UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA (IPTSP)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO (PPGBRPH)

FERNANDA HÉLIA LUCIO

Interleucina-17 na atividade de fagócitos inflamatórios de camundongos BALB/c

Goiânia
2019

UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

[X] Dissertação [ ] Tese

2. Nome completo do autor

FERNANDA HÉLIA LUCIO

3. Título do trabalho

Interleucina-17 na atividade de fagócitos inflamatórios de camundongos BALB/c

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:
a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);
b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.
Casos de embargo:
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.

Documento assinado eletronicamente por **Milton Adriano Pelli De Oliveira**, **Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2021, às 23:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA HÉLIA LUCIO**, **Discente**, em 22/12/2021, às 15:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2586494** e o código CRC **1A9287CD**.

Referência: Processo nº 23070.068291/2021-48 SEI nº 2586494

FERNANDA HÉLIA LUCIO

Interleucina-17 na atividade de fagócitos inflamatórios de camundongos BALB/c

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre
Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Goiânia
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Lucio, Fernanda Hélia
Interleucina-17 na atividade de fagócitos inflamatórios de camundongos BALB/c [manuscrito] / Fernanda Hélia Lucio. - 2019.
xv, 61 f.: il.

Orientador: Prof. Milton Adriano Pelli de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2019.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico.

1. IL-17A. 2. IL-17F. 3. IL-4. 4. Macrófagos inflamatórios. 5. IL-4 KO. I. Oliveira, Milton Adriano Pelli de, orient. II. Título.

CDU 61

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO
Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 – e-mail : ppgbrph@gmail.com

UFG

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE FERNANDA HÉLIA LUCIO- Aos dois dias do mês de agosto do ano de 2019 (02/08/2019), às 09:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA, MARA RÚBIA NUNES CELES e CLAYSON MOURA GOMES para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"Avaliação do papel da interleucina-17 na atividade microbicida de fagócitos inflamatórios de camundongos"**, em nível de MESTRADO, de autoria de FERNANDA HÉLIA LUCIO discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. MILTON ADRIANO PELLI DE OLIVEIRA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora	**Aprovada / Reprovada**
Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira	APROVADA
Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes	APROVADA
Prof. Dr. Clayson Moura Gomes	Aprovado

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10 h 55 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, Murilo Alves Guedes, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

IL-17 NA ATIVIDADE DE FAGÓCITOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C

	Assinatura
Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira – IPTSP/UFG	
Profa. Dra. Mara Rúbia Nunes Celes – IPTSP/UFG	
Prof. Dr. Clayson Moura Gomes – PUC/GO	Clayson Moura Gomes
Secretário da Pós-Graduação:	Murilo Alves Guedes

Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Fernanda Hélia Lucio

Orientador: Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Membros:

1. (Presidente) Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

2.(Memória-externo) Dr. Clayson Moura Gomes

3.(Membro interno) Drª. Mara Rúbia Nunes Celes

Data:02/08/2019

Dedico este trabalho à minha mãe e meus padrinhos por todo amor que têm por mim

"Só há um tempo em que é fundamental despertar.
Esse tempo é agora" Buda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir meu crescimento espiritual, intelectual e moral.

Agradeço a minha mãe, que sempre incentivou meu crescimento e favoreceu de todas as formas mais essa conquista (como todas as outras). Te amo infinitamente, mamãe!

Agradeço ao meu companheiro José Guilherme pela paciência, incentivo e por se alegrar comigo a cada pequena vitória. Você é meu melhor presente.

Ao Bob (Bilbo), tenho imensa gratidão por tanto amor e companheirismo em todos os momentos de estudo. Melhor dog do mundo!

Agradeço ao professor Dr. Milton por sua orientação e pela contribuição durante esse período de aprendizado.

Agradeço aos amigos Pollyana e André. Pessoas incríveis que a vida me permitiu conhecer. A vocês, todo o amor e sucesso do mundo!

Agradeço a todos os meus amigos, em especial aos amigos de laboratório, José e Mirian, por tantos momentos bons, por tantos risos e abraços que me fortaleceram nesta caminhada.

Agradeço ao apoio financeiro do CNPq pelo auxílio à pesquisa, possibilitando a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES, por fornecer a bolsa de estudos. Sem ela teria sido mais difícil me dedicar ao mestrado.

E por fim, agradeço ao Universo e a toda divindade pela sustentação espiritual e por todas as bênçãos encaminhadas a mim. Eu recebo e agradeço! ***Gratidão é a palavra.***

SUMÁRIO

SUMÁRIO x
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS xii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS xiii
RESUMO xiv
ABSTRACT xv
1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA 1
1.1Células fagocíticas e sua relação com as respostas imune inata e adquirida. 1
1.2 Marcadores característicos dos macrófagos murinos. 4
1.3 Respostas dos macrófagos: Produção de ROS, NO e Arginase. 5
1.4 A Influência da IL-17 na ativação dos macrófagos. 6
1.5 A Influência da IL-4 e da IL-13 na ativação dos macrófagos e sua atuação em camundongos knockout para IL-4. 9
2 JUSTIFICATIVA 12
3 OBJETIVOS 14
3.1 Objetivo Geral. 14
3.2 Objetivos Específicos. 14
3.2.1. Avaliar a migração de macrófagos peritoneais após a inoculação de tioglicolato buscando definir o melhor dia para obtenção dessas células ; 14
3.2.2. Avaliar a ação da IL-17 quanto sua capacidade indutora da atividade de arginase e produção de óxido nítrico na presença ou não de LPS ; 14
3.2.3. Avaliar se há sinergismo entre IL-4 ou IFN-γ com IL-17 na ativação alternativa ou clássica de macrófagos ; 14
3.2.4. Avaliar a ação da IL-4 quanto sua capacidade indutora da atividade em células KO para IL-4. 14
4 MÉTODOS 15
4.1 Camundongos. 15
4.2 Obtenção de células peritoneais inflamatórias e enriquecimento de macrófagos em cultura *in vitro.* 15
4.3 Análise de marcadores de superfície de células peritoneais por citometria de fluxo. 16
4.4 Avaliação da Atividade de Arginase. 16
4.5 Detecção de Óxido Nítrico (NO). 17
4.7 Análise Estatística. 17

5 RESULTADOS 18
5.1.1 Análise de marcadores de superfície de células peritoneais residentes ou inflamatórias obtidas em diferentes dias após inóculo com tioglicolato. 18
5.1.2 Expressão de marcadores em células peritoneais aderentes recuperadas em diferentes tempos. 19
5.1.3 Intensidade de Fluorescência de diferentes marcadores. 20
5.1.4 Atividade da Arginase. 21
5.1.5 Produção de óxido nítrico. 24
6 DISCUSSÃO 28
7 CONCLUSÕES 32
8 REFERÊNCIAS 33
9 ANEXOS 40
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE 40

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Figura 1: Células peritoneais inflamatórias aumentam a expressão de M1/70, F4/80 e IL-17R após a inoculação de tioglicolato..... 18
Figura 2: A expressão dos marcadores M1/70, F4/80 e IL-17R em células aderentes é maior no 5º dia após o inóculo com tioglicolato..... 19
Figura 3: Células peritoneais inflamatórias aderentes apresentam maior intensidade de fluorescência no 5º dia após inoculação com tioglicolato. 20
Figura 4: Células de camundongos IL-4 KO possuem uma maior atividade de arginase que de animais WT..... 21
Figura 5: IL-17 não alterou a atividade de arginase em macrófagos de animais selvagens ou IL4 KO..... 22
Figura 6: IL-4 e IL-17 não agem de forma sinérgica para aumentar a atividade da arginase..... 23
Figura 7: Sinergismo entre IFN-γ e LPS induz aumento na produção de nitrito em células de camundongos WT e KO..... 24
Figura 8: IL-17 A age sinergicamente com para induzir a produção de nitrito em células de camundongos WT e KO..... 25
Figura 9: Sinergismo entre IL-17F e LPS para produção de nitrito em células de camundongos WT..... 26
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética, TCLE..... 39
Anexo 2: Termo de prorrogação do projeto..... 44

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

APC: Célula apresentadora de antígeno
Arg: Arginase
CCL: Ligantes de receptores de quimiocinas CC
CXCL: Ligantes de receptores de quimiocinas CXC
CD: Grupo de diferenciação celular
CT: Controle
DAMPs: Padrões Moleculares Associados à Danos
DCs: Células dendríticas
IL: Interleucina
IFN-γ: Interferon - gama
IL-17: Interleucina 17
IL-17R: Receptor de Interleucina 17
iNOS: Óxido nítrico sintase induzida
KO: Do inglês Knockout
LPS: Lipopolissacarídeo
MCSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos
MHC: Complexo de histocompatibilidade principal
M1: Macrófagos classicamente ativados
M2: Macrófagos alternativamente ativados
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFκB: Fator Nuclear kappa B
NO: Óxido nítrico
PAMPs: Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS: Solução salina fosfatada
PRR: Receptores de reconhecimento de padrões
PECs: Células da cavidade peritoneal
PGE2: Prostaglandina E2
ROR-γt: Receptor γt órfão associado ao ácido retinóico
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SFB: Soro fetal bovino
T.a.: Temperatura ambiente
TGF-β: Fator transformador de crescimento β
Th1: Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2: Linfócito T auxiliar do tipo 2
Th17: Linfócito T auxiliar do tipo 17
TNF: Fator de Necrose Tumoral
WT: Wild-type

RESUMO

Introdução: Macrófagos inflamatórios expressam grande quantidade de receptores para IL-17 (IL-17R) favorecendo a ligação da IL-17. O papel da IL-17 na ativação desses macrófagos e o desenvolvimento de uma resposta microbicida ou reguladora não está completamente esclarecido, contudo, estudos anteriores demonstraram que a IL-17 pode estimular macrófagos peritoneais a aumentar a atividade de arginase ou óxido nítrico sintase induzida. Nós investigamos a atuação da IL-17 e sua possível interação com IFN-γ, IL-4 e LPS na indução dos perfis M1 ou M2 de macrófagos de camundongos BALB/c selvagens (WT) e IL-4 *knockout* (KO). **Objetivo:** Avaliar a capacidade da IL-17, sozinha ou em associação com outras citocinas, ativar diferentes perfis de macrófagos. **Métodos:** Macrófagos peritoneais eliciados com tioglicolato foram caracterizados por citometria e estimulados *in vitro* por 48h com diferentes associações IL-17A, IL-17F, LPS, IL-4 e IFN-γ. No sobrenadante avaliamos a produção de NO e as células lisadas foram utilizadas para avaliação da atividade da arginase. **Resultados:** Células totais colhidas em diferentes dias após inóculo com tioglicolato apresentaram pouca variação para os marcadores M1/70, F4/80 e IL-17R. As células aderentes obtidas no dia 5 representaram uma população celular com maior quantidade de células marcadas para M1/70 e F4/80, além de expressar maior quantidade de IL-17R na superfície celular. A IL-17 sozinha não induziu a atividade da arginase nem a produção de NO em camundongos WT e IL-4 KO. A associação de IL-4 com IL-17 também não induziu a atividade da arginase, porém IL-17 associada com o IFN-γ aumentou a produção de NO nas duas linhagens testadas. Os macrófagos IL-4 KO apresentaram maior atividade da arginase mesmo sem estímulo com citocinas e IL-4 proporcionou um aumento ainda maior na atividade destes macrófagos.

Palavras-Chave: IL-17A, IL-17F, IL-4, Macrófagos inflamatórios, IL-4 KO.

ABSTRACT

Introduction: Inflammatory macrophages express high amount of IL-17 receptor (IL17R) favoring IL-17 binding. The role of IL-17 activating macrophages to increase microbicidal activity or regulatory response is not completely clear, but previous studies demonstrated that IL-17 activates peritoneal macrophages to increase arginase and induced nitric oxide synthase. Here, we investigated the role of IL-17 and its interaction with IFN-γ, IL-4 and LPS to induce M1 or M2 profiles in wild type (WT) and IL-4 knockout (KO) BALB/c mice. **Objective**: Evaluate the ability of IL-17, alone or in association with other cytokines, to activate different macrophage profiles. **Methods**: Thioglycolate-elicited peritoneal macrophages were characterized by cytometry and stimulated *in vitro* for 48h with different association of IL-17A, IL-17F, LPS, IL-4 and IFN-γ. The supernatant was used to evaluate NO production and lysed cells were used to evaluate arginase activity. **Results**: Cells harvested from different days after thioglycolate inoculation showed no variation for M1/70, F4/80 and IL-17R. Adherent cells obtained on day 5 presented the largest number of M1/70, F4/80, IL-17R positive cells. IL-17 alone did not induce arginase activity or NO production in WT and IL-4 KO mouse macrophages. Association of IL-4 with IL-17 did not induce arginase activity, but IL-17 plus IFN-γ increased NO production in both strains tested. IL-4 KO macrophages presenting high arginase activity even without stimulation with cytokines and IL-4 increased in these macrophages.

Keywords: IL-17A, IL-17F, IL-4, Inflammatory macrophages, IL-4 KO.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1Células fagocíticas e sua relação com as respostas imune inata e adquirida.

O sistema imunológico dos mamíferos é constituído pela interação de duas diferentes respostas: a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (Kawai e Akira, 2009). Dada a importância do desenvolvimento de uma resposta imune eficaz contra agentes infecciosos, essa resposta conta com diversas células, entre elas os leucócitos, que são células de origem hematopoiéticas compostas por diversos tipos celulares circulantes, que desempenham várias funções na defesa do hospedeiro (Geissmann *et al.*, 2010)(Tristao *et al.*, 2017).

Uma variedade de células está envolvida no processo de defesa estabelecido pela resposta imune, tais como células dendríticas, macrófagos, células T e células B. Essas células têm por objetivos barrar a entrada ou disseminação de microrganismos invasores e eliminar células tumorais (Kuwabara *et al.*, 2017). A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa do organismo contra invasão de microrganismos patogênicos e é mediada principalmente por macrófagos e células dendríticas (Kawai e Akira, 2009). Os macrófagos foram primeiramente descritos por Metchnikoff e são classificados como células mononucleares que apresentam características fagocíticas e pertencem a um grupo de células denominado sistema fagocítico mononuclear, que juntamente com os monócitos, fazem parte de uma população de células mielóides derivadas da medula óssea (Geissmann *et al.*, 2010). Monócitos e macrófagos são células multifuncionais relacionadas tanto ao processo de defesa do hospedeiro, quanto nos processos de promoção e manutenção da homeostasia de tecidos danificados (Oishi e Manabe, 2016).

