



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**DIFERENTES PADRÕES DE INFILTRADO CELULAR E CITOCINAS
DISTINGUEM FORMAS CLÍNICAS DA
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Rosiane Maria da Silva

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**DIFERENTES PADRÕES DE INFILTRADO CELULAR E CITOCINAS
DISTINGUEM FORMAS CLÍNICAS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Rosiane Maria da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas. Sob orientação 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

Si38d Silva, Rosiane Maria da, 1979 -
Diferentes padrões de infiltrado celular e citocinas distinguem formas clínicas da paracoccidiodomicose / Rosiane Maria da Silva. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Oral mucosa. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*. 3. imunohistoquímica. I. Blotta, Maria Heloisa de Souza Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Different patterns of cellular infiltrate and cytokines distinguish clinical forms of paracoccidiodomycosis.

Palavras-chave em inglês:

Oral mucosa

Paracoccidioides brasiliensis

Immunohistochemistry

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Maria Heloisa de Souza Lima Blotta [Orientador]

Mirian Nakagami Sotto

Maria Letícia Cintra

Data da defesa: 10-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

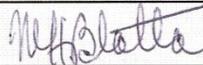
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Rosiane Maria da Silva

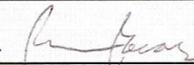
Orientadora: Profa. Dra. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta

Membros:

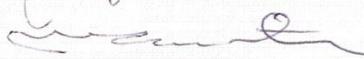
1. Profa. Dra. Maria Heloísa de Souza Lima Blotta -



2. Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto -



3. Profa. Dra. Maria Leticia Cintra -



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

Data: 10/02/2012

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

Agradeço a Deus por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo, pela força nos momentos mais difíceis, nunca me deixou desistir de nada.

Aos meus pais Jair e Sônia pelo amor, educação e por terem acreditado e me dado total apoio durante esses anos. Ao meu irmão Rodrigo, pela ajuda, preocupação e orgulho de ser meu irmão. À minha sobrinha Julia que, com toda a inocência de uma criança, me fez muitas vezes esquecer os problemas. Muito obrigada a minha cunha Cristiane, jamias vou me esquecer de você.

À Dra. Heloisa, agradeço por ter me aceitado como aluna, pela confiança depositada e por tudo que me ensinou durante esses anos.

À Dra. Cecilia, amiga e chefe, obrigada por toda ajuda, pelos inúmeros “sim” todas as vezes que precisei. Agradeço também pela análise de algumas lâminas.

Ao Ronei, grande amigo, agradeço por tudo que aprendi, pelas dicas e pela ajuda na elaboração da tese.

Aos meus amigos de laboratório, Larissa, Carol e Rômulo, pelos bons momentos vividos e por toda ajuda quando precisei; Eliane, Munir e Fernanda, pelos momentos de descontração; à Marcela, minha sucessora nas reações de IHQ e companheira na tão esperada disciplina de didática e a Lisandra, adoradora de gatos como eu.

Ao Rômulo, companheiro estrada durante todos esses anos.

Às minhas amigas de laboratório da PUC, Cristiane e Cibele, pela ajuda, por toda força nos momentos mais difíceis e pelos momentos de descontração e diversão das “neuroses da patologia”.

Ao amigo Hudson, pela preocupação e ajuda técnica no processamento e cortes histológicos dos materiais analisados.

À Márcia minha amiga do coração, e à Bernadete, pelos 10 anos de convivência.

Ao Dr. Geraldo, Fausto e Pedro por comunicarem a entrada de amostras positivas incluídas no estudo e pelo contato com médicos em busca de mais informações clínicas sobre os pacientes.

À Dra. Albina pela ajuda na análise de algumas lâminas e pelo empréstimo de reagentes e anticorpos.

À Betinha pela ajuda na coleta de amostras na PUC.

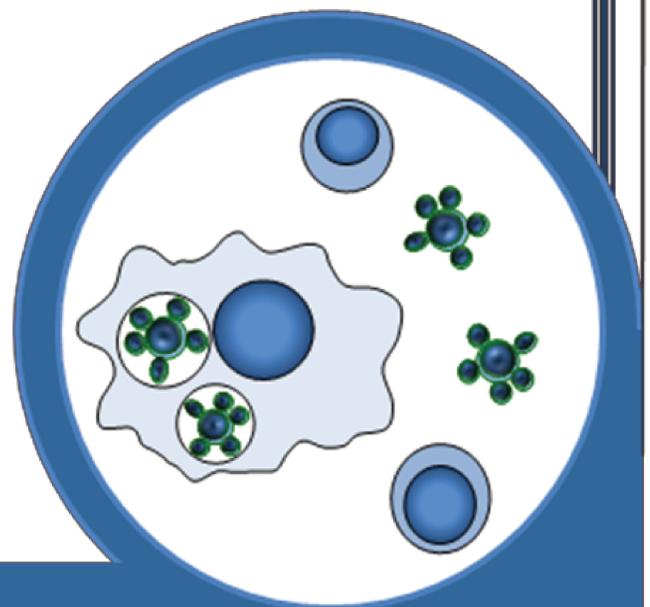
Agradeço a minhas amadas primas Christiane, Adriana e Ligia e aos meus tios e tias por tudo. Agradeço especialmente a minha tia Sirlene pelo seu enorme coração e sua incrível força de viver.

Agradeço também ao meu querido gato Bilú, pelos 14 anos de convivência e mesmo na fase final da tese não deixou de exigir atenção e carinho.

Agradeço a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

Muito obrigada!

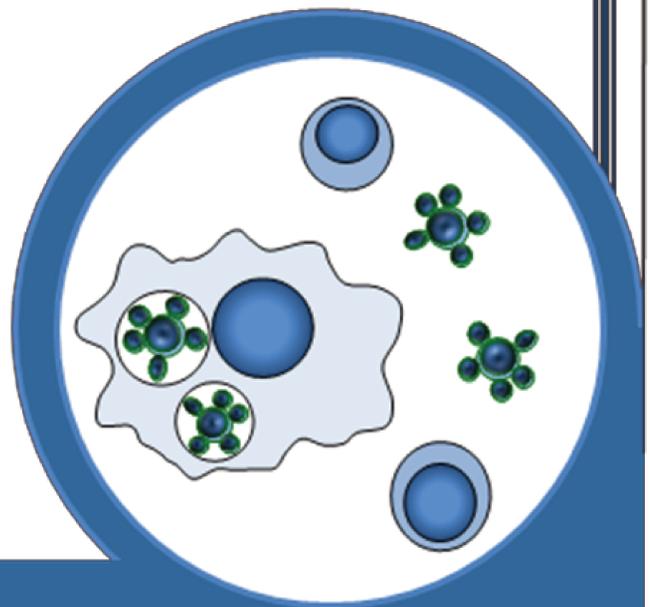
Resumo



A paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, apresenta um largo espectro de manifestações clínicas e imunológicas, variando de formas benignas e localizadas a quadros graves e disseminados. A forma crônica ou adulta (FA) se caracteriza por lesões localizadas com acometimento da pele, mucosa oral (MO) e pulmões; enquanto a forma aguda ou juvenil (FJ) é mais grave e disseminada com acometimento do fígado, baço e linfonodos (LNs). Nós examinamos a resposta inflamatória/imunológica em lesões de pacientes com formas clínicas distintas da PCM. Foram analisados a expressão de citocinas e o fenótipo das células presentes nos infiltrados de biópsias de mucosa oral de 15 pacientes com a forma adulta e de linfonodos de 15 pacientes com a forma juvenil da PCM por imuno-histoquímica (IHQ) e qPCR. Anticorpos monoclonais ou policlonais foram utilizados para caracterizar o infiltrado celular (CD68, CD15, CD3, CD8, CD56 e FOXP3), citocinas (IL-12, IL-18, IL-1 β , IL-23, IFN- γ , IL-17, TGF- β e IL-10) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) por IHQ. O RNA foi extraído de tecidos fixados em blocos de parafina para avaliação da expressão gênica de IL-1 β , IL-23, IFN- γ , IL-17 e IL-4 por qRT-PCR. Os resultados mostraram que a maioria das células inflamatórias nos linfonodos eram CD68+ (macrófagos, células epitelióides e células gigantes), enquanto um infiltrado misto composto por macrófagos e neutrófilos (CD15+) foi detectado na mucosa oral. Linfócitos (CD3+ e CD8+) foram observados em grande número tanto em LNs como em MO. Células IL-12+ foram observadas em pequeno número e distribuição similar nos dois tecidos analisados. A expressão de IL-18, IL-1 β , e TGF- β foi significativamente maior em linfonodos. A marcação para ICAM-1 também foi maior em LNs do que na mucosa oral, localizada principalmente em macrófagos e na

matriz extracelular. Células IFN- γ + e IL-17+ foram vistas em maior número na mucosa oral do que em linfonodos. Um achado interessante foi a detecção de um número muito pequeno de células FOXP3+ (fator de transcrição expresso em células T regulatórias) nos linfonodos comparado ao da mucosa oral, onde se localizavam ao redor dos granulomas. Tendo em vista a presença de células CD8+ e CD56+ nas lesões foi investigada a expressão de moléculas citotóxicas (granzima B, perforina e granulicina), que se mostrou restrita a um pequeno número de células e sem diferença entre os tecidos analisados. Em conjunto, os resultados sugerem que a produção local de moléculas de adesão e citocinas pode estar relacionada a resposta imune diferencial observada nas duas formas da doença. No caso dos linfonodos (pacientes com a FJ da PCM), o desenvolvimento de uma reação inflamatória exacerbada (número elevado de células CD68+, alta expressão de IL-18, IL-1 β , IL-23 e ICAM-1), sem o controle de células Treg (células FOXP3+) poderia levar a uma resposta imune deficiente e aumento da carga fúngica. Por outro lado, a produção de IFN- γ e IL-17, com conseqüente ativação de macrófagos e neutrófilos, bem como a presença de células Treg poderia resultar em melhor controle da resposta inflamatória, resposta imune mais eficiente e conseqüente controle da carga fúngica.

Abstract



Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic disease caused by the fungus *P. brasiliensis*, presents with a wide spectrum of clinical and immunological manifestations, varying from benign and localized forms to severe and disseminated forms. The chronic or adult form (AF) is characterized by localized lesions with involvement of the skin, oral mucosa (OM) and lungs. While the acute or juvenile form (JF) is more severe and presents disseminated widespread with the involvement of the liver, spleen and lymph nodes (LNs). In order to examine the inflammatory/immune response in lesions of patients with different clinical forms of PCM, we analyzed the expression of cytokines as well as the phenotype of the cells in the inflammatory infiltrate. Paraffin-embedded OM biopsies from 15 patients with the localized AF of PCM and LN from 15 patients with the JF of PCM were analyzed by immunohistochemistry (IHC) and qPCR. Monoclonal or polyclonal antibodies were used to characterize the cellular infiltrate (CD68, CD15, CD3, CD8, CD56, and FOXP3), cytokines (IL-12, IL-18, IL-1 β , IL-23, IFN- γ , IL-17, TGF- β and IL-10) and the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by IHC. RNA was extracted from formalin fixed paraffin embedded tissues and analyzed by qPCR. The results showed that most of the inflammatory cells in the LN were CD68+ (macrophages, epithelioid and giant cells), while a mixed infiltrate composed by macrophages and neutrophils (CD15+) was detected in the OM. Lymphocytes (CD3+ and CD8+) were detected in large amounts in both OM and LN. IL-12+ cells were scarce and similarly distributed in both tissues. IL-18, IL-1 β , and TGF- β expression was significantly higher in LNs than in OM. ICAM-1 staining was also significantly higher in patients with the JF, localized mainly in macrophages and

extracellular matrix. IFN- γ + and IL-17+ cells were detected mainly in OM than in LNs. IL-17 was expressed in both epithelial cells and inflammatory infiltrates. An interesting finding was the very low number of FOXP3+ (the transcription factor expressed in regulatory T cells) cells in LNs biopsies, compared to OM, where they localize around the granulomas. Considering the presence of CD8+ and CD56+ cells in the lesions, the expression of cytotoxic granules was examined. The expression of granzyme-B, granulysin and perforin was restricted to a low number of cells and no differences were detected between LNs and OM. Altogether these results suggest that the local production of adhesion molecules and cytokines may account to the differential immune response that characterizes the clinical forms of PCM. In LNs (JF of PCM) the development of an exacerbated inflammatory reaction (elevated number of CD68+ cells, high expression of IL-18, IL-1 β , IL-23 e ICAM-1) without the control of Treg (FOXP3+ cells) could lead to a deficient immune response and increased fungal load. On the other hand, in the OM from patients with AF, the production of IFN- γ and IL-17, with macrophages and neutrophils activation, as well as the presence of Treg cells could result in an improved control of inflammatory response, an efficient immune response and consequent inhibition fungal growth.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Anticorpos e conjugados utilizados nas reações de IHQ..... | 36 |
| Tabela 2- Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações de qRT-PCR..... | 41 |
| Tabela 3- Análise semi-quantitativa das reações de IHQ – Marcação celular | 87 |
| Tabela 4- - Análise semi-quantitativa das reações de IHQ – Expressão de citocinas | 88 |
| Tabela 5- - Análise semi-quantitativa das reações de IHQ – Moléculas citotóxicas | 89 |
| Figura 1- Tela do Programa GSA Image Analyser na função: contagem manual de objetos..... | 38 |
| Figura 2- (A)- Corte histológico de MO de paciente com PCM. (B) Análise pelo Programa GSA Image Analyser na função: cálculo da superfície de objetos..... | 38 |
| Figura 3- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) corados com HE | 44 |
| Figura 4- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-CD68 | 45 |
| Figura 5- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-CD15 | 46 |
| Figura 6- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-CD3 | 47 |
| Figura 7- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-CD8 | 47 |
| Figura 8- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-CD56 | 48 |
| Figura 9- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-FOXP3 | 49 |
| Figura 10 – Avaliação quantitativa de células CD68+, CD15+, CD3+, CD8+, CD56+ e FOXP3+ (número de células /campo)..... | 50 |
| Figura 11- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-IL-12..... | 51 |
| Figura 12- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-IL-18 | 51 |
| Figura13- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-IL-1 β | 52 |

| | |
|---|----|
| Figura 14- Expressão relativa do RNAm para IL-1 β | 52 |
| Figura 15- Cortes histológico de LN (A) e MO (B) marcados com anti-IL-23..... | 53 |
| Figura 16- Expressão relativa do RNAm para IL-23 | 53 |
| Figura 17. Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-ICAM-1 | 54 |
| Figura 18 - Cortes histológicos LN (A) e de MO (B) marcados com anti-IFN- γ | 55 |
| Figura 19 - Expressão relativa do RNAm para IFN- γ | 55 |
| Figura 20- Expressão relativa do RNAm para IL-4 | 56 |
| Figura 21- Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-IL-17..... | 57 |
| Figura 22 - Expressão relativa do RNAm para IL-17 | 57 |
| Figura 23 - Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-TGF- β | 58 |
| Figura 24 - Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-IL-10 | 58 |
| Figura 25 – Avaliação quantitativa de expressão de citocinas e ICAM-1 | 59 |
| Figura 26 - Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-granzima-B | 60 |
| Figura 27 - Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) marcados com anti-perforina | 61 |
| Figura 28 - Cortes histológicos de LN (A e C) e MO (B e D) marcados com anti-granulisina. | 62 |
| Figura 29 – Avaliação quantitativa da expressão de moléculas citotóxicas | 63 |
| Figura 30 – Cortes histológicos de LN (A) e MO (B) - controle negativo..... | 90 |

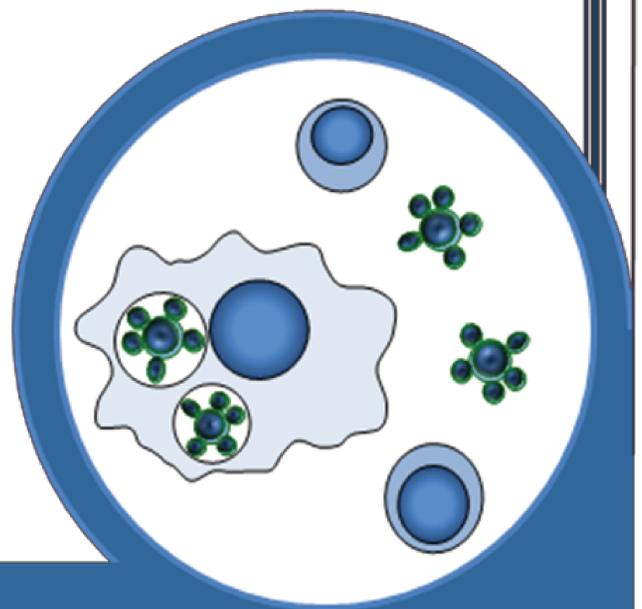
LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| - BSA | Soro Albumina Bovina |
| - CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| - FA | Forma Adulta da paracoccidiodomicose |
| - FJ | Forma Juvenil da paracoccidiodomicose |
| - FOXP3 | <i>Forkhead Box P3</i> |
| - IFN | Interferon |
| - HE | Hematoxilina - eosina |
| - ICAM-1 | Molécula de adesão intercelular-1 |
| - Ig | Imunoglobulina |
| - IHQ | Imuno-histoquímica |
| - LN | Linfonodo |
| - MO | Mucosa oral |
| - NF- κ B | Fator nuclear kappa |
| - PBS | Solução Salina Tamponada com Fostato |
| - PCM | Paracoccidiodomicose |
| - RORc | Retinoic acid-related orphan hormone receptor |
| - qRT-PCR | Reação de Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa (PCR em tempo real) |
| - RPM | Rotação por Minuto |
| - TGF | <i>Transforming growth factor</i> |
| - Th | <i>T helper</i> |
| - TNF | Fator de Necrose Tumoral |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. | OBJETIVOS | 31 |
| 3. | CASUÍSTICA, MATERIAL E METODOS | 33 |
| 3.1. | Casuística | 34 |
| 3.2. | Cortes Histológicos | 34 |
| 3.3. | Reação de Imuno- histoquímica (IHQ)..... | 35 |
| 3.4. | Avaliação da Reação de IHQ. | 36 |
| 3.5. | Análise Semi-Quantitativa | 37 |
| 3.6. | Análise Quantitativa..... | 37 |
| 3.7. | Avaliação da expressão do RNA mensageiro..... | 39 |
| 3.7.1. | Extração de RNA | 39 |
| 3.7.2. | Síntese de cDNA..... | 39 |
| 3.7.3. | Protocolo de qRT-PCR | 40 |
| 3.8. | Análise estatística. | 42 |
| 4. | RESULTADOS | 43 |
| 4.1. | Descrição microscópicas dos cortes hitológicos (HE) | 44 |
| 4.2. | Avaliação da composição do infiltrado celular..... | 45 |
| 4.2.1. | Marcação com anti- CD68 e anti-CD15..... | 45 |
| 4.2.2. | Marcação com anti-CD3 e anti-CD8..... | 47 |
| 4.2.3. | Marcação com anti-CD56..... | 48 |
| 4.2.4. | Marcação com anti-FOXP3..... | 49 |
| 4.3. | Análise quantitativa da marcação celular (GSA ImageAnalyser)..... | 50 |
| 4.4. | Citocinas produzidas por células do sistema imune inato e ICAM-1. | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5. Citocinas produzidas por células da resposta imune adaptativa | 55 |
| 4.5.1. Marcação para IFN- γ | 55 |
| 4.5.2. Expressão gênica de IL-4 | 56 |
| 4.5.3. Marcação para IL-17..... | 57 |
| 4.6. Citocinas anti-inflamatórias..... | 58 |
| 4.6.1. Marcação para TGF- β | 58 |
| 4.6.2. Marcação para IL-10..... | 58 |
| 4.7. Análise quantitativa da expressão de citocinas (GSA ImageAnalyser)..... | 59 |
| 4.8. Detecção de moléculas citotóxicas | 60 |
| 4.8.1. Detecção de granzima-B..... | 60 |
| 4.8.2. Detecção de perforina | 61 |
| 4.8.3. Detecção de granulicina | 62 |
| 4.9. Avaliação quantitativa da expressão de moléculas citotóxicas | 63 |
| 5. DISCUSSÃO | 64 |
| 6. CONCLUSÃO | 74 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 76 |
| 8. APÊNDICE | 86 |
| 8.1. Análise semi-quantitativa das reações de IHQ- Marcação celular | 87 |
| 8.2. Análise semi-quantitativa das reações de IHQ – Expressão de citocinas | 88 |
| 8.3. Análise semi-quantitativa das reações de IHQ – Moléculas citotóxicas..... | 89 |
| 8.4. Controle Negativo das reações de IHQ..... | 90 |
| 8.5. Aprovação do comitê de ética. | 91 |

Introdução



A paracoccidiodomicose (PCM) é a micose sistêmica mais prevalente no Brasil. É causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* e acomete principalmente indivíduos adultos do sexo masculino que residem em áreas rurais (1).

