

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LÍVIA MARA TORRES BUENO

Influência do gênero na resposta dos neutrófilos contra a infecção por
Paracoccidioides brasiliensis

Ribeirão Preto

2018

LÍVIA MARA TORRES BUENO

**Influência do gênero na resposta dos neutrófilos contra a infecção por
*Paracoccidioides brasiliensis***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
De São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina
Roque Antunes Barreira

Co-orientador: Dr. Rafael Ricci de Azevedo

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Bueno, Livia Mara Torres

Influência do gênero na resposta dos neutrófilos contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*.
Ribeirão Preto, 2018.

74 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Roque-Barreira, Maria Cristina.

1. Neutrófilo. 2. *Paracoccidioides brasiliensis*. 3. Paracoccidioidomicose. 4. Gêneros. 5. Resposta imune. 6. Estrógeno.

Lívia Mara Torres Bueno

Influência do gênero na resposta dos neutrófilos contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
De São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina
Roque Antunes Barreira

Co-orientador: Dr. Rafael Ricci de Azevedo

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof^(a). Dr^(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof^(a). Dr^(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof^(a). Dr^(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Dedico essa dissertação aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que me são dadas.

Agradeço a minha orientadora Profa Dr^a Maria Cristina Roque Barreira por permitir que o Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia fosse meu lugar de aprendizado e crescimento pessoal e profissional por quase quatro anos.

Agradeço aos meus pais por todo o apoio afetivo e emocional. Agradeço por todos os esforços que fizeram para que eu e meus irmãos pudéssemos ter uma boa qualidade de vida e oportunidade de estudar. Agradeço por sempre estarem de braços abertos independentemente de minhas decisões.

Agradeço aos meus irmãos André, Aline, Priscila e Maria Clara por estarem sempre presentes na minha vida e me ensinarem o valor da união. Agradeço em especial a Priscila pela linda Catarina, e por todas as alegrias que ela nos proporciona.

Agradeço à Sandra (Darling) por todo o carinho, apoio e ajuda que me ofereceu desde o momento que iniciei meus trabalhos no laboratório. Agradeço também pelas caronas e pelas conversas e pelas aventuras com a imunização das galinhas.

Agradeço ao Rafael por ter me apresentado o mundo dos neutrófilos. Obrigada por ter me auxiliado nos experimentos e na escrita. Agradeço também ao auxílio do Relber e da Flávia nos experimentos e nas ideias. A ajuda de vocês três foi muito importante para a dissertação ser concretizada.

Agradeço ao Relber por todas as contagens do fungo, por todas as ideias e conselhos e pelas caronas para o Bandeirão. E agradeço por todos os cafés (com a Darling) no recuo. Relber: tiro, porrada e bomba.

Agradeço ao grupo de *Toxoplasma gondii* (Flávia, Camilinha e Aline Sardinha) por todo o auxílio em relação às Mics. Agradeço especialmente a Flávia que me ensinou o longo processo de purificação das proteínas.

Agradeço ao Thiago (TT) todos os auxílios com experimentos, todos os conselhos e o auxílio com a escrita da dissertação.

Agradeço á todos do laboratório que tive o prazer de conhecer: Patricia, Nayla, Caroline, Fabrício, Giulia, Marcel, Danilo, Márcia, Iris, Cássia, Sandro, Ita, Fausto, Aline Oliveira, Matheus, Taísa, Thiago (Vuvuzela), Simone e Flávio.

Agradeço as irmãs Érica (pelos auxílios burocráticos) e Patrícia (pelos auxílios do dia-a-dia do laboratório).

Agradeço ao Domingos pelo auxílio nos assuntos de biotério e de criação de animais. Agradeço também pelos momentos de descontração.

Agradeço á Gabriela, Camila e Lúcia pelo auxílio nos assuntos burocráticos.

Agradeço à Maria Helena e Joana pela autoclavagem de materiais e dos vários meios de cultura.

Agradeço a Vanusa por sempre manter os ambientes limpos e conservados.

Agradeço a toda minha família (de sangue ou “postiça”) por todo o apoio e auxílio em todas as horas.

Agradeço ao Felipe por todo carinho, pelo companheirismo e por sempre estar disposto a me ouvir e me ajudar. Você e sua família são muito especiais.

Agradeço aos amigos, em especial ao Junior (Geraldo) e ao Renato (Timmy). Vocês são muito importantes nessa minha caminhada.

Agradeço em especial à Raquel e ao Kiwi, aos amigos de Rio Preto, aos alunos do Laboratório do Prof. José Freire e ao Mário Borelli.

Agradeço, sem citar nomes, os doadores de sangue que contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço aos alunos de outros laboratórios que me auxiliaram para o bom andamento do meu trabalho, especialmente as alunas do Prof. Dario Natália e Letícia.

Agradeço ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

BUENO, L. M. T. **Influência do gênero na resposta dos neutrófilos contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis***. 2018. ...p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo termo-dimórfico que se apresenta na forma de hifa a 25°C e forma de levedura a 37°C. Após inalação de conídios e propágulos de hifas presentes no ambiente, o fungo encontra no hospedeiro as condições ideais para transição em levedura, capaz de causar a doença paracoccidioidomicose (PCM), primariamente pulmonar, podendo ser seguida de disseminação sistêmica. O processo infeccioso é caracterizado pelo reconhecimento de constituintes de leveduras por receptores de células do sistema imune, especialmente fagócitos, que são ativados e produzem citocinas. Neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da infecção, onde combatem o patógeno, fagocitando-o e liberando mediadores e efetores, como citocinas, ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) e NETs (Armadilhas extracelulares de neutrófilos). Esses eventos, além de fatores ambientais e genéticos, têm influência sobre a resistência do hospedeiro ao fungo e, conseqüentemente, sobre a progressão da doença. Um aspecto da epidemiologia da doença impressiona: a incidência de PCM é mais alta em homens do que em mulheres, especialmente na idade reprodutiva. Especula-se que a melhor resposta das mulheres ao fungo possa relacionar-se à maior concentração de estrógeno, uma vez que esse hormônio, *in vitro*, inibe a transição de hifa em micélio. Adicionalmente, nosso grupo verificou, em modelo murino de PCM, que machos e fêmeas divergem quanto à resposta imunitária frente ao fungo, favorecendo a resistência de fêmeas. Todavia, neutrófilos, a despeito de sua aparente relevância em infecções fúngicas, nunca foram estudados quanto ao eventual papel na determinação de diferenças de gênero constatadas na PCM. Este trabalho teve como objetivo comparar neutrófilos de homens e mulheres quanto às funções reguladoras e efetoras, quando essas células são infectadas *in vitro* com leveduras de *P. brasiliensis* (multiplicidade de infecção (MOI) 5:1). Participaram do estudo 38 homens e mulheres saudáveis, com idade entre 23 e 35 anos. Como critério de inclusão no estudo, as mulheres

deveriam estar entre o primeiro e o 15º dia do ciclo menstrual ou utilizarem anticoncepcional à base de estrógeno na data da coleta. Os neutrófilos, purificados a partir do sangue periférico e incubados com leveduras de *P. brasiliensis* e, estudados quanto às habilidades de fagocitose e eliminação de leveduras, produção de citocinas e ROS desenvolvidas por células oriundas de homens e mulheres. Os resultados indicam que os neutrófilos de mulheres mataram o fungo com maior eficiência e produziram maiores concentrações de TNF. Entretanto, dentre as funções neutrofílicas testadas, algumas não foram afetadas pelo gênero do doador, como a habilidade de fagocitose e a produção de ROS. Alguns ensaios foram precedidos da adição ao meio de β -estradiol sintético. Na presença do hormônio sintético, verificamos que (i) neutrófilos de homens limitaram o crescimento fúngico de maneira mais eficiente; (ii) neutrófilos de homens e mulheres diminuíram a produção de TGF- β . Concluimos que há diferenças entre funções de neutrófilos oriundos de homens e de mulheres frente à infecção por *P. brasiliensis*. Parte dos déficits funcionais detectados em neutrófilos de homens frente à infecção fúngica foi revertida pela adição de estrógeno ao meio em que se procederam os ensaios. As observações feitas neste trabalho permitem postular que os neutrófilos, sob efeito do estrógeno, contribuem para que as mulheres sejam mais resistentes à PCM.

Palavras chave: Neutrófilo, *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomicose, Gêneros, Resposta imune, Estrógeno

ABSTRACT

BUENO, L. M. T. **Gender influence on neutrophil response against *Paracoccidioides brasiliensis* infection.** 2018. ...p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Paracoccidioides brasiliensis is a thermo-dimorphic fungus that appears as hyphae at 25 ° C and yeast at 37 ° C. After inhalation of conidia and propagules of hyphae resident in the environment, the fungus finds in the host the ideal conditions for transition in yeast, capable of causing the disease Paracoccidioidomycosis (PCM), primarily pulmonary, and may be followed by systemic dissemination. The infectious process implies in recognition of fungal constituents by immune cell receptors, especially phagocytes, which are activated. Neutrophils, the first recruited cells to the infection focus, fight the pathogen and initiate cytokines' releasing and effector events, such as reactive oxygen species (ROS) production and extracellular traps (NETs) formation. Together, they influence the host resistance to the fungus and, consequently, the disease course. One aspect of the PCM epidemiology is impressive: its incidence is higher in men than in women, especially during their reproductive period. It is speculated that the women's better response to the fungus may be related to the estrogen higher concentration they have, since this hormone, in vitro, inhibits the yeast's growth. Additionally, our group has previously reported that in a murine PCM model, males and females differ on the immune response to the fungus, which favors the females' resistance. However, neutrophils, despite their apparent relevance in fungal infections, have never been studied for their possible contributive role in the gender differences found in PCM. This work aimed to compare the neutrophils regulatory and effector functions in men and women when these cells were in vitro infected with *P. brasiliensis* yeasts. Healthy men and women aged between 23 and 35 have participated in the study. To be included, at the date of neutrophil harvesting women should be between the first and the 15th day of the menstrual cycle or use estrogen-based contraceptives. Neutrophils purified from peripheral blood were incubated with *P. brasiliensis* and assessed for the capacity of phagocytosis and elimination of yeasts, as well as

for the production of cytokine and ROS. Neutrophils from women killed the fungi more efficiently and produced higher concentrations of TNF. Nonetheless, the donor gender has not affected some tested neutrophil functions, namely phagocytosis ability and ROS production. Moreover, assays performed in the presence of synthetic β -estradiol showed that (i) men neutrophils started to kill yeasts more efficiently than in the absence of the hormone; (ii) neutrophils from men and women decreased the production of TGF- β . We conclude that in vitro infection with *P. brasiliensis* unveiled differences between men and women neutrophils' functions. Part of the functional insufficiency verified in men's neutrophils of fighting against the fungal infection reversed by the estrogen addition to the assay medium. The results of this work allow postulating that neutrophils contribute to the women's resistance to paracoccidioidomycosis.

Key words: Neutrophil, *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomycosis, Gender, Immune response, Estrogen

LISTA DE ABREVIATURAS

AUC: Área sob a curva
BHI: Caldo cérebro coração
CFSE: Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: Ensaio imunoenzimático
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HBSS: Solução Balanceada de Hank's
IFN: Interferon
IL: Interleucina
LPS: Lipopolissacarídeo
MOI: Multiplicidade da infecção
MPO: Mieloperoxidase
NETs: Armadilhas extracelulares de neutrófilos
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
Pb18: capa virulenta do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*
PBMC: Células mononucleares do sangue periférico
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PBS-Tween/PBS-T: Solução salina tamponada com fosfato 20%Tween
PCM: Paracoccidioidomicose
pH: Potencial hidrogeniônico
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRRs: Receptores de reconhecimento de padrões
RNAm: RNA mensageiro
ROS: Espécies reativas de oxigênio
RPM: Rotações por minuto
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SFB: Soro fetal bovino
TGF: Fator de crescimento transformador
Th: T helper
TMB: Tetrametilbenzidina
TNF: Fator de necrose tumoral

UFC: Unidades formadoras de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 As diferentes formas do <i>P. brasiliensis</i>	20
Figura 2 Incidência da PCM em países da América Latina.....	22
Figura 3 Defesas desenvolvidas pelos neutrófilos contra patógenos.....	25
Figura 4 Os neutrófilos das mulheres eliminam o <i>P. brasiliensis</i> de maneira mais eficiente que os neutrófilos dos homens.....	41
Figura 5 Os neutrófilos das mulheres eliminam o fungo internalizado de forma mais eficiente.....	42
Figura 6 Neutrófilos de homens e mulheres produziram quantidades equivalentes de ROS	44
Figura 7 Os neutrófilos das mulheres produziram níveis mais altos de TNF e mais baixos de IL-8.....	45
Figura 8 A habilidade fungicida dos neutrófilos dos homens foi maior após a adição do hormônio sintético β -Estradiol.....	48
Figura 9 Após a adição de β -Estradiol, os neutrófilos dos homens aprimoraram a capacidade de eliminar o <i>P. brasiliensis</i>	49
Figura 10 A adição do hormônio sintético β -Estradiol aos neutrófilos diminuiu os níveis de TGF- β produzidos por neutrófilos de homens.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Diferenças na resposta imune entre homens e mulheres.....	28
--	----

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	20
1.2. Paracoccidioidomicose	21
1.3. Resposta imunitária do hospedeiro na PCM	23
1.4. Papel dos neutrófilos na infecção por <i>P. brasiliensis</i>	24
1.5. Influência do gênero na resposta imune	27
1.6. Influência do gênero na PCM.....	29
2. OBJETIVO.....	31
2.1. OBJETIVO GERAL	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Recrutamento dos participantes do estudo	33
3.2. Obtenção da amostra e purificação dos neutrófilos	33
3.3. Manutenção do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	34
3.4. Quantificação da produção de ROS.....	34
3.5. Recuperação de leveduras em ensaios de Fagocitose e Killing por	35
Unidades formadoras de Colônia (UFC)	35
3.6. Recuperação de leveduras em ensaios de Fagocitose e <i>Killing</i> por Citometria de Fluxo	35
3.7. Dosagem de TNF, IL-8, TGF- β e IL-1 β a partir do sobrenadante de cultura de neutrófilos.....	36
3.8. Análise estatística	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Os neutrófilos das mulheres são mais eficientes em eliminar o <i>P.</i> <i>brasiliensis</i>	39
4.2. Neutrófilos de homens e mulheres produzem ROS de forma equivalente	42
4.3. A produção de citocinas pelos neutrófilos difere entre os homens e mulheres	44
4.4. A adição do hormônio sintético β -estradiol potencializa a atividade microbicida de neutrófilos de homens, infectados com <i>P. brasiliensis</i>	46

4.6. A produção de TGF- β pelos neutrófilos dos homens diminuiu após a adição de β -Estradiol	50
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS.....	62

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Paracoccidioides brasiliensis*

Em 1908, o pesquisador Adolpho Lutz observou, em cultura de tecidos, filamentos do tipo hifa e agrupamentos císticos que consistiam de “um maior no centro e outros pequenos ao redor” (LUTZ, 1945). Vinte e dois anos depois Floriano Paulo de Almeida ratificou as observações de Lutz denominando o gênero *Paracoccidioides* (PARDINI; MOREIRA, 2008).