Como células imunes efetoras, os monócitos possuem receptores para quimiocinas e receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que possibilitam sua ativação visando a migração dessas células para o local da infecção ou injúria. São consideradas células intermediárias no desenvolvimento entre precursores da medula óssea e os macrófagos (Geissmann *et al.*, 2010).

Os monócitos murinos podem ser diferenciados por seu fenótipo e sua função. Quando maduros e diferenciados na medula óssea, no sangue ou no baço, podem ser caracterizados em Gr1+Ly6C^{high} e Gr1-Ly6C^{low}. Monócitos Gr1-Ly6C^{low} são menores, perdem a capacidade de expressar CCR2 e L-selectina, aumentam a expressão de receptores para quimiocinas CX3CR1, integrina LFA-1 e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) podendo assim facilitar a recuperação tecidual por promover a acumulação de fibroblastos, angiogênese e deposição de colágeno. Monócito for Gr1+Ly6C^{high}, ele pode se diferenciar de forma semelhante aos macrófagos classicamente ativados e assumirá um perfil diferente no qual poderá se diferenciar em macrófago ou célula dendrítica, que por sua vez podem tanto ativar quanto inibir a resposta imune a depender dos sinais locais ou sistêmicos recebidos e ainda da natureza do patógeno envolvido (Geissmann *et al.*, 2010).

Os macrófagos, por sua vez, podem ter origem desde a formação do saco vitelino onde são gerados macrófagos residentes dos diversos tecidos, ou ainda ter origem hematopoiética onde são derivados da migração de monócitos sanguíneos para os tecidos (Wynn *et al.*, 2013; Ensan *et al.*, 2016). Subpopulações precursoras de monócitos na circulação definem progenitores para macrófagos "residentes" (Ly6C^{low}) no estado estacionário, ou podem ser recrutados para os locais onde se desenvolve o processo inflamatório (Ly6C^{high}) segundo a sinalização de CCR2 (Barin *et al.*, 2012). São células que apresentam características distintas de acordo com o sítio anatômico a que pertencem (Soudi *et al.*, 2013). Os macrófagos residentes habitam diferentes órgãos, sendo especializados na reposta imune local e recebendo denominação específica como as células de Kupffer no fígado, micróglia no cérebro, osteoclastos nos ossos e macrófagos alveolares quando nos pulmões. A reposição tecidual dessas células residentes se dá pela migração de monócitos sanguíneos produzidos pela medula óssea (Lauterbach e Wunderlich, 2017) e elas são caracterizadas principalmente pela presença do marcador CX3CR1 e CCR2^{-} (Epelman *et al.*, 2014; Molawi *et al.*, 2014).

O sistema de fagócito mononuclear é flexível, dinâmico e capaz de responder a estímulos fisiológicos e a circunstâncias patológicas. Os macrófagos são essenciais para a sobrevivência do hospedeiro e fornecem um alvo atraente para manipulá-lo, tanto para fins imunológicos como metabólicos (Gordon, 2007). Há alguns anos, Mills et al., 2000, propuseram uma classificação para essas células após avaliar sua capacidade responsiva. Macrófagos podem ser classificados como M1 ou classicamente ativados, capazes de promover e responder a um perfil pró-inflamatório implicados na defesa mais eficaz do

organismo, e M2 ou alternativamente ativados com perfil anti-inflamatório e propriedades restauradoras voltadas à recuperação do tecido danificado (Mills *et al.*, 2000).

Os macrófagos expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) tais como os receptores semelhantes a Toll (TLR) que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e receptores capazes de reconhecer padrões moleculares associados a danos (DAMPs), quando há presença de fragmentos de células e outros produtos celulares. (Aki *et al.*, 2010). Quando a ativação se dá pelo reconhecimento de antígenos microbianos como o LPS e acontece a ativação do perfil de linfócitos T helper 1 (Th1) responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias específicas como o Interferon-gama (IFN-γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF), acontece a ativação clássica desse macrófago (M1) para eliminar diferentes patógenos intracelulares (Gazzinelli *et al.*, 1998; Mcmahon-Pratt e Alexander, 2004; Oliveira *et al.*, 2005; Pinheiro e Rossi-Bergmann, 2007; Soong, 2008; Zhu *et al.*, 2010). Estas citocinas aumentam a expressão do MHC de classe II e classe I em células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, favorecendo a apresentação de antígenos para linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, o que consequentemente induz ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Chen *et al.*, 2017). A IL-12 é uma dessas citocinas secretadas pelas APCs, importante para diferenciação e manutenção do perfil Th1 de resposta imune (Gao *et al.*, 2018).

Durante uma resposta inflamatória acontece ainda o envolvimento de citocinas como a IL-4 e IL-13 que promovem o desenvolvimento de uma resposta Th2, também capaz de ativar os macrófagos, sendo estes denominados macrófagos alternativamente ativados (M2). Esses macrófagos estão envolvidos nos processos de reparação tecidual, resposta inume alérgica e infecções parasitárias (Gordon, 2007; Zhu *et al.*, 2010; Oishi e Manabe, 2016). Quando os macrófagos são ativados de forma alternativa, eles desempenham funções para ajudar a resolver e finalizar um processo inflamatório. Algumas das medidas desenvolvidas para isso é o aumento da capacidade de eliminação endocítica, expressão de receptores de manose, secreção de CCL17, IL-1ra e IL-10. Essas medidas inibem a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, TNF-α, IL-6, IL-12, GM-CSF, IFN-γ e ânions superóxido. A CCL17 auxilia na produção de citocinas relacionadas ao perfil Th2 de resposta, a IL-1ra atua como antagonista de IL-1 e a IL-10 apresenta ação inibidora parácrina sobre as células vizinhas como os macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Aki *et al.*, 2010; Cherry *et al.*, 2014).

A partir do reconhecimento dos PAMPs e DAMPs, os macrófagos são ativados tornando-se efetores e estabelecem então uma comunicação com os linfócitos T, promovendo a integração da reposta imune inata e adaptativa (Chen *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018). Assim, é iniciado um processo importante para proteção do hospedeiro contra infecção ou injúria tecidual, inclusive aquelas originadas dos processos de necrose e de diversas condições patológicas (Moreira e Zamboni, 2012).

1.2 Marcadores característicos dos macrófagos murinos.

Acredita-se que nos camundongos, os primeiros monócitos que entram na corrente sanguínea oriundos da medula óssea tenham um perfil inflamatório, sendo capazes de sair rapidamente da corrente sanguínea e se desenvolverem em macrófagos teciduais. Uma teoria sustenta que os monócitos que não são inicialmente recrutados para o tecido podem amadurecer ainda mais no sangue e, eventualmente, tornar-se parte de uma população residente de monócitos com o objetivo de contribuir para a integridade do revestimento de células endoteliais dos vasos sanguíneos e promover a manutenção de populações de macrófagos residentes no tecido no estado estacionário. Além disso, essas células tornam-se a principal fonte de macrófagos inflamatórios nos tecidos durante a inflamação e trauma, momento em que a migração de monócitos da corrente sanguínea é melhorada (Mosser e Edwards, 2008).

O uso de marcadores antigênicos como o F4/80 em células de murinos torna possível identificar populações diversas de macrófagos em todos os órgãos do corpo, reforçando definições anteriores de macrófagos em órgãos linfo-hematopoéticos, tecidos gastrointestinais, pulmonares, urogenitais, sistema nervoso e o trato reprodutivo. Esses estudos mostraram a importância dos macrófagos residentes, distribuídos durante o desenvolvimento e durante toda a vida adulta na ausência de inflamação, e a sua extensa heterogeneidade local (Gordon, 2007).

De maneira geral, é difícil a distinção entre macrófagos residentes e macrófagos recém-recrutados derivados de monócitos nos tecidos por análise de marcadores antigênicos como M1/70, marcador de células fagocíticas, e F4/80, marcador de macrófagos (Gordon, 2007; La Flamme *et al.*, 2012). Contudo, essa caracterização é feita pela expressão de IL-17R, pois os macrófagos inflamatórios expressam maior quantidade de receptores para IL-17 que os macrófagos residentes (Barin *et al.*, 2012).

1.3 Respostas dos macrófagos: Produção de ROS, NO e Arginase.

Os estímulos imunes (infecções ou danos teciduais) promovem o recrutamento de populações de macrófagos que vão direcionar a resposta para um perfil pró-inflamatório ou anti-inflamatório, de acordo com a natureza desse estímulo (Soudi *et al.*, 2013). Estudos mostram que o resultado de várias doenças inflamatórias é determinado pelo fenótipo assumido pelos macrófagos (Aki *et al.*, 2010). Após sua ativação pela ligação via PPRs (PAMPs e DAMPs), aqueles macrófagos presentes no ambiente onde há células do perfil Th1 produzindo INF-γ e TNF têm a capacidade de expressar uma grande quantidade das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e fagócito NADPH oxidase (Phox). Estas enzimas são responsáveis por sintetizar respectivamente óxido nítrico (NO) e espécies reativas do oxigênio (ROS), os principais agentes microbicidas descritos para o combate a patógenos intracelulares, apresentando menor produção de ornitina e uréia (Forstermann e Sessa, 2012). Quando estimulados em presença de IL-4 / IL-13, citocinas do perfil Th2, a resposta dos macrófagos M2 é caracterizada por baixa produção de óxido nítrico e aumento no metabolismo da arginina em ornitina e ureia (Bogdan *et al.*, 2000; Gordon, 2003; Mukbel *et al.*, 2007; Colotti e Ilari, 2010). A ornitina pode ser convertida em prolina, um aminoácido importante para a síntese de colágeno, e ainda em poliaminas, essenciais para o crescimento e diferenciação celular no processo de reparação da lesão (Kampfer *et al.*, 2003; Satriano, 2004; Dzik, 2014; Abd El-Aleem *et al.*, 2019).

A L-arginina é um aminoácido importante na resposta imune inata, envolvida em numerosos processos fisiológicos, essencial para o crescimento dos macrófagos e o desenvolvimento de uma resposta M1 ou M2 (Sans-Fons *et al.*, 2013). A polarização da célula pode determinar o rumo de uma resposta imune, tornando-a mais ou menos efetiva. A iNOS é ativada por uma variedade de citocinas e pela ligação de PAMPs aos receptores PRRs, especialmente aos TLRs dos macrófagos. Após essa ativação, acontece a produção de NO pelos macrófagos representando uma importante arma efetora contra microrganismos (Oliveira *et al.*, 2014).

Alguns estudos apontam para a ação da IL-17 no aumento da produção de NO pela indução da transcrição do gene da iNOS (Trajkovic *et al.*, 2001). Sugerem que a IL-17 pode agir sinergicamente com IFN-γ para aumentar a expressão de iNOS em macrófagos de camundongos C57BL/6 e em linhagem de células de camundongos BALB/c (Liu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Zhang, Atsuta, Liu, Chen, Shi e Le, 2013). É interessante

notar que IL-17 não tem efeito sobre macrófagos peritoneais residentes, uma vez que eles não apresentam receptores para essa citocina. (Trajkovic *et al.*, 2001).

1.4 A Influência da IL-17 na ativação dos macrófagos.

A Interleucina 17 é uma importante citocina presente na resposta inflamatória envolvida não apenas nos processos de defesa, mas também relacionada a doenças inflamatórias, autoimunes e tumores (Zhang, Atsuta, Liu, Chen, Shi, Shi, *et al.*, 2013). A IL-17 é produzida por uma ampla gama de células do sistema imune inato e adaptativo e atua em diferentes tipos celulares promovendo a produção de quimiocinas que recrutam e ativam neutrófilos (Sousa *et al.*, 2014), mostrando-se ainda capaz de influenciar no recrutamento de macrófagos (Chen *et al.*, 2011). É uma citocina que possui a capacidade de induzir a proliferação de células de diferentes origens, sendo composta por uma família de citocinas formada por seis membros classificados em IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F (Liao *et al.*, 2017). Contudo, o perfil Th17, principal responsável pela secreção da IL-17, pode ainda produzir outras citocinas e quimiocinas como TNF-α, IL-6, IL-21 e IL-22 (Tristao *et al.*, 2017). Além dos linfócitos Th17, células da imunidade inata como as *natural killler* (NK), neutrófilos, eosinófilos e outras são também capazes de produzir IL-17A e IL-17F (Korn *et al.*, 2009; Cua e Tato, 2010).

Os linfócitos Th17 exercem ações protetivas contra vários tipos de infecções, especialmente relacionada com fungos e bactérias extracelulares tendo a IL-23 como principal citocina para sua manutenção, embora ela não seja requerida para a diferenciação desse perfil (Tristao *et al.*, 2017). As células Th17 são também capazes de secretar TNF-α assim como Th1 e quando atuam em sinergismo essas células podem melhorar a expressão de MHC de classe I nos macrófagos (Chen *et al.*, 2017). Por mecanismos dependentes e independentes da indução da resposta inflamatória, a IL-17 interfere no controle de vírus, fungos, bactérias, protozoários e tumores (Kryczek *et al.*, 2009; Pitta *et al.*, 2009; Khader e Gopal, 2010; Espinosa e Rivera, 2012; Middleton *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).

A IL-17 tem a capacidade de recrutar neutrófilos e monócitos para os locais da inflamação induzindo o aumento na produção de CXCL-8 no local da injúria. A CXCL-8 exerce funções como promoção de quimiotaxia para os neutrófilos e células T, estimula a produção de G-CSF, GM-CSF (expansão de células mielóides) e IL-6, além de estimular

os macrófagos a produzir de IL-1β e TNF-α. A IL-17 pode conduzir a resposta inflamatória aguda para uma resposta crônica (Clements *et al.*, 2017), agindo, portanto, não apenas na condução inicial, mas ainda manutenção de um perfil de resposta imune pró-inflamatória (Trajkovic *et al.*, 2001). Além disso, essa citocina consegue induzir os neutrófilos a apoptose, promovendo a fagocitose dessas células apoptóticas pelos macrófagos (Lopez Kostka *et al.*, 2009). Entretanto, trabalhos anteriores demonstraram que a IL-17 é capaz de induzir a produção de IL-6, caracterizada como uma citocina pró-inflamatória, porém capaz de atuar em macrófagos murinos como reguladora e induzir a expressão de IL-10 e a atividade de arginase (Fernando *et al.*, 2014; Mauer *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2014). Dessa forma, a IL-17 pode desenvolver uma atividade reguladora durante a resposta inflamatória (Zizzo e Cohen, 2013).