Grande parte dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue conter a infecção e não desenvolve a doença, sendo esta condição denominada PCM-infecção. Quando a doença se estabelece, segundo Franco (2), pode se apresentar sob duas formas clínicas principais: a forma juvenil (FJ) ou aguda, mais grave e disseminada e a forma adulta (FA) ou crônica com lesões mais localizadas e de desenvolvimento menos agressivo. Pacientes com PCM podem apresentar umE largo espectro de manifestações clínicas e patológicas que se relacionam estreitamente com o tipo de resposta imunológica desenvolvida (3).

A FJ ocorre em crianças e adultos jovens de ambos os sexos, representando menos de 10% da casuística geral da doença. Esses pacientes apresentam adenomegalia, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea, simulando patologias linfoproliferativas. Essa forma da doença tem uma evolução rápida, com febre, emagrecimento e comprometimento do sistema fagocítico-mononuclear (fígado, baço, LN e medula óssea). Os pacientes com a FJ apresentam a resposta imunológica humoral preservada, com aumento da produção de anticorpos específicos das classes IgG4, IgE e IgA (4-6). Por outro lado, a resposta imunológica celular encontra-se comprometida, o que pode ser verificado pela baixa resposta linfoproliferativa e teste cutâneo de hipersensibilidade tardio negativo a antígenos do fungo, alta produção de IL-4, IL-5 e baixa produção de IFN- γ (7).

A FA ocorre em aproximadamente 90% dos pacientes, tem progressão lenta e insidiosa, podendo levar meses ou anos para se estabelecer, como resultado da reativação de um foco latente da infecção fúngica. Pode ser leve, moderada ou grave e os pacientes geralmente apresentam ulcerações da mucosa oral e/ou comprometimento pulmonar com lesões localizadas ou difusas acompanhadas de manifestações clínicas como tosse, expectoração e dispnéia a esforços (4,8). A FA multifocal atinge mais de um órgão ou sistema, apresentando sintomas variados com lesões na mucosa oral e nasal, comprometimento de linfonodos e, em menor escala, das glândulas adrenais, intestinos e sistema nervoso central (1-3,9). Nestes pacientes a resposta imunológica humoral caracteriza-se pela produção de anticorpos da classe IgG1, embora nas formas mais graves e disseminadas haja produção de IgG4 e IgE. Pacientes com a FA geralmente apresentam teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardio positivo contra antígenos do fungo (10).

As lesões causadas pelo *P. brasiliensis*, caracterizam-se, do ponto de vista histológico, pela presença de microabscessos, reações granulomatosas com células gigantes e infiltrado de plasmócitos, linfócitos e eosinófilos (3). O granuloma é uma tentativa do organismo em conter a infecção fúngica, controlando a proliferação do patógeno e prevenindo a disseminação sistêmica (11).

Em pacientes com a FJ da PCM, a análise histopatológica revela lesões com reação inflamatória não específica e formação de granulomas frouxos, observando-se sinais de multiplicação ativa do fungo dentro das células fagocitárias (12). Em alguns casos, a ausência de células gigantes multinucleadas pode refletir uma resposta

ineficiente contra o fungo (13). Por outro lado, na FA ocorre a formação de granulomas epitelióides típicos, que circundam as lesões, dificultando a multiplicação do fungo (10). Essas diferenças indicam que diferentes fatores atuam localmente influenciando o infiltrado celular nas lesões e o destino do patógeno (1).

Os granulomas são tradicionalmente associados a respostas inflamatórias do tipo Th1 (14) e são compostos por macrófagos e numerosas células gigantes multinucleadas contendo fungos fagocitados. A formação dos granulomas na PCM é dependente da produção local de citocinas e do balanço entre a produção de TNF- α e IL-10 por células inflamatórias em lesões de pele e mucosa de pacientes conforme relatado por Parise-Fortes et al. (13). Heninger et al. (11) mostraram que a formação dos granulomas em animais infectados com *H. capsulatum* é dependente de citocinas e moléculas de adesão, e que a IL-10 era a responsável pelo pequeno tamanho do granuloma na fase inicial da doença.

Não há um consenso em relação aos determinantes da resposta Th1 e Th2 na PCM (15,16). O desenvolvimento da resposta de Th1 e Th2 depende do tipo de citocinas encontradas no local onde ocorre o processo de diferenciação, de forma que, enquanto a célula Th1 é gerada na presença de IL-12, as células Th2 desenvolvem-se em ambientes ricos em IL-4 (17,18). Em pacientes com PCM, a presença de IFN- γ e IL-12 em sido relacionada à proteção, enquanto que a resposta Th2 está relacionada com a forma mais grave da doença, na qual ocorre uma ativação da resposta humoral com a produção IL-4 e IL-13 baixa quantidade de TNF- α e ativação deficitária de macrófagos(7,19,20).

O principal indutor de IFN- γ e indiretamente de TNF- α é a IL-12, que induz a produção de IFN- γ por células NK, células T e células apresentadoras de antígenos (21,22). Como o IFN- γ estimula macrófagos a produzir radicais livres de oxigênio, esta citocina desempenha um importante papel na defesa contra microrganismos intracelulares (23). O eixo formado pela IL-12 e IFN- γ é essencial para o desenvolvimento do granuloma e a imunidade protetora contra vários microrganismos intracelulares tanto no homem e como em camundongos (22,24-26)

A IL-18 é uma citocina pro-inflamatória secretada por macrófagos, linfócitos T e B e células dendríticas(27,28), e mais uma grande variedade de células, como osteoblastos, queratinócitos, astrócitos e células da micróglia (29). A principal função da IL-18 é induzir a produção de IFN- γ por células Th1 na presença da IL-12 (29); também exibe uma série de efeitos pro-inflamatórios independentes de IFN- γ e induz a produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 provavelmente por meio da ativação do NF- κ B (30).

Na infecção experimental pelo *P. brasiliensis* a presença de IFN- γ e IL-12 tem sido relacionada à proteção (resposta do tipo Th1), enquanto a suscetibilidade é associada a uma resposta do tipo Th2, com produção de citocinas regulatórias, responsáveis pela progressão da doença (20). Livonesi et al. (15) observaram que animais deficientes em IL-12 e infectados por *P. brasiliensis* apresentavam uma alta taxa de mortalidade em torno de 27 dias e granulomas frouxos, pouco delimitados, com grande quantidade de fungos nos pulmões. Verificaram também que a ausência da IL-12 também provocava uma resposta celular e humoral exacerbada, com altos níveis de IL-10 e IgG1.

Diferentemente, camundongos deficientes em IL-18 e infectados por *P. brasiliensis*, não apresentam diferenças quanto ao infiltrado das lesões, nem tampouco em relação a produção de citocinas comparado aos camundongos selvagens. A única diferença encontrada se dá nos estágios iniciais da infecção quando camundongos deficientes de IL-18 são mais suscetíveis devido a uma alta expressão de IL-10, resultando em uma maior taxa de mortalidade (31).

Em sinergia com IL-12, a IL-18 induz a produção de IFN- γ nas células T, contribuindo para o desenvolvimento da resposta Th1 (18,29,32). Porém, foi demonstrado que a IL-18, sem a cooperação da IL-12, pode induzir a produção de IL-4 e IL-13 por células T e células NK *in vitro*, citocinas responsáveis pela resposta imune do tipo Th2 (29,32,33). Desta forma, a IL-18 pode ser vista como uma citocina que estimula tanto a resposta Th1 como a Th2 (33). Além da IL-12, a IL-18 atua em sinergismo com IL-15 amplificando a resposta imune a muitos patógenos (29,32).

A molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), uma proteína transmembrana, membro da superfamília das imunoglobulinas, é expressa de forma constitutiva na superfície de vários tipos celulares e apresenta um importante papel na interação de células com a matriz extracelular. Está relacionada com o recrutamento e retenção de células pró-inflamatórias nos tecidos. Stuyt et al demonstraram que a expressão de ICAM-1 em monócitos *in vitro* pode ser estimulada pela presença de IL-18 em sinergia com a IL-12 (34-37).

Em resposta à estimulação por microorganismos, as células do hospedeiro liberam citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , que levam a um aumento da expressão de

várias moléculas de adesão em monócitos e células endoteliais (38). Na PCM experimental foi descrito que existe uma correlação positiva entre a expressão de ICAM-1 e a carga fúngica na lesão (39).

González et al. (36) analisaram a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1, CD18, MAC-1 e LFA-1 em animais infectados por *P. brasiliensis*, e constataram que nos estágios iniciais da infecção pulmonar, essas moléculas estavam fortemente expressas, indicando sua participação na resposta inflamatória local. Adicionalmente, Moreira et al. (39) verificaram que, em animais infectados por *P. brasiliensis*, a expressão de ICAM-1 era regulada por IFN- γ , TNF- α e IL-12, sendo que, na ausência dessas citocinas, ocorria uma diminuição da sua expressão, resultando na migração de células T e conseqüente resposta deficiente contra o fungo.

Recentemente, um terceiro tipo de resposta imunológica adaptativa foi descrito, a resposta Th17, que tem como principal característica a indução da migração de neutrófilos para local o da infecção, principalmente, devido à produção de IL-17A e IL-17F (40). Para a diferenciação das células Th17 é necessária a presença das citocinas TGF- β e IL-6 no local da infecção. Por outro lado, a IL-23 é responsável pela manutenção do fenótipo Th17 (40-46). A IL-23 é uma citocina da família da IL-12, composta por duas subunidades, a p19 e a p40, sendo esta última compartilhada com a IL-12 (21). Alguns trabalhos relatam que a IL-23 p19 promove o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica caracterizada pelo aumento de produção de citocinas TNF- α e IL-1 (21,47,48).

A IL-17A e IL-17F são citocinas da família da IL-17, da qual também fazem parte a IL-17B, C, D e E. São citocinas de caráter pró-inflamatório relacionadas à neutrofilia, aumento de prostaglandinas, óxido nítrico e metaloproteinases (42,46,49,50). Heninger et al. (11) detectaram IL-17 em granulomas de animais infectados por *Histoplasma capsulatum*. Recentemente, foi demonstrado que animais infectados por *Candida albicans* ou *Aspergillus fumigatus* também desenvolvem uma resposta do tipo Th17, que atua como um regulador negativo impedindo a resposta Th1 (51).

A detecção de grande quantidade de TGF- β em granulomas tanto de pacientes com a FJ quanto com a FA da PCM (25,52) é uma indicação da participação da resposta Th17 na infecção humana. De fato, células Th17+ foram detectadas em lesões de MO de pacientes com PCM (53). Loures et al. (54), estudando animais knockout para TLR2 e infectados por *P. brasiliensis*, demonstraram que, na ausência de TLR2, ocorre um influxo de neutrófilos em resposta ao fungo para os pulmões, acompanhado da diminuição de células T CD4+ e T CD8+. Esses animais apresentaram maior resistência à infecção e altos níveis de IL-6, TGF- β , IL-17 e IL-23, sendo que, no decorrer da infecção somente a IL-23 continuou elevada. Verificaram também, que a resposta Th17 impediu a diferenciação de células T regulatórias (T reg), o que poderia ser um fator positivo na resposta contra o fungo, pois esses animais apresentaram maior taxa de sobrevivência.

Além de participar da diferenciação de células Th17, o TGF- β também promove a ativação de células Treg. As células Treg CD4+CD25+ são responsáveis pela manutenção da tolerância imunológica, previnem respostas inflamatórias exacerbadas e participam do controle de doenças autoimunes (55). As células Treg expressam o fator de

transcrição forkhead Box P3 (FOXP3), que forma um complexo com NFAT/AP-1 induzindo a expressão de fatores inflamatórios, produção de IL-2 e atividade supressora da célula (56).

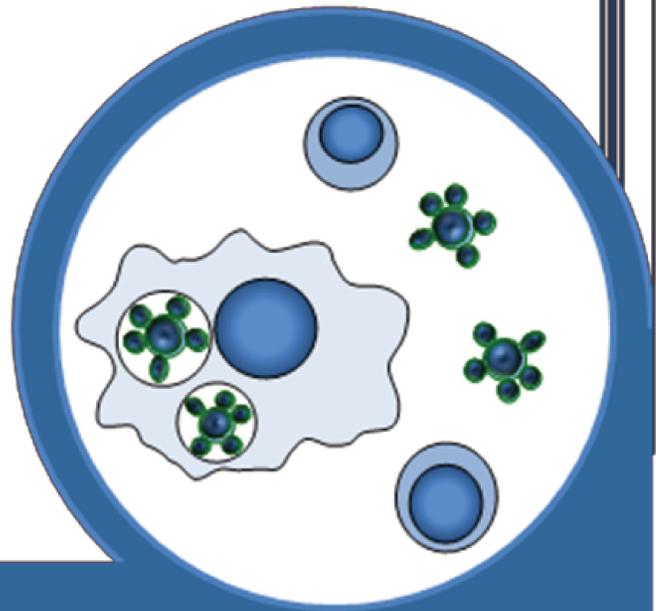
Pacientes com PCM apresentam um número elevado de células Treg no sangue periférico, expressando moléculas associadas à atividade regulatória, além de alta expressão do RNAm para Foxp3, IL-10 e TGF- β , o que sugere a participação dessa população de linfócitos na imunossupressão observada em pacientes com a doença ativa (57). Cavassani et al. (58) detectaram células Treg, TGF- β e IL-10 em lesões crônicas de mucosa oral de pacientes com PCM.

Como descrito anteriormente, a resposta celular contra o fungo pode ser mediada por diversos tipos celulares, tanto da resposta imune inata, como da resposta imune adaptativa. As células NK são células de origem linfóide e estão relacionadas com a resistência a tumores e infecções virais, mas também já foram associadas a defesa contra outros patógenos, como fungos intracelulares (59). Pagliari et al. (60) analisando lesões de pele e MO, de pacientes com PCM, verificaram a presença de células T CD8+ e NK, além da expressão da molécula citotóxica granzima B (62). Também foi demonstrado que células NK (CD56+) de pacientes com PCM são capazes de matar o fungo tanto diretamente (atividade fungicida), como no interior de monócitos infectados (atividade citotóxica), com a participação de grânulos citotóxicos como granzimas, perforina e granulicina (61).

Como citado anteriormente, as formas mais graves da PCM, a forma juvenil e a forma adulta disseminada, são associadas a altos níveis séricos de mediadores

inflamatórios como a IL-18, TNFRs, ICAM-1, IL-12 e TGF- β (23). O papel desses fatores parece ser dependente da concentração produzida, visto que podem ser protetores ou deletérios. Sendo assim, o objetivo deste trabalho, foi avaliar a expressão local de citocinas e ICAM-1 em biópsias de pacientes com PCM na forma juvenil e adulta localizada, relacionando-a com parâmetros de atividade e gravidade da doença. De acordo com dados recentes da literatura e trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório, uma resposta inflamatória descontrolada pode ser prejudicial ao hospedeiro impedindo o pleno funcionamento da resposta imunológica. Dessa forma, a análise do conjunto de mediadores com ação inflamatória na lesão causada pelo *P. brasiliensis* e a sua relação com a forma, atividade e gravidade da doença pode, melhor esclarecer os mecanismos envolvidos no controle desta infecção.

Objetivos



2.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta inflamatória/imunológica local em lesões de pacientes com a FJ (linfonodos) e com a FA (mucosa oral) da PCM.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a composição do infiltrado celular presente em lesões de pacientes com a FJ (linfonodos) e com a FA (mucosa oral) da PCM.

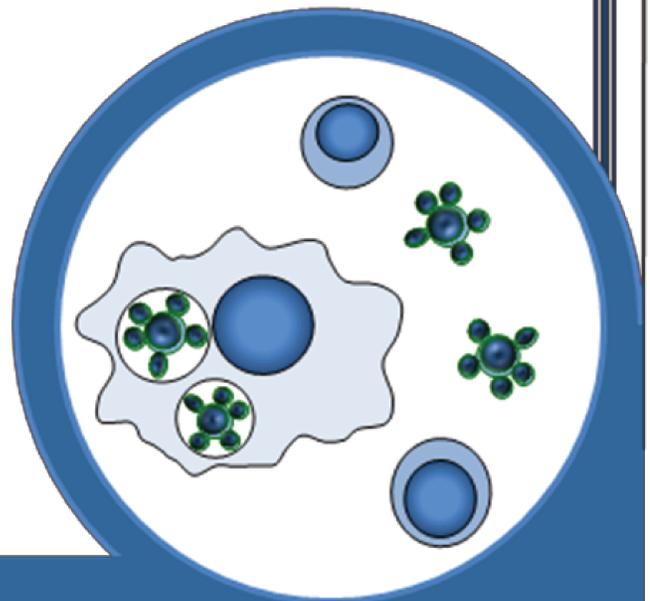
- Avaliar a expressão de citocinas da resposta imune inata (IL-12, IL-18, IL-1 β , IL-23) e ICAM-1 em lesões de pacientes com a FJ (linfonodos) e com a FA (mucosa oral) da PCM.