O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico presente no ambiente como micélio a 25 °C e como levedura a 37 °C (Figura 1). À temperatura ambiente as hifas são alongadas e formam propágulos na forma de conídio, enquanto as leveduras possuem forma de leme com múltiplos brotamentos a 37 °C (RAPPEYE; GOLDMAN, 2006). Dentre as 70 cepas de *P. brasiliensis*, destaca-se a Pb18 por sua virulência, apresentando típica morfologia com fenótipo de algodão e parte interior de cor acastanhada (KUROKAWA; SUGIZAKI; PERAÇOLI, 1998)

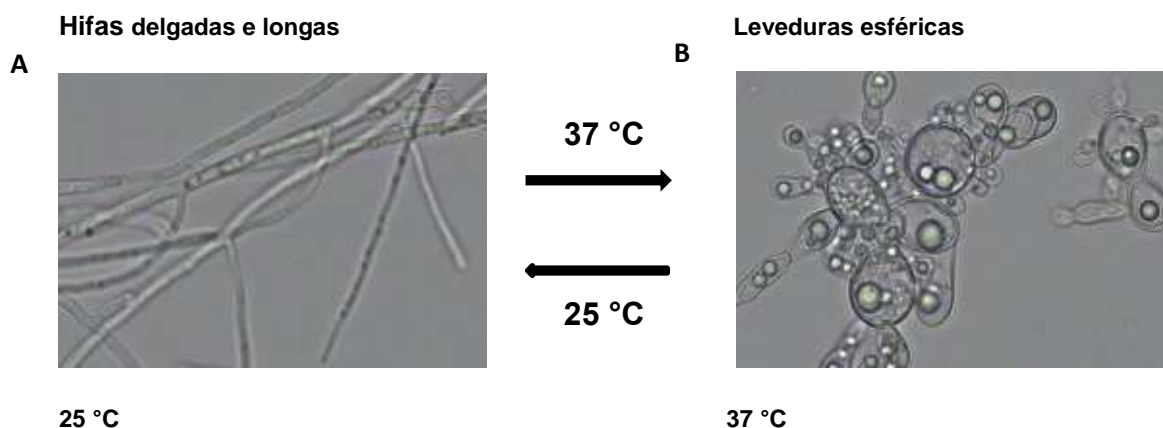


Figura 1. As diferentes formas do *P. brasiliensis*. **A.** Microscopia de Campo Claro de hifas de *P. brasiliensis*. As hifas possuem forma delgada e longa e comumente estão presentes no solo a 25°C. **B.** Microscopia de Campo Claro de leveduras de *P. brasiliensis*. As leveduras apresentam forma esférica, comumente acompanhada de brotamentos, se assemelhando a arquitetura de um leme. São encontradas nessa forma a 37°C no corpo do hospedeiro. Adaptado de (STURME et al., 2011).

Em relação à estrutura do fungo, a parede celular do *P. brasiliensis* apresenta importantes funções estruturais e de interação célula-célula. Entretanto, a parede celular não possui composição homogênea entre as formas: na levedura, a parede celular é constituída por cerca de 81 % de carboidrato, 10% de aminoácidos e 11% de lipídeos, contendo prevalentemente α -glucana e quitina. Já na forma micelial, a parede do fungo apresenta cerca de 51% de carboidrato, 33% de aminoácidos e 8% de lipídeos, composta majoritariamente de polissacarídeos como β -glucana e quitina (DOS REIS ALMEIDA et al., 2014; PUCCIA et al., 2011). Estruturalmente, a presença de α -glucana na forma de levedura contém pequenas quantidades de ligações glicosídicas α -1,3- ou α -1,6-. Por outro lado, a parede celular micelial de β -glucana contém principalmente ligações β -1,3-glicosídicas, com pequena quantidade de ligações β -1,6-glicosídicas (TOMAZETT et al., 2005).

1.2. Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença causada pelo *P. brasiliensis* e afeta a população de vários países da América Latina, como Argentina, Venezuela, Colômbia e Brasil (Figura 2). Anualmente, estima-se que são diagnosticados cerca de um a três novos casos a cada 100.000 habitantes (BOCCA; AMARAL; TEIXEIRA, 2013). Prevalentemente, 80% dos casos ocorre no Brasil, totalizando 3.360 novos casos por ano (FERNANDES et al., 2017; MARTINEZ, 2015). Em relação à concomitância com outras doenças, a PCM é detectada em cerca de 15% dos pacientes com Tuberculose, 1,5% dos pacientes com AIDS e 5% dos pacientes com HIV (MARTINEZ, 2017). Entretanto, devido a não obrigatoriedade da notificação compulsória, as estimativas de pacientes são baseadas em registros de mortalidade e dados de hospitalização. Segundo Shikanai-Yasuda e colaboradores (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017a), entre janeiro de 1998 e dezembro de 2006, a PCM foi a micose responsável pelo maior número de hospitalizações no Brasil. Além disso, o Ministério da Saúde, entre 1980 e 1995, relatou a PCM como a doença com maior taxa de morte entre as micoses sistêmicas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017b).

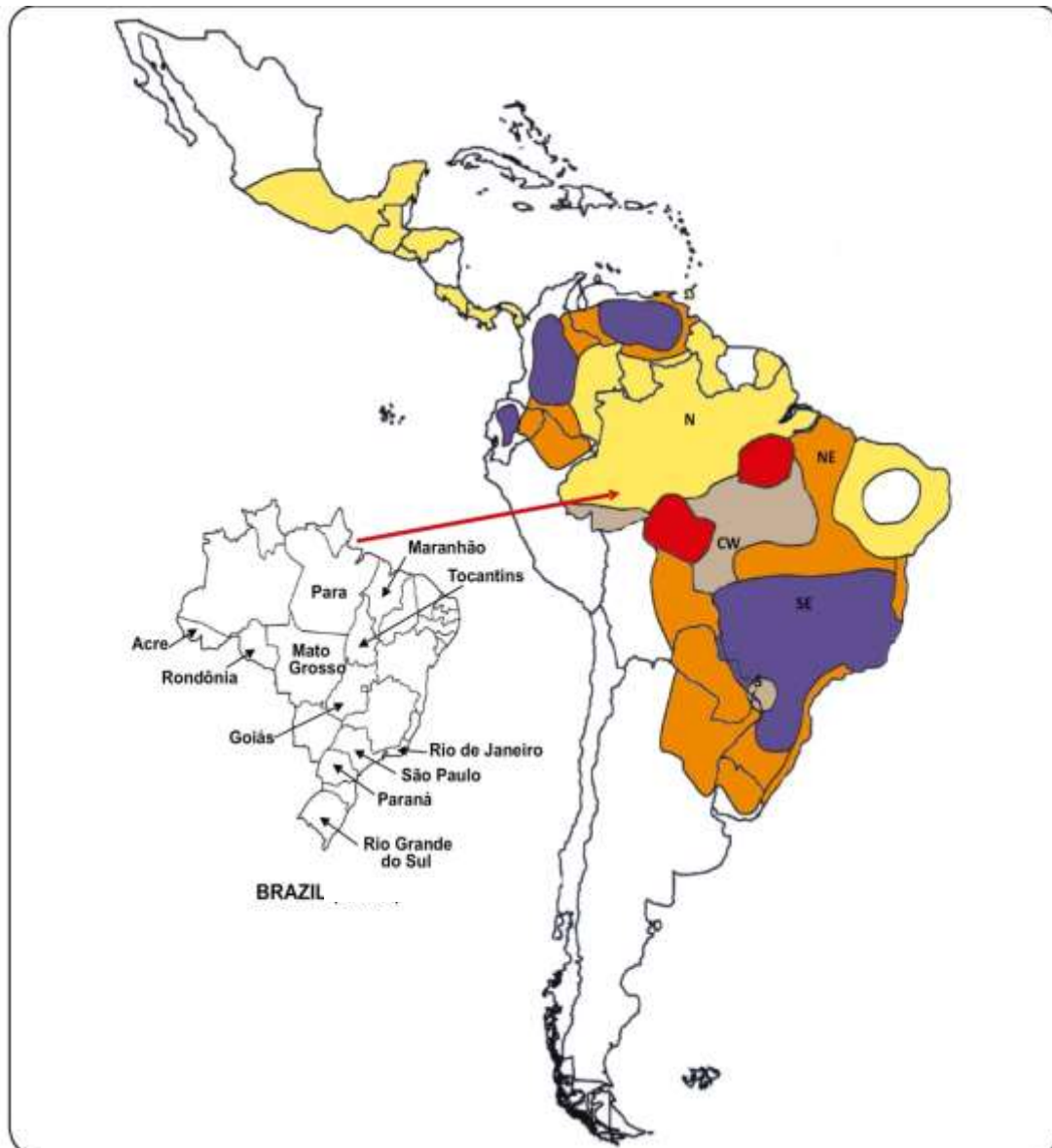


Figura 2. Incidência da PCM em países da América Latina. A imagem está representada por: (■) Primeira área reconhecida de alta endemicidade, (■) Alta endemicidade observada desde a última década do Século 20, (■) Área com pouca evidência de recente endemicidade crescente, (■) Áreas de endemicidade moderada, (■) Baixa endemicidade, (□) Ausência de casos ou casos raros de *Paracoccidioides brasiliensis*. Adaptado de (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017a).

A etiologia dessa doença decorre da inalação do *P. brasiliensis* na forma de hifa que no trato respiratório se modifica para levedura e se espalha de forma generalizada por diversos órgãos. Após a infecção, a PCM pode apresentar duas formas no hospedeiro: a forma aguda e a crônica. A forma aguda afeta crianças, adolescentes, adultos jovens e imunossuprimidos e é caracterizada por febre, perda de peso, anemia, aumento dos linfonodos, eosinofilia e, em metade dos

pacientes, problemas no trato digestório. Em relação à forma crônica, que afeta principalmente homens entre 30 e 60 anos, os pulmões são afetados na maioria dos pacientes. Pele, linfonodos e as mucosas do trato digestivo e respiratório também podem ser acometidos (BOCCA et al., 2013).

O sucesso da invasão e colonização do hospedeiro pelo fungo está diretamente relacionado à capacidade do patógeno de escapar das defesas do hospedeiro (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017). Em relação ao *P. brasiliensis*, além da mudança na composição da parede nas diferentes formas do fungo, a GTPase Cdc42 está envolvida no crescimento do tamanho da célula e mantém o multi-brotamento da levedura. Outro fator de virulência, a adesina gp43, (CAMACHO; NIÑO-VEGA, 2017) inibe a fagocitose, e a melanina, diminui a suscetibilidade a mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antifúngicos (TABORDA et al., 2008).

1.3. Resposta imunitária do hospedeiro na PCM

A resposta imunológica inata corresponde a primeira defesa do hospedeiro contra patógenos. Inicia-se, por exemplo, após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelos receptores presentes nos leucócitos, resultando na ativação de mecanismos efetores e na regulação de genes envolvidos na produção de citocinas (LOURES et al., 2011). Enquanto os leucócitos são recrutados em maior quantidade e aumentam a produção de IFN- γ , GM-CSF, ou IL-1 β , a ativação de macrófagos resulta na produção de espécies reativas, IL-12 e aumento da capacidade fagocítica (CALICH et al., 2008), determinando o tipo de polarização de linfócitos (Th1, Th2 ou Th17). Um perfil de resposta Th1 resultará na produção de IFN- γ e ativação de macrófagos, enquanto um perfil de resposta Th2 induzirá a produção de IL-4 e ativação de células B, e conseqüentemente produção de imunoglobulinas. Já o perfil Th17 resulta na produção de IL-17 e ativação de neutrófilos, que disparam mecanismos efetores de defesa como produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e Armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (MENDES et al., 2017).

Na PCM, o combate a infecção pelo fungo se caracteriza distintamente entre as formas da doença. Na forma aguda a resposta é caracterizada por um perfil Th2, com produção de citocinas associadas a susceptibilidade à doença como IL-4, TGF- β e IL-10; enquanto na forma crônica, há uma resposta Th1 com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-17, caracterizando-se como um perfil de resistência ao parasito (ALVES et al., 2018).

1.4. Papel dos neutrófilos na infecção por *P. brasiliensis*

Originários de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, os neutrófilos são as células brancas mais abundantes do sangue periférico humano, com produção diária de cerca de 1×10^{11} células. Esses leucócitos possuem de 12 μm a 15 μm de diâmetro e núcleo segmentado em três a cinco lóbulos conectados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI; 2011).

Na ausência de infecções ou injúrias, os neutrófilos circulam pela corrente sanguínea e podem, por capilaridade, migrar para o tecido intersticial de determinados órgãos ou continuar no sistema circulatório (PRUCHNIAK; ARAZNA; DEMKOW, 2013). Em média, seis horas após a produção desses polimorfonucleares, as células não recrutadas iniciam o processo de morte celular programada e são ingeridas por macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI; 2011).

Entretanto, na presença de patógenos, os neutrófilos são recrutados para os locais da infecção em um processo que envolve múltiplas moléculas (Figura 3). O reconhecimento de patógenos resulta, por estimulação de mediadores inflamatórios, na expressão de selectinas na superfície de células endoteliais, o que permite a fixação e rolagem dos neutrófilos pelo vaso sanguíneo.

As integrinas presentes na superfície dos neutrófilos auxiliam na adesão ao vaso sanguíneo e as quimiocinas estimulam a transmigração do neutrófilo para o local da infecção (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Após o reconhecimento de PAMPs por Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) presentes nos neutrófilos, mecanismos de defesa como desgranulação,

fagocitose, NETs e produção de citocinas são ativados, resultando na eliminação do patógeno.

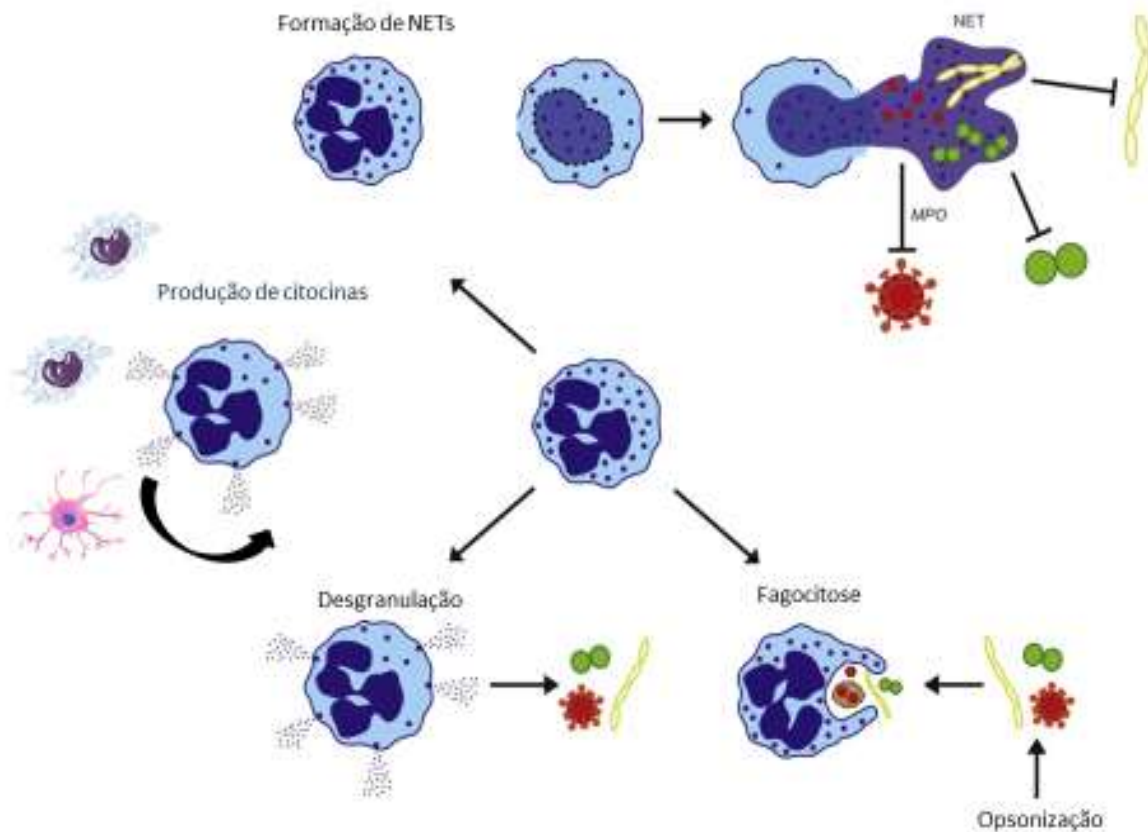


Figura 3. Defesas desenvolvidas pelos neutrófilos contra patógenos. Para combater patógenos, os neutrófilos possuem como mecanismos a formação de Nets, que prendem ou neutralizam os patógenos em redes constituídas de DNA nuclear e grânulos. Além de auxiliar na formação de Nets, os grânulos estão presentes no processo de desgranulação, onde seu conteúdo é dispensado extracelularmente por exocitose, auxiliando na eliminação de agentes patogênicos. Outros mecanismos de eliminação de patógenos desenvolvidos pelos neutrófilos são a produção de citocinas e a fagocitose, onde o neutrófilo engloba o patógeno, posteriormente digerido e eliminado-o pelo processo de digestão celular. Adaptado de (CORTJENS; WOENSEL; BEM, 2016).

