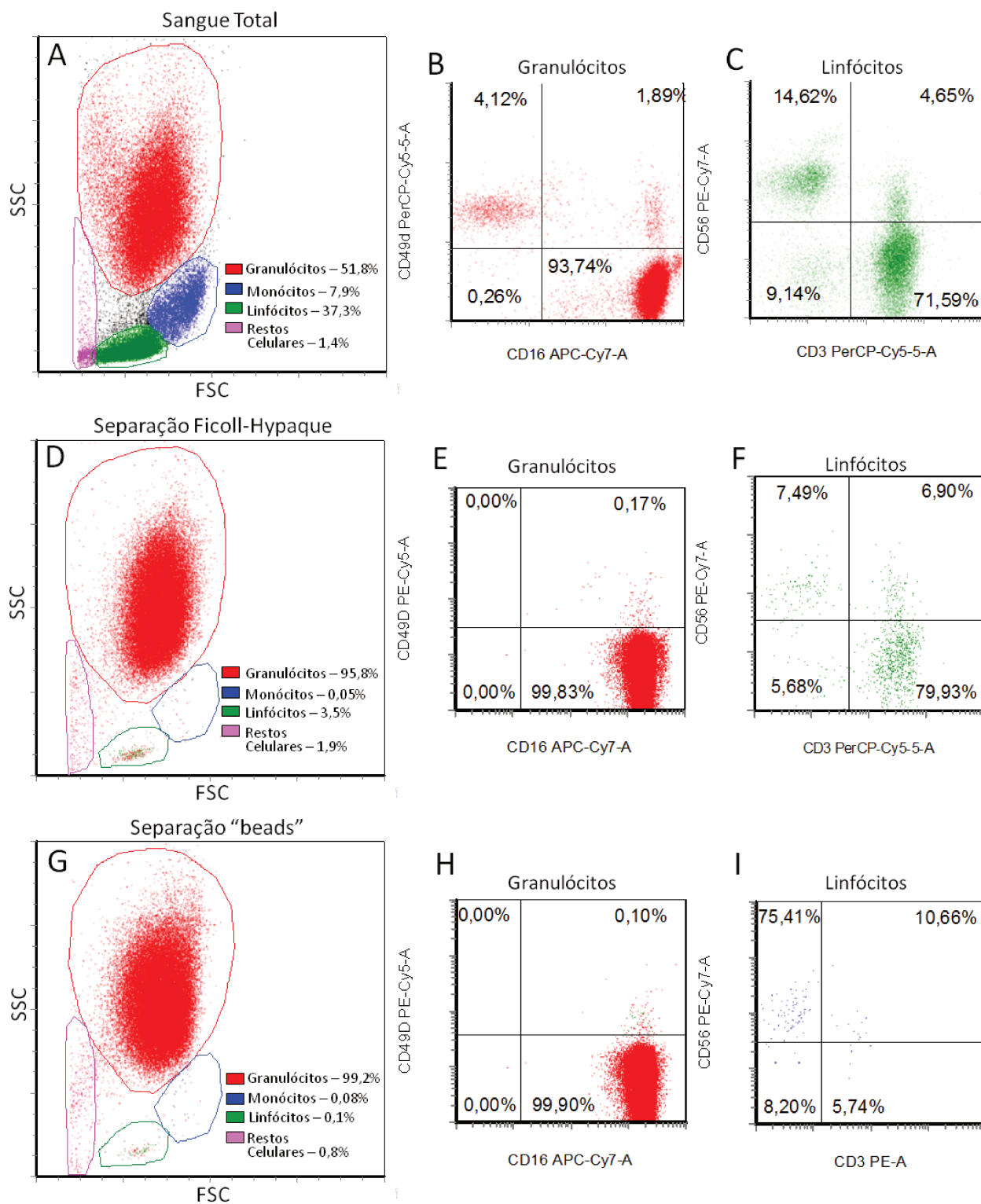
Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

## VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de outubro de 2010.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