- Avaliar a expressão de citocinas da resposta Th1, Th2 e Th17 (IFN- γ , IL-4 e IL-17, respectivamente) em lesões de pacientes com a FJ (linfonodos) e com a FA (mucosa oral) da PCM.

- Avaliar a expressão de citocinas anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10) em lesões de pacientes com a FJ (linfonodos) e com a FA (mucosa oral) da PCM.

- Avaliar a expressão de grânulos citotóxicos (granzima B, perforina e granulicina) em lesões de pacientes com a FJ da PCM (LN) e com a FA (MO) da PCM.

Material e Métodos



3.1. Casuística

Para a realização dos experimentos descritos neste trabalho foram utilizados 30 blocos contendo biópsias de lesões de pacientes com paracoccidioidomicose. Os blocos foram obtidos no arquivo do Laboratório de Patologia da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – PUCSP e do Laboratório de Patologia e Citologia de Sorocaba Ltda. Todos os casos foram classificados levando-se em consideração a forma da doença (descrição em prontuário), tecido analisado, idade e sexo dos pacientes. Foram selecionadas biópsias de LN de 15 pacientes com a FJ (8 a 39 anos) e de MO de 15 pacientes com a FA (29 a 60 anos) da doença.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da PUCSP com solicitação de dispensa do termo de consentimento por se tratar de estudo retrospectivo. O projeto foi aprovado em 10 de dezembro de 2008 (Apêndice, item 8.5).

3.2. Cortes histológicos

Os blocos foram mantidos a -20°C durante 30 minutos quando então foram cortados (espessura de $4\mu\text{m}$) em micrótomo Histocut 820 II (Leica, Mussioch, Alemanha). Cortes seriados foram colocados no banho histológico com água destilada a 50°C e coletados em lâminas Start Frost (Kinttel Galser, Alemanha) identificadas com o número de cada caso. As lâminas foram mantidas em estufa a 80°C por 1 hora, em seguida foram guardadas em caixas porta-lâminas até a realização da reação de imuno-histoquímica.

3.3. Reação de imuno-histoquímica (IHQ)

As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas com várias passagens em xilol e alcoóis graduados até a lavagem em água destilada; em seguida foi realizada a recuperação antigênica com tampão específico para cada anticorpo (citrato pH 6.0, Tris-EDTA pH 9.0 ou EDTA- pH8.0) em panela a vapor, durante 45 minutos. Procedeu-se então ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10v durante 15 minutos, seguido de lavagem com água destilada e incubação com bloqueio de proteína (Dako, Carpinteria, EUA) por 10 minutos. A incubação com o anticorpo primário foi feita *overnight* em câmara úmida. Os anticorpos primários foram diluídos em solução PBS e soro albumina bovina a 2% (PBS-BSA) e dispensados sobre os cortes.

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado a um polímero contendo peroxidase (Envision, Dako, Carpinteria, EUA). Para alguns marcadores, após o anticorpo secundário, foi adicionado um anticorpo terciário contendo peroxidase conjugado a um polímero (MACH4, Biomedical, EUA). Na tabela 1 estão listados os anticorpos primários e os conjugados utilizados nas reações de IHQ. As reações foram reveladas pela adição do substrato cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA) a 0,6%, seguida da ativação com peróxido de hidrogênio 30v durante 5 minutos e coloração nuclear com hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Após o término da reação, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entelan (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA). O controle negativo consistiu em

uma lâmina do mesmo tecido analisado, na qual o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA (Apêndice – item 8.4).

Tabela 1- Anticorpos e conjugados utilizados nas reações de IHQ

| Anticorpo | Marca | Clone/ Lote | Conjugado (polímero) |
|---------------------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Anti - CD3 | Dako | A0452/128 | Envision |
| Anti - CD8 | Dako | M7103/119 | Envision |
| Anti - CD15 | Dako | Carb-3 | Envsion |
| Anti - CD56 | Dako | K0391/100 | Envision |
| Anti - CD68 | Dako | M0814/119 | Envision |
| Anti - FOXP3 | eBioscience | E021753 | MACH4 |
| Anti - IFN-γ | Biosource | OE171/1 | MACH4 |
| Anti - TGF-β | Santa Cruz Biotechnology | sc-146 | MACH4 |
| Anti - IL-10 | Santa Cruz Biotechnology | sc-73309 | MACH4 |
| Anti - IL-12 | R&D Systems | 24910.1 | MACH4 |
| Anti - IL-17 | Santa Cruz Biotechnology | sc-7927 | MACH4 |
| Anti - IL-18 | Santa Cruz Biotechnology | sc-6178 | MACH4 |
| Anti -IL-23 | Biolegend | B114200 | MACH4 |
| Anti-perforina | Leica Microsystems | 141016 | MACH4 |
| Anti- granzima-B | Leica Microsystems | 129130 | MACH4 |
| Anti-granulisina | Leica Microsystems | 6000027 | MACH4 |

3.4. Avaliação da reação de IHQ

As lâminas de IHQ foram analisadas por microscopia ótica (Olympus, modelo CX31RTSF, Japão) para a avaliação da composição celular do infiltrado inflamatório, da presença de citocinas e de ICAM-1. Foram analisados três campos diferentes e aleatórios em cada lâmina (aumento 400X), levando-se em consideração a presença do fungo.

3.5. Análise Semi-Quantitativa

As lâminas foram avaliadas de acordo com a ausência (-), presença leve (+), moderada (++) ou intensa (+++) de marcação (Apêndice, tabelas 3,4 e 5). Todas as lâminas foram avaliadas pelo mesmo observador.

3.6. Análise Quantitativa

Além da análise qualitativa e semi-quantitativa, 3 fotos de campos diferentes (aumento de 400X) de cada caso foram analisadas com o auxílio do programa GSA ImageAnalyser - versão 3.7.4 (<http://image.analyser.gsa-online.de/>). O programa realiza análise científica das imagens em 2D avaliando 3 parâmetros: cálculo da superfície de objetos, cálculo do comprimento de objetos e contagem de objetos. A importação das imagens foi feita em JPEG ou BMP. Em nosso estudo realizamos a contagem manual dos objetos marcados para quantificação das células (fig. 1) e o cálculo da superfície dos objetos para a avaliação da expressão de citocinas, ICAM-1 e grânulos citotóxicos (fig. 2).



Material: corte histológico de linfonodo de paciente com PCM, marcado com anti-CD8 (marrom). Os pontos vermelhos correspondem aos núcleos das células positivas (contagem parcial). No retângulo a esquerda, em destaque, aparece o número de objetos contados.

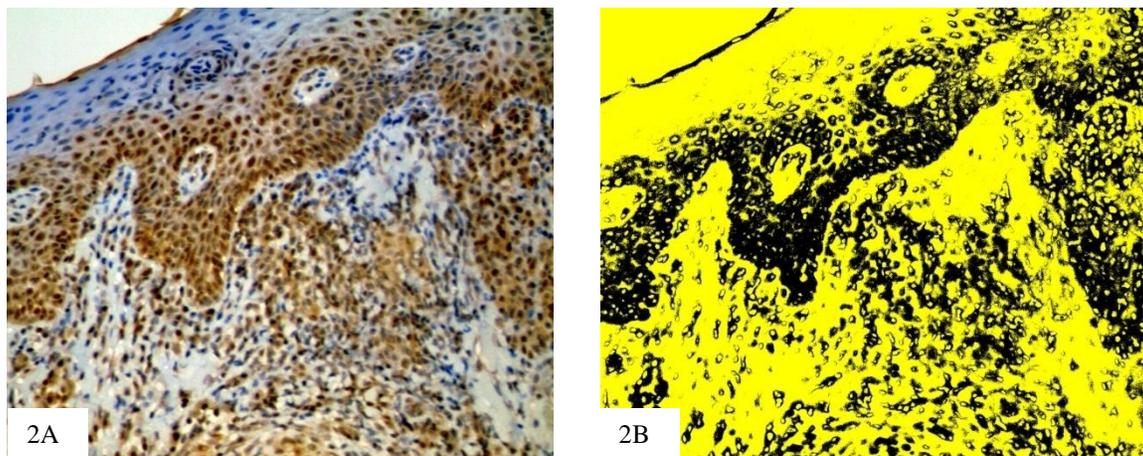


Figura 2- (A) Corte histológico de mucosa oral de paciente com PCM, marcado com anti-IL-17 (marrom) (400X). (B) Foto obtida a partir da análise realizada no Programa GSA Image Analyser na função: cálculo da superfície de objetos. As áreas marcadas em preto (B) correspondem às áreas coradas em marrom (presença de IL-17) da figura à esquerda.

3.7. Avaliação da expressão do RNA mensageiro

Além da expressão de proteínas, analisamos também a expressão do RNA mensageiro (RNAm) de IL-1 β , IL-4, IFN- γ , IL-17 e IL-23.

3.7.1. Extração de RNA

Para a extração de RNA de material parafinado, utilizamos o kit RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Optimized for FFPE Samples (Ambion Inc., Austin, TX, EUA). Todas as etapas foram realizadas de acordo com os procedimentos estipulados pelo fabricante. A concentração do RNA das amostras foi determinada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha.) com leituras das absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Para determinar a pureza das amostras, utilizamos a razão das absorbâncias (A260/A280). Após a extração, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

3.7.2. Síntese de cDNA

O RNA extraído anteriormente foi ressuspenso em água DEPC, na concentração de 1 mg de RNA total por tubo (volume final de 31 μL) e foram adicionados 2,0 μL de um oligonucleotídeo iniciador contendo oligo dT₁₂₋₁₈ [0,75 μg] + random hexamers 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Invitrogen) seguido por incubação de 10 minutos a 70°C com transferência rápida para o gelo. Em cada tubo foram adicionados 18 μL de uma solução que continha os seguintes reagentes: 10 μL do tampão de síntese 5x concentrado, 2,5 μL de dNTP (10mM), 5 μL de

DTT 0,1M (ditioteitrol) e 0,5µL de Superscript R/T II (200 U/µL). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo então transferidas para 40°C por 50 minutos com posterior incubação a 90°C por 5 minutos. Após o término, as amostras foram armazenadas a –80°C até o momento do uso.

3.7.3. Protocolo de RT-PCR em tempo real (qRT-PCR)

A reação de qRT-PCR foi realizada em uma placa de 48 poços (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Em cada poço da placa foram adicionados: 3 µL do cDNA; 1 µL do primer sense e 1µL do primer antisense diluídos na concentração de 80 pM/reação; 5 µL do SYBR® Green master mix (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As sequências dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR estão listadas na Tabela 2. Em cada experimento foi realizado um controle negativo substituindo a amostra de cDNA por água DEPC e um controle positivo no qual utilizamos amostras de células mononucleares do sangue periférico estimuladas. A reação foi realizada em equipamento Real-Time PCR (StepOne; Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e submetida a 40 ciclos de amplificação (programação padrão do equipamento). Os experimentos de cálculo da eficiência da reação foram realizados em triplicata, enquanto que a amplificação de RNAm do material coletado foi realizada em duplicata. A especificidade dos produtos obtidos foi confirmada pela análise da curva de *melting*.

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR

| Primer | Sequência |
|--------------|---|
| GAPDH | sense – 5' TGCACCACCACCTGCTTAGC - 3' antisense – 5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG– 3' |
| IL-1β | sense – 5' CACGATGCACCTGTACGATCA – 3' antisense – 5' AGACATCACCAAGCTTTTTTGTCT – 3' |
| IL-4 | sense – 5' CTGCAAATCGACACCTATTAATGG – 3' antisense – 5' GCACATGCTAGCAGGAAGAACA – 3' |
| IFN-γ | sense – 5' TGG CTT TTC AGC TCT GCA TCG TT – 3' antisense – 5' ATG GGT CCT GGC AGT AAC AGC C – 3' |
| IL-17 | sense – 5'AATCTCCACCGCAATGAGGA – 3' antisense – 5'ACGTTCCCATCAGCGTTGA – 3' |
| IL-23 | sense – 5' TGC CTC CCT ACT GGG CCT CA - 3' antisense – 5'AGT GGT GAC CCT CAG GCT GCA – 3' |

Os resultados foram analisados quanto à expressão do gene de interesse de cada amostra, utilizando como gene normalizador GAPDH e como amostra de referência o cDNA obtido a partir do RNA de um controle normal. Os resultados são expressos como concentração relativa, calculada conforme descrito por Pfaffl (62), utilizando as eficiências de amplificação de cada “primer”, conforme a fórmula abaixo:

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

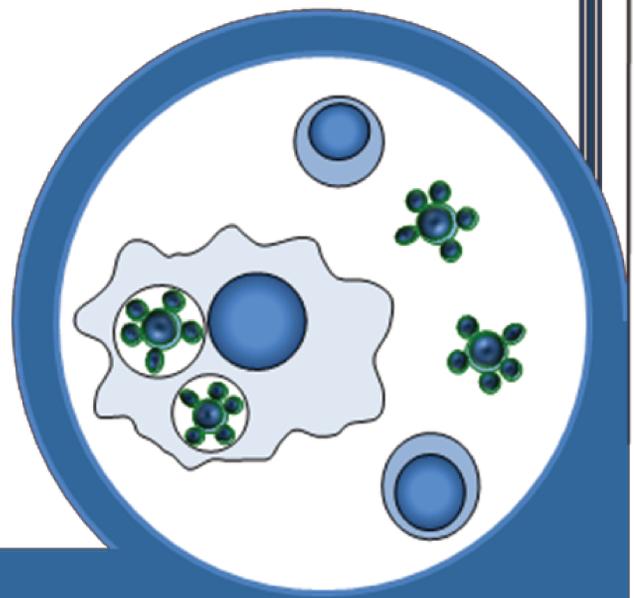
Onde $E_{\text{gene alvo}}$ é a eficiência de amplificação da reação com o primer de interesse (p.e. eficiência do primer para IFN- γ = 98); $E_{\text{gene referência}}$ é a eficiência de amplificação da reação

com o primer do gene normalizador (GAPDH-2= 102,739); ΔCt gene alvo é igual ao valor de Ct de uma amostra- controle amplificada com o primer do gene de interesse (células mononucleares do sangue periférico, estimuladas para o primer avaliado), menos o Ct de amostra para o mesmo gene; ΔCt gene referência é igual ao valor de Ct de uma amostra- controle, amplificada com o primer do gene normalizador, menos o Ct de amostra para o mesmo gene.

3.8. Análise estatística

Na análise quantitativa das reações de IHQ, os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) do número de células por campo. No caso dos marcadores de superfície celular, e média \pm EPM da área, no caso das citocinas, ICAM-1 e grânulos citotóxicos. A expressão relativa do RNAm das citocinas analisadas também foi expressa como média \pm EPM. A comparação entre os dois tipos de tecidos analisados (LN e MO) foi feita pelo teste t não pareado e foram considerados significantes valores de $p \leq 0,05$.

Resultados



4.1 Descrição microscópica dos cortes histológicos (HE)

A avaliação histopatológica mostrou que os LNs apresentavam grande parte da sua estrutura substituída por reação inflamatória crônica do tipo granulomatoso, constituída por células histiocitárias modificadas, com aspecto epitelióide, com arranjo nodular. Em meio aos granulomas e, isoladamente, encontravam-se numerosas células gigantes multinucleadas contendo incontáveis leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*, algumas com estruturas conservadas e aparentemente viáveis e outras com estruturas alteradas e constituídas apenas por halo refringente. Em alguns casos, observamos a presença de fibrose peri-linfonodal, e intra-linfonodal em alguns campos (fig. 3A).

Já na mucosa oral, foi possível observar acantose e abscessos intraepiteliais constituídos por neutrófilos e raras células gigantes multinucleadas, contendo células fúngicas. Na região submucosa observou-se denso infiltrado linfoplasmocitário e eosinofílico acompanhado, em alguns campos, de células gigantes com *Paracoccidioides brasiliensis* (fig. 3B).

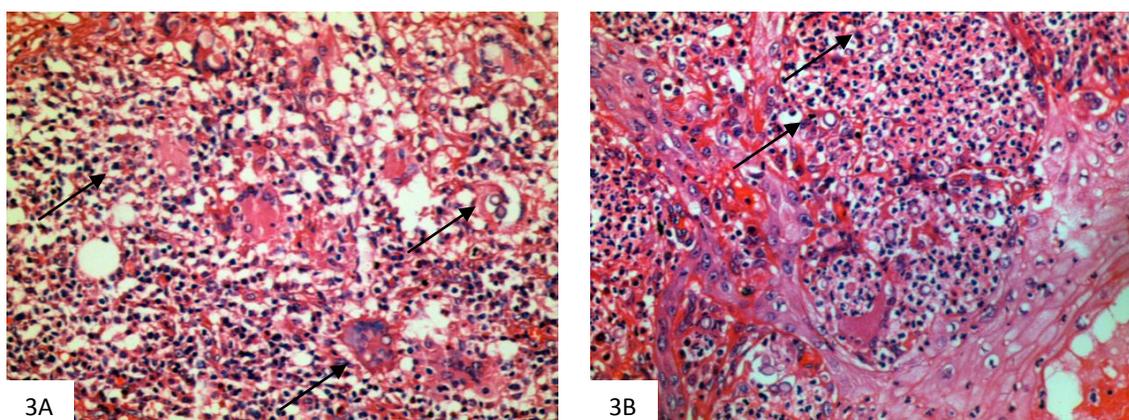


Figura 3 – Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM corados com HE. Setas: leveduras de *P. brasiliensis* (400X).

4.2. Avaliação da composição do infiltrado celular

4.2.1. Marcação com anti-CD68 e anti-CD15

O infiltrado celular foi constituído de células histiocitárias CD68+, compostas por monócitos, macrófagos e células gigantes presentes nos dois tipos de tecido. A quantidade de células CD68+ foi maior nos LNs (fig. 4A) do que nas mucosas (fig. 4B), estando diretamente relacionada com a quantidade de fungos presentes no tecido que, frequentemente, foram vistos no interior de células gigantes. Nos LNs, as células CD68+ foram detectadas ao redor das leveduras, enquanto que, nas mucosas, as células CD68+ estavam organizadas em granulomas compactos.

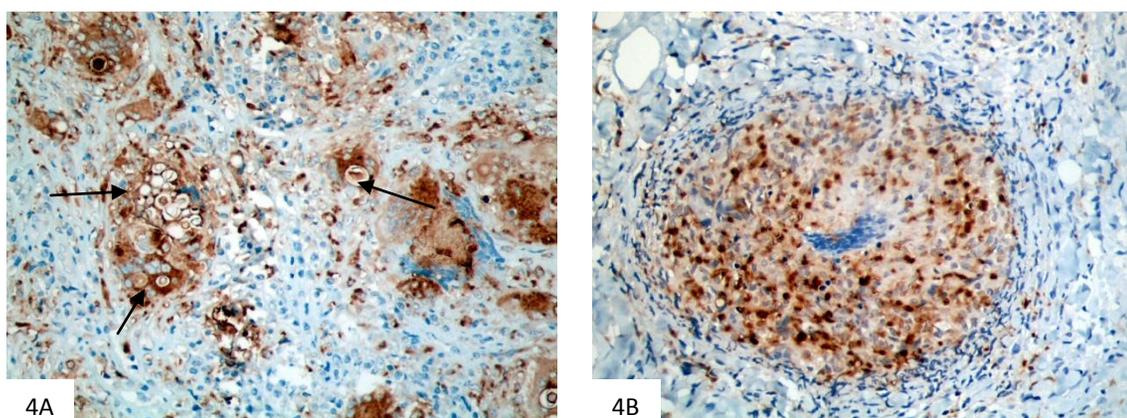


Figura 4 - Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-CD68 (marrom). Setas: leveduras de *P. brasiliensis* no interior de células gigantes (400X).