Internamente os neutrófilos possuem grande quantidade de grânulos, que são formados ao longo do seu desenvolvimento. De acordo com Cowland (COWLAND; BORREGAARD, 2016), embora não esteja definido o local de produção dos grânulos (medula óssea ou em neutrófilos circulantes), a maior parte do RNAm para proteínas granulares estão ausentes nos neutrófilos

circulantes. Os grânulos se diferenciam em quatro tipos: grânulos azurófilos, que são os primeiros grânulos formados durante a maturação dos neutrófilos e contém mieloperoxidase (MPO), grânulos específicos que contém lactoferrina e lisozima, grânulos terciários (gelatinase) e vesículas secretórias (AMULIC et al., 2012). Seguidamente à ativação celular, os grânulos presentes no interior dos neutrófilos se fundem com a membrana celular e liberam seu conteúdo nos vacúolos fagocíticos e também para o meio extracelular, criando assim um ambiente desfavorável para o patógeno. Além disso, alguns componentes dos grânulos possuem atividade antimicrobiana, como a lisozima que degrada a parede das bactérias e, a lactoferrina, que altera o crescimento e aumenta a permeabilidade da membrana bacteriana (AMULIC et al., 2012). Além do processo de desgranulação, os grânulos estão presentes na formação das NETs, que adicionalmente são constituídas de DNA, histonas e DNA mitocondrial. Posteriormente à ativação dos neutrófilos, o núcleo dessas células se torna arredondado, a cromatina nuclear é descondensada e há liberação das redes que pode resultar na captura e morte de patógenos (JAILLON et al., 2013).

Alternativamente aos mecanismos citados, após o reconhecimento de fungos e bactérias por receptores presentes na superfície dos neutrófilos, essas células opsonizam e fagocitam esses patógenos, produzindo ROS como mecanismo de eliminação dos micro-organismos presentes no fagossomo. A NADPH-oxidase transfere elétrons para o oxigênio intracelular, e assim produz superóxidos instáveis que rapidamente formam produtos secundários, como ácido hipocloroso. As diferentes espécies reativas de oxigênio por fim induzem a oxidação de aminoácidos e proteínas que, além de contribuir para a eliminação de micro-organismos, pode resultar em injúria tecidual (KOBAYASHI; MALACHOWA; DELEO, 2018).

Essencial para a regulação do sistema imune, a produção de citocinas são determinantes no curso da infecção e eliminação de patógenos. Após o reconhecimento de PAMPs por PRRs presentes na superfície celular (THOMAS; SCHRODER, 2013), os neutrófilos são capazes de produzir citocinas sintetizadas “de novo” ou pré-formadas em nível basal (NAEGELEN et al., 2015), como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-23, IL-27e TGF- β . (TECCHIO; MICHELETTI; CASSATELLA, 2014).

Em relação à infecção por *P. brasiliensis*, a resposta desenvolvida pelos neutrófilos ainda não é consenso. Alguns autores mostraram que, no processo infeccioso, os neutrófilos podem favorecer o crescimento do fungo. Costa e colaboradores observaram que a produção de IL-10 resulta na diminuição da ativação de neutrófilos e produção de H₂O₂, reduzindo a capacidade de eliminação do *P. brasiliensis* pelos neutrófilos (COSTA et al., 2007). Acorci e co-autores, mostraram que a produção de IL-8 por neutrófilos diminui a apoptose celular, permitindo ao *P. brasiliensis* se estabelecer por mais tempo dentro da célula (ACORCI et al., 2009). Além disso, Puerta-Arias e colaboradores observaram que o tratamento de neutrófilos com anticorpo específico resulta na depleção das células, diminuição da resposta inflamatória e da formação de grânulos na infecção crônica (PUERTA-ARIAS et al., 2016). Entretanto, outros autores observaram que a resposta desenvolvida pelos neutrófilos favorece a eliminação do fungo. Pino-Tamayo e co-autores mostraram que a depleção de neutrófilos resulta na diminuição da produção de IL-17 e IFN- γ e deficiência na eliminação do fungo (PINO-TAMAYO et al., 2016). Em conformidade, Balderramas e co-autores mostraram que os neutrófilos desempenham importante papel na infecção pelo *P. brasiliensis*, produzindo citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, e modulando a resposta imune contra o fungo (BALDERRAMAS et al., 2014). Além disso, de acordo com Mejía e colaboradores, a produção de ROS e NETs pelos neutrófilos previnem a disseminação do patógeno, eliminando-o (MEJÍA et al., 2015).

1.5. Influência do gênero na resposta imune

A produção dos hormônios sexuais, como o estrógeno e a progesterona, advém da conversão do colesterol por ação de enzimas, como a aromatase (FERRERO et al., 2014). Liberado na primeira fase do ciclo menstrual, o estrógeno, embora controle o desenvolvimento e manutenção das características femininas, também é produzido em pequenas quantidades pelos homens, exercendo papel no metabolismo de ossos e gordura (VRTAČNIK et al., 2014).

Em relação às células do sistema imune, os esteroides sexuais se ligam a receptores específicos presentes nas células e se translocam para o núcleo da célula, atuando sobre fatores transcricionais que alteram diretamente a expressão de genes que codificam citocinas (VOM STEEG; KLEIN, 2017).

Recentemente, estudos vêm mostrando a importância da atuação desses hormônios na resposta imune, destacando as diferenças no perfil de resposta entre homens e mulheres, como mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Diferenças na resposta imune entre homens e mulheres

Componente Imune	Característica	Gênero	Referência
Células Dendríticas	Ativação	↑Mulheres	(KOVATS, 2015) (CAPONE et al., 2018)
	Produção de IFN- α	↑Mulheres	
Células NK	Habilidade de lise	↑Homens	(BOUMAN; JAN HEINEMAN; FAAS, 2005)
	Número de Células	↑Homens	
Células T	Ativação de Células CD4+	↑Mulheres	(KLEIN; FLANAGAN, 2016)
	Ativação de Células CD8+	↑Homens	
Citocinas	Pró-inflamatórias	↑Mulheres	(CAPONE et al., 2018)
	Anti-inflamatórias	↑Homens	
Eosinófilos	Número de Células	↑Mulheres	(KESELMAN; HELLER, 2015) (BUPP et al., 2018)
	Viabilidade	↑Mulheres	
Macrófagos	Expressão de TLR4	↑Mulheres	(JAILLON; BERTHENET; GARLANDA, 2017)
	Polarização M1	↑Homens	
	Polarização M2	↑Mulheres	
Neutrófilos	Capacidade Fagocítica	↑Mulheres	(ROVED; WESTERDAHL; HASSELQUIST, 2016) (KLEIN; FLANAGAN, 2016)
	Capacidade Fagocítica	↑Mulheres	
	Número de Células	↑Mulheres	
Neutrófilos	Apoptose	↑Mulheres	(JAILLON; BERTHENET; GARLANDA, 2017) (ROVED; WESTERDAHL; HASSELQUIST, 2016)
	Proliferação	↑Homens	

1.6. Influência do gênero na PCM

Em relação ao *P. brasiliensis*, estudos têm sugerido que o estrógeno tem um importante papel na resposta ao fungo; Restrepo e colaboradores (RESTREPO et al., 1984) descreveram o hormônio feminino como inibidor da transição do *P. brasiliensis* de micélio para levedura, reduzindo a propagação da doença nas mulheres em idade reprodutiva. Em 2002, Aristizábal e colaboradores (ARISTIZÁBAL et al., 2002), mostraram por ensaios *in vivo* que, camundongos fêmeas após infecção por *P. brasiliensis*, não formavam granulomas nos pulmões e apresentavam reação crônica inflamatória mínima, assim como os animais machos castrados após administração de estrógeno. Em continuidade a esses resultados, Pinzan e colaboradores, mostraram que a produção de IFN- γ é maior em fêmeas e machos castrados após administração de estrógeno, enquanto a produção de IL-10 e IL-4 são maiores em animais machos (PINZAN et al., 2010).

Dessa forma, sabendo-se que a presença do hormônio estrógeno diminui a incidência de PCM nas mulheres em idade reprodutiva e, considerando a importância dos neutrófilos na resposta contra o *P. brasiliensis*, no presente trabalho investigamos o papel dos neutrófilos na infecção pelo *P. brasiliensis* entre gêneros, e a possível atuação do estrógeno no curso da infecção.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

- Comparar o perfil de resposta dos neutrófilos obtidos de doadores do sexo masculino e feminino, frente a infecção por *P. brasiliensis*, com ênfase no efeito do hormônio estrógeno no combate dessa infecção.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a produção de citocinas e ROS por neutrófilos de homens e mulheres infectados com *P. brasiliensis*.

- Comparar a capacidade dos neutrófilos de fagocitar e matar o *P. brasiliensis* entre gêneros.

- Comparar a resposta mediada por neutrófilos na infecção por *P. brasiliensis* na ausência ou presença do hormônio sintético β -Estradiol.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Recrutamento dos participantes do estudo

Foram recrutados alunos e funcionários dos programas de pós-graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. No estudo foram incluídos 38 participantes dos sexos feminino e masculino entre 23 e 35 anos de idade com boa saúde e que não utilizaram, pelo menos 24 horas antes da coleta, medicamentos que pudessem influenciar no resultado dos experimentos, cigarro ou bebida alcoólica.

Os participantes do sexo feminino estavam entre o primeiro e 15º dia do ciclo menstrual ou utilizavam anticoncepcional a base de estrógeno na data da coleta. Todos os participantes foram recrutados de forma direta e estavam de acordo com o Termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2).

3.2. Obtenção da amostra e purificação dos neutrófilos

A amostra foi coletada por membros da equipe com experiência prévia em coleta de sangue no laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia, onde a pesquisa foi desenvolvida. Foi coletado de cada participante, pelo sistema a vácuo, o volume de 50 ml de sangue periférico, distribuído em cinco tubos: quatro tubos com anticoagulante (heparina) e um tubo com gel separador para obtenção de soro. Posteriormente o sangue com anticoagulante foi purificado como descrito por Girard e colaboradores para obtenção dos neutrófilos (GIRARD et al., 1995). A amostra foi centrifugada a 450 g por 15 minutos e após a retirada do plasma, foram adicionados 10 ml de Solução Balanceada de Hank's e Ácido etilenodiamino tetra-acético (HBSS-EDTA) 1x e 10 ml de Dextran 6% para remoção das ligações de Cálcio e precipitação dos eritrócitos, respectivamente. Após repouso da amostra por cerca de 40 minutos o sobrenadante foi coletado e a este foi adicionado HBSS-EDTA 1x e 10 ml de Ficoll para o isolamento de células mononucleares por formação de gradiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 270 g por 30 minutos e as camadas onde se encontravam o

sobrenadante (plasma) e o anel celular (Células mononucleares - PBMC) foram descartados, restando somente células vermelhas e neutrófilos. Com o objetivo de lisar os eritrócitos, foram adicionados 35 ml de água estéril e após 15 segundos, 4,5 ml de HBSS 10x. A amostra foi novamente centrifugada e ressuspensa em 10 ml de meio RPMI incompleto para contagem celular. O sangue coletado em tubo com gel separador foi centrifugado a 1700 g por 10 minutos e o soro transferido para eppendorfs estéreis de 1,5 ml. Os eppendorfs foram colocados em banho-maria a 56 °C por 30 minutos para desnaturar proteínas que poderiam interferir nos resultados.

3.3. Manutenção do *Paracoccidioides brasiliensis*

O *P. brasiliensis* foi mantido em meio Caldo cérebro coração (BHI) suplementado com 1 % glicose e 1.5 % v/v ágar com repiques a cada três dias. Três dias antes dos ensaios de ROS, Fagocitose, Killing e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), o *P. brasiliensis* foi cultivado em meio BHI líquido a 37 °C e 180 rpm. Posteriormente às 72 horas de cultivo, o fungo foi centrifugado a 10000 rpm por um minuto, lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, centrifugado novamente e ressuspensa em PBS estéril. Após contagem em microscópio de luz o *P. brasiliensis* foi mantido a 4 °C até sua utilização.

3.4. Quantificação da produção de ROS

Os ensaios de quantificação de quimiluminescência foram realizados de acordo com (LUCISANO-VALIM et al., 2002), com modificações. Os neutrófilos purificados foram incubados (1×10^5 /poço) com a sonda quimioluminescente luminol (0,1 mM) em microplacas de 96 poços por três minutos e posteriormente misturados, em duplicata, à Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), *P. brasiliensis* (MOI 10:1) ou HBSS. A luminescência foi quantificada em luminômetro de microplaca (LB 960 Centro, Berthold Technologies, Germany) durante 60 minutos a 37 °C. A área sobre a curva foi utilizada para determinar a quantidade de ROS produzida pelos neutrófilos.

3.5. Recuperação de leveduras em ensaios de Fagocitose e Killing por Unidades formadoras de Colônia (UFC)

Para avaliar a capacidade dos neutrófilos de fagocitar e matar o fungo por UFC, 1×10^5 neutrófilos foram incubados com 2×10^4 *P. brasiliensis* em eppendorf de 1,5 ml durante 15 minutos em shaker a 37 °C e 180 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas por dez minutos a 300 g, lavadas com HBSS e novamente centrifugadas.

Para o ensaio de fagocitose, as células co-incubadas com o fungo por 15 minutos foram lisadas com água estéril e plaqueadas em duplicata em meio BHI suplementado com 1 % glicose e 1,5 % v/v ágar. Cada condição foi realizada em triplicata, totalizando seis placas por número amostral.

Para o ensaio de Killing, após a co-incubação com o *P. brasiliensis* e posterior centrifugação, as células foram ressuspendidas em HBSS e mantidas por três horas em shaker a 37 °C e 180 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas por dez minutos a 300 g e lavadas com HBSS. Após segunda centrifugação, as células foram lisadas com água estéril e plaqueadas em meio BHI suplementado com 1 % glicose e 1.5 % v/v ágar, de forma equivalente ao ensaio de Fagocitose. Cada condição foi realizada em triplicata, totalizando seis placas por número amostral. As placas dos ensaios foram vedadas com filme plástico, para evitar o ressecamento do meio de cultura, e mantidas a 37 °C em estufa de CO₂ entre sete e 10 dias para contagem das colônias.