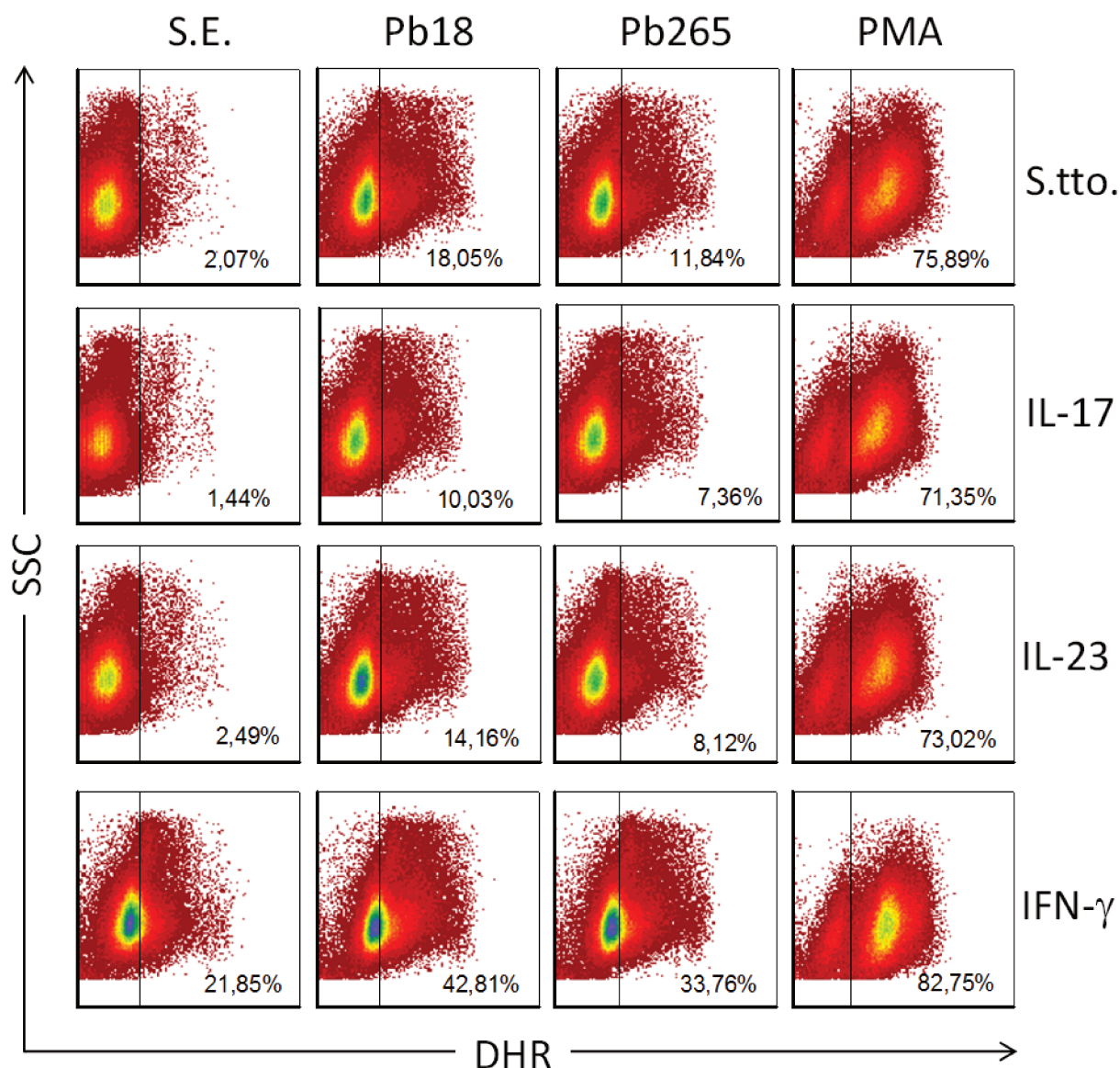
## 8.2. Análise da separação de neutrófilos por gradiente de densidade e separação imunomagnética



**Figura 8.1 (página anterior)** - "Dot-plots" representativos dos resultados da separação de neutrófilos por gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque e separação imunomagnética. **A, D e G**- "Dot-plots" da dispersão de células por tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC), nos quais foram delimitadas as populações de granulócitos (vermelho), monócitos (azul) e linfócitos (verde). **B e C, E e F, H e I** - "Dot-plots" com a análise da marcação com anti-CD16 (neutrófilos) e anti-CD49d (eosinófilos) na população de granulócitos e da marcação com anti-CD3 (linfócitos T) e anti-CD56 (células NK) na população de linfócitos. **A a C** - Células do sangue total após lise de hemácias. **D a F** - Células após separação com gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque. **G a I** - Células após a separação imunomagnética com "beads" anti-CD16. As porcentagens de células estão destacadas em cada gráfico.



### 8.3. Análise da produção de $H_2O_2$ por neutrófilos por citometria de fluxo



**Figura 8.2** - "Dot-plots" representativos da produção de  $H_2O_2$  por neutrófilos estimulados com IL-17, IL-23 e IFN- $\gamma$ , e expostos à células leveduriformes de *P. brasiliensis* ou PMA (controle positivo). Neutrófilos foram estimulados por 24 horas com as citocinas recombinantes, marcados com dihidrorodamina (DHR-123) e expostos por 1 hora a células leveduriformes de *P. brasiliensis* (cepas Pb18 e Pb265 - razão 1 levedura:10 neutrófilos). Os números nos gráficos representam a porcentagem de células positivas para DHR-123 nos quadrantes.