Os neutrófilos (CD15+) foram vistos nos dois tipos de tecidos analisados, mas em maior quantidade nas mucosas (fig. 5A). Vimos células CD15+ formando exsudatos nos dois tipos de tecidos, além de abscessos intra-epiteliais nas mucosas (fig. 5B).

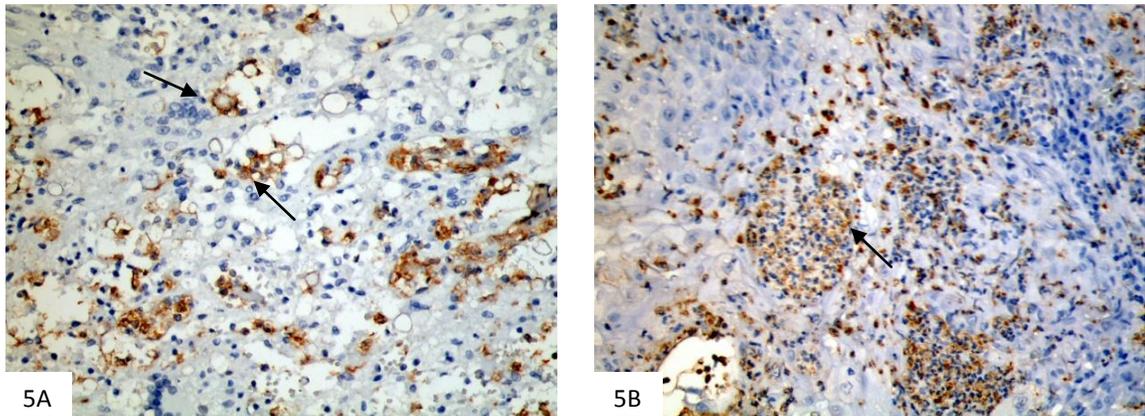


Figura 5 – Corte histológico de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcado com anti-CD15 (marrom). (aumento 400X). Setas: Leveduras de *P. brasiliensis* rodeadas por células CD15+ (A) e abscessos intraepiteliais (B)

4.2.2. Marcação com anti-CD3 e anti-CD8

A análise dos cortes histológicos mostrou infiltrado linfocitário localizado, principalmente, ao redor dos aglomerados de macrófagos e células gigantes, formando granulomas típicos. Além disso, foram observadas muitas células T CD3+ (fig. 6A e B), na sua maioria T CD8+ (fig. 7). O número de células linfocitárias foi grande nos dois tipos de tecidos analisados, não apresentando nenhuma relação com as formas da doença ou com a quantidade de fungos no tecido. A fig. 7 mostra a localização das células CD8+ ao redor de células gigantes ou próximas aos fungos nos linfonodos (fig. 7A) ou ao redor de granulomas na mucosa oral (fig. 7B).

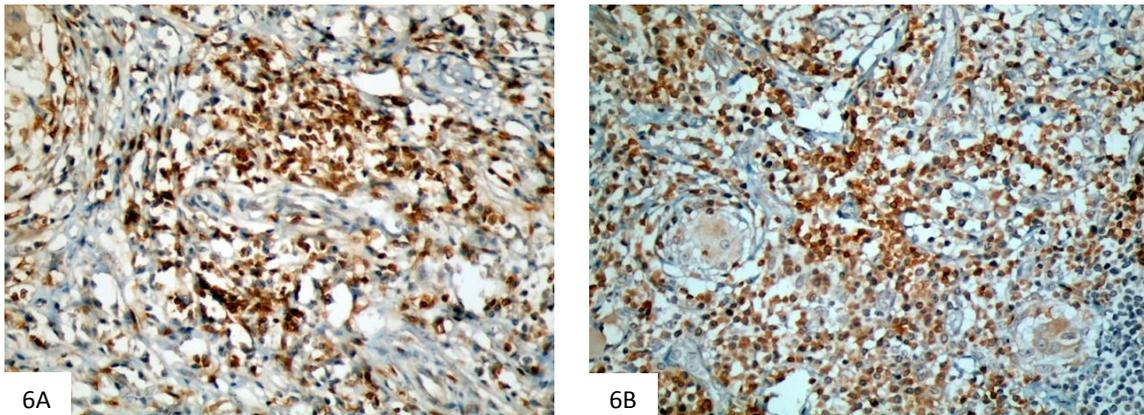


Figura 6. Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-CD3. (400X).

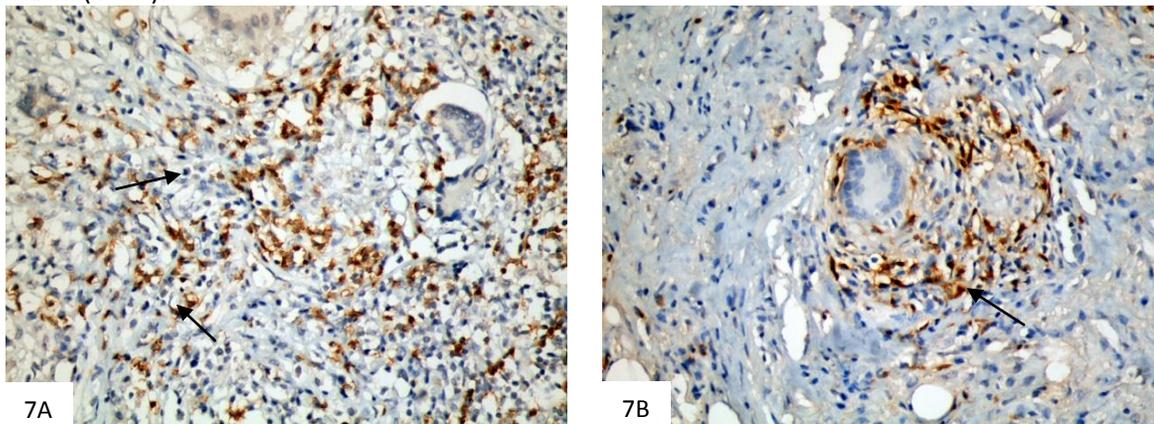


Figura 7. Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-CD8. (400X). Setas: Células CD8+ ao redor de células gigantes ou próximas aos fungos (fig. 7A) e ao redor de granulomas (fig. 7B)

4.2.3. Marcação com anti-CD56

As células CD56+ foram evidenciadas pelo anticorpo específico nos dois tipos de tecido, embora em pequeno número. Nos LNs, as células CD56+ estavam, na maioria das vezes, localizadas na periferia do granuloma (fig. 8A), enquanto que na MO, elas estavam presentes no tecido conjuntivo, sempre abaixo da membrana basal (seta) (fig. 8B). Não foi observada diferença quanto ao número de células CD56+ nos dois tipos de tecidos analisados.

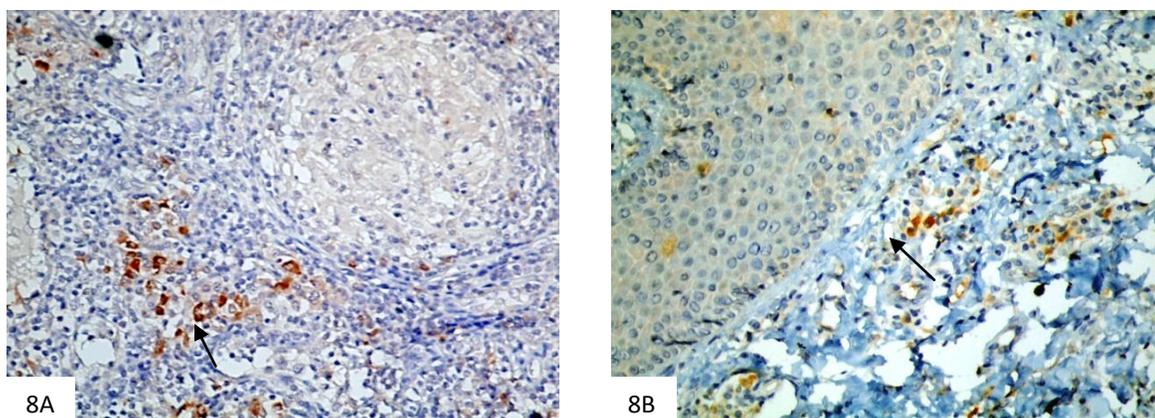


Figura 8. Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-CD56 (400X). Setas: Células CD56+ localizadas na periferia (fig. 8A) e tecido conjuntivo (fig. 8B)

4.2.4. Marcação com anti-FOXP3

Células FOXP3+ foram raramente encontradas nos LNs (fig. 9A). Já nas mucosas foram vistas em maior número, localizadas logo abaixo da membrana basal e/ou ao redor dos granulomas (fig. 9B e C). Em todos os cortes de MO analisados, foram detectadas células FOXP3+ nos abscessos intraepiteliais.

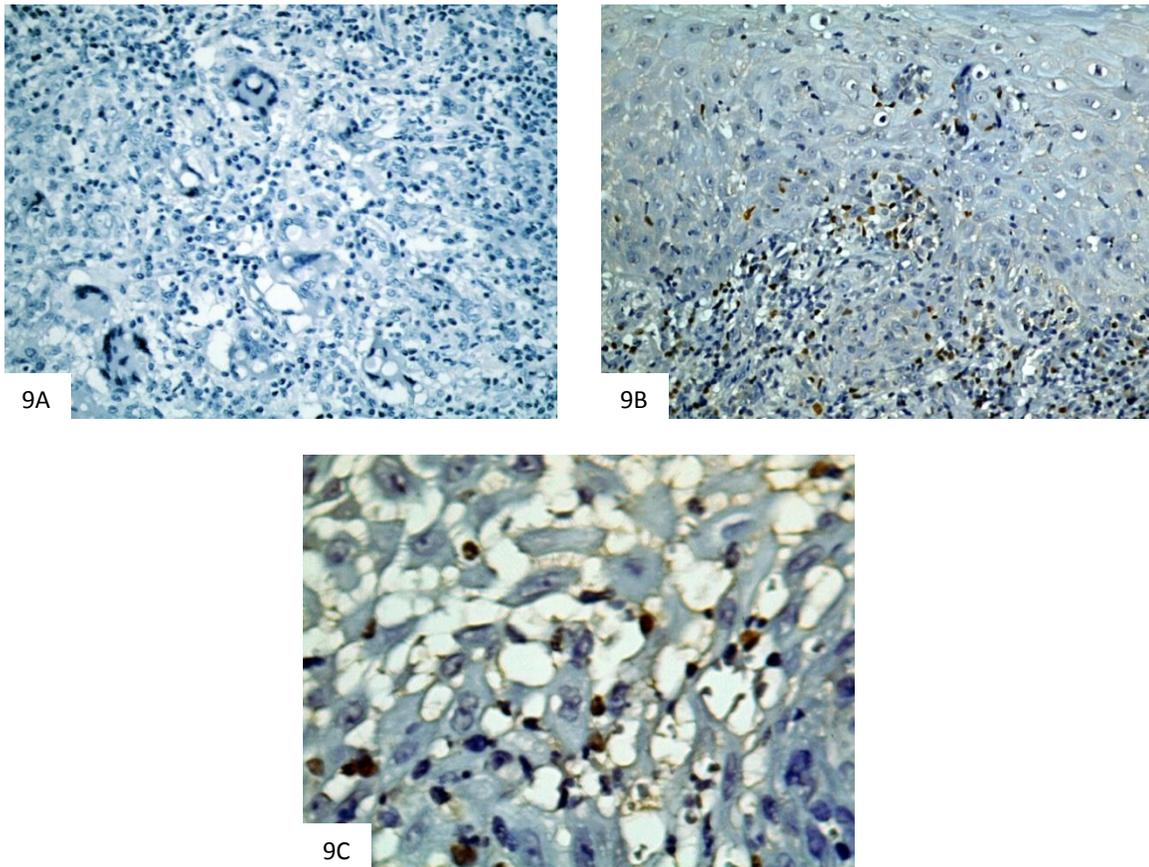


Figura 9 - Corte histológico de linfonodo (A) e mucosa oral (B e C) em pacientes com PCM marcados com anti-FOXP3 (A e B aumento 400X, C aumento de 1000x).

4.3. Análise quantitativa da marcação celular (GSA ImageAnalyser)

A análise quantitativa mostrou diferenças significantes quanto ao número de células CD3+, CD8+ e CD68+, maior nos LNs do que nas mucosas (fig. 10). O número mais elevado de linfócitos nos LNs explica-se pela natureza do órgão. Entretanto, o acúmulo de células CD68+ reflete o infiltrado celular decorrente da infecção e do elevado número de fungos.

Por outro lado, nos LNs, o número de células CD15+ e FOXP3+, foi significantemente menor do que nas mucosas (fig. 10).

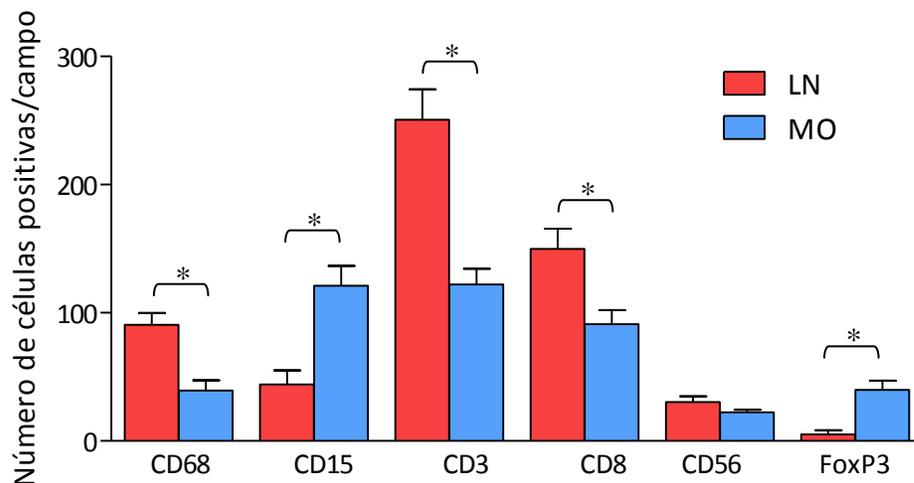


Figura 10 – Número de células marcadas com anti-CD68, anti-CD15, anti-CD3, anti-CD8, anti-CD56 e anti-FOXP3 em linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM. Os resultados foram expressos como média do número de células por campo \pm EPM. * $p < 0,05$

4.4. Citocinas produzidas por células do sistema imune inato e ICAM-1

Na avaliação das citocinas produzidas por células do sistema imune inato analisamos a expressão de IL-12, IL-18, IL-1 β , IL-23, além da expressão de ICAM-1, molécula de adesão que está intimamente ligada com o processo inflamatório e cuja expressão é induzida pela IL-1 β , IL-18 e IFN- γ (63). A marcação para IL-12 foi escassa nos dois tecidos analisados e as poucas células positivas apresentavam morfologia típica de macrófagos (fig. 11A e B). A análise quantitativa não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os tecidos analisados (fig. 25)

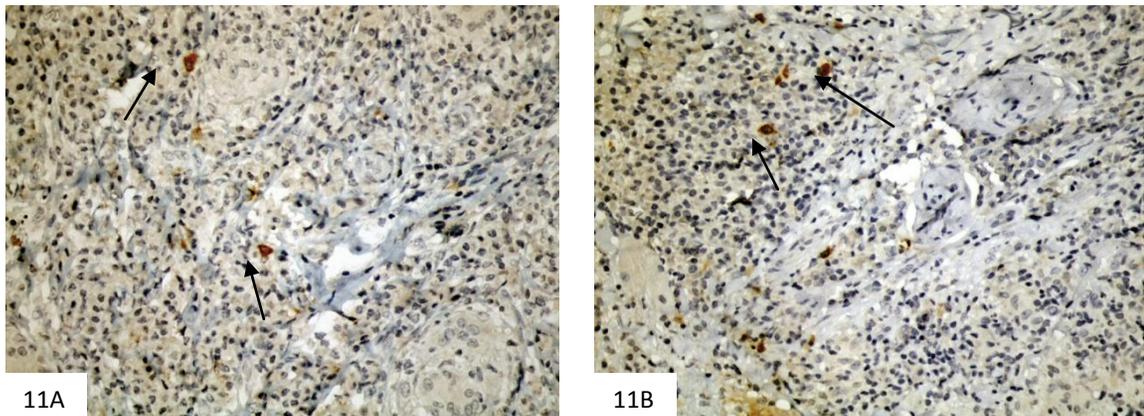


Figura 11- Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-IL-12. (400X). Setas: poucas células IL-12+ tanto nos LN quanto nas MO.

Células IL-18+ foram detectadas nos dois tipos de tecidos, sendo vista uma quantidade significativamente maior nos LNs do que nas mucosas (fig. 12A). Nos LNs as células positivas estavam localizadas ao redor das células gigantes e na MO ao redor dos granulomas ou em células isoladas com características de macrófagos (fig. 12A e B).

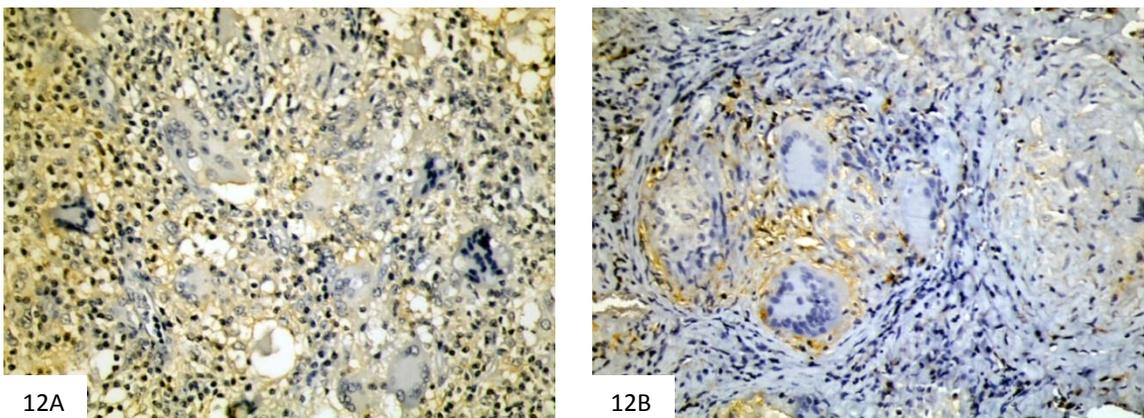


Figura 12- Corte histológico de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcado com anti-IL-18 (400X).