Nos ensaios que utilizaram o hormônio sintético β -Estradiol (1×10^{-10} nM/ml), anteriormente a incubação com o fungo, os neutrófilos foram incubados a 37 °C por 30 minutos em estufa de CO₂ com HBSS e β -Estradiol ou somente com HBSS.

3.6. Recuperação de leveduras em ensaios de Fagocitose e Killing por Citometria de Fluxo

Para avaliar a capacidade dos neutrófilos de fagocitar e matar o fungo por Citometria de Fluxo, *P. brasiliensis* (2×10^4 /eppendorf) foram incubados com Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) (100 μ M/ml) no escuro a 37°C por 30 minutos sob agitação. Posteriormente o fungo foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm, lavado com PBS e ressuspendido em HBSS. Semelhantemente aos ensaios de Fagocitose e *Killing* por UFC, 1×10^5 neutrófilos foram incubados a 37°C por 30 minutos em estufa de CO₂ com o hormônio sintético β -Estradiol (1×10^{-10} nM/ml) ou somente com HBSS. Sequencialmente, os neutrófilos (MOI 1:5) foram adicionados em eppendorf de 1,5 ml com 2×10^4 *P. brasiliensis* durante 15 minutos em shaker a 37°C e 180 rpm. As células foram centrifugadas por dez minutos a 300 g, lavadas com PBS e novamente centrifugadas. Para o ensaio de fagocitose as células foram fixadas em Formol 3% e mantidas no escuro a 4°C até análise por citometria de fluxo, utilizando o equipamento GuavaEasyCyte Mini (Millipore, EUA). Cada condição foi realizada em triplicata.

Para o ensaio de Killing, após os 15 minutos de co-incubação com o fungo e posterior centrifugação, as células foram ressuspendidas em HBSS e mantidas por três horas em shaker a 37°C e 180 rpm. Posteriormente, as células foram centrifugadas por dez minutos a 300 g e lavadas com PBS. Após segunda centrifugação as células foram fixadas em Formol 3% e mantidas no escuro a 4°C até análise por citometria de fluxo, utilizando o equipamento GuavaEasyCyte Mini (Millipore, EUA). Cada condição foi realizada em triplicata.

3.7. Dosagem de TNF, IL-8, TGF- β e IL-1 β a partir do sobrenadante de cultura de neutrófilos

Os neutrófilos purificados, após contagem em Microscópio de Luz, foram centrifugados, ressuspendidos em meio RPMI incompleto e plaqueados na concentração de 2×10^6 células/poço. Juntamente com as células, foram adicionados em toda a placa o soro (5% do volume total) dos doadores em seus respectivos neutrófilos purificados; e em triplicata, meio RPMI incompleto, lipopolissacarídeo (LPS) (1 μ g/ml) ou *P. brasiliensis* (MOI 1:5).

Nos ensaios em que o hormônio sintético β -Estradiol (1×10^{-10} nM/ml) foi utilizado, anteriormente a incubação com o fungo, os neutrófilos foram incubados a 37 °C por 30 minutos em estufa de CO₂ com meio RPMI e β -Estradiol, ou somente com meio RPMI incompleto. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ por 20 horas. Após esse período o sobrenadante foi congelado. O ensaio foi realizado em triplicata.

As dosagens de citocinas foram realizadas por ELISA utilizando-se o sistema OptEIAM SET: Human (Pharmingen, San Diego, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos de captura foram diluídos em tampão carbonato (0,1 M, pH 9,6) e incubados overnight a 4°C. Posteriormente as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05 % e incubadas com tampão de bloqueio contendo PBS e 10 % de SFB por 1 hora a temperatura ambiente. Após o tempo de bloqueio, as placas foram lavadas com PBS-T e os sobrenadantes da cultura celular foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Sequencialmente, após cinco lavagens, o anticorpo de detecção conjugado com peroxidase foi adicionado a placa e após 1 hora no escuro a temperatura ambiente, as placas foram lavadas e reveladas pela adição de uma solução contendo tetrametilbenzidina (TMB), tampão TMB e H₂O₂. Cerca de 30 minutos depois a reação foi bloqueada com uma solução de ácido sulfúrico e água e a leitura realizada a $\lambda = 450$ nm em leitor de microplacas (Power WaveX – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC).

3.8. Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Prisma 6.0 (GraphPad Software). Os testes utilizados foram os testes Test t de Student ou One-Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Diferenças com o $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Os neutrófilos das mulheres são mais eficientes em eliminar o *P. brasiliensis*.

A PCM não está na lista nacional de notificação compulsória de doenças e, dessa forma, poucos são os registros da mesma no país. Contudo, acredita-se que o número de homens infectados pelo fungo *P. brasiliensis* é superior ao número de mulheres infectadas. Complementarmente, evidências de estudos recentes têm sugerido que homens e mulheres respondem distintamente a agentes patogênicos (CAPONE et al., 2018). Nesse sentido, no presente trabalho buscamos verificar se neutrófilos obtidos de homens respondem diferentemente de neutrófilos femininos a infecção *in vitro* por *P. brasiliensis*.

Inicialmente, avaliamos a capacidade fagocítica dos neutrófilos após incubá-los por 15 minutos, na proporção de cinco neutrófilos para cada fungo. Verificamos que não existe diferença significativa na capacidade fagocítica entre gêneros (Figura 4A).

Para avaliar a capacidade das células de eliminar *P. brasiliensis*, igualmente o ensaio anterior, os neutrófilos foram co-incubados com fungo por 15 minutos e, após a lavagem para remoção das leveduras não internalizadas, as células foram incubadas por três horas adicionais. As análises de UFC revelaram que uma quantidade significativamente maior de colônias de *P. brasiliensis* foi recuperada dos neutrófilos obtidos de homens (Figura 4B), mostrando assim, maior eficiência dos neutrófilos femininos de eliminar o fungo.

Posteriormente, analisamos a habilidade fungicida dos neutrófilos ao subtrair a quantidade de fungos recuperada após três horas, da quantidade de *P. brasiliensis* fagocitada nos 15 minutos iniciais (Figura 4C). Observamos que os neutrófilos dos homens possuem menor habilidade fungicida quando comparado aos neutrófilos femininos, sendo a habilidade fungicida dos neutrófilos das mulheres 27,8% maior do que a habilidade fungicida dos homens.

Os dados individuais do número de colônias recuperadas após 15 minutos e após três horas de co-incubação dos neutrófilos com o fungo estão representados graficamente na Figura 5A e, complementarmente mostram a

diferença entre os tempos, significativa para grupo feminino, indicando maior eficiência em eliminar o fungo quando comparado ao grupo masculino. Por fim, observamos no gráfico da Figura 5B a taxa de redução da carga fúngica (killing/fagocitose) de neutrófilos de homens e mulheres. Verificamos que enquanto 64% dos homens aumentaram a carga fúngica, após três horas de co-incubação com *P. brasiliensis*, dentre os neutrófilos das mulheres, apenas 38% das doadoras apresentaram esse aumento. Na verdade, a maioria das mulheres apresentaram redução da carga fúngica: 31% das doadoras reduziram a metade ou mais a carga fúngica; 23% reduziram entre 26 a 50% da carga fúngica e, 8% diminuíram de 1 a 25% dessa carga de *P. brasiliensis*. No que diz respeito a redução da carga fúngica pelos neutrófilos dos homens, 18% deles diminuíram entre 1 a 25%, enquanto os 18% restante diminuíram a carga fúngica inicial pela metade.

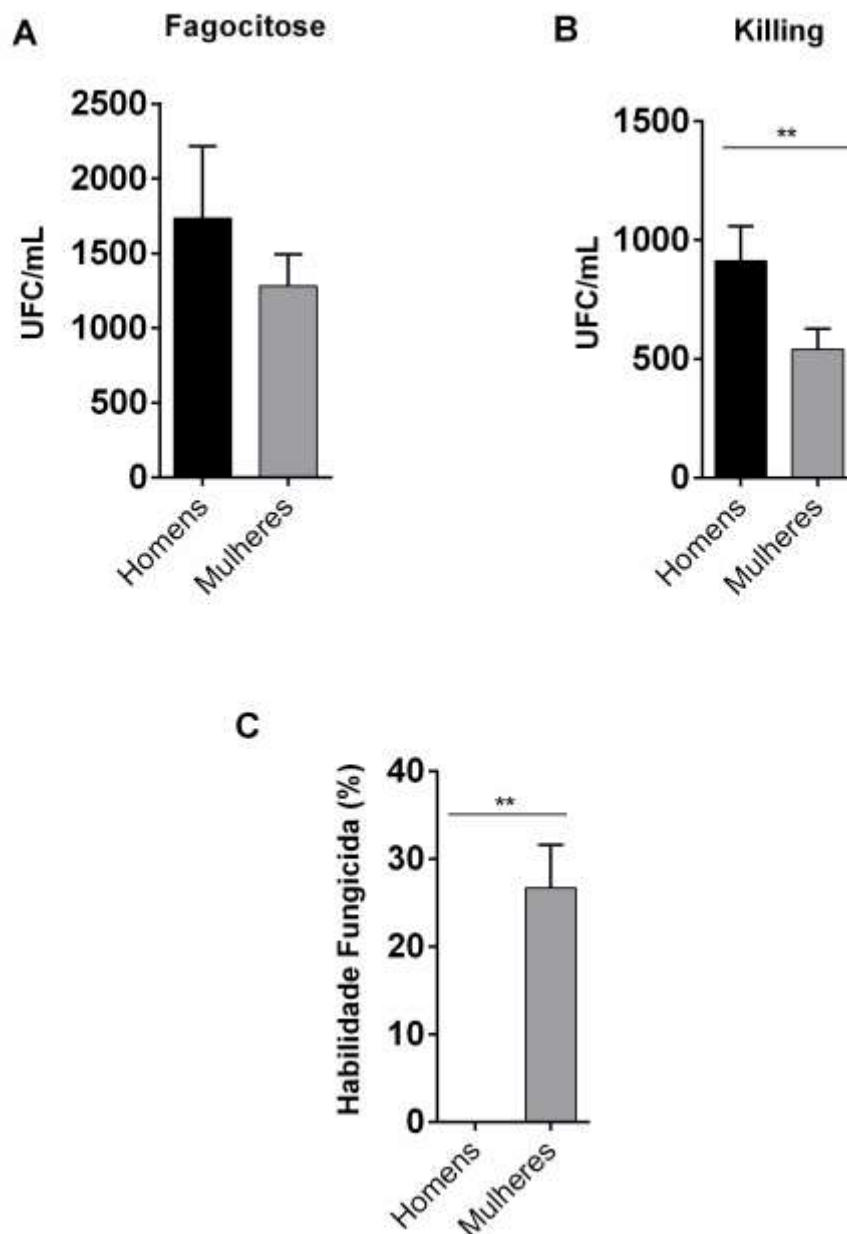


Figura 4. Os neutrófilos das mulheres eliminam o *P. brasiliensis* de maneira mais eficiente que os neutrófilos dos homens. A: Número de colônias de *P. brasiliensis* fagocitadas após 15 minutos de co-incubação com os neutrófilos. **B:** Número de colônias recuperadas após três horas de co-incubação dos neutrófilos com *P. brasiliensis*. **C:** Atividade fungicida (Taxa redução da carga fúngica). Razão de UFC 3h/15min de cada indivíduo. Os resultados representam a média e o desvio padrão de treze doadores do sexo masculino e treze doadores do sexo feminino (**) $p < 0,05$. Test t de Student.

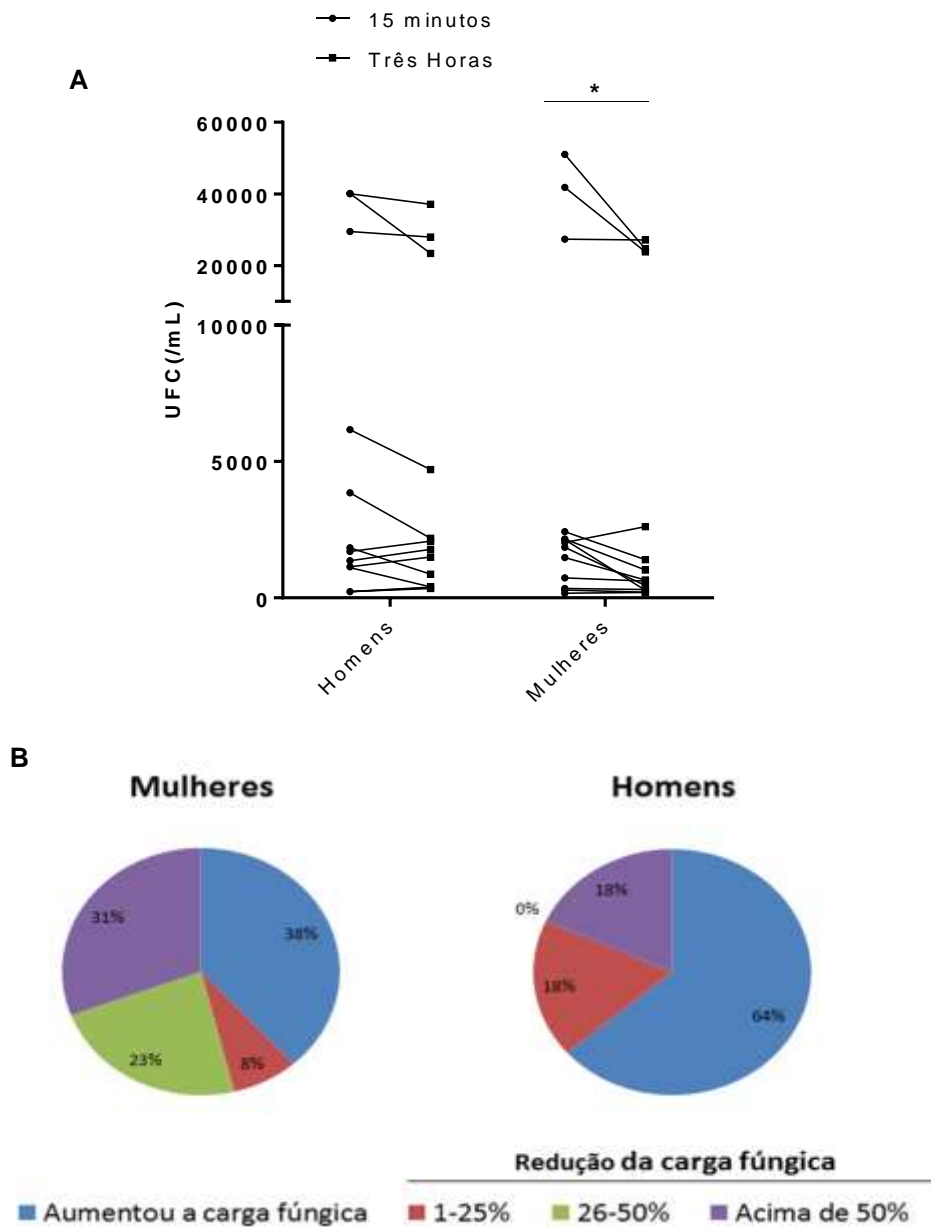


Figura 5. Os neutrófilos das mulheres eliminam o fungo internalizado de forma mais eficiente. A: Capacidade dos neutrófilos de homens e mulheres em eliminar o *P. brasiliensis* fagocitado após três horas de co-incubação. **B:** Frequência da carga fúngica de neutrófilos de homens e mulheres após 15 minutos e 3 horas de co-incubação com *P. brasiliensis*. Os resultados representam a média e o desvio padrão de treze doadores do sexo masculino e treze doadores do sexo feminino. Teste t de Student.