IL-17A e IL-17F agem em ampla gama de células com o objetivo de induzir a expressão de citocinas como TNF, IL-1β, IL-6, GM-CSF, G-CSF, quimiocinas como CXCL1, CXCL8, CXCL10 e metaloproteinases. Além disso, são capazes de produzir CCL20, ligante para CCR6 que é quimiotática para células dendríticas (Korn *et al.*, 2009). A IL-17A é a isoforma mais estudada da família IL-17 por ser a isoforma mais importante (De La Paz Sanchez-Martinez *et al.*, 2017).

Na fase inicial da inflamação, os neutrófilos são as células que prevalecem no processo inflamatório e são capazes de produzir várias citocinas, como a IL-17. Contudo, as principais células responsáveis pela produção dessas citocina são os linfócitos Th17 sendo ela a citocina de assinatura desse perfil de resposta imune adaptativa. Receptores para IL-17RA estão expressos em diversas células de diferentes tecidos (Sahin *et al.*, 2015; Clements *et al.*, 2017; Tristao *etb al.*, 2017) e mesmo atuando em resposta protetiva do hospedeiro contra diversos agentes infecciosos, a IL-17A pode promover um papel deletério direcionando a resposta imune para o desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamatórias e câncer (Prabhala *et al.*, 2016). IL-17RA é o receptor cognato da IL-17 e se liga tanto com a IL-17A quanto com a IL-17F, embora apresente maior afinidade com a IL-17A. Esse receptor tem expressão mais intensa em células hematopoiéticas e uma expressão menor em células residentes como osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais. Já o IL-17RC é o receptor cognato para IL-17F, com alta expressão em células não hematopoiéticas (Korn *et al.*, 2009). Alguns estudos apontam uma resposta imune Th1 amplificada em modelos de camundongos IL-17ARKO aumentando a gravidade da doença. Boari et al, demonstraram que o silenciamento desse receptor provocou a evolução da infecção por *T.*

cruzi levando ao aumento da mortalidade devido a uma resposta Th1 exagerada (Tosello Boari *et al.*, 2012).

A IL-17A também é capaz de agir sobre macrófagos, já que estes expressam os receptores IL17RA e IL-17RC (Barin *et al.*, 2012; Ge *et al.*, 2014) induzindo a produção de citocinas e quimiocinas como a IL-6, CCL2, IL-1β, IL-12, IL-10 e TNF-α através da ativação da p38 MAPK promovendo assim sua ativação e diferenciação. (De La Paz Sanchez-Martinez *et al.*, 2017). Entretanto, a produção de moléculas envolvidas na resposta inflamatória induzidas pela IL-17 em macrófagos é complexa e não foi ainda completamente caracterizada (De La Paz Sanchez-Martinez *et al.*, 2017). Além disso, já foi observado que a deficiência da IL-17 interfere no recrutamento de macrófagos, provocando alterações no desenvolvimento da inflamação. Experimento realizado em camundongos KO para IL-17A mostrou uma diminuição na expressão de MCH de classe II e também dos receptores de manose nos macrófagos, além de comprometer sua maturação, ativação e diferenciação (Barin *et al.*, 2012).

Devido a sua capacidade de promover inflamação, vários trabalhos relacionam a IL-17 com a patogênese de inflamações crônicas, alergias e doenças autoimunes como artrite reumatoide (AR), Esclerose Múltipla (EM), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Doença Inflamatória Intestinal (DII) entre outras (Mcgeachy e Cua, 2008; Korn *et al.*, 2009). Para evitar tais doenças, a sinalização desta citocina deve ser muito bem regulada. Existem trabalhos que demonstram que a IL-17 pode exercer uma atividade moduladora na inflamação, inibindo a expressão de genes pró-inflamatórios. Dentre os mecanismos de regulação negativa descritos, podemos citar a dupla fosforilação de c/EBPb, recrutamento de TRAF3 e de TRAF4 (Shen *et al.*, 2009; Song e Qian, 2013). Outro mecanismo de regulação da IL-17 é mediado pelos neutrófilos atraídos para o ambiente inflamatório, os quais podem entrar em apoptose e favorecer a geração de macrófagos reguladores (Laskay *et al.*, 2008; Mosser e Edwards, 2008).

A IL-17 pode recrutar macrófagos e induzi-los à produção de citocinas (incluindo a própria IL-17) e quimiocinas. Essa interação entre macrófagos e IL-17 pode potencializar as respostas inflamatórias mediadas por essa citocina, induzindo inclusive a ativação clássica dos macrófagos, uma vez que a IL-17 promove a polarização de M1 induzida por IFN-γ, favorecendo a fosforilação de STAT1 e suprimindo a fosforilação de STAT6, o que conduziria a uma polarização M2 ativando alternativamente os macrófagos. Os macrófagos então ativados pela via clássica são estimulados pela IL-17 a produzir citocinas como a IL-6 e a IL-23, importantes para a diferenciação e manutenção

do perfil Th17 (Zhang, *et al.*, 2013). A IL-23 desenvolve um papel crítico ao estabelecer essa ligação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (Korn *et al.*, 2009). Quando combinada ao IFN-γ, a IL-17 pode regular a produção de IL-10 nos macrófagos e induzir a produção de óxido nítrico (NO) (Quirino *et al.*, 2016).

Macrófagos M1 apresentam aumento na expressão de TLR2 e TLR4 se comparados com macrófagos não estimulados e um aumento ainda mais significante nos M2 utilizando-se a mesma comparação. Já em macrófagos diferenciados com IL-17 observou-se um aumento menor na expressão de TLR2 e TLR4 comparados com macrófagos não diferenciados. Estudos mostraram que monócitos estimulados com IL-17 se diferenciaram em macrófagos e não apresentaram alterações na expressão das suas moléculas de superfície relacionadas com os fenótipos M1 e M2. Esses resultados sugerem que macrófagos diferenciados com IL-17 expressam receptores TLR2 e TLR4 na sua superfície, o que consequentemente contribui para a sua ativação (De La Paz Sanchez-Martinez *et al.*, 2017).

Embora muitos trabalhos demonstrem que a IL-17 seja capaz de exercer uma influência na atividade pró-inflamatória dos macrófagos (Trajkovic *et al.*, 2001; Korn *et al.*, 2009; Zhang, Atsuta, Liu, Chen, Shi, Shi, *et al.*, 2013), outros estudos demonstram que essa citocina pode agir também na regulação da resposta inflamatória, induzindo o macrófago a produzir citocinas anti-inflamatórias e estabelecendo também um perfil permissivo nessas células (Zizzo e Cohen, 2013; Sousa *et al.*, 2014).

1.5 A Influência da IL-4 e da IL-13 na ativação dos macrófagos e sua atuação em camundongos knockout para IL-4.

A IL-4 e a IL-13 são citocinas canônicas do tipo 2 que atuam na resposta imune contra parasitas extracelulares através da indução da produção de IgE, ativação de macrófagos M2 e diferenciação de linfócitos Th0 em Th2 (Wang *et al.*, 2015). Receptores para IL-4 estão presentes em células hematopoiéticas, enquanto os receptores para IL-13 estão presentes em maior quantidade em células não hematopoiéticas (Gordon e Martinez, 2010), contudo, essas citocinas podem se ligar aos receptores de cadeia α comum, IL-13Rα2 e IL-4Rα (Hodgkinson *et al.*, 2017).

A IL-4 é uma citocina pleiotrópica (Hodgkinson *et al.*, 2017), descrita pela primeira vez em 1982 como um fator secretado por células T que seria capaz de levar à

proliferação de células B (Kedong *et al.*, 2019). Hoje se sabe que essa citocina é capaz de desempenhar um papel central na mediação do fenótipo Th2 além de desenvolver funções na homeostase e regulação da resposta imune. É produzida principalmente por células Th2, contudo, pode ser produzida também por outras células de origem hematopoiética como mastócitos, eosinófilos e basófilos (Paliard *et al.*, 1988; Seder *et al.*, 1992; Moqbel *et al.*, 1995; La Flamme *et al.*, 2012; Hodgkinson *et al.*, 2017).

A IL-4 está relacionada com a proliferação celular e prevenção da apoptose em diversas células, como linfócitos e macrófagos (Ul-Haq *et al.*, 2016), podendo promover a ativação alternativa dos macrófagos, estabelecendo um fenótipo de restauração celular com alteração do equilíbrio Th1/Th2 (Gordon e Martinez, 2010). Essa ativação para um perfil M2 é caracterizada pelo aumento do metabolismo da L-arginina pela enzima arginase, promovendo assim o desenvolvimento de uma função restauradora por essa célula (Hodgkinson *et al.*, 2017). Além disso, essa citocina é capaz de regular as condições alérgicas (Ul-Haq *et al.*, 2016).

A transcrição do gene para produção da IL-4 é dependente do Fator Nuclear de Células T (NF-AT) (Park *et al.*, 2006). Esse fator de transcrição permanece inativo no citoplasma até que seja desfosforilado pela ação da calcineurina após ativação celular. Essa desfosforilação leva a sua translocação para o núcleo onde ele será integrado a outro fator de transcrição, AP-1. Essa integração inicia o processo de transcrição do gene para IL-4, desencadeando a ativação de outros três fatores de transcrição: STAT6, GATA3 e C-maf. STAT6 é um fator de transcrição responsável pela expressão do receptor de IL-4, capaz de induzir ainda o aumento da síntese dessa proteína e consequentemente a diferenciação do perfil Th2. Estudos realizados em camundongos knockout para receptores de IL-4 (IL-4RaKO), onde houve bloqueio da ação de STAT6, comprovaram a incapacidade de diferenciação de células T naive para o perfil Th2, impedindo consequentemente a produção de IL-4. GATA 3 também está relacionado ao desenvolvimento de células Th2, agindo na região distal do gene e C-maf atuando na região proximal do gene promotor de IL-4. A deficiência em C-maf leva à expressão reduzida de IL-4 (Ul-Haq *et al.*, 2016).

Assim como a IL-4, a IL-13 é também uma citocina do perfil Th2 que apresenta atividade sobreposta com a IL-4 na ativação alternativa dos macrófagos, embora possuam funções distintas (Munitz *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2015; Hodgkinson *et al.*, 2017). A IL-4 e a IL-13 atuam nos macrófagos de forma a regular positivamente a expressão dos receptores de manose e das moléculas de MHC de classe II, estimulando a endocitose e a

apresentação de antígenos além de promoverem a ativação da enzima arginase (Gordon, 2003).

A IL-13 é uma citocina marcante do perfil Th2 e desempenha um papel importante em doenças alérgicas. Essa citocina pode ser produzida por várias células como células T auxiliares foliculares, células linfoides inatas do grupo 2 (ILC2), eosinófilos, mastócitos e basófilos (Mitamura *et al.*, 2018).

Embora a IL-4 e IL-13 sejam indutores diretos da ativação alternativa dos macrófagos, outras citocinas como a IL-25 e IL-33 são capazes de amplificar indiretamente essa polarização através das células Th2, induzindo o aumento da produção de citocinas desse perfil. A IL-25 é uma citocina da família da IL-17 capaz de induzir a produção de células hematopoiéticas (Gordon e Martinez, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

O sistema inume é responsável por promover e manter a homeostasia no hospedeiro. Para isso desenvolve mecanismos de defesa contra agentes patogênicos ou potencialmente patogênicos e injúrias internas capazes de provocar algum dano celular (Murray, 2018). Para que células como os macrófagos sejam capazes de responder satisfatoriamente a cada agressão elas recebem uma série de estímulos pós-reconhecimento do agente agressor, como o de citocinas pró-inflamatórias ou reguladoras (Hotchkiss *et al.*, 2016). Esses estímulos induzem o recrutamento de populações de macrófagos que serão capazes de conduzir a resposta inflamatória (Soudi *et al.*, 2013).

Quando ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs), os macrófagos podem se diferenciar em M1 ou M2 (Aki *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2014). Macrófagos classicamente ativados (M1) são capazes de produzir IL-12 o que induz a produção de IFN-γ principalmente por células T auxiliares Th1. Essa citocina ajuda a estabelecer um perfil pró-inflamatório e com alto poder microbicida desse macrófago (Geissmann *et al.*, 2010). Quando são estimulados por citocinas como IL-4 e IL-13, são caracterizados por uma ativação alternativa que favorece o estabelecimento de ações que promovem a reparação tecidual (Gordon, 2003). Contudo outras citocinas também estão envolvidas na ativação dessas células, entre elas está a IL-17, citocina importante na resposta inflamatória e na ativação indução da proliferação celular (Zhang, Atsuta, Liu, Chen, Shi e Le, 2013).

Os macrófagos têm a capacidade de promover ações não apenas microbicidas ou reparadoras, mas também são capazes de estabelecer a regulação da resposta imune através da produção de IL-10 (Schmidt *et al.*, 2000). Diferentes estudos descreveram que a IL-17 tem a capacidade de induzir nos macrófagos o aumento ou diminuição da produção de IL-10, direcionando assim a produção de citocinas pró- ou anti-inflamatórias (Zizzo e Cohen, 2013; Sousa *et al.*, 2014).

Pelo fato dos macrófagos serem células fagocíticas cuja ativação pode ser ainda estimulada pela ação de diferentes citocinas tais como a IL-17, IL-4 e IL-13, nossos ensaios buscam demonstrar *in vitro* a importância dessas citocinas na atividade desses fagócitos. Sabendo das propriedades controversas da IL-17 e da capacidade da IL-4 em ativar alternativamente os macrófagos (Gordon, 2003), buscamos entender a atuação da IL-17 nos macrófagos inflamatórios de murinos, células capazes de expressar maior quantidade de receptores para IL-17 na sua superfície celular (Barin *et al.*, 2012), e como essa citocina interage na presença de outros estímulos. A utilização de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c WT e IL-4KO nos permite avaliar se há sinergismo entre IL-17 e IFN-γ e IL-17 e IL-4, avaliando ainda a ação da IL-4 quanto sua capacidade de induzir atividade em células IL-4KO.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral.

Avaliar se a IL-17 é capaz de ativar macrófagos inflamatórios peritoneais de camundongos BALB/c WT ou IL-4 KO de forma clássica ou alternativa

3.2 Objetivos Específicos.

3.2.1. Avaliar perfil de macrófagos peritoneais após a inoculação de tioglicolato em diferentes tempos;

3.2.2. Avaliar a ação da IL-17 quanto sua capacidade indutora da atividade de arginase e produção de óxido nítrico na presença ou não de LPS ;

3.2.3. Avaliar se há sinergismo entre IL-4 ou IFN-γ com IL-17 na ativação alternativa ou clássica de macrófagos ;

3.2.4. Avaliar a ação da IL-4 quanto sua capacidade indutora da atividade em células KO para IL-4.

4 MÉTODOS

4.1 Camundongos.

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c WT e IL-4 KO de ambos os sexos e com idades entre 6 a 16 semanas. Os animais foram mantidos em estantes ventiladas e permaneceram durante todo o desenvolvimento do projeto no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Receberam alimentação e água *ad libitum*. Projeto desenvolvido mediante aprovação pela Comissão de Ética No Uso de Animais CEUA sob o protocolo 39/2013 (Anexos 1, 2 e 3).