A marcação para IL-1 β foi muito intensa nos linfonodos, localizada em células gigantes, em macrófagos ao redor das leveduras do fungo e nos granulomas em geral (fig. 13A). Nas mucosas, a marcação foi mais discreta embora também distribuída por o todo tecido (fig. 13B). A análise quantitativa mostrou expressão estatisticamente maior de IL-1 β em linfonodos comparada à da mucosa oral (fig.25).

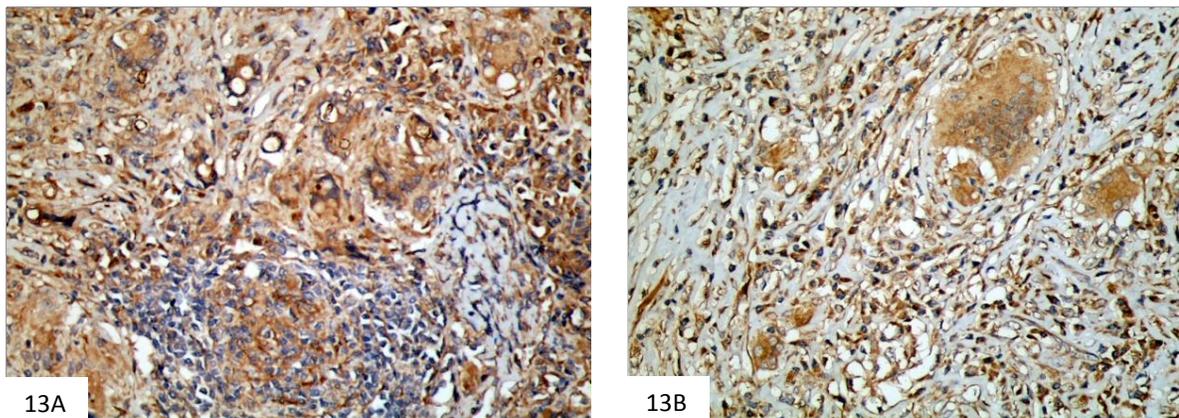


Figura 13- Corte histológico de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcado com anti-IL-1 β . (400X).

A avaliação da expressão gênica relativa de IL-1 β em LNs e MO de pacientes com PCM foi concordante com a pesquisa da proteína por IHQ, maior nos linfonodos embora sem diferença estatística (fig. 14).

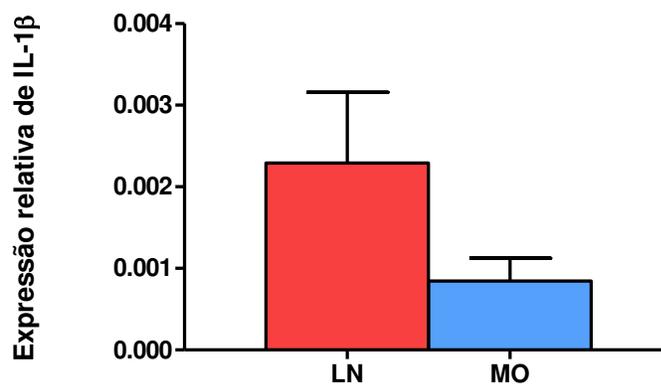


Figura14. Expressão relativa do RNAm para IL-1 β em linfonodo e mucosa oral de pacientes com PCM. A análise foi feita em material extraído dos blocos de tecido parafinados.

A marcação para IL-23 foi detectada nas células inflamatórias em geral e macrófagos de permeio, tanto no LN como na MO (fig. 15A). Na MO a expressão foi menor, e restrita a células gigantes, macrófagos e algumas células epiteliais (fig. 15B). A análise quantitativa não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os dois tecidos analisados (fig. 15).

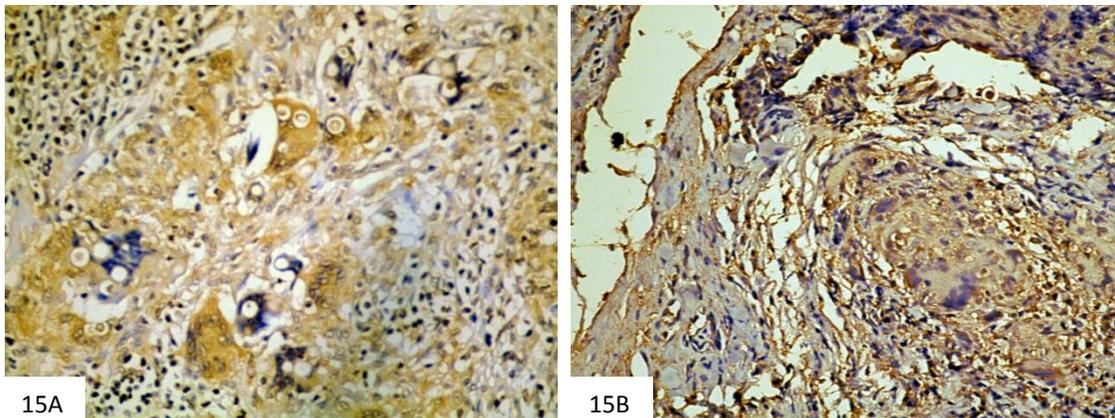


Figura 15- Corte histológico de linfonodo (A) e mucosa oral (B) marcado com anti-IL-23 (aumento 400X).

A avaliação da expressão gênica relativa de IL-23, embora muito baixa, foi maior na mucosa do que nos linfonodos, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa (fig. 16).

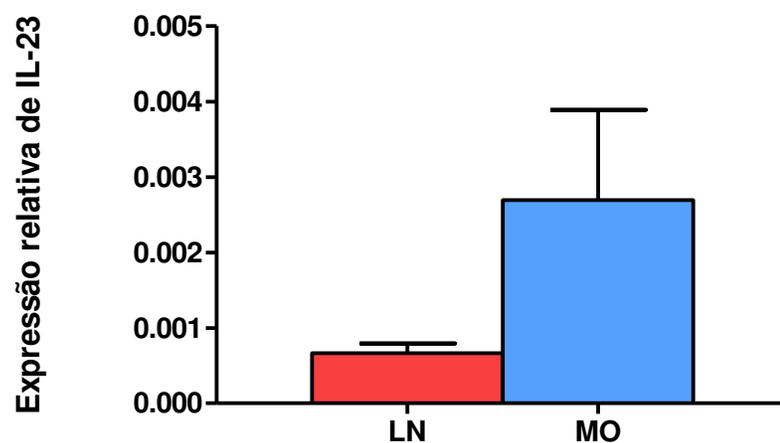


Figura. 16- Expressão relativa do RNAm para IL-23 em linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM. A análise foi feita em material extraído dos blocos de tecido parafinados.

A marcação para ICAM-1 foi mais intensa nos LNs, formando uma rede delicada na matriz extracelular, envolvendo as células inflamatórias que fazem parte dos granulomas, por todo o tecido (fig. 17A). A marcação foi mais forte em locais onde havia mais células gigantes. (seta). A presença de numerosas células fúngicas foi associada a uma forte expressão de ICAM-1. Nas mucosas a marcação, muitas vezes, ficou delimitada ao redor das células gigantes e células inflamatórias (fig. 17B). A análise quantitativa mostrou expressão significativamente maior de ICAM-1 nos linfonodos do que nas mucosas (fig. 25).

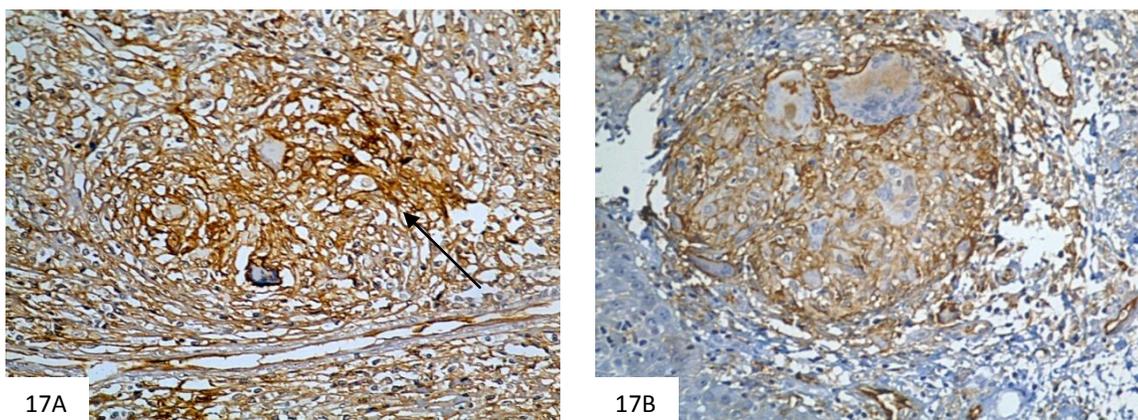


Figura 17 - Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) marcados com anti-ICAM-1. (400X).

4.5. Citocinas produzidas por células da resposta imune adaptativa

4.5.1. Marcação para IFN- γ

A marcação para IFN- γ , citocina chave da resposta Th1, foi mais intensa nas mucosas do que nos linfonodos, em áreas onde o processo inflamatório era mais exuberante (fig. 18B). Nos LNs, células IFN- γ^+ foram raramente detectadas e, quando presentes, localizavam-se, geralmente em áreas próximas aos granulomas (seta) (fig. 18A). A marcação para IFN- γ ocorreu principalmente em células com característica de linfócitos (figura 18A e B).

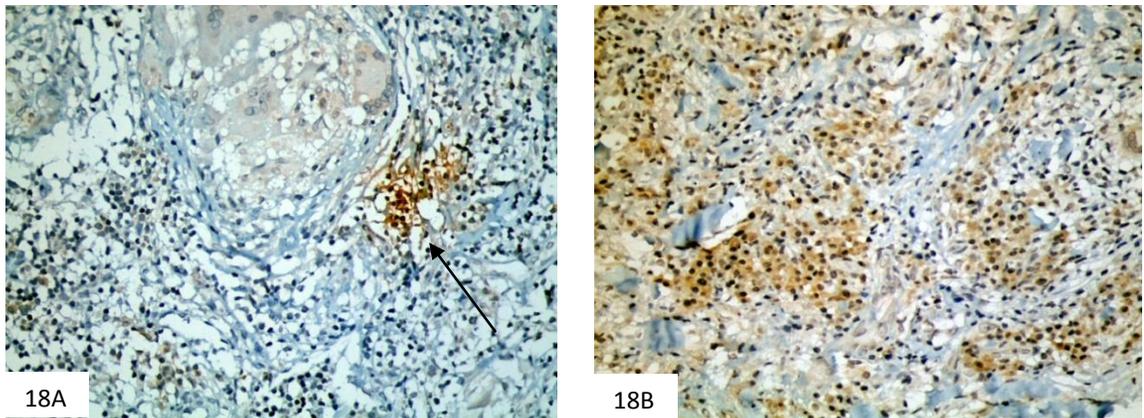


Figura18 - Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-IFN- γ . (400X).

A expressão do RNAm para IFN- γ também foi maior na mucosa oral comparada aos linfonodos, mas a diferença não foi estatisticamente significativa (fig. 19).

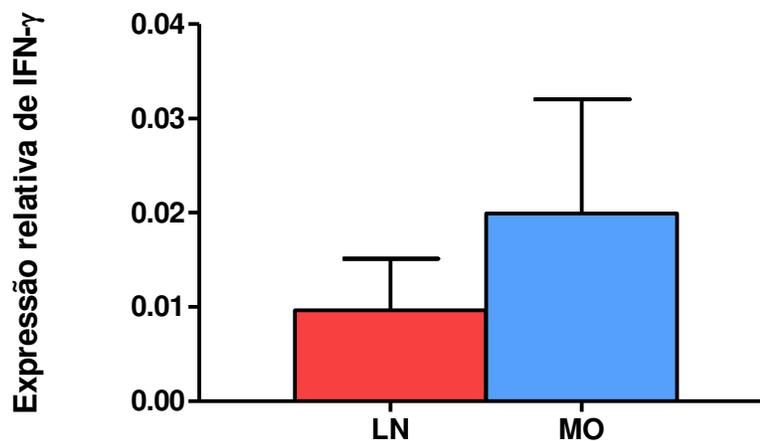


Figura 19- Expressão relativa do RNAm para IFN- γ em linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM. A análise foi feita em material extraído dos blocos de tecido parafinados.

4.5.2. Expressão gênica de IL-4

Não foi possível detectar IL-4, principal citocina da resposta Th2, pelo método de IHQ provavelmente devido à baixa sensibilidade dos anticorpos testados.

Entretanto, a avaliação da expressão gênica desta citocina mostrou-se mais elevada em linfonodos do que na mucosa oral (fig. 20).

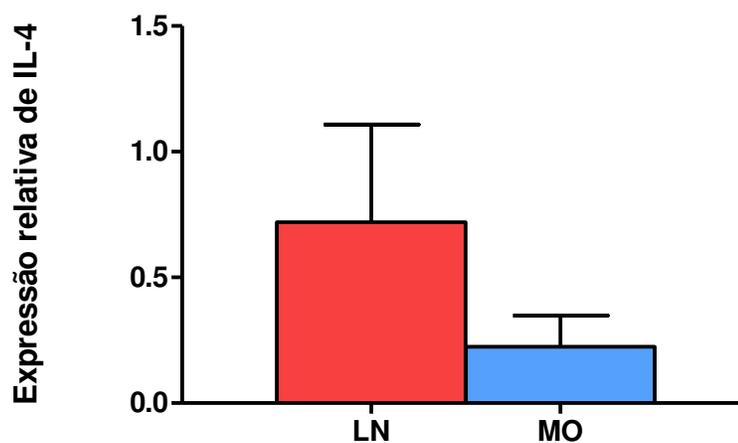


Figura 20- Expressão relativa do RNAm para IL-4 em linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM. A análise foi feita em material extraído dos blocos de tecido parafinados.

4.5.3. Marcação para IL-17

A resposta Th17 foi analisada por meio da detecção de IL-17 (RNAm e proteína) nos tecidos em questão. A marcação para IL-17 foi mais intensa na MO, tanto em células do infiltrado inflamatório como em células epiteliais (fig.21B). Em alguns casos células gigantes também foram positivas. Nos LNs a marcação foi menor, ficando restrita às células gigantes e alguns linfócitos de permeio (seta) (fig.21A). A quantificação da marcação para IL-17 mostrou expressão significativamente maior na mucosa oral comparada à dos LNs (fig. 25). Entretanto, a expressão gênica da IL-17, embora um pouco maior nos LNs, não foi significativamente diferente nos dois tecidos analisados (fig. 22).

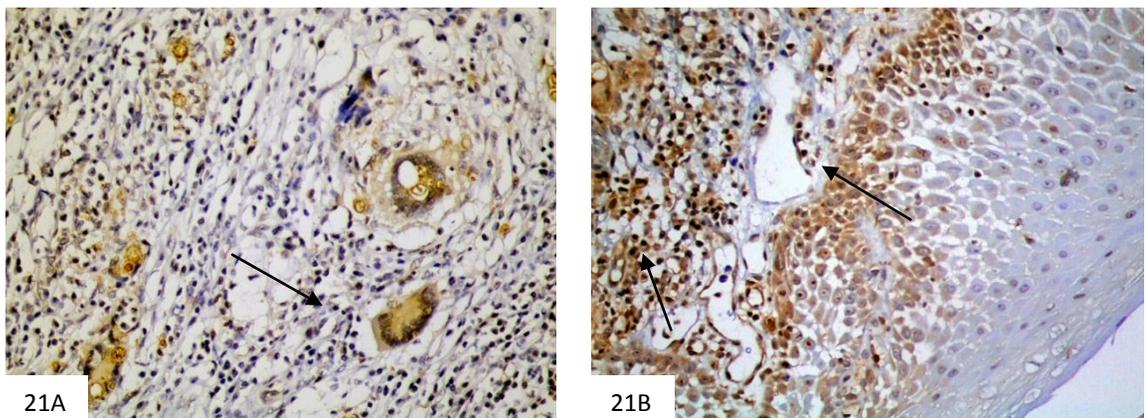


Figura 21 - Cortes histológicas de linfonodo (A) e mucosa oral (B) marcados com anti-IL-17 (400X).

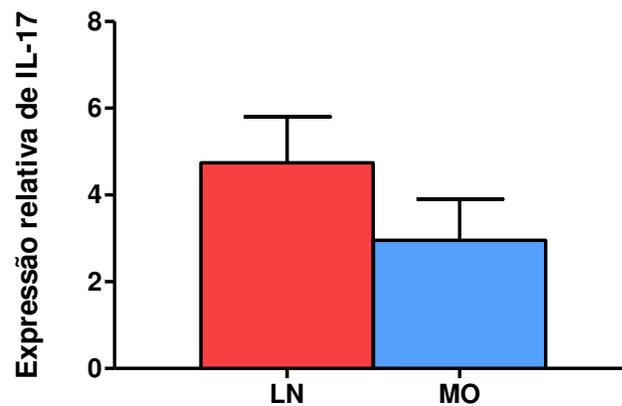


Figura 22- Expressão relativa do RNAm para IL-17 em linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM. A análise foi feita em material extraído dos blocos de tecido parafinados.

4.6. Citocinas anti-inflamatórias

4.6.1. Marcação para TGF- β

Células TGF- β + foram detectadas em ambos os tecidos analisados, tanto em células gigantes como em macrófagos (fig. 23A e B). Os casos que apresentaram uma maior quantidade de fungos tiveram uma maior marcação para TGF- β , independente do tipo de tecido analisado.

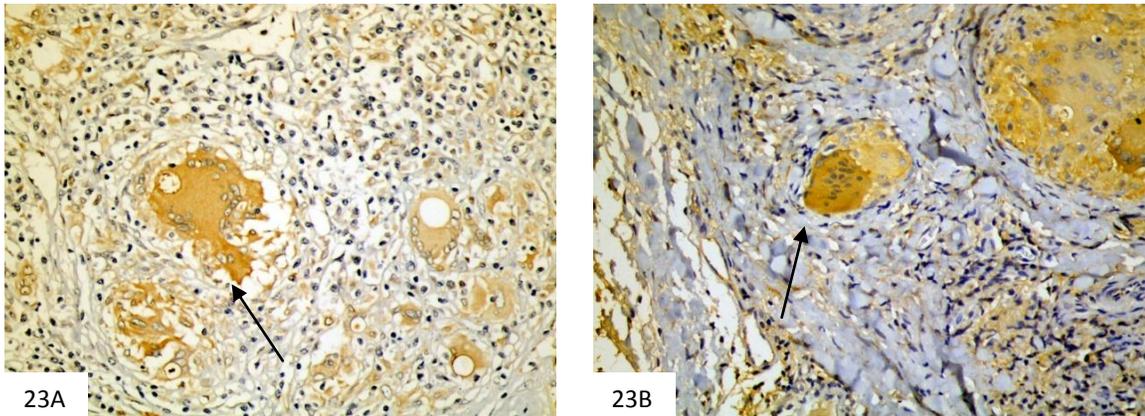


Figura 23. Cortes histológicos de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcados com anti-TGF- β (400X).