4.2. Neutrófilos de homens e mulheres produzem ROS de forma equivalente

Sabendo-se que os neutrófilos das mulheres, quando comparados aos neutrófilos dos homens, são mais eficientes em eliminar o *P. brasiliensis*, propusemo-nos a investigar os mecanismos envolvidos na resposta ao fungo. Considerando que a produção de ROS pelos neutrófilos é uma importante resposta para eliminação de patógenos, inicialmente investigamos diferenças quantitativas na produção desse composto químico entre homens e mulheres.

Para determinar se os neutrófilos produzem ROS em níveis equivalentes, as células de homens e mulheres foram incubadas com a sonda luminol e infectadas com *P. brasiliensis*. A quimiluminescência foi monitorada durante 60 minutos.

Como observado na Figura 6, os neutrófilos de homens e mulheres produziram níveis semelhantes de ROS quando infectados com *P. brasiliensis*. A quimiluminescência detectada através do luminol mostrou que a produção de ROS pelos neutrófilos das mulheres ($1,04 \times 10^5 \pm 1,94 \times 10^4$ AUCxCPS) foi equivalente a 88% do composto químico produzido pelos neutrófilos dos homens ($1,2 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^4$ AUCxCPS).

Quando comparamos a produção de ROS pelos neutrófilos dos homens infectados com os neutrófilos incubados somente com HBSS, foram detectados níveis similares ($1,1 \times 10^5 \pm 1,94 \times 10^4$ e $1,2 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^4$ AUCxCPS respectivamente), assim como entre o controle negativo e os neutrófilos infectados das mulheres ($1,1 \times 10^5 \pm 1,66 \times 10^4$ e $1,04 \times 10^5 \pm 1,94 \times 10^4$ AUCxCPS respectivamente).

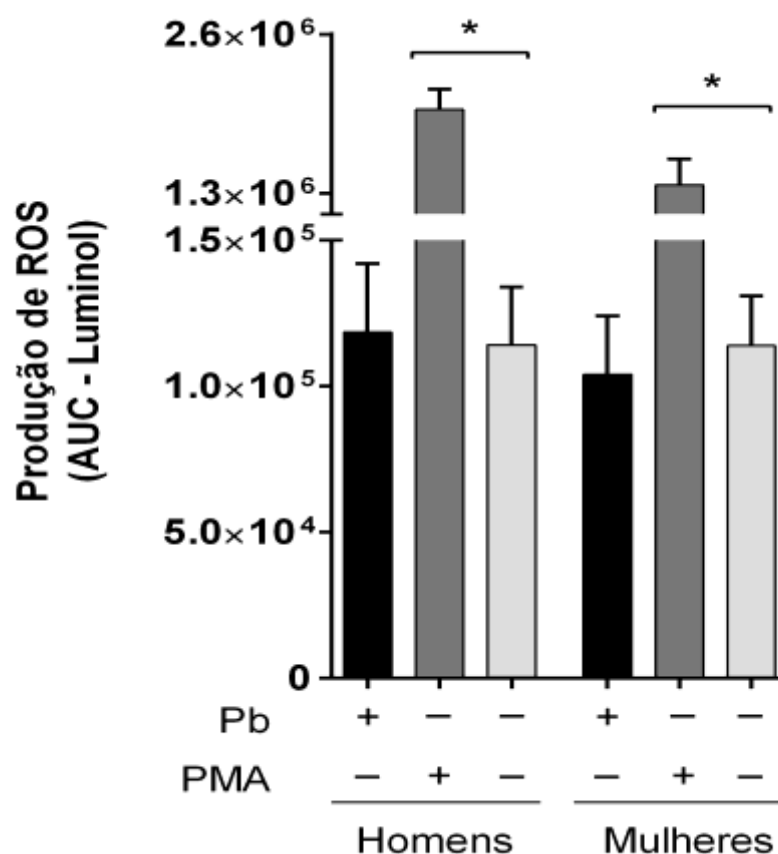


Figura 6. Neutrófilos de homens e mulheres produziram quantidades equivalentes de ROS. Neutrófilos de homens e mulheres foram co-incubados com *P. brasiliensis* (MOI 10:1), PMA ou meio. A produção de ROS foi quantificada por reação com luminol, produzindo fótons luminescentes (CPS). A produção de ROS não foi numericamente diferente entre os neutrófilos de homens e mulheres. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados representam a média e o desvio padrão de dez doadores do sexo masculino e dez doadores do sexo feminino. Teste One-Way ANOVA. * Representa diferença significativa entre os valores do PMA e meio.

4.3. A produção de citocinas pelos neutrófilos difere entre os homens e mulheres

Embora os neutrófilos das mulheres sejam mais eficientes em matar o fungo quando comparados aos neutrófilos dos homens, a produção de ROS não se mostrou alterada entre os gêneros. Desse modo, para estudarmos o perfil de resposta dos neutrófilos contra a infecção pelo *P. brasiliensis*, analisamos de

forma subsequente o perfil de citocinas produzidas pelos neutrófilos de homens e mulheres.

Para avaliarmos o efeito imunomodulador dos neutrófilos entre os gêneros, as células foram co-incubadas com *P. brasiliensis* durante 20 horas e o sobrenadante foi coletado para o ensaio de ELISA.

Como observado na Figura 7A, quando incubados com *P. brasiliensis*, os neutrófilos das mulheres produziram quantidades significativamente maiores ($12.9892 \pm 3,6 \text{ pg/mL}$) de TNF em comparação às quantidades produzidas pelos homens ($0 \pm 3.36 \text{ pg/mL}$).

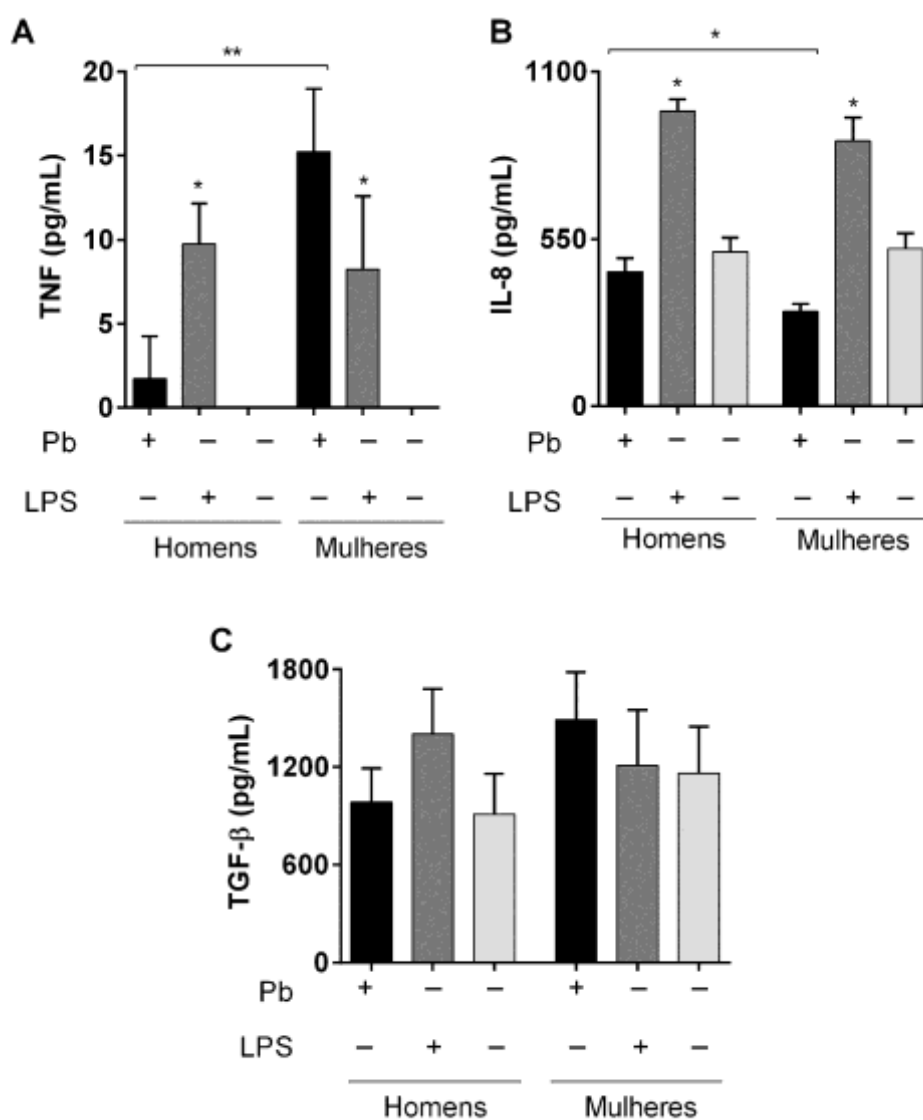


Figura 7. Os neutrófilos das mulheres produziram níveis mais altos de TNF e mais baixos de IL-8. A, B e C: Níveis de TNF, IL- 8 e TGF – β, respectivamente, detectados em sobrenadante de cultura de neutrófilos infectados com *P. brasiliensis* ou estimulados com LPS ou meio de doadores do

sexo feminino e masculino. Os resultados representam a média e o desvio padrão de nove doadores do sexo masculino e oito doadores do sexo feminino. (**) $p < 0,05$. Teste One-Way ANOVA. * Representa diferença significativa entre os valores do LPS e meio.

Em relação à produção de IL-8, a Figura 7B mostra que os neutrófilos dos homens co-incubados com *P. brasiliensis* produziram quantidades significativamente maiores dessa citocina ($856.663 \pm 43.3 \text{ pg/mL}$), quando comparada aos neutrófilos das mulheres ($273.266 \pm 22.2 \text{ pg/mL}$). As células estimuladas com LPS produziram altas concentrações de IL-8, não havendo diferença entre os neutrófilos dos homens e das mulheres.

No que se refere à quantificação de TGF- β (Figura 7C), a resposta dos neutrófilos foi semelhante entre os gêneros. Enquanto os neutrófilos das mulheres produziram em média $1492 \pm 274,5 \text{ pg/mL}$, os neutrófilos dos homens produziram $1091.06 \pm 171.9 \text{ pg/mL}$ de TGF- β .

4.4. A adição do hormônio sintético β -estradiol potencializa a atividade microbicida de neutrófilos de homens, infectados com *P. brasiliensis*

Considerando a maior eficiência dos neutrófilos das mulheres em eliminar o *P. brasiliensis* e produzir a citocina pró-inflamatória TNF, a próxima etapa do trabalho foi analisar o papel do hormônio feminino estrógeno no perfil diferencial de resposta entre os gêneros.

Para isso, inicialmente adicionamos aos neutrófilos de homens e mulheres o hormônio sintético β -estradiol ($1 \times 10^{-10} \text{ nM/mL}$) e analisamos, por ensaio de CFU, a capacidade dos neutrófilos em fagocitar e eliminar o *P. brasiliensis* na presença, ou não, do β -estradiol sintético.

Como observado na Figura 8A, não verificamos diferença significativa na capacidade fagocítica dos neutrófilos de homens após a adição de β -estradiol.

No que se referem à capacidade de eliminar o fungo (Figura 8B), os neutrófilos dos homens se mostraram mais eficientes após a adição do β -estradiol; a quantidade de fungo eliminada na presença do hormônio sintético foi significativamente maior à quantidade eliminada na ausência do hormônio.

Posteriormente, analisamos a capacidade fungicida dos neutrófilos (Figura 8C) subtraindo a quantidade de fungo eliminada após três horas de co-incubação da quantidade de fungo fagocitada após 15 minutos. Como resultado, os neutrófilos dos homens aumentaram de forma significativa a capacidade fungicida após a adição de β -estradiol.

Em relação aos neutrófilos das mulheres (dados não mostrados na figura 8), não houve diferença na habilidade fungicida após a adição do hormônio sintético.

Sequencialmente, como forma de reiteração dos resultados observados por UFC, seguiu-se análise pela técnica de Citometria de Fluxo (FACs).

Para tanto, o *P. brasiliensis* foi marcado com CFSE (100 μ M/mL) e posteriormente co-incubado com os neutrófilos (MOI 1:5) para os ensaios de Fagocitose e *Killing*. As células foram fixadas e analisadas pelo Citômetro de Fluxo (Figura 9).

Na Figura 9A observa-se que não houve diferença significativa na quantidade de colônias fagocitadas pelos neutrófilos dos homens. No que diz respeito à adição do hormônio β -Estradiol aos neutrófilos, as células dos homens fagocitaram 96% dos fungos em relação à quantidade fagocitada pelos neutrófilos masculinos na ausência do hormônio sintético.

Em contrapartida, a quantidade de fungo eliminada pelos neutrófilos dos homens (Figura 9C) após a adição do β -Estradiol, foi significativamente maior quando comparada a quantidade eliminada na ausência do hormônio sintético. Dessa forma, os neutrófilos dos homens foram mais eficientes em controlar o crescimento do fungo após a adição do hormônio.

Em relação às mulheres, (dados não mostrados na figura 9) os neutrófilos fagocitaram quantidades equivalentes de fungo após a adição, ou não, do hormônio sintético. Em conformidade, a habilidade fungicida dos neutrófilos das mulheres não apresentou diferença significativa após a adição de β -Estradiol.

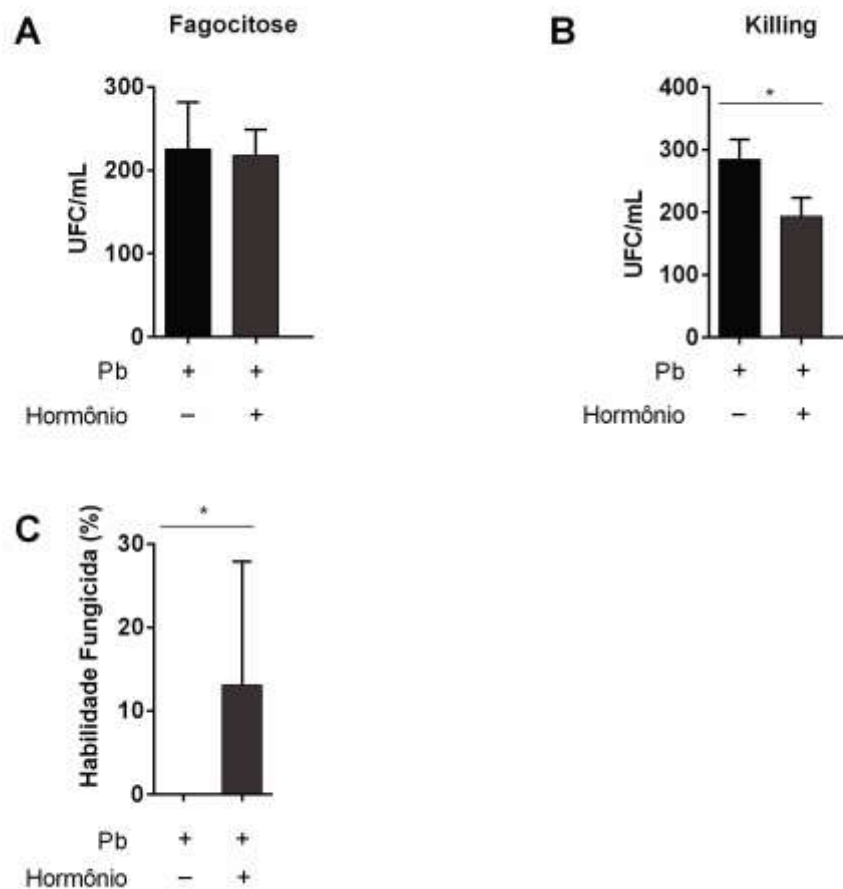


Figura 8. A habilidade fungicida dos neutrófilos dos homens foi maior após a adição do hormônio sintético β -Estradiol. A: Número de colônias fagocitadas após 15 minutos de incubação dos neutrófilos com *P. brasiliensis* e adição, ou não, de β -Estradiol. **B:** Número de colônias recuperadas após três horas de incubação dos neutrófilos com *P. brasiliensis* e adição, ou não, de β -Estradiol. **C:** Em porcentagem o número de colônias de *P. brasiliensis* fagocitadas – número de colônias de *P. brasiliensis* recuperadas. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três doadores do sexo masculino (*) $p < 0,05$. Teste t de Student.