4.2 Obtenção de células peritoneais inflamatórias e enriquecimento de macrófagos em cultura *in vitro*.

Os animais foram inoculados com 3 mL de Tioglicolato a 3% (DIFcoLaboratories, Detroit, MI, USA) por 4 a 6 dias. Após este período, os animais foram eutanasiados por decaptação após anestesia com 100µL de xilazina (Anasedan)/ketamina (Cetamin) e em seguida foi realizada a lavagem peritoneal com PBS estéril gelado. As células obtidas foram mantidas no gelo durante todo o procedimento. Macrófagos residentes não inflamatórios foram obtidos de animais não injetados com tioglicolato.

As células peritoneais totais obtidas foram lavadas com PBS. Para a avaliação dos marcadores de superfície as células foram submetidas a dois procedimentos distintos. No primeiro, após a lavagem com PBS, as células totais foram marcadas para M170, F480 e IL-17R. No segundo procedimento, as células foram incubadas por 1h em placas de 6 poços (Costar, Sigma, Alemanha) previamente tratadas com SBF 50%. Após a incubação, as células do sobrenadante foram desprezadas e as células aderidas foram retiradas com a adição de meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MD, USA)

contendo 1g/L de bicarbonato de sódio (Labsynth, São Paulo), e EDTA (Vetec, Alemanha) a 2mM e posteriormente marcadas para M170, F480 e IL-17R.

Para os estímulos em placa utilizamos células aderidas que foram incubadas em estufa a 36ºC contendo 5% de CO_2 por 48 h na presença ou ausência de IL-17A (Biolegend, San Diego', Estados Unidos) nas concentrações de 150 e 300 ng/mL, IL-17F (Biolegend, San Diego, Estados Unidos) na concentração de 50 ng/mL, IFN-γ (R&D Systems, Miniápolis, EUA) nas concentrações de 0,2, 1 ng/ml, IL-4 (R&D Systems) nas concentrações de 0,04 e 0,2 ng/mL e Lipopolissacáride (LPS, Escherichia coli O111:B4, Sigma) a 0,5 μg/mL, Células co-estimuladas com LPS e citocinas foram primadas por 2 horas antes da adição do LPS. As células foram incubadas a $1x10^5$ células/mL para quantificação de NO e em $5x10^4$ células/mL para ensaio da atividade de arginase.

4.3 Análise de marcadores de superfície de células peritoneais por citometria de fluxo.

Para avaliar a expressão de marcadores de superfície foram utilizadas $2x10^5$ células em 100μL de PBS contendo 2% de SBF, 5 mM de EDTA e 0,02% de azida sódica (tampão de FACS). Células totais ou aderidas foram incubadas com anticorpos específicos por 20 minutos em Ta, lavadas em tampão de FACS e ressuspendidas em 50 μL de tampão de FACS contendo 1μg/mL de anticorpos anti-CD11b (clone M1/70) FITc-conjugado (BD Pharmingen); 1μg/mL de anti-F4/80 PE de camundongo (BD Pharmingen) ou 1μg/mL de anti-IL17R PE (invitrogen) por 20 minutos em Ta. As células foram novamente lavadas e ressuspendidas em 200μl de tampão de FACS. Foram coletados 20.000 eventos de cada amostra em aparelho C6 Accuri (Accuri, Estados Unidos) e os dados foram analisados no software CFlow da BD.

4.4 Avaliação da Atividade de Arginase.

A Avaliação da atividade de arginase foi realizada como descrito anteriormente por Corraliza et al, em 1994. Após 48 h de incubação, as células aderidas à placa de cultura foram lisadas com 100 μL de tampão de Lise 10x (Tris-HCl 500 mM, pH 7.5 adicionados a 1% de Triton) diluído 1/10 em água milliQ e 2 μL de inibidor de protease (Sigma) incubando por cerca de 30 minutos. Depois de incubados, o conteúdo dos poços foi

transferido para tubos de microcentrifuga. Foram adicionados 100 µL Tris HCl contendo 0,02% de azida sódica a cada poço para remoção do material restante que foi transferido para o respectivo tubo. As amostras foram armazenadas a -20ºC até o uso. Essas amostras foram incubadas por 10 min a 56°C. Depois foi adicionado 50µL de L-arginina (5M pH 9.7) e incubado por 60 min a 37°C. A reação foi parada pela adição de 200 µL de solução ácida H_2SO_4:H_3PO_4:H_2O (1:3:7). Subsequentemente, 25 µL da solução de α-isonitropropiophenone (0,9g α-isonitropropiophenone em 10 mL de etanol absoluto) foi adicionada e incubada a 100°C por 45 min para o desenvolvimento de cor. Foi transferido 120µL da solução de cada amostra (em duplicata) para placa de microtitulação e realizada a leitura na leitora de ELISA (MULTISKAN) em filtro 550nm. A curva padrão foi feita usando uma solução de uréia e o limite de detecção do ensaio foi de 2,5 mg/dL de uréia.

4.5 Detecção de Óxido Nítrico (NO).

Para detecção de óxido nítrico foi utilizado o método de Griess. Foram utilizados 50 µL de sobrenadante das culturas e 50 µL de reagente de Griess (0,05% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochoride, 0,5% de sufanilamida em 2.5% de ácido fosfórico) em uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada em leitora de ELISA (MULTISKAN) em filtro de 550nm. O limite de detecção do ensaio foi de 5 µM.

4.7 Análise Estatística.

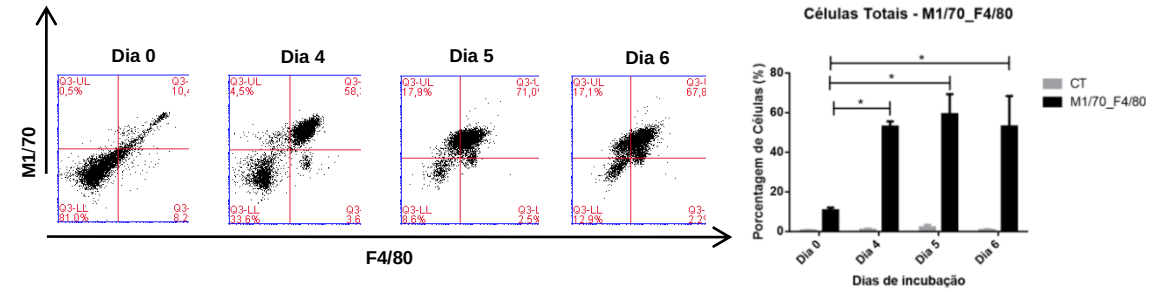
Os resultados foram comparados para avaliar a significância das diferenças utilizando o teste ANOVA Two-way seguido pelo teste de Fisher LSD para os ensaios de citometria de fluxo e o teste ANOVA One-way seguido pelo teste de Fisher, usando o programa Graph-Pad Prism Sophtware 5.0 (Inc. San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados em gráficos contendo média ± desvio padrão. Valores de $p<0,05$ foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1.1 Análise de marcadores de superfície de células peritoneais residentes ou inflamatórias obtidas em diferentes dias após inóculo com tioglicolato.

Células peritoneais dos camundongos foram colhidas antes (dia zero-residentes) ou quatro, cinco e seis dias após a inoculação IP com tioglicolato (inflamatórias) para a análise da expressão das moléculas M1/70, F4/80 e IL-17R. Na figura 1A podemos observar que a porcentagem de células com dupla marcação para M1/70 e F4/80 aumentou no quarto dia após a inoculação (10 ± 2,46 dia zero X 53 ± 5,3 dia 4; P<0,05), mantendo se constante nos quinto e sexto (59,2 ± 17,5 dia 5 e 52,9 ± 26,7 dia 6). A porcentagem de expressão do receptor para IL-17 também aumentou no quarto dia em células expressando o marcador M1/70 (1,5 ± 0,8 dia zero X 35,2 ± 11,3 dia 4) com uma queda no quinto (13,7 ± 7,49) e um novo aumento no sexto dia (43,3 ± 22,5 dia 6) (figura 1B).

A)



B)

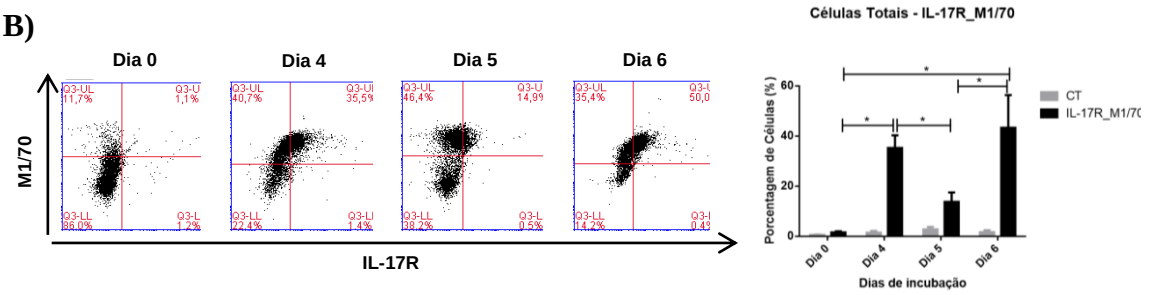


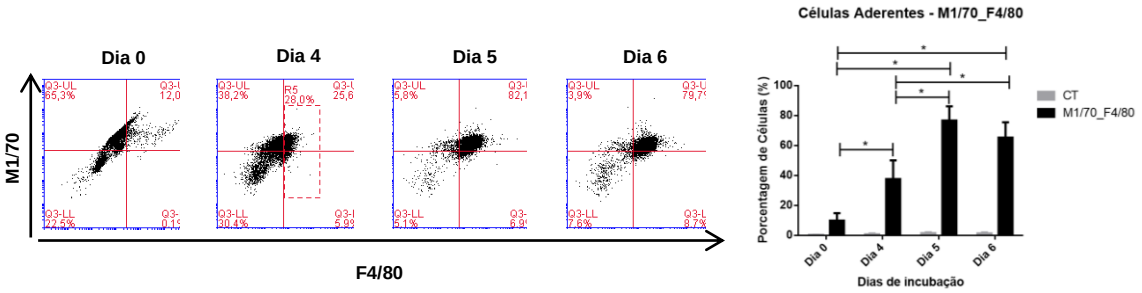
Figura 1. Células peritoneais inflamatórias aumentam a expressão de M1/70, F4/80 e IL-17R após a inoculação de tioglicolato. Células peritoneais de camundongos BALB/c foram recuperadas no dia zero (antes do inóculo) ou de 4 a 6 dias após o inóculo com tioglicolato IP para observar a marcação para M1/70 e F4/80 **(A)** ou IL-17R e M1/70 **(B)** por citometria de fluxo. Os *dot blots* à esquerda mostram uma figura representativa da marcação das células recuperadas. À direita as barras representam a média ± desvio

padrão da porcentagem de células marcadas. O * indica diferença significativa entre os grupos (p<0,05) avaliada por ANOVA Two-way seguido por teste de Fisher LSD. Os gráficos apresentados constituem a média de quatro experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento.

5.1.2 Expressão de marcadores em células peritoneais aderentes recuperadas em diferentes tempos.

Para selecionar uma população enriquecida em macrófagos, as células coletadas da cavidade peritoneal nos diferentes tempos foram aderidas à superfície da placa antes de se proceder as análises dos marcadores de superfície. Na figura 2 observamos que a porcentagem de células aderentes com dupla marcação para M1/70 e F4/80 aumentou no quarto dia (9,9 ± 8,6 dia zero X 37,6 ± 21,6 dia 4, p<0,05) e continuou aumentando no 5º dia (37,6 ± 21,6 dia 4 X 76,7 ± 16,4 dia 5, p<0,05) mantendo-se constante no sexto dia (65,2 ± 20,5 dia 64). A expressão de IL-17R nas células M1/70 foi maior no quarto dia (1,6 ± 1,3 dia zero X 38,6 ± 7,9 dia 4, p<0,05), aumentando no quinto dia (46,6 ± 5,3) e diminuindo consideravelmente no sexto dia (12,2 ± 1,7).

A)



B)

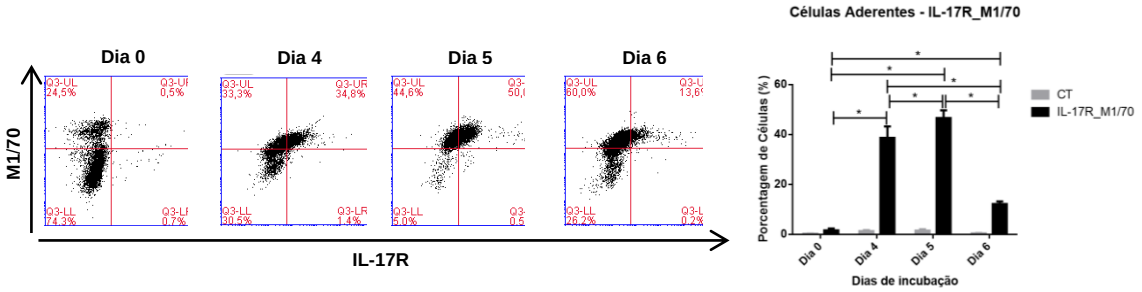


Figura 2. A expressão dos marcadores M1/70, F4/80 e IL-17R em células aderentes é maior no 5º dia após o inóculo com tioglicolato. Células peritoneais de camundongos BALB/c foram recuperadas no dia zero (antes do inóculo) ou de 4 a 6 dias após o inóculo com tioglicolato IP e aderidas por uma hora antes da marcação para M1/70 e F4/80 **(A)** ou IL-17R e M1/70 **(B)** por citometria de fluxo. Os *dot blots* a esquerda mostram uma figura representativa das células recuperadas. À direita as barras representam a média ± desvio padrão da porcentagem de células marcadas. O * indica diferença significativa entre os grupos (p<0,05) avaliada por ANOVA Two-way seguido por teste de Fisher LSD. Os gráficos apresentados constituem a média de três experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento.

5.1.3 Intensidade de Fluorescência de diferentes marcadores.

Foi analisada também a intensidade de fluorescência dos marcadores M1/70 e IL-17R expressos em células totais e em células aderentes. A expressão dos marcadores para M1/70_IL-17R nas células totais foi muito heterogênea (Figura 3A), porém, nas células aderentes, observa-se que a intensidade de fluorescência dos dias 4, 5 e 6 superior ao dia zero, destacando-se um aumento significativo no 5^0 dia pós-inoculação com tioglicolato (figura 3B).