4.6.2. Marcação para IL-10

A detecção de células IL-10+ foi maior nos LNs do que na mucosa, embora sem diferença significativa. Nos LNs muitas células positivas para IL-10 apresentaram características de linfócitos e/ou células gigantes (fig. 24A), enquanto que, nas mucosas, somente células com características de linfócitos foram positivas (fig. 24B).

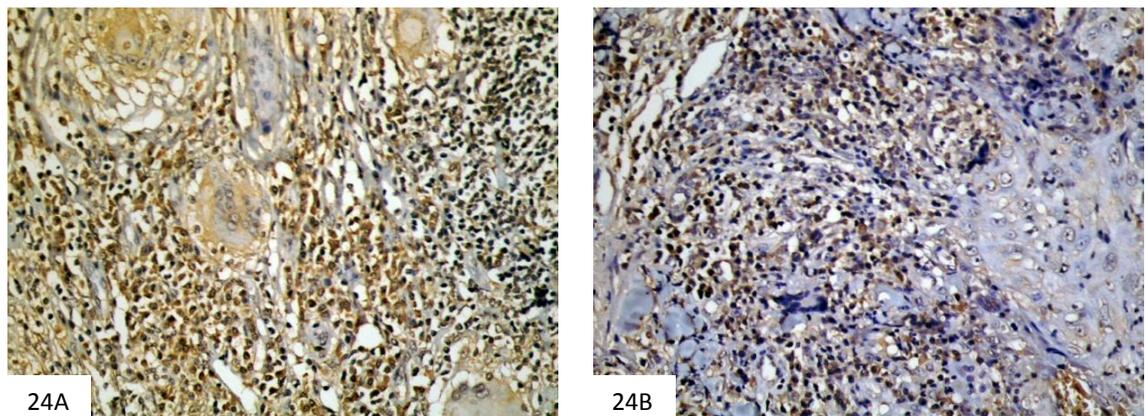


Figura 24 - Corte histológico linfonodo (A) e de mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcado com anti-IL-10 (aumento 400X).

4.7. Análise quantitativa da expressão de citocinas e ICAM-1 (GSA ImageAnalyser)

A análise quantitativa revelou diferenças estatisticamente significativas na expressão de IL-18, IL-1 β , ICAM-1 e TGF- β maior nos LNs do que nas mucosas. Por outro lado, a expressão de IL-17 e IFN- γ foi maior nas mucosas. A expressão de IL-10, IL-12 e IL-23 não foram diferentes nos dois tipos de tecido analisados (fig. 19)

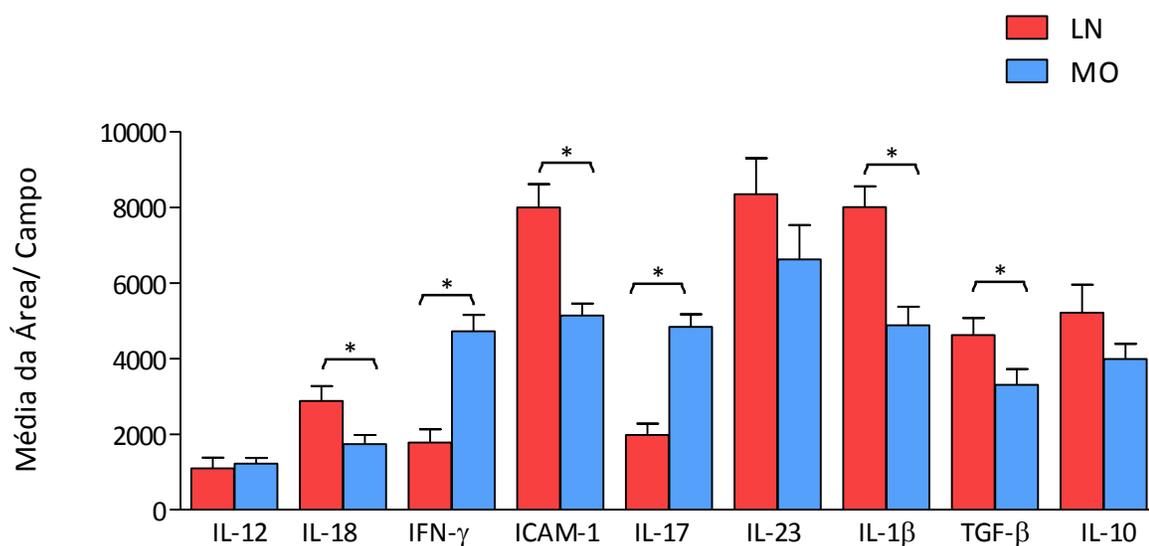


Figura 25- Expressão de citocinas e ICAM-1 em linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM. Os resultados foram expressos como média da área marcada/campo \pm EPM. * $p < 0,05$

4.8. Detecção de moléculas citotóxicas

A presença de células CD8+ e NK (CD56+) no infiltrado celular, em lesões causadas pelo *P. brasiliensis*, levou-nos a investigar a expressão das moléculas citotóxicas granzima-B, perforina e granulicina.

4.8.1. Detecção de granzima-B

Poucas células positivas para granzima-B foram encontradas nos LNs em células com características de linfócito (26A), enquanto que nas mucosas vimos células positivas ao redor dos granulomas (26B). Não foi detectada diferença significativa quanto ao número de células marcadas entre os tecidos estudados (fig. 29).

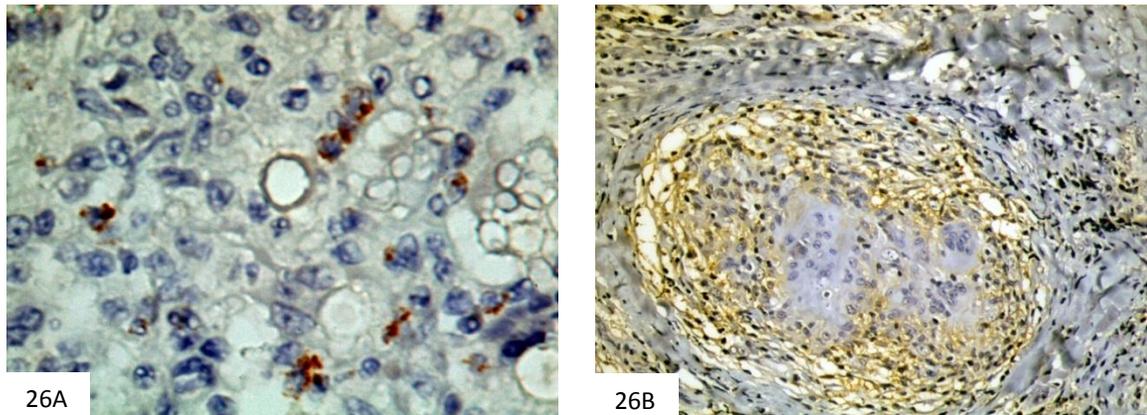


Figura 26- Corte histológico de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcado com anti-granzima-B (A: 1000X, B: 400X).

4.8.2. Detecção de perforina

Células positivas para perforina foram detectadas nos dois tipos de tecidos, em número semelhante. Observamos perforina em células isoladas com características de linfócitos, localizadas ao redor do fungo ou de células gigantes (fig. 27).

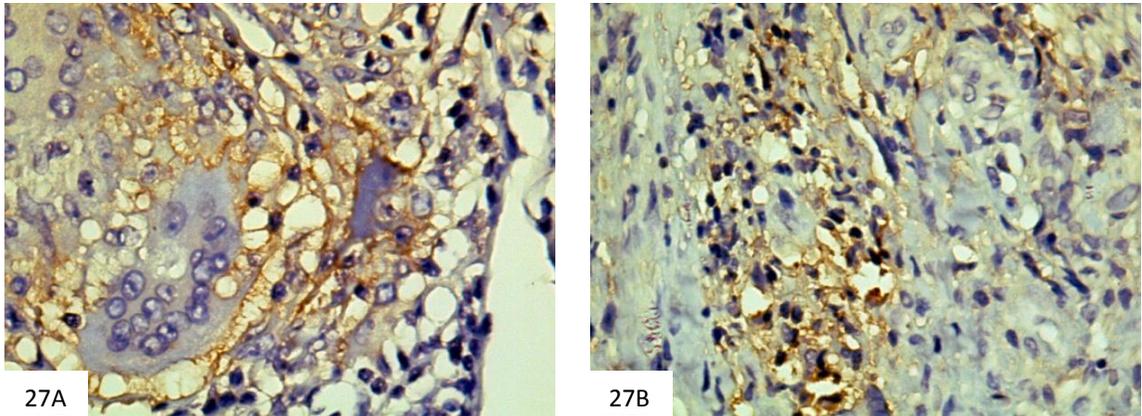


Figura 27 - Corte histológico de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM marcado com anti-perforina (1000X).

4.8.3. Detecção de granulicina

A granulicina foi encontrada em maior quantidade nas mucosas do que nos LN. Nos LNs a granulicina foi detectada em algumas células com características de linfócitos e/ou de células gigantes, enquanto que, nas mucosas, apenas células com características de linfócitos foram positivas (fig. 28).

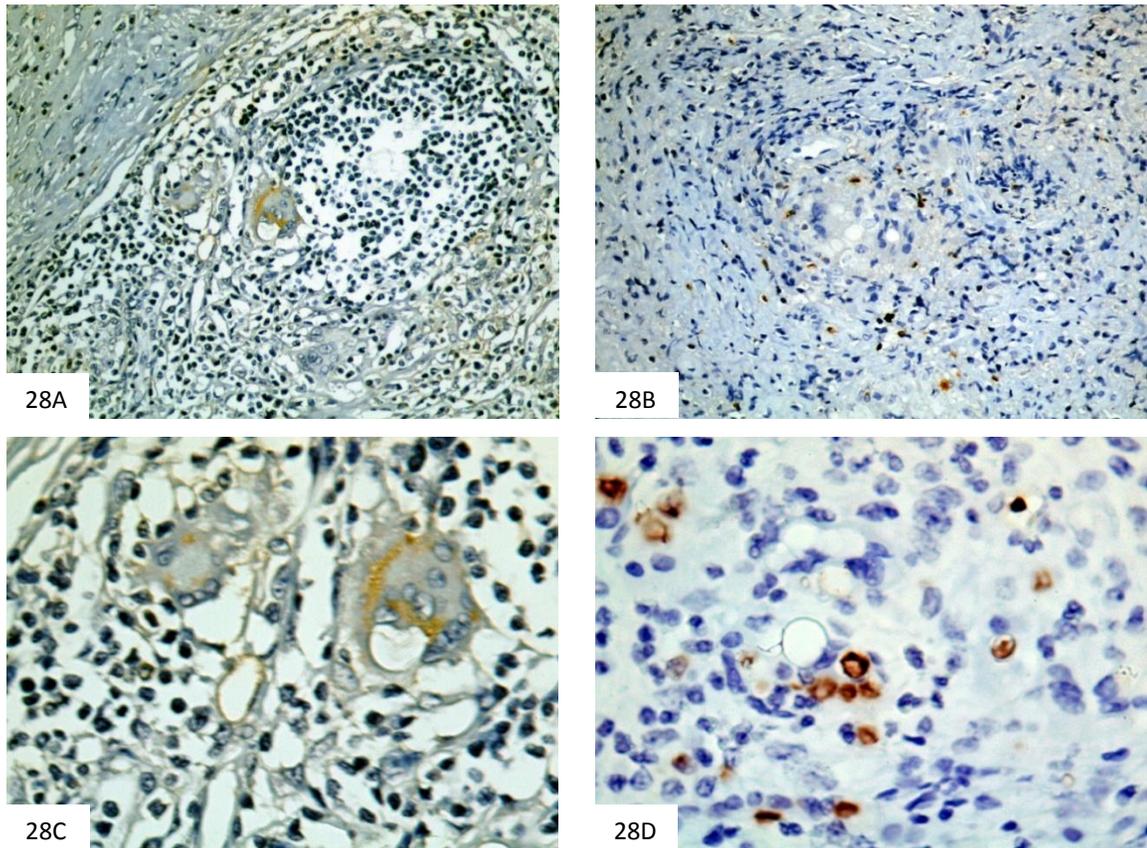


Figura 28- Corte histológico de linfonodo (A e C) e mucosa oral (B e D) de pacientes com PCM marcado com anti-granulicina. (A e B: 400X, C e D: 1000X).

4.9. Análise quantitativa da expressão de moléculas citotóxicas (GSA ImageAnalyser)

A análise quantitativa mostrou não haver diferença estatisticamente significativa quanto à expressão das moléculas citotóxicas granzima-B, perforina e granulicina, nos dois tecidos estudados (fig. 29)

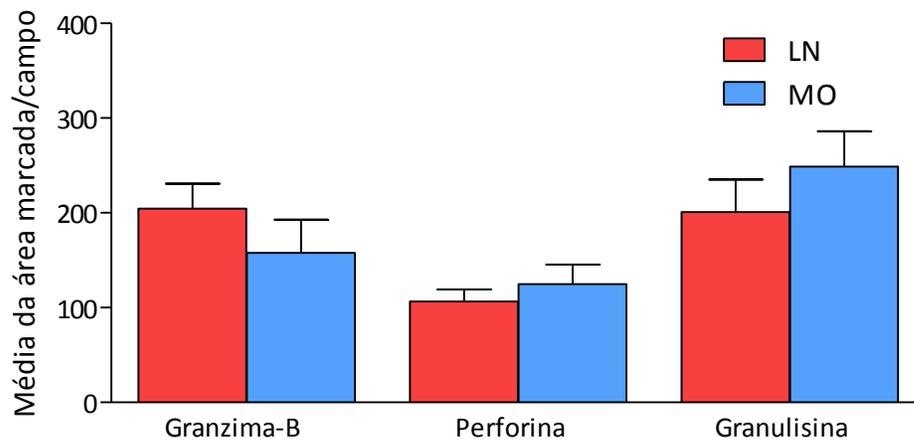
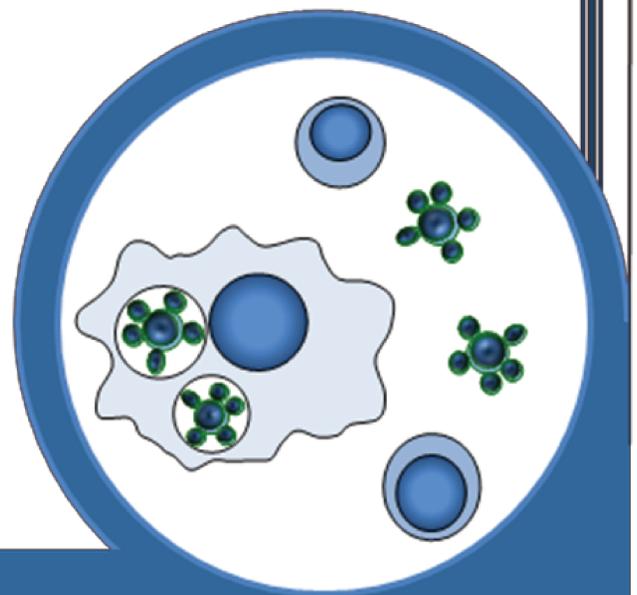


Figura 29 – Expressão de moléculas citotóxicas em linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM. Os resultados foram expressos como média da área marcada \pm EPM. * $p < 0,05$

Discussão



A infecção pelo *P. brasiliensis* é caracterizada por uma forte resposta inflamatória/imunológica, que pode ser constatada tanto no sangue periférico (com a elevação da concentração de marcadores inflamatórios), como nas lesões caracterizadas por infiltrados ricos em células T, células B, mastócitos, monócitos, macrófagos e células gigantes, e neutrófilos, assim como seus mediadores (13,52,60,64). A liberação de moléculas efetoras nas lesões regula o tráfego de leucócitos, iniciando a resposta inflamatória, ativando células fagocíticas a um estado microbicida e direcionando a resposta adaptativa.

A resposta inflamatória pode servir para limitar a infecção, mas também pode contribuir para a patogenicidade. Reações paradoxais foram descritas em pacientes com a FJ da PCM que apresentaram uma piora das manifestações clínicas, mesmo sob tratamento antifúngico, demandando a introdução de corticoterapia (65).

Em nosso estudo analisamos biópsias de linfonodos, tendo em vista o comprometimento marcante dessas estruturas na forma juvenil disseminada da PCM, e biópsias de mucosa oral, como representantes da forma adulta, localizada, da doença. Assim como em outros estudos, verificamos que os pacientes com a FJ da doença apresentam uma grande quantidade de fungos nas lesões, o que justifica o aumento do infiltrado celular, principalmente com células CD68+ e moléculas de adesão atuando na resposta ao patógeno (39). (39). Por outro lado, nos pacientes com a FA a concentração de células CD68+ foi menor e, geralmente, acompanhada de células CD15+, principalmente nos abscessos intra-epiteliais.

A grande quantidade de células inflamatórias e a presença de TGF- β e TNF- α , nas duas formas da doença, foram relatadas em vários estudos que relacionaram a resposta inflamatória intensa à quantidade de fungo no local da infecção (13,52,64).

As citocinas são determinantes no processo de diferenciação da resposta imune celular. A IL-12 é responsável pelo direcionamento da resposta para o tipo Th1, promovendo a produção de IFN- γ por células T (21). Em trabalho anterior de nosso grupo, observamos não haver diferença entre os níveis séricos de IL-12, nos pacientes com a FJ e a FA da PCM (23). Esses dados estão de acordo com os resultados do presente trabalho que mostraram que o número de células IL-12+ não é muito diferente em linfonodos e mucosa oral. Entretanto, o papel da IL-12 e da resposta Th1 na doença é incontestável, visto que a infecção pelo *P. brasiliensis* em camundongos *knockout* para essa citocina, resulta em doença bem mais grave, com alta taxa de mortalidade (15).

A formação do granuloma é um processo fisiológico muito importante para conter a disseminação do fungo, sendo dependente da presença de citocinas Th1 no local da infecção (14). Para isso, o eixo formado pela IL-12 e IFN- γ é essencial e confere a imunidade protetora contra o agente infeccioso (22,24-26). O IFN- γ produzido por células T e NK estimula a migração, aderência, fagocitose e atividade microbicida de neutrófilos e macrófagos e, além disso, sustenta a resposta Th1 por manter as células CD4+ capazes de responder à estimulação pela IL-12. O IFN- γ restaura a resistência a infecções fúngicas em pacientes com doença granulomatosa crônica (66) e, como terapia adjuvante, potencializa o tratamento antifúngico (67).