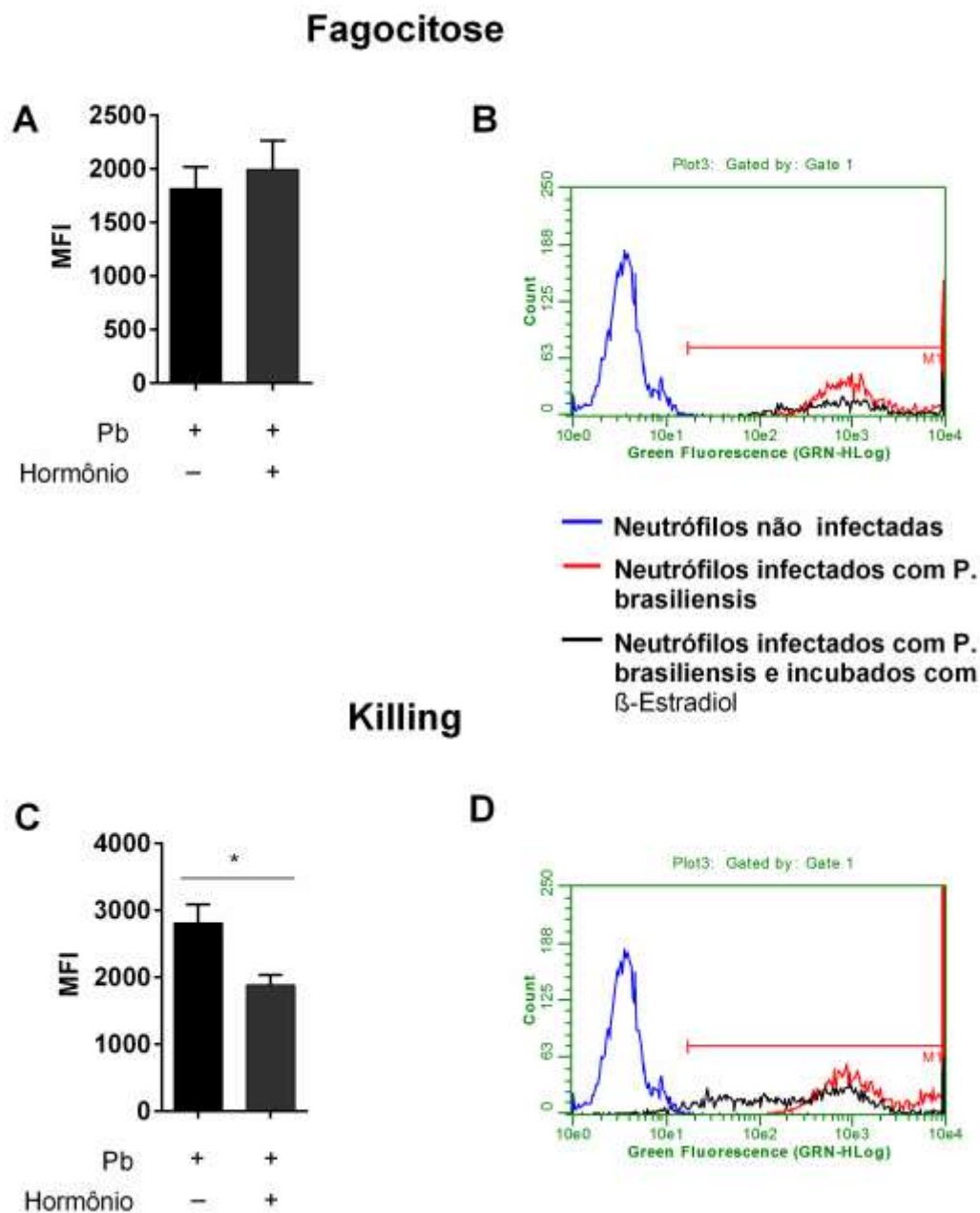


Figura 9. Após a adição de β -Estradiol, os neutrófilos dos homens aprimoraram a capacidade de eliminar o *P. brasiliensis*. O *P. brasiliensis* marcado com CFSE foi co-incubado com os neutrófilos para os ensaios de Fagocitose e Killing, fixados e analisados por citometria de fluxo. **A:** Número de colônias fagocitadas após 15 minutos de incubação dos neutrófilos com *P. brasiliensis* e adição, ou não, de β -Estradiol. **B:** Histograma ilustrativo da fagocitose por neutrófilos de um doador. **C:** Número de colônias recuperadas após três horas de incubação dos neutrófilos com *P. brasiliensis* e adição, ou não, de β -Estradiol. **D:** Histograma ilustrativo do *killing* por neutrófilos de um doador. Os resultados representam a média e o desvio padrão de três doadores do sexo masculino. (*) $p < 0,05$. Test t de Student.

4.6. A produção de TGF- β pelos neutrófilos dos homens diminuiu após a adição de β -Estradiol

Verificada a importância do β -Estradiol na eliminação do *P. brasiliensis*, analisamos de forma subsequente, a produção das citocinas IL-8, IL-1 β , TNF e TGF- β pelos neutrófilos de homens e mulheres, infectados, na presença ou não do hormônio sintético β -Estradiol.

Como observado na Figura 10A, não houve diferença na produção de IL-8 pelos neutrófilos dos homens após a adição do β -Estradiol (493.655 \pm 87.3pg/mL e 479.323 \pm 80.6pg/mL respectivamente).

Em relação à TGF- β (Figura 10B), após a adição do hormônio, a produção dessa citocina pelos neutrófilos dos homens reduziu de forma significativa quando comparadas as células não incubadas com hormônio sintético (132.885 \pm 17pg/mL e 1091.06 \pm 159pg/mL).

A produção de TNF pelos neutrófilos de homens, incubados com *P. brasiliensis*, não foi alterada de maneira significativa após a adição hormônio β -Estradiol (de 15.636 \pm 3.3pg/mL para 9.35 \pm 0.7pg/mL - Figura 10C).

Considerando o papel de IL-1 β na proteção do hospedeiro e eliminação do *P. brasiliensis*, a produção da citocina pró-inflamatória foi quantificada conjuntamente a IL-8, TNF e TGF- β a partir do sobrenadante de neutrófilos co-incubados com *P. brasiliensis*. Como observado na Figura 10D, a produção de IL-1 β pelos neutrófilos dos homens não apresentou diferença significativa, independentemente à adição de β -Estradiol (1.377 \pm 0.3pg/mL e 0.91 \pm 0.7pg/mL respectivamente).

Em relação à produção de citocina pelos neutrófilos das mulheres (dados não mostrados na figura 10), as quantificações de IL-8, TNF e IL-1 β não se mostraram significativamente diferente após a adição, ou não, de β -Estradiol (respectivamente 193.539 \pm 27.4pg/mL e 236.111 \pm 28.9pg/mL; 8.37 \pm 0.83pg/mL e 20.8 \pm 6.2pg/mL; 5.5 \pm 3.8pg/mL e 3 \pm 0.7pg/mL). Em contrapartida, a quantificação de TGF- β se mostrou significativamente menor após a adição do hormônio sintético (respectivamente na ausência e presença do hormônio 151.041 \pm 99pg/mL e 1663.51 \pm 261.5pg/mL).

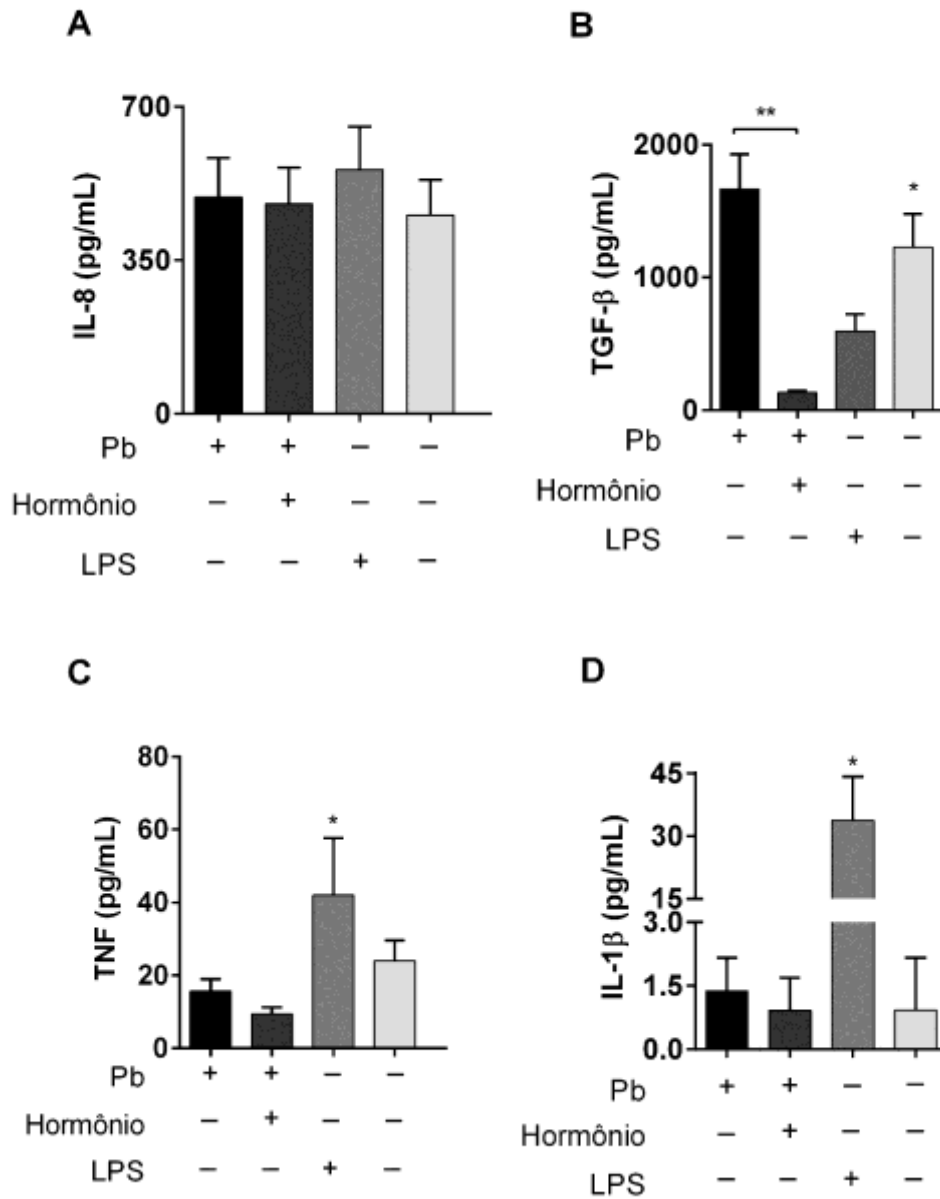


Figura 10. A adição do hormônio sintético β -Estradiol aos neutrófilos diminuiu os níveis de TGF- β produzidos por neutrófilos de homens. **A, B, C e D:** Níveis de IL- 8, TGF - β , TNF e IL-1 β , respectivamente, detectados em sobrenadante de cultura de neutrófilos co-incubados com *P. brasiliensis* e estimulados, ou não, com β -Estradiol, ou estimulados com LPS ou meio de doadores do masculino. Os resultados representam a média e o desvio padrão de seis doadores do sexo masculino. (**) $p < 0,05$. One-Way ANOVA.
* Representa diferença significativa entre os valores do PMA e meio.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostraram que variações no padrão de resposta às infecções por homens e mulheres estão associadas ao hormônio feminino estrógeno. Entretanto, não há estudos mostrando diferenças entre gêneros na resposta de neutrófilos contra o *P. brasiliensis*. Assim, o objetivo desse trabalho foi comparar o perfil de resposta dos neutrófilos de homens e mulheres frente ao *P. brasiliensis*. Como resultado, observamos que os neutrófilos das mulheres produziram maior quantidade de TNF e eliminaram o fungo de forma eficaz quando comparado aos neutrófilos dos homens. Em acréscimo, após a adição do hormônio sintético β -estradiol, os neutrófilos dos homens aperfeiçoaram a resposta contra o fungo, produzindo menor quantidade de TGF- β e eliminaram o fungo de forma mais eficiente.

Capazes de desempenhar várias funções, os neutrófilos são as primeiras células de defesa recrutadas para o local de infecção, desempenhando importante papel no sistema imune. Após o reconhecimento de PAMPs por receptores presentes em sua superfície, os neutrófilos ativados, objetivando a eliminação dos patógenos, são capazes de produzir inúmeras citocinas e ROS.

Em relação a outras infecções fúngicas, trabalhos anteriores mostraram que o gênero pode influenciar na resposta a infecção: McClelland e colaboradores observaram que camundongos machos aumentaram significativamente a carga fúngica do cérebro e pulmão em comparação com camundongos fêmeas após infecção por *Cryptococcus neoformans* (MCCLELLAND et al., 2013); Loster e colaboradores mostraram que camundongos fêmeas são infectados em maior número por *Candida* quando comparadas à camundongos machos (LOSTER; WIECZOREK; LOSTER, 2016) e Strati e colaboradores observaram um número aumentado de espécies de fungos intestinais em mulheres (STRATI et al., 2016). Embora não haja um consenso em relação a maior capacidade de eliminação de patógenos de homens ou mulheres, os trabalhos publicados relacionando gênero e infecções fúngicas evidenciaram que há diferenças no perfil de resposta ao patógeno entre gêneros. Em relação ao *P. brasiliensis*, os trabalhos mostraram que a produção de estrógeno pelo sexo feminino tem papel protetor na infecção ao fungo;

entretanto, pouco se sabe do papel dos neutrófilos na infecção entre gêneros. Considerando outros patógenos, Kadioglu e colaboradores mostraram que camundongos machos infectados com *Streptococcus pneumoniae* exibiram um aumento significativo no influxo de neutrófilos em seus pulmões e tiveram maior quantidade de pneumococos em comparação com camundongos fêmeas (KADIOGLU et al., 2011). Traub e co-autores observaram que neutrófilos são recrutados em menor quantidade em camundongos fêmeas infectadas com Citomegalovírus (TRAUB et al., 2012).