Ressalta-se que população aderente foi homogênea com cerca de 80% de macrófagos (duplo positiva para M1/70 e F4/80) (Figura 2A) e que a expressão o IL-17R foi maior no quinto dia (Figura 2B e 3B), sendo este considerado o melhor dia para se testar o papel da IL-17 sobre os macrófagos. Além disso, o número de células recuperadas no 5^0 dia foi maior em relação aos outros dias avaliados (dados não mostrados). Dessa forma, essa população foi escolhida para a realização dos experimentos.

A) **B)**

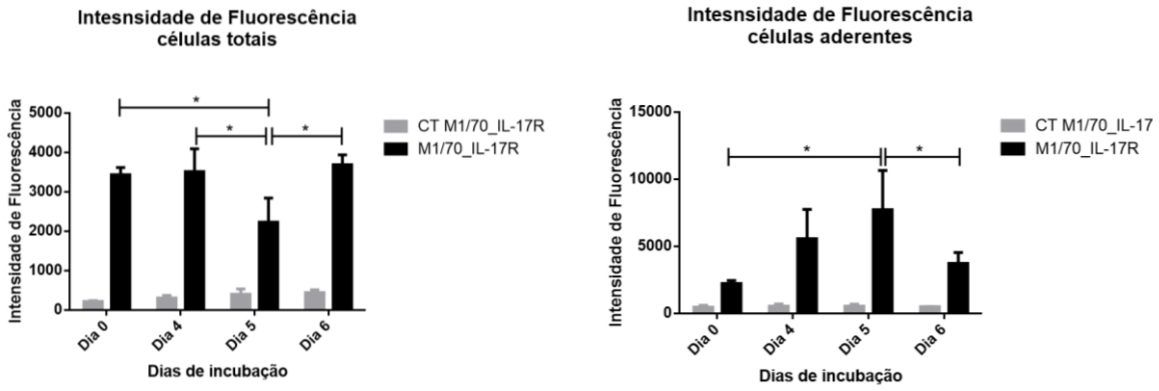


Figura 3. Células peritoneais inflamatórias aderentes apresentam maior intensidade de fluorescência no 5º dia após inoculação com tioglicolato. Intensidade de fluorescência dos marcadores M1/70 e IL-17R em células inflamatórias totais (A) ou aderentes (B) obtidas dia zero (sem tioglicolato) ou 4 a 6 dias após inóculo com tioglicolato. As barras representam a intensidade de fluorescência ± Desvio Padrão. **CT** controle de isotipo. O * indica diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$) avaliada por ANOVA Two-way seguido por teste de Fisher LSD. Os gráficos apresentados constituem a média de três experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento.

5.1.4 Atividade da Arginase.

Para caracterizar os macrófagos M2 de animais WT ou deficientes em IL-4, foi analisada a atividade da arginase em células peritoneais aderentes estimuladas com as doses de 0,2 ng/mL e 0,04 ng/mL de IL-4 (Figura 4).

Ambas as doses induziram um aumento na atividade de arginase semelhante nas duas linhagens, entretanto, macrófagos de camundongos IL-4 KO apresentaram sempre uma atividade de arginase superior aos animais selvagens. Com esses dados concluiu-se que as diferentes concentrações de IL-4 foram capazes de induzir a produção de uréia tanto em macrófagos de camundongos WT quanto em KO para IL-4, sendo que em camundongos KO verificamos maior atividade de arginase mesmo independente dos estímulos com IL-4, o que aparentemente demonstra maior sensibilidade desse grupo a IL-4 quando submetidos às mesmas condições.

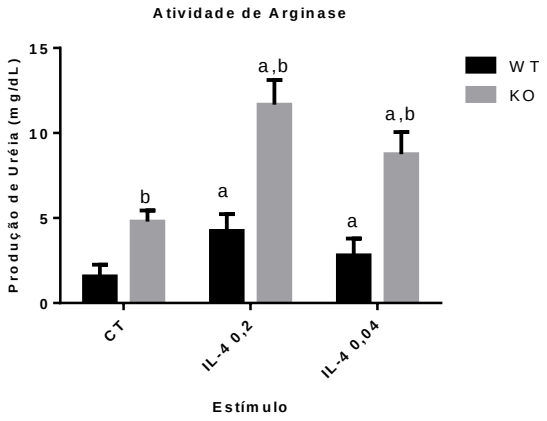


Figura 4. Células de camundongos IL-4 KO possuem uma maior atividade de arginase que de animais WT. Células peritoneais aderentes de camundongos WT ou IL-4 KO foram estimuladas *in vitro* com 0,2 ou 0,04 ng/mL de IL-4 por 48h e o lisado celular analisado para atividade de arginase. As barras representam a quantidade de uréia produzida (média ± desvio padrão). "a" significa diferença estatística em relação ao controle não estimulado e "b" significa diferença estatística entre as diferentes linhagens para o mesmo estímulo. As médias foram avaliadas por ANOVA One-way seguido por Teste de Fisher LSD considerando significativo $p<0,05$. Os gráficos apresentados constituem a média de sete experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento.

Uma vez demonstrada a resposta frente a IL-4, nossa próxima investigação foi avaliar se a IL-17 é capaz de induzir alteração na atividade da arginase nos macrófagos dos animais WT ou IL-4 KO. Nas figuras 5A e 5B observamos que a IL-4 a 0,04 ng/mL induziu aumento na atividade de arginase em ambas as linhagens, como o esperado. Em macrófagos de camundongos WT testados com diferentes concentrações de IL-17A (150

e 300 ng/mL) não observamos alteraração da atividade, entretanto, a IL-17F a 50 ng/mL demonstrou uma tendência em aumentar a atividade de arginase em relação ao controle (p=0,06). Doses mais baixas de IL-17A também foram utilizadas, não alterando a atividade de arginase (dados não mostrados).

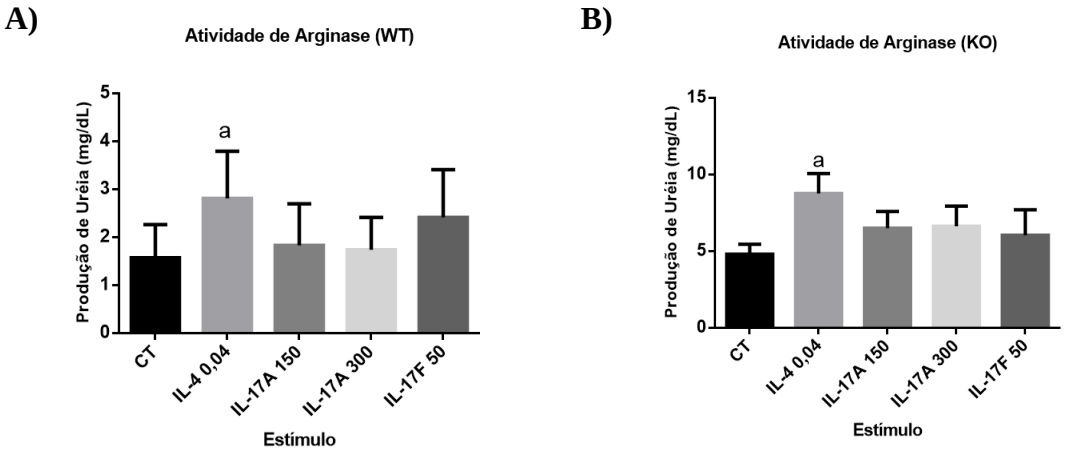


Figura 5. IL-17 não alterou a atividade de arginase em macrófagos de animais selvagens ou IL4 KO. Células peritoneais aderentes de camundongos WT (A) e IL-4 KO (B) foram estimulados *in vitro* com IL-4 (0,04 ng/mL), IL-17A (150 e 300 ng/mL) ou IL-17F (50 ng/mL) por 48h e o lisado celular foi analisado para atividade de arginase. As barras representam a quantidade média de uréia produzida ± Desvio Padrão, onde "a" indica diferença significativa com o grupo não estimulado ($p<0,05$) avaliada por ANOVA One-way seguido pelo teste de Fisher LSD. Os gráficos apresentados constituem a média de sete experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento.

Em macrófagos de animais IL-4 KO foi possível observar uma tendência de aumento na atividade de arginase quando a IL-17A foi utilizada nas concentrações de 150 ($p=0,06$) e 300 ng/mL ($p=0,07$) (Figura 5B). Nesta linhagem, a IL-17F não foi capaz de induzir a produção de uréia na dose testada.

Como a IL-17 sozinha não foi capaz de alterar a atividade de arginase de forma significativa em macrófagos peritoneais de camundongos WT ou IL-4 KO, embora em alguns experimentos tenha sido observada uma tendência para aumentar a atividade da enzima, resolvemos investigar se haveria sinergismo entre IL-17 e IL-4. Para responder a essa questão, realizamos os ensaios com IL-4 a 0,04 ng/mL e IL-17A nas concentrações de 150 e 300 ng/mL e IL-17F a 50 ng/mL. Observamos que a atividade da arginase não alterou em macrófagos de camundongos WT e KO tratados com IL-17A associada à IL-4 (Figura 6).

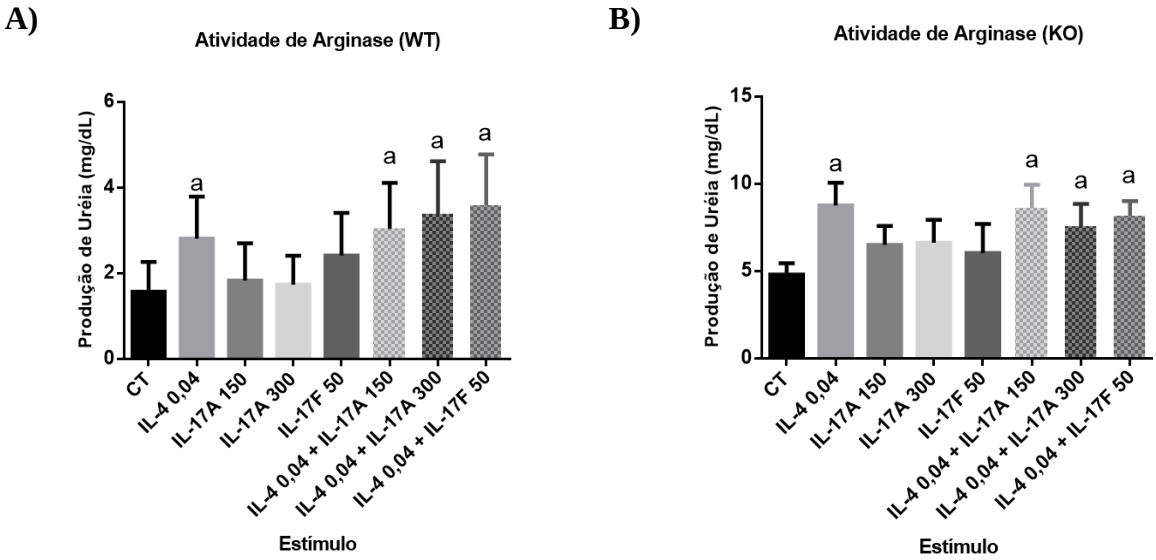


Figura 6. IL-4 e IL-17 não agem de forma sinérgica para aumentar a atividade da arginase. Células peritoneais aderentes de camundongos WT (A) e camundongos KO (B) foram estimuladas *in vitro* com IL-4 (0,04 ng/mL), IL-17A (150 e 300 ng/mL), IL-17F (50 ng/mL) ou associação destas citocinas por 48h e o lisado celular foi analisado para atividade de arginase. As barras representam a quantidade média de uréia produzida ± Desvio Padrão, onde "a" indica diferença significativa com o controle não estimulado ($p<0,05$) avaliada por ANOVA One-way seguido pelo teste de Fisher LSD. Os gráficos apresentados constituem a média de sete experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento.

5.1.5 Produção de óxido nítrico.

Para caracterizar os macrófagos M1 de animais WT ou IL-4KO, foi analisada a produção de NO em células inflamatórias aderentes estimuladas com IFN-γ nas concentrações de 1 e 0,2 ng/mL associado ao LPS a 0,5 μg/mL (Figura 7). Observamos que a dose de 1 ng/mL de IFN-γ foi capaz de induzir um aumento na produção de óxido nítrico em animais WT, mas não em animais IL-4KO, enquanto a dose mais baixa de 0,2 ng/mL não induziu NO em macrófagos de nenhuma linhagem de camundongo. Adicionalmente, observamos que a associação de LPS ao IFN-γ na dose de 0,2 ng/mL foi capaz de induzir aumento na produção de NO por macrófagos de ambas as linhagens.

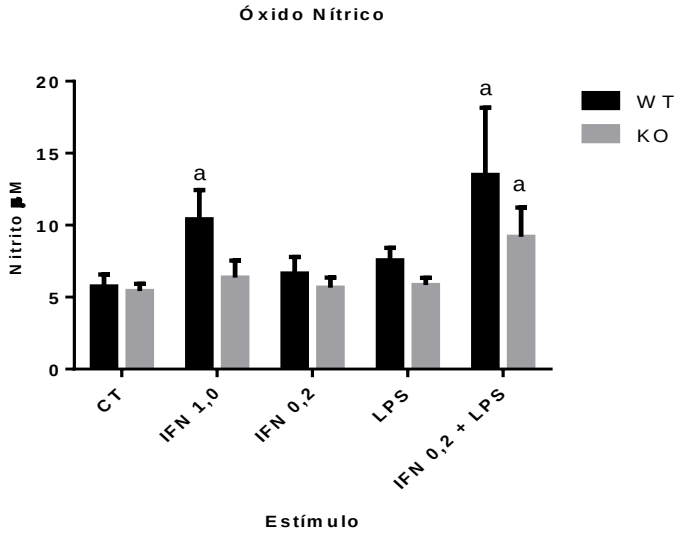


Figura 7. Sinergismo entre IFN-γ e LPS induz aumento na produção de nitrito em células de camundongos WT e KO. Células peritoneais aderentes de camundongos WT (preto) ou IL-4 KO (cinza) foram estimulados *in vitro* com IFN-γ nas concentrações de 1 e 0,2 ng/mL e LPS a 0,5 µg/mL. As barras representam a quantidade média de nitrito produzida ± Desvio Padrão, onde "a" indica diferença significativa entre a média de nitrito produzida e o respectivo controle não estimulado ($p<0,05$) avaliada por ANOVA One-way seguido pelo teste de Fisher LSD. Os gráficos apresentados constituem a média de quatro experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento.

Para avaliar se a IL-17 possui algum efeito sinérgico com IFN-γ em macrófagos de animais WT ou IL-4KO na indução da produção de NO, as células aderentes dos animais foram estimuladas com IFN-γ nas concentrações 0,2, IL-17A nas concentrações de 150 e 300 ng/mL e IL-17F na concentração de 50 ng/mL (Figura 8). IL-17A e IL-17F nas concentrações testadas não induziram sozinhas a produção de NO, assim como IFN-γ a 0,2 ng/mL. Quando testados simultaneamente, IFN-γ a 0,2 ng/mL e IL-17A a 300 ng/mL, podemos verificar aumento na produção de NO em células de camundongos WT, sugerindo que houve sinergismo entre elas ($p<0,05$), pois houve diferença estatística com relação ao controle (figura 8A).

Sob as mesmas condições, avaliamos as células de camundongos KO (figura 8B) onde observamos que a IL-17A sozinha também não foi capaz de induzir a produção de NO. Para avaliar se houve sinergismo entre as citocinas, verificamos que IFN-γ a 0,2 ng/mL e IL-17A nas concentrações de 150 e 300 ng/mL foram capazes de induzir a produção de NO acima do controle, sugerindo um sinergismo.

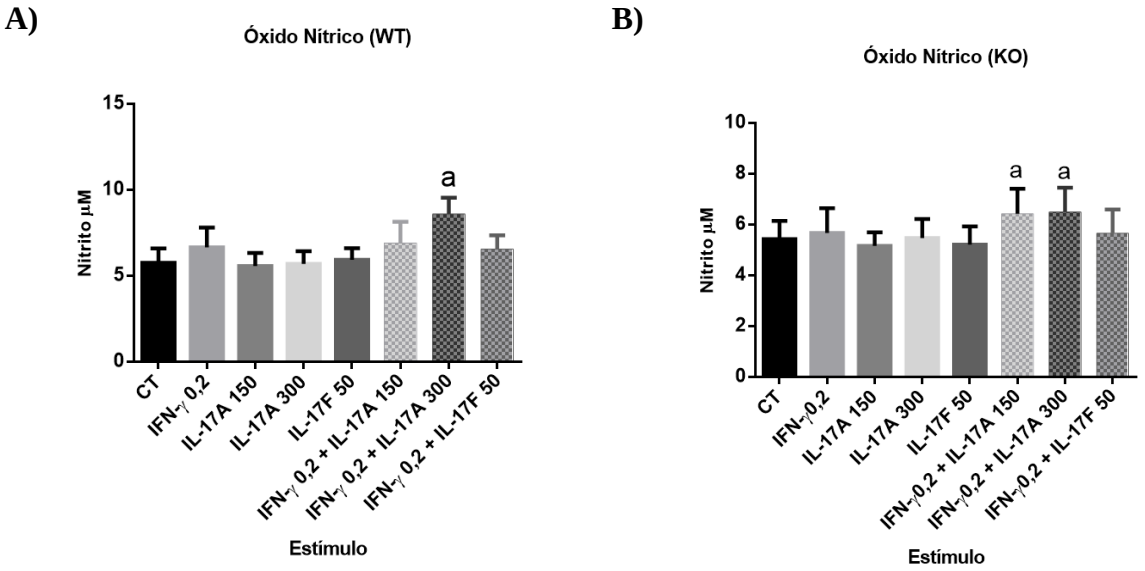


Figura 8. IL-17 A age sinergicamente com IFN-γ para induzir a produção de nitrito em células de camundongos WT e KO. Células peritoneais aderentes de camundongos WT (A) ou IL-4 KO (B) foram estimulados *in vitro* com IFN-γ a 0,2 ng/mL, IL-17A a 150 e 300 ng/mLe IL-17F a 50ng/mL sozinhos ou em associação. As barras representam a quantidade média de nitrito produzida ± Desvio Padrão, onde "a" indica diferença significativa entre a média de nitrito produzida e o controle não estimulado ($p<0,05$) avaliada por ANOVA One-way seguido pelo teste de Fisher LSD. Os gráficos apresentados constituem a média de quatro experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento.

Na sequência, verificamos a capacidade das células aderentes em produzir NO frente a combinação dos estímulos IL-17A, IL17-F, LPS e IFN-γ (figura 9). As células foram estimuladas com IL-17A nas concentrações de 150 e 300 ng/mL, com LPS a 0,5 µg/mL e com IFN-γ a 0,2 ng/mL.

Verificamos que apenas na combinação de LPS com IL-17F em animais WT houve sinergismo para a produção de NO (figura 9A). Em relação ao grupo IL-4KO observou-se uma grande variabilidade da resposta, sem diferença estatística nos resultados (figura 9B).

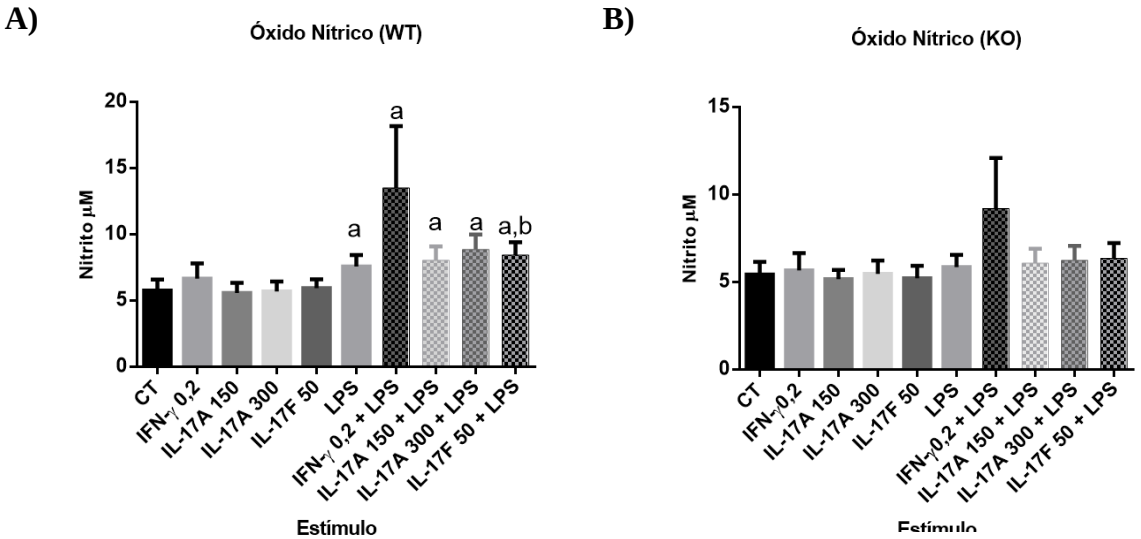


Figura 9. Sinergismo entre IL-17F e LPS para produção de nitrito em células de camundongos WT. Células peritoneais aderentes de camundongos WT (A) ou IL-4 KO (B) foram estimulados *in vitro* com IFN-γ a 0,2 ng/mL LPS a 0,5 µg/mL e IL-17A a 150 e 300 ng/mL e IL-17F sozinhos ou em associação. As barras representam a quantidade média de nitrito produzida ± Desvio Padrão, onde "a" indica diferença significativa entre a média de nitrito produzida e o controle não estimulado e "b" significa diferença estatística em relação aos estímulos individuais ($p<0,05$) foram avaliadas por ANOVA One-way seguido por Teste de Fisher LSD. Os gráficos apresentados constituem a média de quatro experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento para camundongos WT e a média de três experimentos independentes com dois camundongos em cada experimento para KO.

6 DISCUSSÃO

Os macrófagos são células multifuncionais com grande capacidade fagocítica, característica que qualifica sua importância na defesa do hospedeiro para eliminação de agentes infecciosos, capacidade de eliminar fragmentos celulares remanescentes da resposta imune e ainda estimular a renovação da matriz extracelular (Geissmann *et al.*, 2010; Okabe e Medzhitov, 2016). Macrófagos inflamatórios murinos derivados de monócitos, recém-recrutados da corrente sanguínea, são capazes de expressar os marcadores M1/70, F4/80 e receptores de citocinas como IL-17R (Gordon, 2007; Barin *et al.*, 2012; Sousa *et al.*, 2014). Em estudos realizados em camundongos BALB/c foi possível observar que os receptores de IL-17 presentes nos macrófagos podem ser regulados frente a diferentes estímulos inflamatórios. A indução do perfil pró-inflamatório em macrófagos é capaz de aumentar a expressão de receptores para IL-17 (Barin *et al.*, 2012).

Para a realização dos experimentos, foi inoculado tioglicolato na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c com o objetivo de induzir a migração de macrófagos inflamatórios. O perfil das células totais recém-migradas foi avaliado após a lavagem peritoneal de animais inoculados. Nos dias 4, 5 e 6 não houve variação significativa na porcentagem de macrófagos migratórios que marcaram para M1/70 e F4/80, embora o número de células recuperadas tenha sido maior no quinto dia (dados não mostrados). No dia 4 foi observada maior expressão do receptor IL-17 em células positivas para M1/70, seguido pelo dia 6, contudo no dia 5 houve uma diminuição na expressão desse receptor. Essa variação pode ser justificada devido à presença da ampla variedade de outras populações celulares positivas para M1/70 capazes de expressar esse receptor, como neutrófilos e linfócitos B (Korn *et al.*, 2009).

Em virtude dessa variação, objetivou-se selecionar uma população mais purificada de macrófagos inflamatórios. Assim, as células peritoneais obtidas foram incubadas em placa para promover a aderência dos macrófagos (Pineda-Torra *et al.*, 2015; Bolling *et al.*, 2018). Dessa forma foi possível selecionar uma população celular mais homogênea para realização dos experimentos.

Uma vez constatado que a população de células totais mostrou-se mais heterogênea que as células aderentes, as quais 80% marcavam para M1/70 e F4/80 no dia 5, as células peritoneais inflamatórias totais foram comparadas às células aderentes quanto à intensidade de fluorescência dos receptores para IL-17 presentes em células que expressavam M1/70. Foi demonstrado em números absolutos que as células aderentes foram capazes de expressar maior quantidade de receptores, constatado pela maior intensidade de fluorescência em relação às células totais em todos os dias avaliados (4, 5 e 6 dias). Observamos ainda que a intensidade de fluorescência das células aderentes marcadas foi maior no dia 5 em relação aos outros dias. Dessa forma, os resultados indicaram o dia 5 como melhor dia para obtenção das células peritoneais inflamatórias para o estudo do papel da IL-17 sobre macrófagos.

Mills et al., 2000, propuseram uma classificação para os macrófagos, classificando-os em classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2) (Mills *et al.*, 2000). Quando os macrófagos são classicamente ativados, é necessário que ocorra a elaboração de produtos microbicidas. Para isso, a célula utiliza a L-arginina, que é catabolizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), produzindo NO e citrulina. Quando são alternativamente ativados (M2), ocorre a ação da enzima arginase que cataboliza a L-arginina gerando como produto final ornitina e uréia (Durante *et al.*, 2007).

Macrófagos M2 podem ser ativados pelo reconhecimento de fungos, parasitas, complexos imunes, LPS, complemento e produtos celulares (PAMPs e DAMPs) através dos seus PRRs. Somado a isso, citocinas como fator estimulador de colônias de macrófagos (MCSF), IL-4, IL-13, IL-10 e fator de crescimento tumoral-β (TGF-β) se ligam aos receptores cognatos nessas células favorecendo o desenvolvimento desse perfil de ativação. A ligação de IL-4, IL-13 e TGF-β ativa a via de transcrição STAT-6, induzido a ativação do gene codificador da arginase-1 (Roszer, 2015).

Pelos resultados obtidos foi possível constatar que macrófagos inflamatórios peritoneais de camundongos BALB/c WT e KO para IL-4 foram capazes de responder a diferentes concentrações de IL-4 produzindo uréia, o que demonstra a viabilidade dessas células para o estudo proposto. Além disso, foi demonstrado que células de camundongos KO para IL-4 se mostraram mais responsivas às concentrações de IL-4 testadas, o que evidenciou maior sensibilidade dessa população celular mesmo quando não estimuladas.

Quando estimulados por LPS, os macrófagos M2 são capazes produzir de IL-12 e IL-10 (Soudi *et al.*, 2013). A IL-10 é uma citocina reguladora capaz de inibir a produção

e secreção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN-γ, através da inibição do fator de transcrição pró-inflamatório NF-κB (Schmidt *et al.*, 2000) levando consequentemente à redução da produção de NO em macrófagos ativados (Padigel *et al.*, 2003). Dessa forma, a IL-10 consegue estimular um aumento da atividade da arginase nessas células induzindo um perfil regulador.

Os macrófagos constituem a primeira linha de defesa do organismo. Quando há a polarização para o perfil M1 pela ligação de LPS ao TLR4, acontece a ativação da via NF-kB, desencadeando a transcrição de genes pró-inflamatórios que induzem a produção de citocinas e quimiocinas, como IL-12, IL-1β e TNF-α. O IFN-γ é capaz de se ligar ao macrófago M1 e reforçar o perfil pró-inflamatório pré-estabelecido pelo reconhecimento do LPS por TLR4 (Haydar *et al.*, 2019). Quando combinada ao IFNγ, a IL-17 pode regular negativamente a produção de IL-10 nos macrófagos infectados e induzir a produção de óxido nítrico (NO) (Quirino *et al.*, 2016).

A inoculação de tioglicolato na cavidade peritoneal dos camundongos promoveu a migração de células em resposta ao estímulo inflamatório. Dessa forma, muitas citocinas pró-inflamatórias, como o IFN-γ e TNF, envolvidas na resposta inflamatória induzida *in vivo* colaboraram na ativação prévia dos macrófagos utilizados no estudo. Nossos resultados demonstraram que quando macrófagos WT foram estimulados *in vitro* com diferentes concentrações de IL-17A e IL-17F, houve uma tendência da IL-17F estimular a atividade de arginase, o que poderia ser devido a uma maior expressão do receptor IL17R (Barin *et al.*, 2012).

Entretanto, em camundongos IL-4KO a IL-17A (150 e 300 ng/mL) apresentou uma tendência em induzir a atividade de arginase, com p=0,06 e p=0,07, respectivamente, sendo que a IL-17F não conseguiu induzir essa atividade. Dessa forma, concluímos que a IL-17 não foi capaz de induzir o aumento da atividade da arginase nas linhagens de camundongos testadas. Quando avaliada se haveria sinergismo entre a IL-17 e a IL-4, concluímos que não houve alteração na atividade da arginase.

A indução das células aderentes para um perfil M1 foi avaliada pela detecção de nitrito resultante da produção de NO. Tanto as células de camundongos WT quanto IL-4KO não foram capazes de responder ao estímulo mínimo com IFN-γ 0,2 ng/mL, sendo as células de camundongos WT responderam ao IFN-γ 1 ng/mL. O LPS é um produto ativador de macrófagos, capaz induzir a produção de mediadores inflamatórios e aumentar a expressão de iNOS (La Flamme *et al.*, 2012). O LPS sozinho na concentração utilizada não foi capaz de induzir a produção de NO nas células de

camundongos WT e KO. Contudo, quando avaliado em associação com o IFN-γ 0,2 ng/mL, foi possível observar sinergismo entre os estímulos nas células de camundongos WT e KO.

Embora já tenha sido demonstrada a capacidade da IL-17 em induzir a produção de NO em macrófagos (Quirino *et al.*, 2016), trabalhos anteriores demonstraram que macrófagos de diferentes linhagens de camundongos não foram capazes de produzir NO quando estimulados com IL-17 (Trajkovic *et al.*, 2001; Bi *et al.*, 2014). Assim, foi avaliada a participação da IL-17 na indução da produção de NO e concluiu-se que tanto a IL-17A quanto a IL-17F nas concentrações utilizadas não foram capazes de induzir sozinhas NO nestas células. Contudo, foi observado sinergismo dentre IL-17A a 300 ng/mL e IFN-γ a 0,2 ng/Ml na indução de NO em células aderentes de camundongos WT. Em camundongos KO para IL-4 o sinergismo foi observado nas duas concentrações testadas de IL-17A (150 e 300 ng/mL) com o IFN-γ a 0,2 ng/mL. Verificou-se também que não houve sinergismo entre a IL-17A (150 e 300 ng/mL) com LPS, embora a interação da IL-17F com o LPS tenha sido capaz de induzir a produção de NO nas células aderentes.

Linfócitos de camundongos BALB/c tem uma predisposição para expansão preferencial de células Th2, secretoras de IL-4, sendo uma linhagem mais favorável para a ativação alternativa dos macrófagos (Kropf *et al.*, 2003). As células utilizadas no nosso estudo são de origem inflamatória, uma forma de induzir a maior migração de células. Assim, deve ser considerado que elas passaram por ativação prévia *in vivo*, para posteriormente serem submetidas aos estímulos *in vitro* como proposto no estudo. Com isso, é possível que essas células tenham recebido diversos estímulos como ação de IFN-γ e IL-13. No caso de camundongos IL-4KO, observamos maior atividade da arginase, mesmo em células não estimuladas. Como a IL-13 pode induzir os macrófagos na atividade da arginase (Gordon, 2003), consideramos o fato de que os macrófagos peritoneais de camundongos IL-4KO possam ter sido previamente ativados alternativamente *in vivo*, induzindo essas células ao perfil M2, induzindo assim maior atividade da arginase.

Acreditamos então que, ao estimularmos *in vitro* esses macrófagos com IL-4, estimulamos um perfil já pré-definido, tornando a IL-4 nesse cenário capaz de otimizar a ativação alternativa dos macrófagos, resultando assim na maior atividade da arginase.

7 CONCLUSÕES

7.1. Células aderentes do dia 5 após inoculação com tioglicolato são as melhores para se avaliar a ação da IL-17, pois elas expressam maior quantidade de receptores para IL-17 em relação às células totais em todos os dias avaliados (4, 5 e 6 dias);

7.2. Células de camundongos KO para IL-4 são mais sensíveis à ação da IL-4 e apresentam maior atividade da arginase, mesmo sem estímulo;

7.3. A IL-17 não foi capaz de induzir o aumento da atividade da arginase sozinha e nem em associação com a IL-4 em camundongos BALB/c WT e KO;

7.4. LPS apresentou sinergismo com IFN-γ induzindo a produção de NO nas células de camundongos WT e KO;

7.5. IL-17 sozinha não induziu NO. Assim, a IL-17 sozinha não foi capaz de induzir um perfil M1;

7.6. A IL-17A apresentou sinergismo com IFN-γ na indução de NO nas linhagens testadas;

7.7. IL-17F apresentou sinergismo com o LPS na indução de NO nas células de camundongos WT.

8 REFERÊNCIAS

ABD EL-ALEEM, S. A. et al. Cellular and physiological upregulation of inducible nitric oxide synthase, arginase, and inducible cyclooxygenase in wound healing. **J Cell Physiol**, Jun 3 2019.

AKI, K. et al. ANG II receptor blockade enhances anti-inflammatory macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 298, n. 4, p. F870-82, Apr 2010.

BARIN, J. G. et al. Macrophages participate in IL-17-mediated inflammation. **Eur J Immunol,** v. 42, n. 3, p. 726-36, Mar 2012.

BI, Y. et al. IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating IFN-gamma-activated macrophage programming. **J Immunol,** v. 192, n. 2, p. 704-13, Jan 15 2014.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Rev,** v. 173, p. 17-26, Feb 2000.

BOLLING, A. K. et al. Isolating and culturing of sputum macrophages: A potential ex vivo/in vitro model. **Exp Lung Res,** v. 44, n. 6, p. 312-322, Aug 2018.

CHEN, J.; WANG, W.; LI, Q. Increased Th1/Th17 Responses Contribute to Low-Grade Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. **Cell Physiol Biochem,** v. 44, n. 1, p. 357-367, 2017.

CHEN, K. et al. IL-17RA is required for CCL2 expression, macrophage recruitment, and emphysema in response to cigarette smoke. **PLoS One,** v. 6, n. 5, p. e20333, 2011.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **J Neuroinflammation,** v. 11, p. 98, Jun 3 2014.

CLEMENTS, A. E. et al. Impacts of Interleukin-17 Neutralization on the Inflammatory Response in a Healing Ligament. **J Cytokine Biol,** v. 2, n. 1, May 2017.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, p. in press, May 29 2010.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nat Rev Immunol,** v. 10, n. 7, p. 479-89, Jul 2010.

DE LA PAZ SANCHEZ-MARTINEZ, M. et al. IL-17-differentiated macrophages secrete pro-inflammatory cytokines in response to oxidized low-density lipoprotein. **Lipids Health Dis,** v. 16, n. 1, p. 196, Oct 10 2017.

DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. **Clin Exp Pharmacol Physiol,** v. 34, n. 9, p. 906-11, Sep 2007.

DZIK, J. M. Evolutionary roots of arginase expression and regulation. **Front Immunol,** v. 5, p. 544, 2014.

ENSAN, S. et al. Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. **Nat Immunol,** v. 17, n. 2, p. 159-68, Feb 2016.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity,** v. 41, n. 1, p. 21-35, Jul 17 2014.

ESPINOSA, V.; RIVERA, A. Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. **Cytokine,** v. 58, n. 1, p. 100-6, Apr 2012.

FERNANDO, M. R. et al. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. **PLoS One,** v. 9, n. 4, p. e94188, 2014.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J,** v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012.

GAO, Y. et al. STAT3 expression by myeloid cells is detrimental for the T- cell-mediated control of infection with Mycobacterium tuberculosis. **PLoS Pathog,** v. 14, n. 1, p. e1006809, Jan 2018.

GAZZINELLI, R. T. et al. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa. **Braz J Med Biol Res,** v. 31, n. 1, p. 89-104., 1998.

GE, S. et al. Interleukin 17 receptor A modulates monocyte subsets and macrophage generation in vivo. **PLoS One,** v. 9, n. 1, p. e85461, 2014.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science,** v. 327, n. 5966, p. 656-61, Feb 5 2010.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol,** v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003.

_____. The macrophage: past, present and future. **Eur J Immunol,** v. 37 Suppl 1, p. S9-17, Nov 2007.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity,** v. 32, n. 5, p. 593-604, May 28 2010.

HAYDAR, D. et al. Azithromycin Polarizes Macrophages to an M2 Phenotype via Inhibition of the STAT1 and NF-kappaB Signaling Pathways. **J Immunol**, Jul 1 2019.

HODGKINSON, J. W.; FIBKE, C.; BELOSEVIC, M. Recombinant IL-4/13A and IL-4/13B induce arginase activity and down-regulate nitric oxide response of primary goldfish (Carassius auratus L.) macrophages. **Dev Comp Immunol,** v. 67, p. 377-384, Feb 2017.

HOTCHKISS, R. S. et al. Sepsis and septic shock. **Nat Rev Dis Primers,** v. 2, p. 16045, Jun 30 2016.

KAMPFER, H.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Expression and activity of arginase isoenzymes during normal and diabetes-impaired skin repair. **J Invest Dermatol,** v. 121, n. 6, p. 1544-51, Dec 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **Int Immunol,** v. 21, n. 4, p. 317-37, Apr 2009.

KEDONG, H. et al. Anti-Inflammatory Effects of Interleukin-4 on Intervertebral Disc Cells. **Spine J**, Jun 29 2019.

KHADER, S. A.; GOPAL, R. IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens. **Virulence,** v. 1, n. 5, p. 423-7, Sep-Oct 2010.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol,** v. 27, p. 485-517, 2009.

KROPF, P. et al. Factors influencing Leishmania major infection in IL-4-deficient BALB/c mice. **Parasite Immunol,** v. 25, n. 8-9, p. 439-47, Aug-Sep 2003.

KRYCZEK, I. et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. **Blood,** v. 114, n. 6, p. 1141-9, Aug 6 2009.

KUWABARA, T. et al. The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. **Mediators Inflamm,** v. 2017, p. 3908061, 2017.

LA FLAMME, A. C. et al. Type II-activated murine macrophages produce IL-4. **PLoS One,** v. 7, n. 10, p. e46989, 2012.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology,** v. 213, n. 3-4, p. 183-91, 2008.

LAUTERBACH, M. A.; WUNDERLICH, F. T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Pflugers Arch,** v. 469, n. 3-4, p. 385-396, Apr 2017.

LIAO, C. et al. Shear stress inhibits IL-17A-mediated induction of osteoclastogenesis via osteocyte pathways. **Bone,** v. 101, p. 10-20, Aug 2017.

LIU, L. et al. Interleukin-17 and prostaglandin E2 are involved in formation of an M2 macrophage-dominant microenvironment in lung cancer. **J Thorac Oncol,** v. 7, n. 7, p. 1091-100, Jul 2012.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J Immunol,** v. 182, n. 5, p. 3039-46, Mar 1 2009.

MAUER, J. et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. **Nat Immunol,** v. 15, n. 5, p. 423-30, May 2014.

MCGEACHY, M. J.; CUA, D. J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. **Immunity,** v. 28, n. 4, p. 445-53, Apr 2008.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol Rev,** v. 201, p. 206-24, Oct 2004.

MIDDLETON, G. W.; ANNELS, N. E.; PANDHA, H. S. Are we ready to start studies of Th17 cell manipulation as a therapy for cancer? **Cancer Immunol Immunother,** v. 61, n. 1, p. 1-7, Jan 2012.

MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol,** v. 164, n. 12, p. 6166-73, Jun 15 2000.

MITAMURA, Y. et al. Hierarchical control of interleukin 13 (IL-13) signals in lung fibroblasts by STAT6 and SOX11. **J Biol Chem,** v. 293, n. 38, p. 14646-14658, Sep 21 2018.

MOLAWI, K. et al. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. **J Exp Med,** v. 211, n. 11, p. 2151-8, Oct 20 2014.

MOQBEL, R. et al. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. **J Immunol,** v. 155, n. 10, p. 4939-47, Nov 15 1995.

MOREIRA, L. O.; ZAMBONI, D. S. NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. **Front Immunol,** v. 3, p. 328, 2012.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol,** v. 8, n. 12, p. 958-69, Dec 2008.

MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of Leishmania amazonensis amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am J Trop Med Hyg,** v. 76, n. 4, p. 669-75, Apr 2007.

MUNITZ, A. et al. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 105, n. 20, p. 7240-5, May 20 2008.

MURRAY, P. J. Immune regulation by monocytes. **Semin Immunol,** v. 35, p. 12-18, Feb 2018.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity,** v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul 17 2014.

OISHI, Y.; MANABE, I. Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. **NPJ Aging Mech Dis,** v. 2, p. 16018, 2016.

OKABE, Y.; MEDZHITOV, R. Tissue biology perspective on macrophages. **Nat Immunol,** v. 17, n. 1, p. 9-17, Jan 2016.

OLIVEIRA, L. S. et al. A defective TLR4 signaling for IFN-beta expression is responsible for the innately lower ability of BALB/c macrophages to produce NO in response to LPS as compared to C57BL/6. **PLoS One,** v. 9, n. 6, p. e98913, 2014.

OLIVEIRA, M. A. et al. Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with Leishmania. **Microbes Infect,** v. 7, n. 2, p. 213-23, Feb 2005.

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J. P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with Leishmania mexicana and Leishmania amazonensis. **J Immunol,** v. 171, n. 7, p. 3705-10, Oct 1 2003.

PALIARD, X. et al. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. **J Immunol,** v. 141, n. 3, p. 849-55, Aug 1 1988.

PARK, J. et al. Inhibition of interleukin-4 production in activated T cells via the downregulation of AP-1/NF-AT activation by N-lauroyl-D-erythro-sphingosine and N-lauroyl-D-erythro-C20-sphingosine. **Biochem Pharmacol,** v. 71, n. 8, p. 1229-39, Apr 14 2006.

PINEDA-TORRA, I. et al. Isolation, Culture, and Polarization of Murine Bone Marrow-Derived and Peritoneal Macrophages. **Methods Mol Biol,** v. 1339, p. 101-9, 2015.

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of Leishmania amazonensis infection in C57Bl/6 mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 102, n. 1, p. 79-82, Feb 2007.

PITTA, M. G. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani. **J Clin Invest,** v. 119, n. 8, p. 2379-87, Aug 2009.

PRABHALA, R. H. et al. Targeting IL-17A in multiple myeloma: a potential novel therapeutic approach in myeloma. **Leukemia,** v. 30, n. 2, p. 379-89, Feb 2016.

QUIRINO, G. F. S. et al. Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response. **Infect Immun,** v. 84, n. 8, p. 2289-2298, Aug 2016.

ROSZER, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. **Mediators Inflamm,** v. 2015, p. 816460, 2015.

SAHIN, E. et al. Loss of Phosphatase and Tensin Homolog in APCs Impedes Th17-Mediated Autoimmune Encephalomyelitis. **J Immunol,** v. 195, n. 6, p. 2560-70, Sep 15 2015.

SANS-FONS, M. G. et al. Arginine transport is impaired in C57Bl/6 mouse macrophages as a result of a deletion in the promoter of Slc7a2 (CAT2), and susceptibility to Leishmania infection is reduced. **J Infect Dis,** v. 207, n. 11, p. 1684-93, Jun 1 2013.

SATRIANO, J. Arginine pathways and the inflammatory response: interregulation of nitric oxide and polyamines: review article. **Amino Acids,** v. 26, n. 4, p. 321-9, Jul 2004.

SCHMIDT, M. et al. IL-10 induces apoptosis in human monocytes involving the CD95 receptor/ligand pathway. **Eur J Immunol,** v. 30, n. 6, p. 1769-77, Jun 2000.

SEDER, R. A. et al. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. **J Exp Med,** v. 176, n. 4, p. 1091-8, Oct 1 1992.

SHEN, F. et al. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBPbeta by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. **Sci Signal,** v. 2, n. 59, p. ra8, Feb 24 2009.

SONG, X.; QIAN, Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. **Cytokine**, Apr 1 2013.

SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites. **J Immunol,** v. 180, n. 7, p. 4355-60, Apr 1 2008.

SOUDI, S. et al. Comparative study of the effect of LPS on the function of BALB/c and C57BL/6 peritoneal macrophages. **Cell J,** v. 15, n. 1, p. 45-54, Spring 2013.

SOUSA, L. M. et al. Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. **Parasite Immunol,** v. 36, n. 1, p. 13-31, Jan 2014.

SUZUKI, A. et al. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. **Cytokine,** v. 75, n. 1, p. 79-88, Sep 2015.

TOSELLO BOARI, J. et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during Trypanosoma cruzi infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathog,** v. 8, n. 4, p. e1002658, 2012.

TRAJKOVIC, V. et al. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. **J Neuroimmunol,** v. 119, n. 2, p. 183-91, Oct 1 2001.

TRISTAO, F. S. M. et al. Th17-Inducing Cytokines IL-6 and IL-23 Are Crucial for Granuloma Formation during Experimental Paracoccidioidomycosis. **Front Immunol,** v. 8, p. 949, 2017.

UL-HAQ, Z.; NAZ, S.; MESAIK, M. A. Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 32, p. 3-15, Dec 2016.

WANG, B. et al. IL-17A but not IL-22 suppresses the replication of hepatitis B virus mediated by over-expression of MxA and OAS mRNA in the HepG2.2.15 cell line. **Antiviral Res,** v. 97, n. 3, p. 285-92, Mar 2013.

WANG, L. et al. Expression of Nodal on Bronchial Epithelial Cells Influenced by Lung Microbes Through DNA Methylation Modulates the Differentiation of T-Helper Cells. **Cell Physiol Biochem,** v. 37, n. 5, p. 2012-22, 2015.

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature,** v. 496, n. 7446, p. 445-55, Apr 25 2013.

ZHANG, Q. et al. IL-17-mediated M1/M2 macrophage alteration contributes to pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. **Clin Cancer Res,** v. 19, n. 12, p. 3176-88, Jun 15 2013.

ZHANG, Y. et al. IL-17A synergizes with IFN-gamma to upregulate iNOS and NO production and inhibit chlamydial growth. **PLoS One,** v. 7, n. 6, p. e39214, 2012.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). **Annu Rev Immunol,** v. 28, p. 445-89, 2010.

ZIZZO, G.; COHEN, P. L. IL-17 stimulates differentiation of human anti-inflammatory macrophages and phagocytosis of apoptotic neutrophils in response to IL-10 and glucocorticoids. **J Immunol,** v. 190, n. 10, p. 5237-46, May 15 2013.

9 ANEXOS

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA

UFG

Goiânia, 30 de outubro de 2017.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PEDIDO DE EMENDA DO PROTOCOLO N°. 039/13

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto**: Avaliação do papel da interleucina-17 na atividade microbicida de fagócitos inflamatórios de camundongos
2. **Pesquisador Responsável:** Milton Adriano de Oliveira
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** IPTSP/UFG
4. **Pesquisadores Participantes:** Milton Adriano de Oliveira, Lohane Suzart Martins, Clayson Moura Gomes, Pollyana Guimarães de Oliveira, Jéssica Cristina dos Santos, Fernanda Dias Tomé, Thiago Nattan Nunes, Lucilla Ribeiro Ávila, Nathália Oliveira de Carvalho, Fernanda Hélia Lucio,
5. **Unidade onde será realizado:** IPTSP/UFG
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 28/05/13
7. **Data da apresentação do Pedido de Emenda:** 22/09/17

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise da adequação solicitada, **APROVOU** o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.
Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei n°. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa n°. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em dezembro de 2019.

III - Data da reunião: 30/10/2017

Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA

UFG

Goiânia, 08/ 07/ 2013

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA, PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O N. 39/2013

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino): Pesquisa

II - Identificação:

Título do projeto: Avaliação do papel da interleucina-17 na atividade microbicida de fagócitos inflamatórios de camundongos.

❑ **Pesquisador Responsável/ Unidade:**
Milton Adriano Pelli de Oliveira / IPTSP

❑ **Pesquisadores Participantes:**

❑ Nome	Instituição	Formação Básica	Titulação	Função na Pesquisa
Lohane Suzart Martins http://lattes.cnpq.br/8731589841319964	IPTSP/UFG	Biomédica	Graduada	Planejamento e execução dos experimentos
Clayson Moura Gomes http://lattes.cnpq.br/8550177354539916	IPTSP/UFG	Biomédico	Mestre	Planejamento e execução dos experimentos
Pollyana Guimarães de Oliveira http://lattes.cnpq.br/7639500605796445	IPTSP/UFG	Ciências Biológicas	Graduada	acompanhamento e apoio aos experimentos
Jéssica Cristina dos Santos http://lattes.cnpq.br/0398078410648015	PUC/GO	estudante Biomedicina	Segundo Grau	acompanhamento e apoio aos experimentos
Fernanda Dias Tomé http://lattes.cnpq.br/5151812054858883	IPTSP/UFG	estudante Biomedicina	Segundo Grau	acompanhamento e apoio aos experimentos
Thiago Nattan Nunes http://lattes.cnpq.br/8262280394859710	IPTSP/UFG	Ciências Biológicas	Segundo Grau	acompanhamento e apoio aos experimentos

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com

Lucilla Ribeiro Ávila http://lattes.cnpq.br/3794004026980103	IPTSP/UFG	Biologa	Mestre	acompanhamento e apoio aos experimentos
Nathália Oliveira de Carvalho http://lattes.cnpq.br/8163450080191640	IPTSP/UFG	estudante Biomedicina	Segundo Grau	acompanhamento e apoio aos experimentos

- **Unidade onde será realizado:**
  Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP

- **Data de apresentação à CEUA:** 28/05/2013

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Objetivo geral

Avaliar se a interleucina-17 é capaz de alterar os mecanismos leishmanicidas de macrófagos e neutrófilos.

Objetivos específicos

1-Avaliar a expressão das enzimas iNOS, Phox e Arginase em macrófagos e neutrófilos estimulados por lipopolissacárides na presença ou ausência de IL-17.

2- Avaliar a produção de CCL2, CXCL1,CXCL2, IL-1b, IL-10, IL-12p70, IL-6, TNFa e VEGF em macrófagos e neutrófilos estimulados por lipopolissacárides na presença ou ausência de IL-17.

3-Avaliar a expressão de CD40, CD80, CD86 e receptor de IL-17 em macrófagos ou neutrófilos cultivados na presença de IL-17 e estimulados por lipopolissacáride.

4-Avaliar a expressão das enzimas iNOS, Phox e Arginase em macrófagos e neutrófilos infectados por diferentes espécies de leishmânia na presença ou ausência de IL-17.

5-Avaliar a expressão de CD40, CD80, CD86 e receptor de IL-17 em macrófagos ou neutrófilos infectados por leishmânia na presença ou ausência de IL-17.

6- Avaliar o efeito da adição ou bloqueio de PGE2 na atividade de arginase, produção de NO e produção de citocinas por macrófagos e neutrófilos cultivados na presença de IL-17 e estimulados por lipopolissacáride ou infectados por leishmânias.

7-Avaliar o efeito do INF-g e IL-4 na expressão das enzimas iNOS, Phox e Arginase em macrófagos e neutrófilos estimulados por lipopolissacárides ou infectados por leishmânia na presença ou ausência de IL-17.

8- Avaliar o efeito do INF-g e IL-4 na produção de CCL2, CXCL1,CXCL2, IL-1b, IL-10, IL-12p70, IL-6, TNFa e VEGF em macrófagos e neutrófilos estimulados por lipopolissacárides ou infectados por leishmânia na presença ou ausência de IL-17.

9-Avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos e neutrófilos infectados por diferentes espécies de leishmânia na presença ou ausência de IL-17.

10-Avaliar a capacidade microbicida de macrófagos e neutrófilos infectados por diferentes espécies de leishmânia na presença ou ausência de IL-17.

11- Avaliar o efeito do INF-g e IL-4 na atividade fagocítica e microbicida de macrófagos e neutrófilos infectados por diferentes espécies de leishmânia na presença ou ausência de IL-17.

IV - Sumário do projeto:

- **Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos:**

Para pesquisa com neutrófilos, não existe outra forma de obter estas células a não ser dos indivíduos, sendo que neutrófilos podem ser obtidos do sangue periférico ou cavidade peritoneal inflamada, porém, o número de neutrófilos obtido de sangue periférico de camundongos é inferior ao obtido da cavidade peritoneal inflamada.

- **Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do Ambiente (ar, temperatura, umidade), Alimentação/hidratação:**

Serão utilizados camundongos BALB/c e C57BL/6 machos de 8-12 semanas oriundos do biotério do IPTSP/UGF. Para cada grupo de experimentos serão utilizados 5 camundongos de cada linhagem. Os animais serão utilizados para obtenção de células peritoneais. Como a quantidade de células peritoneais obtidas de cada animal é de cerca de 10.000.000, será possível fazer um grupo de experimentos (descrito a seguir) com as células obtidas. Serão necessários animais injetados com tioglicolato por 5 dias para obtenção de macrófagos e 6 h para obtenção de neutrófilos.

Experimentos:

1) Avaliação da atividade de arginase, produção de NO e citocinas por macrófagos
2) Avaliar a produção de citocinas e quimiocinas em macrófagos
3) Avaliar a expressão de marcadores de superfície em macrófagos
4) Avaliar a expressão das enzimas expressão das enzimas iNOS, Phox e Arginase em macrófagos
5) Avaliar a atividade fagocítica e leishmanicida de macrófagos

Portanto, serão utilizados:

5 animais por grupo experimental
5 grupos experimentais para obtenção de macrófagos (25 animais de cada linhagem)
5 grupos experimentais para obtenção de neutrófilos (25 animais de cada linhagem)
Total de animais de cada linhagem (50 animais).

Total de animais das duas linhagens (100 camundongos).

Os animais serão mantidos em estantes ventiladas Alesco que serão adquiridas com verbas do projeto aprovado no edital Universal FAPEG 2012. As estantes ventiladas possuirão caixa confeccionada em polisulfona, nas medidas: 31cm comprimento x 20cm de largura x 13cm de altura contendo até 5 animais por gaiola. Será fornecida a vontade água acidificada e ração comercial. A sala é climatizada a 22°C com ciclos de claro e escuro de 12 horas.

- **Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada:** Para a obtenção das células, os camundongos serão inoculados na cavidade peritoneal com 1ml de caldo tioglicolato e após 6 horas (para neutrófilos) ou 5 dias (para macrófagos inflamatórios).

- **Método de eutanásia:**

Os animais serão anestesiados com xilazina e cetamina antes da eutanásia que será feita por decapitação. O método de decapitação foi escolhido, pois possibilita uma menor contaminação de sangue na

cavidade peritoneal. Após a coleta das células, os animais serão acondicionados em sacos plásticos e mantidos em freezer -20C.

- **Destino do animal:**
  As carcaças serão incineradas na escola de veterinária do UFG.

V – Comentários do relator frente às orientações da SBCAL

- **Estrutura do protocolo:** Adequada, apresenta cronograma compatível, termo de responsabilidade assinado

- **Análise de sofrimento imposto, métodos alternativos e benefícios:** Os animais serão manipulados apenas por pesquisadores treinados para tal a fim de promover um estresse mínimo durante a injeção com tioglicolato, anestesia e decapitação dos animais.

- **Análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:** De uma maneira geral, o projeto apresenta risco mínimo para os pesquisadores, já que os animais utilizados não estarão infectados. Além disto, todos os pesquisadores terão a disposição e deverão utilizar os EPIs como gorro, máscara, jalecos e luvas de procedimento. Todos os pesquisadores serão devidamente treinados para o correto manuseio dos materiais cirúrgicos, seringas e cuidados para trabalho no fluxo laminar. Caso algum dos pesquisadores se sinta incomodado com a manipulação e sacrifico dos animais, estes serão convidados a se retirarem do recinto para evitar riscos psicológicos. A manipulação dos parasitos (leishmânias) será feita em cabine de fluxo laminar com os devidos EPIs sem a presença de materiais perfuro cortantes.

VI - Parecer da CEUA:

Diante do exposto, o parecer da CEUA sobre o projeto é **APROVADO**.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste parecer consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o *Relatório Final* baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONSEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

VII - Data da reunião: 08/07/2013

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera

Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com

Anexo 2 – Termo de prorrogação do projeto

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
Rua 235, S/N - Setor Universitário -Goiânia-GO - CEP 74605-050 – Fone (62)3209-6109 - FAX (62) 3209-6363.

UFG

C E R T I D Ã O

Certificamos que no Conselho Diretor do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, em reunião realizada no dia 31 de agosto de 2017, foi apreciado e aprovado a prorrogação do Projeto de Pesquisa "Avaliação do papel da interleucina-17 na atividade microbicida de fagócitos inflamatórios de camundongos", com Prorrogação da Vigência Final para 31/12/2019 – Coordenador: Prof. Dr. Milton Adriano Pelli de Oliveira

Goiânia, 31 de agosto de 2017

Valéria Maria de Sousa Moura
Coordenadora Administrativa em exercício do IPTSP/UFG

Profª. Drª. Flávia Aparecida de Oliveira
Diretora do IPTSP/UFG

Tendo em vista Certidão expedida, encaminhe-se à Profª. Drª. Fabíola Souza Fiaccadori, para os devidos fins.

Profª. Drª. Flávia Aparecida de Oliveira
Diretora do IPTSP/UFG