A associação entre proteção e o eixo IL-12/IL-23/IFN- γ na PCM foi reforçada pela descrição de um paciente com a forma juvenil disseminada, no qual foi constatada deficiência da subunidade β 1 (p40) do receptor da IL-12/IL-23 (68).

Em nosso estudo, diferentemente da IL-12, cuja expressão foi semelhante nas duas formas da doença, a marcação para IFN- γ foi maior na mucosa oral, onde os granulomas se apresentavam mais organizados e compactos e a quantidade de células fúngicas foi menor. A expressão do RNAm para IFN- γ também foi maior nas lesões de mucosa oral, embora a diferença, em relação aos linfonodos, não tenha atingido significância estatística.

Outra citocina importante para o direcionamento da resposta imunológica é a IL-18, que age em sinergia com a IL-12 e a IL-15 induzindo a produção de IFN- γ e, conseqüentemente, a resposta Th1. Por outro lado, foi demonstrado que, na ausência de IL-12, a IL-18 pode induzir um aumento de citocinas Th2 e da produção de IgE (29). Corvino et al. (23) detectaram concentrações elevadas de IL-18 no soro de pacientes com a FJ de PCM, associadas a outros marcadores de atividade inflamatória, o que concorda com os nossos achados de uma maior expressão de IL-18 nos LNs do que nas mucosas.

Animais *knockout* para IL-18 e infectados por *P. brasiliensis* apresentam maior resistência ao fungo no início da infecção (30 dias), acompanhada da produção de citocinas protetoras com o IFN- γ e IL-12, em relação aos animais controle (31). Esses dados sugerem que uma produção elevada de IL-18 nos estágios iniciais da doença poderia inibir uma resposta protetora do tipo Th1, agravando a doença.

Embora a IL-18 compartilhe as mesmas propriedades pro-inflamatórias da IL-1 β , sua ação também pode contrabalançar os efeitos dessa citocina. Vários estudos mostraram que IL-1 β tem um papel essencial na imunidade antifúngica (69). Leveduras de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 (alta virulência) são capazes de induzir a produção de altas concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α por monócitos do sangue periférico (70). A transcrição gênica mediada por NF κ B é essencial para a síntese de precursores da IL-1 β . Em adição, um segundo estímulo desencadeia o processamento proteolítico da pro-IL-1 β em IL-1 β bioativa, por complexos intracelulares que contém caspase-1, denominados inflamassomas. Trabalhos recentes revelaram um papel importante para o inflamassoma NLR3 na geração de IL-1 β nas infecções fúngicas (71).

Assim como para a IL-18, nossos resultados mostraram que a expressão de IL-1 β foi significativamente maior nos linfonodos, comparada à da mucosa oral, indicando a sua participação na resposta inflamatória local.

A molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) é considerada também como um receptor celular a patógenos microbianos como a *Candida albicans* (72). Vários trabalhos, tanto na PCM experimental como humana, mostraram a atuação desta molécula na doença. Concentrações elevadas da forma solúvel da ICAM-1 foram detectadas no soro de pacientes com PCM (23). Por outro lado, ICAM-1 também foi detectada localmente, tanto em macrófagos alveolares de pacientes com PCM pulmonar (73), como na placenta de mulheres com PCM, em lesões causadas pelo fungo (74). Gonzalez et al. (36) demonstraram que, em camundongos infectados por *P. brasiliensis*, a ICAM-1 atua nos processos inflamatórios agudos e subagudos, sendo responsável pelo recrutamento e

retenção de células pro inflamatórias em resposta ao fungo (37). Nossos resultados mostraram maior expressão de ICAM-1 em linfonodos de pacientes com a FJ da PCM, comparada à da mucosa oral, e associada à grande quantidade de fungos e intensa resposta inflamatória.

Em trabalhos anteriores de nosso grupo, verificamos que a forma juvenil da PCM está associada a uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10, produção de anticorpos das classes IgE, IgG4, IgA e eosinofilia (7,19,75). Embora não tenha sido possível a detecção de IL-4 por IHQ, a pesquisa do RNAm se revelou positiva nos dois tecidos analisados, sendo um pouco maior em linfonodos.

Além da resposta Th2, associada a uma doença mais grave e disseminada e da resposta Th1, associada a formas assintomáticas e brandas da PCM e à proteção, um terceiro tipo de resposta, mediada por células Th17, tem sido amplamente explorado e parece atuar nas infecções fúngicas. O reconhecimento de fungos via dectina-1, induz, preferencialmente, células Th17, tanto em humanos como em camundongos (50). A resposta Th17, parece ser crucial na defesa contra fungos, como a *Candida albicans*, resultando no recrutamento de neutrófilos. Camundongos *knockout* para IL-17 são altamente suscetíveis à candidíase mucosa e disseminada (71). Alguns trabalhos também têm mostrado que a resposta mediada pela IL-17 está deprimida em pacientes com infecções fúngicas (40,43,46,51,76). Heninger et al. (11), estudando granulomas de pulmões infectados por *Histoplasma capsulatum*, observaram a presença de IL-17 e IFN- γ , citocinas produzidas por células T CD4+ presentes no local da lesão.

Em alguns processos infecciosos, a produção de IL-17 por células T CD4+ resulta em uma resposta imunológica protetora para o hospedeiro. Em infecções por *M. tuberculosis* foi demonstrado que a resposta Th17, além de gerar IL-17, induz outras células presentes no local da infecção a produzirem IL-23 e IL-17, o que promove o influxo de neutrófilos e, conseqüentemente, a resistência do hospedeiro à doença (77). Em relação às infecções fúngicas, a resposta do tipo Th17 pode estar associada à inflamação crônica, como acontece nas MO infectadas por *C. albicans* (43,78). A IL-17 foi detectada nos pulmões de camundongos inoculados por via intra-nasal com conídios de *P. brasiliensis*, em associação com macrófagos e neutrófilos (79). Em trabalho recente de nosso grupo, foi observado que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com a FA da PCM produzem maiores quantidades de IL-17, além de expressarem mais RNAm para IL-17 e RORc comparado a pacientes com a FJ da doença e controles saudáveis (80).

Em nosso trabalho, a presença de IL-17 em maior quantidade nas mucosas do que em LNs de pacientes com PCM, bem como o infiltrado de neutrófilos, poderia estar relacionado a uma eficiente resposta de defesa, que impediria a disseminação das células fúngicas. A IL-17 pode ser produzida por vários tipos de células, além de linfócitos T CD4+ (81). Nossos resultados mostraram que a grande expressão de IL-17 nas mucosas não se restringia, apenas, a células com característica de linfócitos, mas também a macrófagos, células gigantes e células epiteliais. Al-Ramili et al. (82) detectaram IL-17 em células do epitélio respiratório de pacientes asmáticos. Pagliari *et al* (53) também descreveram a

presença de células IL-17+ e FOXP3+ em lesões de pele e mucosa oral de pacientes com PCM.

As células T regulatórias têm um papel fundamental na manutenção da tolerância aos constituintes próprios e na homeostase imunológica, e são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição FOXP3, necessário para a sua geração e função (83). As células Treg migram para locais de infecção, onde exercem um controle da resposta inflamatória. Na PCM experimental foi demonstrado que o recrutamento de células Treg dependente de CCR5, determina a magnitude da resposta Th1, de forma a favorecer a persistência do patógeno no local da infecção (84). Ferreira et al (57) verificaram um número elevado de células Treg no sangue periférico de pacientes com a forma ativa da PCM associada a maior expressão de TGF- β e IL-10.

Em nosso trabalho, o fato das células Treg estarem praticamente ausentes nos linfonodos, associado à presença de intensa reação inflamatória, sugere que possam ter um papel no controle da resposta local. Por outro lado, a detecção dessas células em MO (58,60) e pele (60), locais geralmente acometidos nas formas mais brandas e localizadas da PCM, poderia indicar um controle da resposta inflamatória exacerbada e da destruição tecidual.

O TGF- β e a IL-10 são potentes citocinas imunossupressoras com efeitos benéficos e deletérios na resposta do hospedeiro aos fungos. A IL-10 é prontamente produzida por neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células Treg e atua inibindo a resposta de fagócitos, a secreção de citocinas pro-inflamatórias como TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 e a resposta imune celular protetora. Entretanto, mais tardiamente no curso da infecção, a

alta produção de IL-10 pode ser benéfica por contribuir com a resolução da resposta inflamatória. Algumas evidências indicam que a produção de IL-10 por células do sistema imune inato, é responsável pela prevenção da ativação excessiva das funções efetoras da resposta inata, enquanto que a IL-10 produzida por células Tregs é responsável pelo estabelecimento do comensalismo e, talvez, pela latência ou persistência do patógeno.

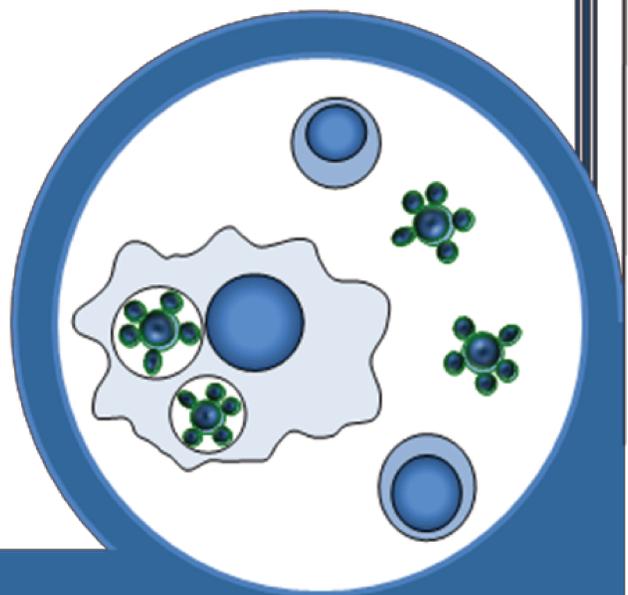
Em nosso estudo a expressão de TGF- β foi maior nos LNs, conforme já havíamos observado previamente, tanto no sangue periférico (6), como em lesões em LNs (52). Assim como a IL-10, o TGF- β tem propriedades imunossupressoras inibindo a resposta proliferativa de células T e a ativação de macrófagos, essencial para a defesa antifúngica.

A presença de células *natural killers* (NK) e linfócitos CD8+ nas lesões de pacientes com PCM poderia indicar um papel para os grânulos citotóxicos na resposta de defesa contra o fungo. Em trabalho anterior de nosso grupo, mostramos que células CD8+ de pacientes com PCM apresentam atividade citotóxica diminuída em relação a indivíduos assintomáticos (sem doença), principalmente no que diz respeito à produção de perforina (85). No presente estudo verificamos que a expressão de moléculas citotóxicas (granzima B, perforina e granulicina) ficou restrita a um pequeno número de células e sem diferença entre os tecidos analisados.

Em conjunto, os resultados sugerem que a produção local de moléculas de adesão e citocinas, pode estar relacionada à resposta imune diferencial observada nas duas formas da doença. No caso dos linfonodos (pacientes com a FJ da PCM), o desenvolvimento de uma reação inflamatória exacerbada (número elevado de células CD68+, alta expressão de IL-18, IL-1 β , IL-23 e ICAM-1), sem o controle de células Treg

(FOXP3+) poderia levar a uma resposta imune deficiente e aumento da carga fúngica. Por outro lado, a produção de IFN- γ e IL-17, com consequente ativação de macrófagos e neutrófilos, bem como a presença de células Treg, poderia resultar em melhor controle da resposta inflamatória, resposta imune mais eficiente, e consequente controle da carga fúngica.

Conclusão

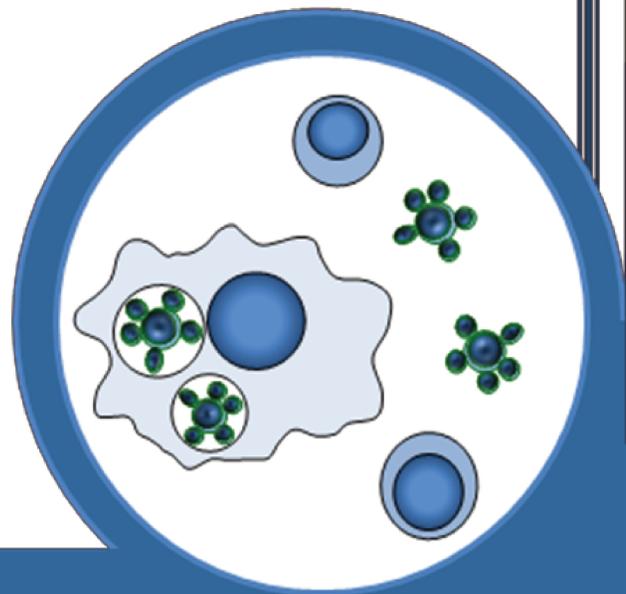


A análise do infiltrado celular, a expressão de citocinas e de ICAM-1 em linfonodos e mucosa oral de pacientes com PCM mostrou diferenças marcantes:

Nos linfonodos (pacientes com a FJ da PCM) foi observada uma reação inflamatória intensa, caracterizada por um número elevado de células CD68+ e alta expressão de IL-18, IL-1 β , TGF- β e ICAM-1. Neste tecido as células Treg (FOXP3+) foram praticamente ausentes. Neste caso, o desenvolvimento de uma reação inflamatória exacerbada, sem o controle de células Treg poderia levar a uma resposta imune deficiente e aumento da carga fúngica.

Na mucosa oral prevaleceu uma reação mais controlada com infiltrado misto de macrófagos e neutrófilos, granulomas compactos e maior expressão de IFN- γ e IL-17. Células Treg foram visualizadas ao redor dos granulomas. O desencadeamento de uma resposta Th1 e TH17, com consequente ativação de macrófagos e neutrófilos, bem como a presença de células Treg poderia resultar em melhor controle da resposta inflamatória, resposta imune mais eficiente e controle da carga fúngica.

Referências Bibliográficas



1. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6 (2): 89-117.
2. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1987; 25 (1): 5-18.
3. Almeida OP, Jacks J, Jr., Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14 (5): 377-83.
4. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001; 13 (4): 248-52.
5. Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. 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.
6. Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP 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.
7. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. 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.
8. Lortholary O, Denning DW, Dupont B. Endemic mycoses: a treatment update. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43 (3): 321-31.
9. Franco MV, Goes AM, Koury MC. Model of in vitro granulomatous hypersensitivity in human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 1997; 137 (3): 129-36.
10. Montenegro MR. [Clinical forms of paracoccidioidomycosis]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986; 28 (3): 203-4.
11. Heninger E, Hogan LH, Karman J, Macvilay S, Hill B, Woods JP et al. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. *J Immunol.* 2006; 177 (5): 3303-13.

12. Franco M, Bagagli E, Cunha M, Chamma LG, Fecchio D. Paracoccidioides brasiliensis antigen batches from the same isolate show immunological and biochemical differences. Mycopathologia. 1996; 135 (1): 13-9.
13. Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peracoli MT. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. Br J Dermatol. 2006; 154 (4): 643-50.
14. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Jr., Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. Nat Rev Immunol. 2007; 7 (12): 975-87.
15. Livonesi MC, Souto JT, Campanelli AP, Maffei CM, Martinez R, Rossi MA et al. Deficiency of IL-12p40 subunit determines severe paracoccidioidomycosis in mice. Med Mycol. 2008; 46 (7): 637-46.
16. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. Chest. 2000; 117 (4): 1162-72.
17. Netea MG, Vonk AG, van den Hoven M, Verschueren I, Joosten LA, van Krieken JH et al. Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection. Eur J Immunol. 2003; 33 (12): 3409-17.
18. Park S, Cheon S, Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. Cell Mol Immunol. 2007; 4 (5): 329-35.
19. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. Cytokine. 2005; 32 (1): 20-9.
20. Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40 (2): 156-62.
21. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. Nat Rev Immunol. 2005; 5 (7): 521-31.

22. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 495-521.
23. Corvino CL, Mamoni RL, Fagundes GZ, Blotta MH. 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.
24. Romani L, Puccetti P, Bistoni F. Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10 (4): 611-36.
25. Parise-Fortes MR, da Silva MF, Sugizaki MF, Defaveri J, Montenegro MR, Soares AM et al. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. *Med Mycol.* 2000; 38 (1): 51-60.
26. Souto JT, Aliberti JC, Campanelli AP, Livonesi MC, Maffei CM, Ferreira BR et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon-gamma. *Am J Pathol.* 2003; 163 (2): 583-90.
27. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 1995; 378 (6552): 88-91.
28. Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol.* 1998; 70: 281-312.
29. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 423-74.
30. Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H et al. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol.* 1998; 63 (6): 658-64.

31. Panagio LA, Tristao FS, Moreira AP, Pereira MS, Cavassani KA, Milanezi CM et al. Role of interleukin (IL)-18 in experimental paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2008; 46 (5): 435-42.
32. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol.* 2003; 73 (2): 213-24.
33. Takiyama Y, Miyokawa N, Tokusashi Y, Ito K, Kato S, Kimura S et al. Thyroid-stimulating hormone induces interleukin-18 gene expression in FRTL-5 cells: immunohistochemical detection of interleukin-18 in autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 2002; 12 (11): 935-43.
34. Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol.* 1999; 66 (6): 876-88.
35. Stuyt RJ, Netea MG, Geijtenbeek TB, Kullberg BJ, Dinarello CA, van der Meer JW. Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunology.* 2003; 110 (3): 329-34.
36. Gonzalez A, Lenzi HL, Motta EM, Caputo L, Sahaza JH, Cock AM et al. Expression of adhesion molecules in lungs of mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Microbes Infect.* 2005; 7 (4): 666-73.
37. Teixeira RCdA, Gabriel Junior A, De Martinho MC, Martins LC, Lopes AC, Tufik S. Marcadores de ativação endotelial e auto-anticorpos na artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol.* 2007; 47: 7.
38. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994; 84 (7): 2068-101.
39. Moreira AP, Campanelli AP, Cavassani KA, Souto JT, Ferreira BR, Martinez R et al. Intercellular adhesion molecule-1 is required for the early formation of granulomas and participates in the resistance of mice to the infection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Am J Pathol.* 2006; 169 (4): 1270-81.
40. Romani L. Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol.* 2008; 46 (6): 515-29.

41. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol*. 2007; 51 (12): 1139-47.
42. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*. 2008; 453 (7198): 1051-7.
43. Zelante T, De Luca A, D'Angelo C, Moretti S, Romani L. IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur J Immunol*. 2009; 39 (3): 645-8.
44. Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. *Cell Res*. 2009; 19 (4): 399-411.
45. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci*. 1183: 211-21.
46. Atarashi K, Umesaki Y, Honda K. Microbiotal influence on T cell subset development. *Semin Immunol*. 23 (2): 146-53.
47. Liu ZJ, Yadav PK, Su JL, Wang JS, Fei K. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2009; 15 (46): 5784-8.
48. Wei XQ, Rogers H, Lewis MA, Williams DW. The role of the IL-12 cytokine family in directing T-cell responses in oral candidosis. *Clin Dev Immunol*. 2011: 697340.
49. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007; 8 (9): 942-9.
50. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol*. 2007; 8 (6): 630-8.
51. Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, Montagnoli C, Bozza S, Moretti S et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*. 2007; 37 (10): 2695-706.
52. Neworal EP, Altemani A, Mamoni RL, Noronha IL, Blotta MH. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase

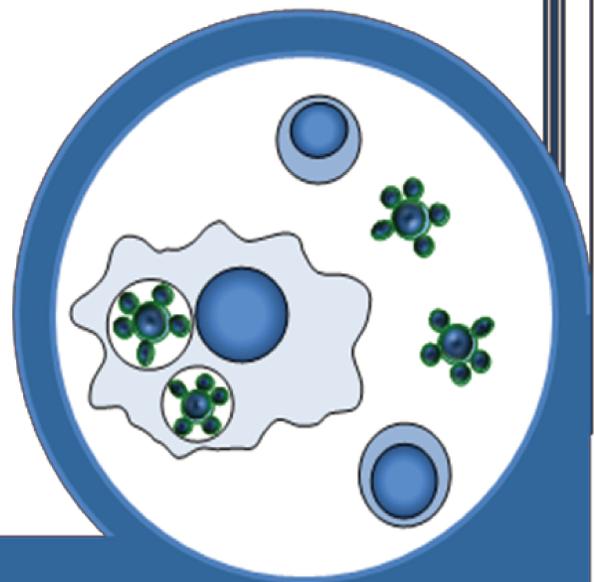
- (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2003; 21 (5): 234-41.
53. Pagliari C, Fernandes ER, Stegun FW, da Silva WL, Seixas Duarte MI, Sotto MN. Paracoccidioidomycosis: cells expressing IL17 and Foxp3 in cutaneous and mucosal lesions. *Microb Pathog*. 50 (5): 263-7.
 54. Loures FV, Pina A, Felonato M, Araujo EF, Leite KR, Calich VL. Toll-like receptor 4 signaling leads to severe fungal infection associated with enhanced proinflammatory immunity and impaired expansion of regulatory T cells. *Infect Immun*. 78 (3): 1078-88.
 55. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol*. 11 (2): 119-30.
 56. Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y et al. FOXP3 and ROR γ transcriptional regulation of Treg and Th17. *Int Immunopharmacol*. 11 (5): 536-42.
 57. Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 78 (10): 4392-401.
 58. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol*. 2006; 177 (9): 5811-8.
 59. Sun JC, Lanier LL. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8 T cells. *Nat Rev Immunol*. 11 (10): 645-57.
 60. Pagliari C, Pereira NV, Kanashiro L, Stegun FW, Croda J, Duarte MI et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. *J Cutan Pathol*. 37 (5): 565-70.
 61. Longui L, *Evaluation of the role of natural killer cells (CD56+ cells) in the immunological response against Paracoccidioides brasiliensis infection*. 2010, UNICAMP: Campinas.
 62. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29 (9): e45.

63. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 519-50.
64. Kaminagakura E, Bonan PR, Jorge J, Almeida OP, Scully C. Characterization of inflammatory cells in oral paracoccidioidomycosis. *Oral Dis.* 2007; 13 (4): 434-9.
65. Gryscek RC, Pereira RM, Kono A, Patzina RA, Tresoldi AT, Shikanai-Yasuda MA et al. Paradoxical reaction to treatment in 2 patients with severe acute paracoccidioidomycosis: a previously unreported complication and its management with corticosteroids. *Clin Infect Dis.* 50 (10): e56-8.
66. Puccetti P, Romani L, Bistoni F. A TH1-TH2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. *Trends Microbiol.* 1995; 3 (6): 237-40.
67. Roilides E, Lammaigne CG, Farmaki E. Cytokines in immunodeficient patients with invasive fungal infections: an emerging therapy. *Int J Infect Dis.* 2002; 6 (3): 154-63.
68. Moraes-Vasconcelos D, Grumach AS, Yamaguti A, Andrade ME, Fieschi C, de Beaucoudrey L et al. *Paracoccidioides brasiliensis* disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta1 subunit of the interleukin (IL)-12/IL-23 receptor. *Clin Infect Dis.* 2005; 41 (4): e31-7.
69. Vonk AG, Netea MG, van Krieken JH, Iwakura Y, van der Meer JW, Kullberg BJ. Endogenous interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis.* 2006; 193 (10): 1419-26.
70. Kurokawa CS, Araujo JP, Jr., Soares AM, Sugizaki MF, Peracoli MT. Pro- and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiol Immunol.* 2007; 51 (4): 421-8.
71. Poeck H, Ruland J. SYK kinase signaling and the NLRP3 inflammasome in antifungal immunity. *J Mol Med (Berl).* 88 (8): 745-52.
72. Egusa H, Nikawa H, Makihira S, Jewett A, Yatani H, Hamada T. Intercellular adhesion molecule 1-dependent activation of interleukin 8 expression in *Candida albicans*-infected human gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73 (1): 622-6.

73. Fornazim MC, Balthazar A, Quagliato R, Jr., Mamoni RL, Garcia C, Blotta MH. Evaluation of bronchoalveolar cells in pulmonary paracoccidioidomycosis. *Eur Respir J*. 2003; 22 (6): 895-9.
74. Juliano PB, Blotta MH, Altemani AM. ICAM-1 is overexpressed by villous trophoblasts in placentitis. *Placenta*. 2006; 27 (6-7): 750-7.
75. Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2006; 35 (3-4): 207-16.
76. O'Connor W, Jr., Zenewicz LA, Flavell RA. The dual nature of T(H)17 cells: shifting the focus to function. *Nat Immunol*. 11 (6): 471-6.
77. Mucida D, Salek-Ardakani S. Regulation of TH17 cells in the mucosal surfaces. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123 (5): 997-1003.
78. Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev*. 2008; 226: 160-71.
79. Lopera D, Naranjo TW, Cruz OG, Restrepo A, Cano LE, Lenzi HL. Structural and topographic dynamics of pulmonary histopathology and local cytokine profiles in *Paracoccidioides brasiliensis* conidia-infected mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 5 (7): e1232.
80. Paião MR, *Evaluation of the participation of cells producing IL-17 (Th17) in human Paracoccidioidomycosis: effect of treatment with IL-17 and IL 23 on fungicidal activity and migration capacity of neutrophils*. 2011, UNICAMP: Campinas.
81. Linden A. Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001; 126 (3): 179-84.
82. Al-Ramli W, Prefontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemiere C et al. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123 (5): 1185-7.
83. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 10 (7): 490-500.

84. Moreira AP, Cavassani KA, Massafera Tristao FS, Campanelli AP, Martinez R, Rossi MA et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol.* 2008; 180 (5): 3049-56.
85. Mamoni RL B-SL, Blotta MHSL., *The role of CD8+cells in human paracoccidioidomycosis*, in *Biomédica.* 2008. p. 68.

Apêndice



8.1. Análise semi-quantitativa das reações de IHQ – Marcação celular

A análise semi-quantitativa mostrou um número maior de células CD68+, CD3+ e CD8+ nos LNs do que nas mucosas, enquanto que células CD15+ e FOXP3+ foram mais freqüentes nos cortes de MO comparado aos LNs. Não foram observadas diferenças entre a quantidade de células CD56+ nos dois tipos de tecidos.

Tabela 3: Análise semi-quantitativa da marcação celular

| Nome | Idade (anos) | Sexo (F/M) | Tecido* | CD68 | CD15 | CD3 | CD8 | CD56 | FOXP3 |
|------|--------------|------------|---------|------|------|-----|-----|------|-------|
| SCGS | 10 | F | LN | +++ | + | +++ | +++ | + | - |
| WOM | 12 | M | LN | +++ | + | +++ | +++ | ++ | - |
| DPS | 15 | F | LN | +++ | ++ | +++ | +++ | + | - |
| JV | 10 | F | LN | +++ | + | +++ | +++ | + | - |
| AMBS | 12 | M | LN | ++ | + | +++ | +++ | + | - |
| FFF | 30 | M | LN | +++ | + | +++ | +++ | ++ | - |
| VTC | 22 | M | LN | +++ | + | +++ | +++ | ++ | + |
| GBS | 35 | M | LN | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| YSS | 11 | M | LN | +++ | + | +++ | +++ | + | - |
| JCA | 19 | M | LN | +++ | + | +++ | +++ | + | - |
| CA | 14 | M | LN | +++ | + | +++ | +++ | ++ | - |
| MAXM | 10 | M | LN | ++ | + | +++ | +++ | + | - |
| SCS | 8 | F | LN | +++ | + | +++ | +++ | ++ | - |
| DGSA | 22 | M | LN | +++ | + | +++ | +++ | ++ | - |
| MAS | 39 | F | LN | ++ | +++ | +++ | +++ | + | ++ |
| JLM | 42 | M | MO | ++ | +++ | ++ | ++ | + | ++ |
| AC | 60 | M | MO | ++ | +++ | + | ++ | + | + |
| JFP | 49 | M | MO | + | +++ | + | + | ++ | ++ |
| GMGG | 45 | M | MO | + | +++ | ++ | ++ | + | ++ |
| BGF | 47 | M | MO | + | + | + | + | ++ | ++ |
| JFM | 47 | M | MO | ++ | +++ | ++ | ++ | + | ++ |
| FTS | 47 | M | MO | + | +++ | + | + | + | +++ |
| VC | 45 | M | MO | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| AMA | 51 | M | MO | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| AAB | 29 | M | MO | ++ | ++ | + | + | + | +++ |
| SLA | 51 | M | MO | + | +++ | + | + | + | ++ |
| MLL | 40 | F | MO | + | +++ | ++ | ++ | + | +++ |
| IS | 58 | M | MO | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| ACPC | 48 | M | MO | ++ | +++ | ++ | ++ | + | ++ |
| JJT | 60 | M | MO | + | +++ | ++ | ++ | + | +++ |

*LN: linfonodo, MO: mucosa oral; - ausência, + presença leve, ++ presença moderada, +++ presença intensa

8.2. Análise semi-quantitativa das reações de IHQ - Expressão de citocinas

A análise semi-quantitativa mostrou maior expressão de IL-18, ICAM-1 e TGF- β nos LNs, enquanto que nas mucosas foi detectada maior quantidade de IFN- γ e IL-17. As citocinas IL-10 e IL-23 foram intensamente expressas nos dois tipos de tecido, sem diferenças significativas. Por outro lado, a expressão de IL-12 foi mínima tanto nos LNs como nas mucosas (Tabela 4).

Tabela 4: Análise semi-quantitativa da expressão de citocinas

| Nome | Idade (anos) | Sexo (F/M) | Tecido* | IL-12 | IL-18 | IFN- γ | ICAM-1 | IL-17 | IL-23 | TGF- β | IL-10 |
|------|--------------|------------|---------|-------|-------|---------------|--------|-------|-------|--------------|-------|
| SCGS | 10 | F | LN | + | ++ | + | +++ | + | +++ | +++ | +++ |
| WOM | 12 | M | LN | ++ | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| DPS | 15 | F | LN | + | +++ | + | +++ | + | +++ | ++ | ++ |
| JV | 10 | F | LN | + | ++ | + | +++ | + | +++ | +++ | ++ |
| AMBS | 12 | M | LN | + | ++ | ++ | +++ | + | ++ | +++ | +++ |
| FFF | 30 | M | LN | ++ | ++ | + | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| VTC | 22 | M | LN | + | +++ | + | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| GBS | 35 | M | LN | + | +++ | + | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| YSS | 11 | M | LN | ++ | ++ | + | +++ | + | ++ | ++ | ++ |
| JCA | 19 | M | LN | + | ++ | + | +++ | + | +++ | +++ | ++ |
| CA | 14 | M | LN | + | ++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| MAXM | 10 | M | LN | ++ | +++ | + | +++ | + | +++ | ++ | ++ |
| SCS | 8 | F | LN | + | ++ | + | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| DGSA | 22 | M | LN | ++ | ++ | + | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| MAS | 39 | F | LN | + | +++ | + | +++ | + | ++ | ++ | +++ |
| JLM | 42 | M | MO | + | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| AC | 60 | M | MO | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| JFP | 49 | M | MO | + | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ |
| GMGG | 45 | M | MO | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| BGF | 47 | M | MO | + | + | +++ | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ |
| JFM | 47 | M | MO | + | ++ | ++ | + | +++ | ++ | ++ | +++ |
| FTS | 47 | M | MO | + | ++ | ++ | + | ++ | +++ | + | ++ |
| VC | 45 | M | MO | + | ++ | ++ | + | +++ | ++ | ++ | +++ |
| AMA | 51 | M | MO | + | ++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| AAB | 29 | M | MO | ++ | + | +++ | + | ++ | +++ | ++ | ++ |
| SLA | 51 | M | MO | + | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| MLL | 40 | F | MO | + | ++ | +++ | + | ++ | +++ | ++ | ++ |
| IS | 58 | M | MO | + | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| ACPC | 48 | M | MO | + | ++ | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| JJT | 60 | M | MO | ++ | + | +++ | ++ | + | +++ | ++ | ++ |

*LN: linfonodo, MO: mucosa oral; + marcação leve, ++ marcação moderada, +++ marcação intensa

8.3. Análise semi-quantitativa das reações de IHQ- Moléculas citotóxicas

Não encontramos diferenças na expressão das moléculas citotóxicas na análise semi-quantitativa nos dois tipos de tecido.

Tabela 5: Análise semi-quantitativa da expressão de moléculas citotóxicas.

| Nome | Idade (anos) | Sexo (F/M) | Tecido* | Granzima -B | Perforina | Granulisina |
|------|--------------|------------|---------|-------------|-----------|-------------|
| SCGS | 10 | F | LN | +++ | ++ | ++ |
| WOM | 12 | M | LN | +++ | + | ++ |
| DPS | 15 | F | LN | +++ | ++ | ++ |
| JV | 10 | F | LN | +++ | +++ | +++ |
| AMBS | 12 | M | LN | ++ | ++ | ++ |
| FFF | 30 | M | LN | +++ | ++ | ++ |
| VTC | 22 | M | LN | +++ | ++ | ++ |
| GBS | 35 | M | LN | ++ | +++ | ++ |
| YSS | 11 | M | LN | +++ | ++ | ++ |
| JCA | 19 | M | LN | +++ | ++ | ++ |
| CA | 14 | M | LN | +++ | +++ | ++ |
| MAXM | 10 | M | LN | ++ | ++ | ++ |
| SCS | 8 | F | LN | +++ | ++ | ++ |
| DGSA | 22 | M | LN | +++ | ++ | +++ |
| AMS | 39 | F | LN | ++ | +++ | ++ |
| JLM | 42 | M | MO | ++ | +++ | +++ |
| AC | 60 | M | MO | ++ | +++ | +++ |
| JFP | 49 | M | MO | ++ | +++ | +++ |
| GMGG | 45 | M | MO | ++ | +++ | +++ |
| BGF | 47 | M | MO | ++ | ++ | ++ |
| JFM | 47 | M | MO | +++ | +++ | +++ |
| FTS | 47 | M | MO | ++ | +++ | ++ |
| VC | 45 | M | MO | ++ | +++ | +++ |
| AMA | 51 | M | MO | +++ | +++ | +++ |
| AAB | 29 | M | MO | ++ | ++ | ++ |
| SLA | 51 | M | MO | ++ | +++ | +++ |
| MLL | 40 | F | MO | ++ | +++ | +++ |
| IS | 58 | M | MO | +++ | +++ | ++ |
| ACPC | 48 | M | MO | ++ | +++ | +++ |
| JJT | 60 | M | MO | ++ | +++ | +++ |

*LN: linfonodo, MO: mucosa oral; + presença leve, ++ presença moderada, +++ presença intensa

8.4. Controle Negativo

O controle negativo consistiu em uma lâmina do mesmo tecido analisado, na qual o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA para avaliar a especificidade da reação do anticorpo primário (fig. 30).

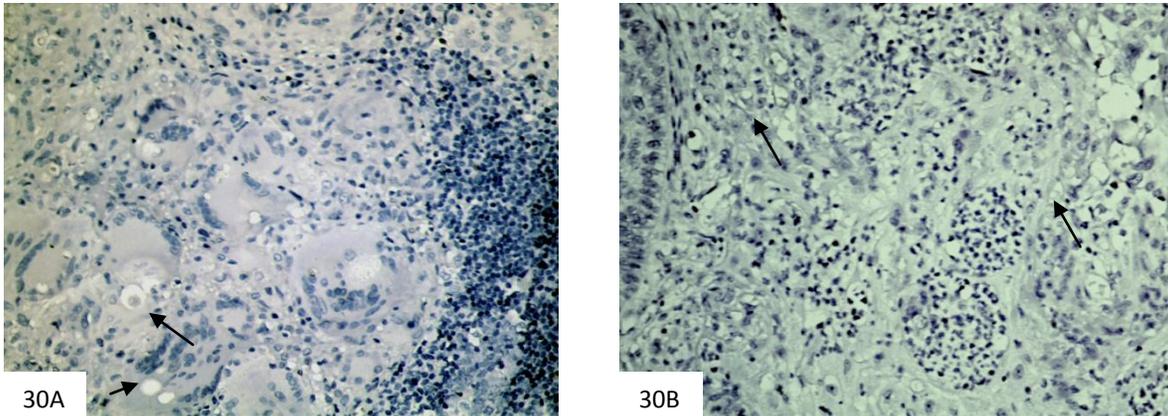


Figura 30- Corte histológico de linfonodo (A) e mucosa oral (B) de pacientes com PCM – controle negativo (aumento 400X). Setas: Leveduras de *P. brasiliensis*

8.5. Aprovação do comitê de ética



Fundação São Paulo
Pontifícia Universidade Católica de São Paulo

CCMB
Centro de Ciências Médicas e Biológicas
Praça Dr. José Ermírio de Moraes, 290
CEP 18030-230 - Sorocaba - SP
Telefone: (015) 3212.9900
Telefax: (015) 3212.9879
Caixa Postal 1570

Hospital Santa Lucinda
Rua Cláudio Manuel de Costa, 57
CEP 18030-230 - Sorocaba - SP
Telefax: (015) 3212.9900 / 9837 / 9935
Caixa Postal 1570
www.sorocaba.pucsp.br

Comitê de Ética em Pesquisa

Sorocaba, 10 de dezembro de 2008.

Ilma. Sra.
Rosiane Maria da Silva
Pesquisador responsável

Ref: **APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA E EMENDAS**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Médicas e Biológicas de Sorocaba-PUC/SP informa que aprovou em reunião ordinária realizada em **09.12.08**.

Projeto de pesquisa: **“Participação da IL-18, IL-12 e IL-17 na resposta inflamatória ao Paracoccidioides brasiliensis”** e o parecer do relator.


Prof.ª Dra. Maria Angelina Nardi de Souza Martinez
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do CCMB-PUC/SP