Os neutrófilos possuem como mecanismo de eliminação de patógenos, a fagocitose. Essas células emitem prolongamentos que englobam o alvo, internalizando-o em um fagossoma e posteriormente, destruindo-o no ambiente hostil fagossômico (NORDENFELT, 2014). Malcolm e colaboradores (MALCOLM et al., 2018) mostraram que a fagocitose e o *killing* por neutrófilos são importante na eliminação de *Mycobacterium abscessus*, assim como Dong e co-autores (DONG et al., 2017) que observaram um fator de transcrição que inibe a fagocitose e *killing* por neutrófilos, favorecendo o crescimento bacteriano. Ullah e colaboradores (ULLAH; RITCHIE; EVANS, 2017), observaram a integração de mecanismos dos neutrófilos como fagocitose e *killing* na eliminação do *Streptococcus pneumoniae*.

Em relação aos gêneros, embora trabalhos anteriores mostraram que as mulheres fagocitam de forma mais eficiente (GIUSEPPINA BOZZUTO, PAOLA RUGGIERI, 2016; KLEIN; FLANAGAN, 2016), nossos resultados, diferentemente, mostraram que os neutrófilos das mulheres e dos homens fagocitam de maneira equivalente o *P. brasiliensis*, na presença, ou não, do hormônio β -estradiol. Em trabalho anterior do nosso grupo, Pinzan e co-autores (PINZAN et al., 2010) observaram que os macrófagos de camundongos machos e fêmeas fagocitaram de forma equivalente o *P. brasiliensis*, em conformidade com os nossos resultados em neutrófilos humanos. Esses resultados sugerem que o processo de fagocitose pode sofrer influência de outros fatores, como a produção de citocinas e de Espécies Reativas. Além da capacidade dos neutrófilos de fagocitar, a eliminação do patógeno é um processo essencial para a supressão de qualquer infecção (GUO et al., 2011; SEGAL, 2005; TENG et al., 2017).

No que diz respeito ao processo de eliminação de *P. brasiliensis* por neutrófilos, embora sejam escassos os trabalhos que relacionem a eliminação do fungo entre gêneros, observamos em nosso estudo que as células das mulheres foram mais eficientes em matar o fungo quando comparados aos neutrófilos dos homens. No entanto, a adição do hormônio feminino sintético aos neutrófilos dos homens diminuiu a quantidade de UFC significativamente, dessa forma, evidenciando que os neutrófilos dos homens controlam mais eficientemente o crescimento fúngico na presença de β -estradiol. De forma geral, nossos resultados evidenciam o papel do hormônio sintético na eliminação do *P. brasiliensis*, e reiteram a capacidade fungicida dos neutrófilos.

Uma vez caracterizado os processos de killing e fagocitose de *P. brasiliensis* por neutrófilos entre os gêneros, buscamos compreender os mecanismos efetores favorecedores dos fenótipos observados. Os fagócitos em geral, incluindo os neutrófilos, produzem como mecanismo de defesa as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que podem atravessar as membranas de patógenos e danificar ácidos nucleicos, proteínas e membranas celulares. Dudte e colaboradores (DUDTE; HINNEBUSCH; SHANNON, 2017; NGUYEN; GREEN; MECSAS, 2017) mostraram que a inibição de ROS contribui para a infecção e proliferação bacteriana; Carneiro e co-autores (CARNEIRO et al., 2017), observaram a importância da produção de ROS na apoptose e no processo inflamatório na infecção e Giraldo (GIRALDO; HERNANDEZ, 2016), mostrou um aumento na produção de ROS após a infecção por HIV-1. Porém, em contradição aos trabalhos citados, outros autores mostraram que determinados patógenos adquiriram mecanismos que minimizam a produção de ROS e beneficiam a infecção; Kinkead e colaboradores (KINKEAD; FAYRAM; ALLEN, 2017) observaram que a *Francisella novicida* diminui a produção de ROS, inibindo a apoptose, e Green e co-autores (GREEN et al., 2016) mostraram que a *Yersinia spp* possui proteínas efetoras que bloqueiam a produção de ROS. Em relação ao *P. brasiliensis*, Tamayo e colaboradores (TAMAYO et al., 2017) mostraram que o gênero *Paracoccidioides spp* produz catalases que decompõem o H_2O_2 e protegem contra o ROS produzido pelos neutrófilos do hospedeiro. Dessa forma, a baixa quantificação de ROS, observada em nossos resultados, em conformidade com a literatura, sugere um mecanismo

desenvolvido pelo fungo como forma de proteção contra as Espécies Reativas produzidas pelo hospedeiro.

Quanto à produção de citocinas, já foi demonstrado que os neutrófilos podem degradar citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF, exercendo um papel regulatório na defesa contra *Candida albicans* (GRESNIGT et al., 2012). Entretanto, outros autores mostraram que a produção de IL-1 β pelos neutrófilos é um importante mecanismo de eliminação de patógenos, uma vez que ativa o processo de autofagia (IULA et al., 2018). Complementarmente, a produção de IL-1 β potencializa o recrutamento de neutrófilos (PEIRÓ et al., 2017). Nossos resultados mostraram a produção de IL-1 β pelos neutrófilos infectados de homens e mulheres foram semelhantes, independentemente da adição do hormônio β -estradiol. Huang e co-autores (HUANG et al., 2014) observaram que a medida que ocorre a produção de ROS, ocorre o aumento da produção de IL-1 β , mostrando uma relação de proporcionalidade entre os parâmetros. Em similaridade não verificamos diferença significativa na produção de ROS entre homens e mulheres, bem como na produção de IL-1 β .

A citocina TGF- β , após a adição do hormônio sintético β -Estradiol, apresentou uma produção significativamente menor pelos neutrófilos de homens e mulheres. Embora reconhecida por ser quimioatraente e auxiliar na ativação dos neutrófilos (LAGRAOUI; GAGNON, 1997; RAINER et al., 2014), essa citocina é descrita por alguns autores como importante regulador da infecção de *Mycobacterium tuberculosis* (HIRSCH et al., 1994) e *Trypanosoma cruzi* (SILVA; TWARDZIK; REED, 1991), auxiliando no crescimento quantitativo do patógeno e na progressão da infecção. Em conformidade, Ricci-Azevedo e colaboradores mostrou que neutrófilos co-incubados com as lectinas ArtinM (RICCI-AZEVEDO et al., 2016) e Paracoccina (RICCI-AZEVEDO et al., 2018) diminuem a produção de TGF- β , o que por fim foi associado a eliminação de patógeno intracelulares (*Leishmania major* e *P. brasiliensis*, respectivamente). Em adição, estudos anteriores mostraram que o estrógeno inibe a via do gene de TGF- β ; enquanto o estrógeno atua como estimulador da proliferação celular, a citocina TGF- β possui função inibitória (ITO et al., 2010; MATSUDA et al., 2001). Dessa forma, a produção diminuída de TGF- β após a adição de β -Estradiol *in vitro* mostra que o hormônio feminino tem importante papel na atenuação da progressão da infecção pelo *P. brasiliensis*.

Em relação a TNF, a produção pelos neutrófilos das mulheres foi significativamente maior quando comparada à quantidade produzida pelos neutrófilos dos homens. Estudos anteriores mostraram que a produção dessa citocina auxilia na eliminação de *Leishmania braziliensis* (FALCÃO et al., 2015), *Mycobacterium abscessos* (BERNUT et al., 2016), *Salmonella enterica* (DE JONG et al., 2012)e, de interesse em nosso trabalho, o *P. brasiliensis* (RODRIGUES et al., 2007). Em relação às mulheres, elas possuem um perfil pró-inflamatório com alta produção de TNF (CAPONE et al., 2018), favorecendo o combate a patógenos, aperfeiçoando a citotoxicidade de neutrófilos (COMEN et al., 2016) e apoptose dessas células (WRIGHT et al., 2010). Dessa forma, a produção aumentada de TNF pelos neutrófilos das mulheres, observada em nosso estudo, evidencia um perfil celular protetor e mais eficiente em eliminar o fungo quando comparado aos neutrófilos dos homens.

O recrutamento de neutrófilos é resultante da ação de várias quimiocinas e citocinas. A citocina IL-8 é produzida pelos neutrófilos e aumenta o recrutamento dessas células, auxiliando na eliminação de patógenos, como descrito por Hilda (HILDA; DAS, 2015) e Frasson e co-autores (FRASSON et al., 2017). Por outro lado, outros estudos mostraram que IL-8 pode favorecer a diminuição da apoptose. Acorci e colaboradores mostraram que a produção aumentada de IL-8 favorece a sobrevivência dos neutrófilos, possibilitando a modulação da apoptose e conseqüentemente a infecção pelo *P. brasiliensis* (ACORCI et al., 2009). Em conformidade, em nosso estudo, os neutrófilos dos homens produziram alta concentração de IL-8 e eliminaram o fungo de forma pouco eficiente, apresentando grande quantidade de UFC após ensaio de *killing*; enquanto os neutrófilos das mulheres produziram menor quantidade de IL-8, mas eliminaram o *P. brasiliensis* de forma eficaz.

Nesse estudo, demonstramos que os neutrófilos das mulheres respondem à infecção causada pelo *P. brasiliensis* de maneira mais eficiente em relação aos neutrófilos dos homens. Além disso, verificamos que o hormônio feminino estrógeno, controla o crescimento e favorece o combate ao fungo por neutrófilos. Dessa forma, mostramos em nosso trabalho a importância do hormônio feminino estrógeno frente à infecção por *P. brasiliensis*. Como perspectiva para futuros trabalhos, realizaremos ensaios comparando a produção de NETs pelos neutrófilos de homens e mulheres e utilizaremos

neutrófilos de pacientes com PCM para avaliar a resposta após a adição do β -estradiol.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Diante dos nossos resultados, podemos concluir que:

- Os neutrófilos das mulheres são mais eficientes em eliminar o *P. brasiliensis* e produzir citocinas pró-inflamatórias como TNF; entretanto, após a adição do hormônio β -estradiol, os neutrófilos de homens e mulheres diminuíram a produção de TGF β e os neutrófilos dos homens aprimoraram sua capacidade de limitar o crescimento do *P. brasiliensis*, mostrando que o hormônio feminino estrógeno desempenha um importante papel na eliminação do *P. brasiliensis* por neutrófilos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ACORCI, M. J. et al. Inhibition of human neutrophil apoptosis by *Paracoccidioides brasiliensis*: Role of interleukin-8. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 2, p. 73–79, 2009.
- ALVES, A. B. R. M. et al. Differential production of interleukin-1 family cytokines (IL-1 β , IL-18, IL-33 and IL-37) in patients with paracoccidioidomycosis: Correlation with clinical form and antifungal therapy. **Medical Mycology**, v. 56, n. 3, p. 332–343, 2018.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 459–489, 2012.
- ARISTIZÁBAL, B. H. et al. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on. **Medical Mycology**, v. 40, n. August 2001, p. 169–178, 2002.
- BALDERRAMAS, H. A. et al. Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to *Paracoccidioides brasiliensis*. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1. **Cytokine**, v. 67, n. 1, p. 36–43, 2014.
- BERNUT, A. et al. *Mycobacterium abscessus*-Induced Granuloma Formation Is Strictly Dependent on TNF Signaling and Neutrophil Trafficking. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1–28, 2016.
- BOCCA, A. L. et al. *Paracoccidioidomycosis*: Eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1177–1191, 2013.
- BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; TEIXEIRA, M. M. *Paracoccidioidomycosis*: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. p. 1177–1191, 2013.
- BOUMAN, A.; JAN HEINEMAN, M.; FAAS, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 4, p. 411–423, 2005.
- BUPP, M. R. G. et al. Androgen-induced immunosuppression. v. 9, n. April, 2018.
- CALICH, V. L. G. et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis*

- infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 223–236, 2008.
- CAMACHO, E.; NIÑO-VEGA, G. A. Paracoccidioides Spp.: Virulence Factors and Immune-Evasion Strategies. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, 2017.
- CAPONE, I. et al. Sexual Dimorphism Of Immune Responses: A new perspective in cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 2018.
- CARNEIRO, M. B. H. et al. NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during Leishmania amazonensis Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. 2017.
- COMEN, E. et al. OPEN TNF is a key cytokine mediating neutrophil cytotoxic activity in breast cancer patients. **Nature Publishing Group**, n. February, 2016.
- CORTJENS, B.; WOENSEL, J. B. M. VAN; BEM, R. A. Ac ce pt e cr t. **Paediatric Respiratory Reviews**, 2016.
- COSTA, D. L. et al. Effect of interleukin-10 on the Paracoccidioides brasiliensis killing by gamma-interferon activated human neutrophils. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 1, p. 73–80, 2007.
- COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 11–28, 2016.
- DE JONG, H. K. et al. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 10, p. 1–9, 2012.
- DONG, G. et al. FOXO1 regulates bacteria-induced neutrophil activity. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 1–14, 2017.
- DOS REIS ALMEIDA, F. B. et al. alpha-(1,4)-Amylase, but not alpha- and beta-(1,3)-glucanases, may be responsible for the impaired growth and morphogenesis of Paracoccidioides brasiliensis induced by N-glycosylation inhibition. **Yeast (Chichester, England)**, v. 31, n. 1, p. 1–11, jan. 2014.
- DUDTE, S. C.; HINNEBUSCH, B. J.; SHANNON, J. G. Interactions with Human Neutrophils In vitro. v. 7, n. August, p. 1–11, 2017.
- FALCÃO, S. A. C. et al. Exposure to Leishmania braziliensis Triggers Neutrophil Activation and Apoptosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–19, 2015.
- FERNANDES, F. F. et al. Impact of Paracoccin Gene Silencing on Paracoccidioides brasiliensis Virulence. **mBio**, v. 8, n. 4, jul. 2017.
- FERRERO, S. et al. Aromatase and endometriosis: Estrogens play a role.

- Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1317, n. 1, p. 17–23, 2014.
- FRASSON, A. P. et al. Adenosine reduces reactive oxygen species and interleukin-8 production by *Trichomonas vaginalis*-stimulated neutrophils. **Purinergic Signalling**, v. 13, n. 4, p. 569–577, 2017.
- GIRALDO, D. M.; HERNANDEZ, J. C. HIV-1-derived single-stranded RNA acts as activator of human neutrophils. **Immunologic Research**, n. 52, 2016.
- GIRARD, D. et al. Effects of interleukin-2 on gene expression in human neutrophils. **Blood**, v. 86, n. 3, p. 1170–1176, ago. 1995.
- GIUSEPPINA BOZZUTO, PAOLA RUGGIERI, A. M. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. **Ann Ist Super Sanità**, v. 46, n. 1, p. 66–80, 2016.
- GREEN, E. R. et al. Fis Is Essential for *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence and Protects against Reactive Oxygen Species Produced by Phagocytic Cells during Infection. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. 1–26, 2016.
- GRESNIGT, M. S. et al. Neutrophil-Mediated Inhibition of Proinflammatory Cytokine Responses. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 10, p. 4806–4815, 2012.
- GUO, B. et al. Quantitative impact of neutrophils on bacterial clearance in a murine pneumonia model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4601–4605, 2011.
- HILDA, J. N.; DAS, S. D. TLR stimulation of human neutrophils lead to increased release of MCP-1, MIP-1 α , IL-1 β , IL-8 and TNF during tuberculosis. **HUMAN IMMUNOLOGY**, p. 8–12, 2015.
- HIRSCH, C. S. et al. Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor- β 1. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 5, p. 1229–1237, 1994.
- ITO, I. et al. Estrogen inhibits transforming growth factor β signaling by promoting Smad2/3 degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14747–14755, 2010.
- IULA, L. et al. Autophagy Mediates Interleukin-1 β Secretion in Human Neutrophils. v. 9, n. February, p. 1–14, 2018.
- JAILLON, S. et al. Neutrophils in innate and adaptive immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, n. 4, p. 377–394, 2013.
- JAILLON, S.; BERTHENET, K.; GARLANDA, C. Sexual Dimorphism in Innate

- Immunity. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, 2017.
- KADIOGLU, A. et al. Sex-based differences in susceptibility to respiratory and systemic pneumococcal disease in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 12, p. 1971–1979, 2011.
- KESELMAN, A.; HELLER, N. Estrogen signaling modulates allergic inflammation and contributes to sex differences in asthma. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. NOV, 2015.
- KINKEAD, L. C.; FAYRAM, D. C.; ALLEN, L.-A. H. *Francisella novicida* inhibits spontaneous apoptosis and extends human neutrophil lifespan. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 102, n. 3, p. 815–828, 2017.
- KLEIN, S. L.; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 626–638, 2016.
- KOBAYASHI, S. D.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. **Journal of Innate Immunity**, v. 59840, 2018.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.
- KOVATS, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular Immunology**, v. 294, n. 2, p. 63–69, 2015.
- KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. **Virulence factors in fungi of systemic mycoses** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 1998.
- LAGRAOUI, M.; GAGNON, L. Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF-beta 1. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 43, n. 3, p. 313–318, maio 1997.
- LOSTER, J. E.; WIECZOREK, A.; LOSTER, B. W. Correlation between age and gender in *Candida* species infections of complete denture wearers: A retrospective analysis. **Clinical Interventions in Aging**, v. 11, p. 1707–1714, 2016.
- LOURES, F. V. et al. MyD88 signaling is required for efficient innate and adaptive immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2470–2480, 2011.
- LUCISANO-VALIM, Y. et al. A simple method to study the activity of natural compounds on the chemiluminescence of neutrophils upon stimulation by immune complexes. **Journal of pharmacological and toxicological methods**,

- v. 47, p. 53–58, 2002.
- LUTZ, A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil . Contribuição ao conhecimento das. **Adolpho Lutz - Obra Completa**, v. 22, p. 483–494, 1945.
- MALCOLM, K. C. et al. Neutrophil killing of Mycobacterium abscessus by intra- and extracellular mechanisms. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–19, 2018.
- MARTINEZ, R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57 Suppl 1, p. 11–20, 2015.
- MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.
- MATSUDA, T. et al. Cross-talk between Transforming Growth Factor- β and Estrogen Receptor Signaling through Smad3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 46, p. 42908–42914, 2001.
- MCCLELLAND, E. E. et al. The Role of Host Gender in the Pathogenesis of Cryptococcus neoformans Infections. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–7, 2013.
- MEJÍA, S. P. et al. Human neutrophils produce extracellular traps against Paracoccidioides Brasiliensis. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 161, n. 2015, p. 1008–1017, 2015.
- MENDES, R. P. et al. **Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil**. [s.l: s.n.]. v. 11
- NAEGELEN, I. et al. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.
- NGUYEN, G. T.; GREEN, E. R.; MECSAS, J. Neutrophils to the ROScues: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. August, 2017.
- NORDENFELT, P. Quantitative assessment of neutrophil phagocytosis using flow cytometry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1124, p. 279–289, 2014.
- PARDINI, A.; MOREIRA, V. Paracoccidioidomycose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. v. 5, n. 51, p. 11–24, 2008.
- PEIRÓ, T. et al. Neutrophils drive alveolar macrophage IL-1 β release during respiratory viral infection. **Thorax**, p. thoraxjnl-2017-210010, 2017.

- PINO-TAMAYO, P. A. et al. Depletion of Neutrophils Exacerbates the Early Inflammatory Immune Response in Lungs of Mice Infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.
- PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.
- PRUCHNIAK, M. P.; ARAZNA, M.; DEMKOW, U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 187, n. 1, p. 68–73, 2013.
- PUCCIA, R. et al. The *Paracoccidioides* cell wall: Past and present layers toward understanding interaction with the host. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. DEC, p. 1–7, 2011.
- PUERTA-ARIAS, J. D. et al. Depletion of neutrophils promotes the resolution of pulmonary inflammation and fibrosis in Mice infected with *paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–23, 2016.
- RAINER, P. P. et al. Cardiomyocyte-specific transforming growth factor β suppression blocks neutrophil infiltration, augments multiple cytoprotective cascades, and reduces early mortality after myocardial infarction. **Circulation Research**, v. 114, n. 8, p. 1246–1257, 2014.
- RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining Virulence Genes in the Dimorphic Fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 281–303, 2006.
- RESTREPO, A. et al. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. **Infection and immunity**, v. 46, n. 2, p. 346–353, nov. 1984.
- RICCI-AZEVEDO, R. et al. Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on *Leishmania major*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 2016.
- RICCI-AZEVEDO, R. et al. Human neutrophils are targets to paracoccin, a lectin expressed by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Inflammation Research**, v. 67, n. 1, p. 31–41, 2018.
- RODRIGUES, D. R. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* killing by IFN- γ , TNF- α and GM-CSF activated human neutrophils: Role for oxygen metabolites. **Medical Mycology**, v. 45, n. 1, p. 27–33, 2007.

- ROVED, J.; WESTERDAHL, H.; HASSELQUIST, D. NU SC. **Hormones and Behavior**, 2016.
- SEGAL, A. W. How Neutrophils Kill Microbes. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 197–223, 2005.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consensus Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. v. 50, n. June, p. 715–740, 2017a.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, 2017b.
- SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 3, p. 539–45, 1991.
- STRATI, F. et al. Age and gender affect the composition of fungal population of the human gastrointestinal tract. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–16, 2016.
- STURME, M. H. J. et al. Molecular biology of the dimorphic fungi Paracoccidioides spp. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 89–97, 2011.
- TABORDA, C. P. et al. Melanin as a virulence factor of Paracoccidioides brasiliensis and other dimorphic pathogenic fungi: A minireview. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 331–339, 2008.
- TAMAYO, D. et al. Paracoccidioides spp. catalases and their role in antioxidant defense against host defense responses. p. 22–32, 2017.
- TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–7, 2014.
- TENG, T. S. et al. Neutrophils and immunity: From bactericidal action to being conquered. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, 2017.
- THOMAS, C. J.; SCHRODER, K. Pattern recognition receptor function in neutrophils. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 7, p. 317–328, 2013.
- TOMAZETT, P. K. et al. The cell wall of Paracoccidioides brasiliensis: insights from its transcriptome. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 4, n. 2, p. 309–325, 2005.
- TRAUB, S. et al. Sex Bias in Susceptibility to MCMV Infection: Implication of TLR9. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–13, 2012.

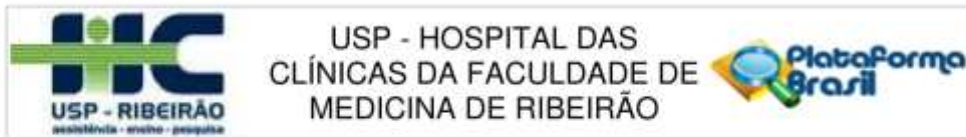
ULLAH, I.; RITCHIE, N. D.; EVANS, T. J. The interrelationship between phagocytosis, autophagy and formation of neutrophil extracellular traps following infection of human neutrophils by *Streptococcus pneumoniae*. **Innate Immunity**, v. 23, n. 5, p. 413–423, 2017.

VOM STEEG, L. G.; KLEIN, S. L. Sex Steroids Mediate Bidirectional Interactions Between Hosts and Microbes. **Hormones and Behavior**, v. 88, p. 45–51, 2017.

VRTAČNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 3, p. 329–342, 2014.

WRIGHT, H. L. et al. Review Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. n. March 2010, p. 1618–1631, 2010.

YA-FANG HUANG , PEI-CHI LO , CHIA-LIANG YEN , PETER A. NIGROVIC , WEN-CHEN CHAO , WEI-ZHI WANG , CHENG-KANG HSU , YAU-SHENG TSAI , CHI-CHANG SHIEHHUANG, Y.-F. 1 Redox regulation of pro-IL-1 β processing may contribute to the increased severity of serum-induced arthritis in NOX2-deficient mice Running title: Redox regulation of IL-1 β production in arthritis Ya-Fang. p. 1–61, 2014.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do gênero na resposta dos neutrófilos contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*

Pesquisador: LIVIA MARA TORRES BUENO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 88813318.0.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

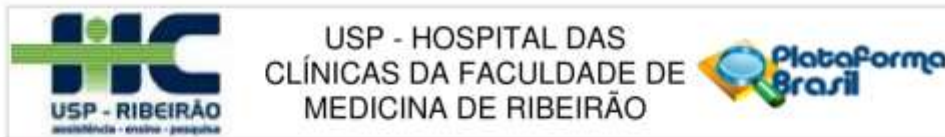
Número do Parecer: 2.689.659

Apresentação do Projeto:

A paracoccidioidomicose é uma micose causada pelo fungo dimorfo *Paracoccidioides brasiliensis*. A doença é adquirida após a inalação de micélios presentes no ambiente que inicialmente migram para o pulmão e posteriormente se espalham por outros órgãos. Após o reconhecimento do fungo pelas células do hospedeiro, há o desencadeamento de resposta imunológica com produção de IL-12 e IFN- γ e ativação de células como macrófagos e neutrófilos. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para os locais de infecção, desempenhando um importante papel na modulação da resposta contra *P. brasiliensis*. Em resposta ao reconhecimento do fungo por receptores, os neutrófilos amplificam a resposta contra o patógeno ao produzir citocinas como IL-12 e IL-10 e se comunicar com outras células do sistema imune. A resposta ao fungo e a progressão da doença estão relacionadas a fatores ambientais, genéticos e a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. Estudos mostram que homens e mulheres respondem diferentemente ao *P. brasiliensis*; há uma menor incidência da doença nas mulheres em idade reprodutiva, possivelmente relacionada ao hormônio feminino estrógeno.

Serão recrutados 40 participantes divididos em dois grupos: 20 doadores do sexo masculino e 20 doadores do sexo feminino em idade reprodutiva. O volume coletado de cada participante será de 50 mL. Os neutrófilos serão isolados e infectados com *P. brasiliensis*, com ou sem o acréscimo do hormônio β -Estradiol. Posteriormente será avaliada a produção de TNF- α , TGF- β , IL-8 e IL-18, produção de ROS e a capacidade fungicida dos neutrófilos.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.689.659

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o papel do estrógeno na resposta mediada por neutrófilos em infecção por *P. brasiliensis*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Durante o procedimento de coleta de sangue o participante poderá sentir dor no local de introdução da agulha. Em alguns casos há a possibilidade de queda da pressão arterial com episódios de tonturas e visão turva. Caso aconteça, a coleta será interrompida e o participante será instruído a abaixar a cabeça, ingerir pequena quantidade de sal e esperar até a pressão ser normalizada. Após o procedimento poderá ocorrer hematomas no braço utilizado para coleta.

Benefícios: Embora não haja benefício imediato, os pesquisadores se propõem a estudar diferenças na infecção por *P. brasiliensis* entre gêneros. Considerando a alta taxa de infecção pelo fungo em países da América Latina, o estudo trará um direcionamento para tratamentos individualizados, buscando melhorar a resposta do paciente à infecção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo observacional caso-controle. Estudos anteriores mostraram que o hormônio estrógeno pode proteger contra a infecção por *P. brasiliensis*. Considerando que as mulheres durante a idade reprodutiva possuem alta taxa de estrógeno enquanto os homens possuem pequena taxa desse hormônio, serão recrutados 20 participantes do sexo masculino e 20 participantes do sexo feminino em idade reprodutiva, faixa etária entre 23 e 35 anos. Os homens serão considerados controles negativos em relação às mulheres. Será coletado de cada participante um volume de sangue periférico de 50 mL, utilizado para purificação de neutrófilos e análise da produção de TNF- α , TGF- β , IL-8 e IL-1 β , produção de ROS e a capacidade fungicida dos neutrófilos. Os resultados serão comparados entre os gêneros.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios devidamente apresentados

Recomendações:

não se aplica

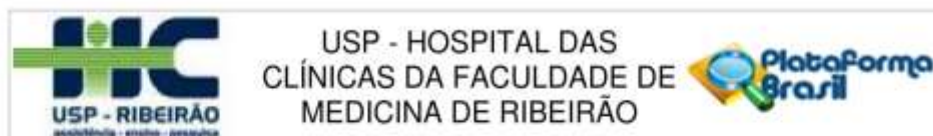
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 2.689.659

parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P RQJETO_1092860.pdf	02/05/2018 16:13:24		Aceito
Outros	UPC.pdf	02/05/2018 16:12:32	LIVIA MARA TORRES BUENO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	02/05/2018 16:11:53	LIVIA MARA TORRES BUENO	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	01/05/2018 09:42:21	LIVIA MARA TORRES BUENO	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	01/05/2018 09:41:25	LIVIA MARA TORRES BUENO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	01/05/2018 09:40:04	LIVIA MARA TORRES BUENO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	01/05/2018 09:37:11	LIVIA MARA TORRES BUENO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 04 de Junho de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cap@hcrp.usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA**

NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE NÚMERO:
SEXO: M() F()
DATA DE NASCIMENTO:
TELEFONE: ()

Você está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) da pesquisa denominada "Influência do gênero na resposta dos neutrófilos contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis*".

Durante a pesquisa os doadores serão divididos em dois grupos: o grupo dos doadores do sexo masculino e o grupo dos doadores do sexo feminino. Os dois grupos serão formados por doadores saudáveis. Para pertencer ao grupo de doadores feminino, você deverá utilizar anticoncepcional ou estar entre o Primeiro e 15º dia do ciclo menstrual na data da coleta. Os doadores masculinos servirão como grupo controle da pesquisa, pois homens produzem o hormônio estrógeno em pequena quantidade.

É necessário estar nessa condição, pois estudaremos como o hormônio estrógeno influencia na contaminação pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

Sua participação na pesquisa consistirá na coleta de 50 ml de sangue (que corresponde aproximadamente ao volume de quatro colheres de sopa). Não é necessário jejum antes da doação. A coleta de sangue será realizada por pesquisadores da equipe, no laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia localizado no Prédio Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Você poderá sentir algum desconforto como dor no local da introdução da agulha e poderá ocorrer pequeno sangramento durante o procedimento. Caso ocorra queda da pressão e episódios de tonturas e visão turva, a coleta será interrompida e você será orientado a abaixar a cabeça, ingerir pequena quantidade de sal e esperar até que a pressão se normalize.

Após o procedimento o braço poderá ficar roxo. Sua privacidade será respeitada. Você será identificado (a) por uma sigla com as iniciais do seu nome e dia do nascimento seguido da data do experimento. Não há nenhum valor econômico relacionado à sua participação no estudo.

A qualquer momento você poderá desistir da participação no estudo ou retirar o consentimento sem nenhum tipo de prejuízo. Os pesquisadores envolvidos com o projeto são: Livia Mara Torres Bueno, Rafael Ricci de Azevedo, Relber Gonçalves Aguiar, Flávia Costa Mendonça Natividade e Maria Cristina Roque Antunes Barreira, sendo qualquer dúvida esclarecida pelos telefones (16)3315-3066, (17)99141-6688 e (16)98183-3135.

Dúvidas relacionadas aos aspectos éticos, você poderá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP/FMRP-USP pelo telefone (16)3602-2228.

Caso ocorra algum dano decorrente da participação no estudo, você terá direito à indenização, conforme as leis vigentes no país. Você receberá uma cópia do TCLE e deverá dar um visto (rubricar) em todas as páginas.

Data:

Nome:

Assinatura:

Data:

Nome:

Assinatura: