



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

DÊNNIS HENRIQUE LEANDRO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE LINFÓCITOS B
REGULATÓRIOS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE.**

CAMPINAS

2018

DÊNNIS HENRIQUE LEANDRO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE LINFÓCITOS B
REGULATÓRIOS NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestre em ciências, na
área de concentração Patologia Clínica.

ORIENTADOR: RONEI LUCIANO MAMONI

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO DÊNNIS HENRIQUE LEANDRO DA SILVA, E ORIENTADO PELO
PROF. DR. RONEI LUCIANO MAMONI.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38c Silva, Dênnis Henrique Leandro da, 1993-
Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos B regulatórios na
paracoccidiodomicose / Dênnis Henrique Leandro da Silva. – Campinas, SP :
[s.n.], 2018.

Orientador: Ronei Luciano Mamoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Linfócitos B reguladores. 2. Paracoccidiodomicose. 3. Linfócitos B. I.
Mamoni, Ronei Luciano. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phenotypical and functional characterization of regulatory b cells in
paracoccidiodomycosis

Palavras-chave em inglês:

B-Lymphocytes, Regulatory

Paracoccidiodomycosis

B-Lymphocytes

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Ronei Luciano Mamoni [Orientador]

Plinio Trabasso

Angela Maria Victoriano de Campos Soares

Data de defesa: 27-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

DÊNNIS HENRIQUE LEANDRO DA SILVA

ORIENTADOR: RONEI LUCIANO MAMONI

MEMBROS:

1. PROF. DR. RONEI LUCIANO MAMONI

2. PROF. DR. PLÍNIO TRABASSO

3. PROF^a. DR^a. ANGELA MARIA VICTORIANO DE CAMPOS SOARES

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 27/08/2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me permitido conhecer pessoas excepcionais durante a graduação e por me dar a oportunidade de entrar numa profissão tão importante para a promoção da saúde.

Agradeço à meus pais, meus verdadeiros heróis, pelo esforço e motivação direcionados a mim neste período.

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro concedido para que esse projeto fosse viável.

Agradeço ao Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni pela confiança, apoio e tempo dedicados a mim e ao desenvolvimento desse projeto.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Maria Heloisa Souza Lima Blotta por ter me acolhido em seu laboratório e por ter acreditado em mim.

Agradeço à todos os amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pessoas especiais, pela paciência, ensinamentos, apoio e amizade.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos dimórficos do gênero *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*), restrita à América Latina e uma das principais micoses sistêmicas do Brasil. A resposta imunológica na PCM é heterogênea e está relacionada ao desenvolvimento de manifestações clínicas distintas. A doença mais grave e disseminada é caracterizada pelo comprometimento de linfonodos, fígado, baço e medula óssea; enquanto formas brandas apresentam lesões da pele, mucosa e pulmões. Ambas as formas clínicas apresentam uma resposta imune celular comprometida (mediada por células T) e a ativação policlonal das células B. Em geral, a resistência à infecção está associada ao desenvolvimento da resposta imune Th1 e Th17 e baixa ativação das células B. Por outro lado, a susceptibilidade é relacionada a uma resposta do tipo Th2, com a ativação policlonal dos linfócitos B. Além de serem responsáveis pela produção de anticorpos, estudos recentes têm demonstrado que uma subpopulação de células B (chamada Bregs) pode exercer um papel regulador da resposta celular, principalmente através da produção de citocinas supressoras (IL-10 e TGF- β). Neste estudo, tivemos por objetivos comparar a frequência de leucócitos circulantes de pacientes com PCM ativa e controles; e caracterizar, fenotípica e funcionalmente, os linfócitos B na PCM humana, avaliando seu papel como células reguladoras (Breg). Foram analisados amostras de sangue periférico de pacientes com PCM com doença ativa e doadores saudáveis (controle). A quantificação relativa e fenotipagem de leucócitos circulantes foi feita por citometria de fluxo. A análise da capacidade de células B purificadas para produzirem citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) foi realizada por culturas após vários estímulos (CpG-ODN, CD40L solúvel e DNA de *P. brasiliensis* e gp43). Nossos resultados mostraram que pacientes com PCM apresentam maior número de células B circulantes (células CD19⁺ e/ou CD20⁺) do que controles. Além disso, houve

uma maior frequência de células B apresentando fenótipo Breg (células CD20⁺CD24⁺CD38^{high}) no sangue periférico de pacientes com PCM em comparação com os controles. Os experimentos *in vitro* mostraram que as células B de pacientes com PCM apresentam capacidade aumentada para produzir citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), tanto em células não estimuladas quanto após todos os estímulos utilizados. Em conclusão, nossos resultados, embora preliminares, indicam que as células B poderiam participar como células reguladoras no PCM humana, contribuindo para a supressão da resposta imunológica celular observada em pacientes com PCM ativa, por meio da produção de citocinas supressoras.

Palavras-chave: Linfócito B regulatório. Breg. Paracoccidioidomicose. Linfócitos B.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* and *P. lutzii*), restricted to Latin America and one of the main systemic mycoses in Brazil. The immune response in PCM is heterogeneous and is related to the development of distinct clinical manifestations. The most serious and widespread disease is characterized by the commitment of lymph nodes, liver, spleen and bone marrow; while mild forms present lesions of the skin, mucosa, and lungs. Both clinical forms have a compromised cellular immune response (T cell-mediated) and polyclonal activation of B cells. In general, resistance to infection is associated with the development of Th1 and Th17 immune response and low activation of B cells. On the other hand, susceptibility is related to a Th2-type response with polyclonal activation of B lymphocytes. In addition to being responsible for antibody production, recent studies have shown that a B-cell subpopulation (called Bregs) may play a mainly through the production of suppressor cytokines (IL-10 and TGF- β). In this study, we aimed to compare the frequency of circulating leukocytes in patients with active PCM and controls; and characterize, phenotypically and functionally, B lymphocytes in human PCM, evaluating their role as regulatory cells (Breg). Peripheral blood samples from patients with active PCM and healthy donors (control) were analyzed. Relative quantification and phenotyping of circulating leukocytes were done by flow cytometry. Analysis of the ability of purified B cells to produce anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β) was performed by cultures after various stimuli (CpG-ODN, soluble CD40L, gp43 and DNA from *P. brasiliensis*). Our results showed that patients with PCM present a greater number of circulating B cells (CD19⁺ and/or CD20⁺ cells) than controls. In addition, there was a higher frequency of Breg phenotype presenting Breg phenotype (CD20⁺CD24⁺CD38^{high} cells) in the peripheral blood of PCM patients compared to controls. In vitro experiments

have shown that B cells from patients with PCM have increased capacity to produce anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β), both in unstimulated cells and after all stimuli used. In conclusion, our results, although preliminary, indicate that B cells could participate as regulatory cells in human PCM, contributing to the suppression of the cellular immune response observed in patients with active PCM, through the production of suppressor cytokines.

Keywords: Regulatory B cell. Breg. Paracoccidioidomycosis. B cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Célula apresentadora de antígeno
BAAF-R – Receptor do fator ativador de células B
Bregs – Linfócitos B regulatórios
BSA – Albumina bovina fetal
CMSP – Células mononucleares do sangue periférico
CpG-ODN – Oligodesoxinucleotídeo CpG
EAE – Encefalomielite autoimune experimental
ELISA – Ensaio imunoenzimático
gp43 – Glicoproteína de 43 kDaltons
HTT – Teste de hipersensibilidade do tipo tardia
IFN- γ – Interferon gama
IgA – Imunoglobulina A
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL-4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-17 – Interleucina 17
IL-1 β – Interleucina 1 beta
IL-22 – Interleucina 22
IMF – Intensidade média de fluorescência
LES – Lúpus eritematoso sistêmico
MBP – Proteína básica maior
MHC II – Complexo de histocompatibilidade maior de classe II
NK – Células Natural Killer
NKT – Células Natural Killer de linhagem T
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato
PBS-B-A – Solução Salina Tamponada com Fosfato com albumina bovina fetal e azida sódica
PCM – Paracoccidiodomicose
PD-1 – Molécula de morte programada 1
PMA – "Phorbol 12-myristate 13-acetate"
PRRs – Receptores de reconhecimento padrão
sCD40L – CD40 ligante solúvel
TCR – Receptor de células T
TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta
TLRs – Receptores do tipo Toll
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Casuística	20
3.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e purificação de linfócitos B (CD20 ⁺) por seleção imunomagnética positiva.	20
3.3 Condições de cultura utilizadas para os experimentos <i>in vitro</i>	21
3.4 Avaliação fenotípica de leucócitos presentes na circulação periférica de pacientes com PCM e controles normais.	21
3.5 Imunofluorescência para avaliação fenotípica de linfócitos B purificados.	25
3.6 Quantificação de citocinas por ELISA	26
3.7 Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Quantificação relativa das populações de leucócitos (fenotipagem) circulantes por citometria de fluxo.	27
4.2 Análise do fenótipo de linfócitos B purificados estimulados <i>in vitro</i>	35
4.3 Avaliação da produção de IL-10 por linfócitos B purificados estimulados <i>in vitro</i>	38
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8. ANEXOS	58
8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/UNICAMP	58
8.2 TCLE de controles.	62
8.3 TCLE de pacientes.	64

1. INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é a principal micose sistêmica da América Latina que acomete indivíduos imunocompetentes [1]. Estudos moleculares recentes permitiram a classificação dos fungos causadores da doença como pertencentes à ordem *Onygenales*, família *Onygenaceae* [2]. Acreditava-se que o gênero *Paracoccidioides*, era composto somente pela espécie *P. brasiliensis*, contudo, estudos filogenéticos de isolados do fungo relataram uma extensa variabilidade genética, indicando a existência de várias subespécies do complexo *Paracoccidioides*: S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4 [2, 3], sendo proposta a criação de uma nova espécie, o *P. lutzii*, que ocorre com alta incidência na região centro-oeste do Brasil, e no Equador [2, 4]. Ambas as espécies são fungos termodimórficos, apresentando-se na temperatura ambiente (25°) em sua forma miceliana e no organismo do hospedeiro (37°) na forma de levedura [5]. A espécie *P. brasiliensis* é endêmica das regiões Sul e Sudeste, enquanto que a espécie *P. lutzii* é endêmica no Centro-Oeste e no Equador [6].

Inquéritos epidemiológicos realizados no Brasil, Venezuela, Argentina e Colômbia demonstram que até 50% da população de áreas endêmicas tenham sido expostos a esse fungo [6]. No entanto, grande parte dos indivíduos expostos conseguem conter a infecção e não desenvolvem a doença, fato evidenciado pela alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam o teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardia (HHT) positivo para antígenos do fungo [7]. A PCM caracteriza-se por apresentar um largo espectro de manifestações clínicas, agrupadas em 2 formas principais: a forma crônica (FC), geralmente mais localizada e menos agressiva e a forma aguda (FA), mais grave e disseminada [8]. Em ambas as formas clínicas a imunidade celular é comprometida e a ausência de intervenção por meio de terapia específica leva a altas taxas de mortalidade [9, 10], sendo considerada a oitava causa de mortalidade por

doença infecciosa/parasitária predominantemente crônica, superando a mortalidade causada pelas leishmanioses, e a mais alta taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas entre indivíduos imunocompetentes [11].

Nos últimos anos, vários estudos vêm sendo realizados a fim de compreender como os fungos são reconhecidos pelo sistema imunológico e quais respostas estão envolvidas na susceptibilidade e resistência a esses patógenos. Diversas evidências têm apontado que a resposta envolvida na resistência ao *P. brasiliensis* é predominantemente Th1/Th17, enquanto que a suscetibilidade envolve uma resposta Th2 [12]. No modelo experimental da PCM, camundongos suscetíveis à doença (linhagem B10.A) apresentam resposta imune celular deprimida, evidenciada pela proliferação de linfócitos e reação de HTT diminuídas frente a estímulos com antígenos do fungo [10]. Também se caracterizam pela produção preferencial de citocinas do tipo Th2, tais como IL-4, IL-5 e IL-10, e anticorpos das classes IgG1 e IgA [10]. Diferentemente, os camundongos resistentes (linhagem A/Sn – A/J) caracterizam-se pela resposta celular preservada, com linfoproliferação e testes de HTT positivos e produção de citocinas do tipo Th1 como o IFN- γ e o TNF- α , assim como produção de anticorpos da classe IgG2a [13-16].

Esses dados encontrados no modelo experimental assemelham-se com os diferentes perfis de apresentações clínicas da PCM humana. A FA caracteriza-se por um comprometimento da resposta imune celular, associada com uma resposta predominante Th2/Th9, composta pela produção aumentada (*in vitro*) de citocinas supressoras da resposta imune celular, tais como a IL-4, IL-5, IL-10, o fator de transformação de crescimento-beta (TGF- β), além de baixa produção de IFN- γ e TNF- α [7, 12, 17-21]. Por outro lado, indivíduos com a FC desenvolvem uma resposta mista com a participação predominante de células Th17/Th22, com a presença das citocinas IL-17 e IL-22, além

da produção de citocinas do tipo Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-2 e quantidades variáveis de IL-10 e IL-4 [12, 18, 19, 21].

Como mencionado, pacientes com PCM apresentam resposta imune celular deprimida, demonstrada pela falta de reatividade em testes de hipersensibilidade tardia utilizando antígeno extraído do fungo, bem como através de testes *in vitro*, nos quais linfócitos apresentam proliferação diminuída frente à estimulação com mitógenos (PHA), antígenos de *Candida albicans* e de *P. brasiliensis* [22]. Esses dados foram posteriormente confirmados por nosso grupo [21] e por outros pesquisadores [23], que também correlacionaram a diminuição da resposta celular com a forma clínica apresentada pelo paciente, encontrando maior supressão na FA da PCM.

Concomitante à supressão da resposta imune celular, pacientes com PCM apresentam ativação policlonal de células B, resultando na hipergamaglobulinemia característica da doença [10, 24, 25]. Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que pacientes com PCM apresentam produção diferencial de classes e isotipos de imunoglobulinas. Foi demonstrado que pacientes com a FA ou com a FC multifocal (principalmente os que apresentam envolvimento de linfonodos) apresentam grande produção de IgE e IgG4 específicas para antígeno do fungo (gp43). Enquanto que pacientes com a FC unifocal apresentam produção preferencial de IgG1 [20]. É importante salientar que uma glicoproteína de 43 kDaltons, denominada de gp43, é produzida e excretada pelo fungo em cultura e apresenta-se como antígeno imunodominante, reconhecido por anticorpos presentes no soro da grande maioria dos pacientes com PCM [26-29].

Os linfócitos B são tradicionalmente conhecidos por participarem da resposta imunológica por meio da produção de anticorpos. Porém, essas células também podem desempenhar a função de células apresentadoras de antígenos (APCs). Na

paracoccidioidomicose experimental a apresentação de antígenos por linfócitos B leva à diferenciação de linfócitos Th2, por meio da produção de IL-4 e IL-10 [30], contribuindo assim para a suscetibilidade à doença. Atualmente, está bem estabelecido que a diferenciação das células T nas diversas subpopulações e o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa, é regulada principalmente pela presença de citocinas produzidas no ambiente onde ocorre a apresentação do antígeno por APCs [31, 32]. A interação dessas citocinas com receptores expressos nas células T induz uma sinalização intracelular específica e consequente ativação de fatores de transcrição característicos de cada subpopulação [31, 32]. Dessa forma, a diferenciação de células Th1 ocorre através da presença de IL-12 e IFN- γ , enquanto que as células Th2 se diferenciam na presença de IL-4 [31, 33, 34]. Por outro lado, a diferenciação de células Th17 ocorre principalmente na presença de TGF- β , IL-1 β e IL-6, apesar de outras citocinas inflamatórias como o TNF- α também apresentarem efeitos adicionais na diferenciação [34, 35].

Além da produção de anticorpos e da função como APC, mais recentemente, estudos demonstraram que linfócitos B podem desempenhar a função de células regulatórias, principalmente pela produção de IL-10. Sendo essa última atividade desempenhada por uma subpopulação denominada de células B regulatórias (Bregs) [36-38].

Em camundongos as células Bregs foram inicialmente identificadas como células B1a expressando a molécula CD5 (CD5⁺), posteriormente uma população produtora de IL-10 foi caracterizada como CD19⁺CD5⁺CD1d^{+(high)} [39, 40]. É interessante notar que no modelo experimental da PCM, alguns estudos demonstraram que linfócitos B1 (CD19⁺CD5⁺) estão relacionados com a suscetibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis* por meio da produção de IL-10 [41], interferindo com a capacidade fagocítica de macrófagos e com a formação de granulomas [41]. Além disso, a presença de linfócitos

B1 interfere com a polarização da resposta imunológica adaptativa, levando a um desvio precoce para a resposta Th2 e a consequente suscetibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis* [42].

Em humanos, vários marcadores estão sendo utilizados para caracterizar a população de linfócitos B com atividade regulatória [38]. Grande parte dos trabalhos caracterizam essa população como CD19⁺CD24^{high}CD38⁺ [43-47], como CD19⁺CD24^{high}CD27⁺ [48, 49] ou como CD19⁺CD25⁺CD71⁺CD73⁻ [50]. Independentemente do fenótipo, a atividade regulatória dessas células é exercida principalmente pela produção de IL-10 [38].

Após sua descrição, as células Bregs vêm sendo extensivamente estudadas, principalmente em relação à sua participação em doenças autoimunes e na resposta imunológica a tumores. Observa-se que em algumas doenças autoimunes como no Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) [47], no pênfigo [43], na artrite reumatoide [51-53], assim como na esclerose múltipla e em seu modelo experimental (encefalomielite autoimune experimental - EAE) [54, 55], a população de células Bregs está diminuída ou apresenta menor capacidade de regulação, levando à um aumento da diferenciação de células inflamatórias (Th1 e Th17) e dessa forma contribuindo para a evolução da doença [56, 57]. Por outro lado, alguns estudos demonstram que em tumores, particularmente em focos metastáticos, há um aumento no número de linfócitos B com fenótipo regulatório presentes no infiltrado tumoral [58-61]. Dessa forma interferindo com a resposta anti-tumoral, principalmente pela produção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β [58].

Foi observado que pacientes com artrite idiopática juvenil apresentavam menor quantidade de linfócitos com fenótipo regulatório CD24^{high}CD38^{high} na circulação

periférica, além de menor produção de IL-10 após a separação e estímulo em in vitro dessas células [62].

Já em relação ao papel das células Bregs em doenças infecciosas, os estudos ainda são bastante incipientes, com poucos trabalhos demonstrando a participação em infecções virais e parasitárias [63].

Em pacientes infectados pelo HIV foi descrito um aumento no número de células Bregs na circulação periférica e no tecido intestinal, tanto na infecção aguda quanto na fase crônica, de pacientes sem tratamento [64]. Na tuberculose, observou-se que pacientes submetidos a tratamento apresentaram uma diminuição no número de células Bregs na circulação, comparados a pacientes sem tratamento, sendo essa diminuição correlacionada ao aumento na produção de IL-22 e IFN- γ . Dessa forma reestabelecendo o perfil de resposta imunológica do tipo Th1, ideal para conter a progressão da doença e eliminação do patógeno [65].

Na pneumonia causada por *Pneumocystis*, observou-se que pacientes não infectados por HIV apresentaram menor quantidade de linfócitos B circulantes em relação a indivíduos saudáveis. Já no modelo experimental da mesma doença, observou-se que a quantidade de linfócitos B está relacionada ao clearance do patógeno. Em camundongos BAFF-R^{-/-}, observou-se os camundongos desenvolveram uma resposta Th1/Th17, promovendo a eliminação do fungo [66].

Ainda não está devidamente esclarecida a forma pela qual as células Bregs são ativadas por patógenos, mas diversos estudos, realizados principalmente em modelos experimentais, demonstram que a ativação das células Bregs para a produção de IL-10 se dá tanto por meio da interação com linfócitos T, via CD40-CD40L [67, 68], como pelo reconhecimento direto de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por meio de Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), principalmente os receptores do

tipo Toll (TLRs) [69]. Dessa forma, o estímulo com CpG-ODN (via TLR9) aparenta ser o principal indutor da produção de IL-10 por estas células [68-71].

Temos por hipótese que na doença humana, assim como ocorre no modelo experimental, os linfócitos B possam desempenhar o papel de células apresentadoras de antígeno, levando à diferenciação de linfócitos Th2. Também acreditamos que os linfócitos B possam atuar como células regulatórias (Bregs), por meio da produção de IL-10 e TGF- β e dessa maneira contribuir para a supressão da resposta celular observada nos pacientes com PCM.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos linfócitos B na paracoccidiodomicose humana, avaliando seu papel como células regulatórias.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar e caracterizar, por meio de citometria de fluxo, o fenótipo de leucócitos, particularmente de linfócitos B, presentes na circulação periférica de pacientes com Paracoccidiodomicose ativa, em comparação com indivíduos saudáveis (controle).
- Avaliar se linfócitos B purificados (de pacientes e controles) estimulados com leveduras de *P. brasiliensis*, antígenos e DNA derivados do fungo, assim como agonista de TLR9 (CpG-ODN) produzem citocinas supressoras (IL-10 e TGF- β).
- Avaliar se linfócitos B purificados (de pacientes e controles) estimulados com leveduras de *P. brasiliensis*, antígenos e DNA derivados do fungo, assim como agonista específico de TLR9 (CpG-ODN) se diferenciam em linfócitos B com fenótipo regulatório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Esse estudo prospectivo foi realizado de Novembro de 2015 a Janeiro de 2018, utilizando 17 pacientes com a doença ativa e 12 indivíduos saudáveis. Para os experimentos foram coletados 50 mL de sangue periférico de pacientes com PCM ou controles em tubos com heparina sódica, por punção venosa. Os pacientes foram recrutados no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Foram incluídos somente pacientes com a “doença-ativa”, ou seja, pós-diagnóstico ou no máximo com um mês de tratamento, que ainda apresentavam sintomas e exames laboratoriais compatíveis com a paracoccidiodomicose em atividade, e que não apresentavam comorbidades associadas. Indivíduos do grupo controle foram recrutados na comunidade universitária da Unicamp, sendo excluídos indivíduos com sinais ou sintomas de doenças infecciosas ou inflamatórias em atividade, bem como aqueles que fizeram uso de medicamentos anti-inflamatórios 2 semanas antes da coleta. Todos os indivíduos que participaram da pesquisa assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido conforme regras estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (CAAE: 50875515.6.0000.5404).

3.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e purificação de linfócitos B (CD20⁺) por seleção imunomagnética positiva.

As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas através da centrifugação com ficoll-hypaque (densidade = 1,077 g/mL) a 800g por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse processo, as CMSP foram transferidas para tubo cônico estéril, seguindo-se duas lavagens com PBS estéril. Então as células foram contadas e submetidas à purificação de Linfócitos B.

Os Linfócitos B foram purificados através dos Kits CD20 MicroBeads (Miltenyi Biotec) de acordo com as recomendações do fabricante. Obtivemos populações celulares com pureza de 90-95%, confirmado por citometria de fluxo (dados não mostrados).

3.3 Condições de cultura utilizadas para os experimentos *in vitro*.

Após a purificação, os linfócitos B foram ressuspensos na concentração de 1×10^6 em Meio RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado com soro bovino fetal 10%, L-glutamina (2 mM) e gentamicina (5 $\mu\text{g/mL}$). As células foram então cultivadas em placas de cultura celular (CORNING INC, USA) em 6 condições: SE (sem estímulo), CD40L (20ng/mL - Biolegend), CpG-ODN (1 $\mu\text{g/mL}$ - Invivogen), DNA (extraído do fungo *P. brasiliensis* – 10 ng/mL) e gp43 (Glicoproteína de 43kDa extraída do fungo *P. brasiliensis* – 1 $\mu\text{g/mL}$) por 48h em estufa a 37°C com 5% CO₂. Nas últimas 6 horas de cultura as células foram reestimuladas com PMA (50 ng/mL) e ionomicina (250 ng/mL) na presença de Brefeldina A (1 $\mu\text{g/mL}$). Passado esse período os sobrenadantes das culturas foram então coletados e armazenados a -80°C para dosagem de citocinas (ver abaixo) e as células foram posteriormente fenotipadas pela técnica de citometria de fluxo (ver abaixo).

3.4 Avaliação fenotípica de leucócitos presentes na circulação periférica de pacientes com PCM e controles normais.

Para quantificação e avaliação fenotípica de leucócitos presentes na circulação periférica de pacientes com PCM e controles normais, 1mL do sangue periférico coletado em tubos contendo heparina sódica foi transferido para tubos de poliestireno e foram adicionados 3mL de Tampão de Lise de Hemácias, com incubação à temperatura ambiente por 10 minutos para completa lise dos eritrócitos. Passado o período de

incubação, o tubo foi centrifugado a 300g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1mL de tampão de lavagem (PBS+BSA(1%)-azida sódica - PBS-B-A). Para a imunofluorescência, 50µL da suspensão de células foi transferida para tubos contendo uma mistura de anticorpos marcados com fluorocromos (ver tabela I) e incubados por 30 minutos a 4°C no escuro. Após este período foram adicionados 150 µL de PBS-B-A a cada tubo, que então foram centrifugados a 300g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e as células novamente lavadas. Em seguida, as células foram ressuspensas em 200 µL de formaldeído (2%). A aquisição das células foi efetuada em citômetro de fluxo (FACSCanto/Becton & Dickson). A análise dos resultados foi então realizada em programa específico (FACSDiva - BD Biosciences), onde foi analisado a porcentagem de células positivas e/ou a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada marcador, conforme demonstrado nas figuras 1 a 3.

Tabela I. Pannel de anticorpos conjugados a fluorocromos utilizados para a fenotipagem de leucócitos circulantes.

Tubo	FITC/Alx488	PE	PercP/PE-Cy5	APC/Alx647	PE-Cy7	APC-Cy7
1	Controle de Isotipo	Controle de Isotipo	Controle de Isotipo	Controle de Isotipo	Controle de Isotipo	Controle de Isotipo
2	CD3	-	CD49d	-	CD14	CD16
3	CD19	TCR $\gamma\delta$	CD3	CD4	CD56	CD8
4	CD45RA	CD4	CD3	CD45RO	-	CD8
5	CD25	CD4	CD69	CD3	CD56	CD8
6	CD19	CD27	CD24	CD38	CD20	-

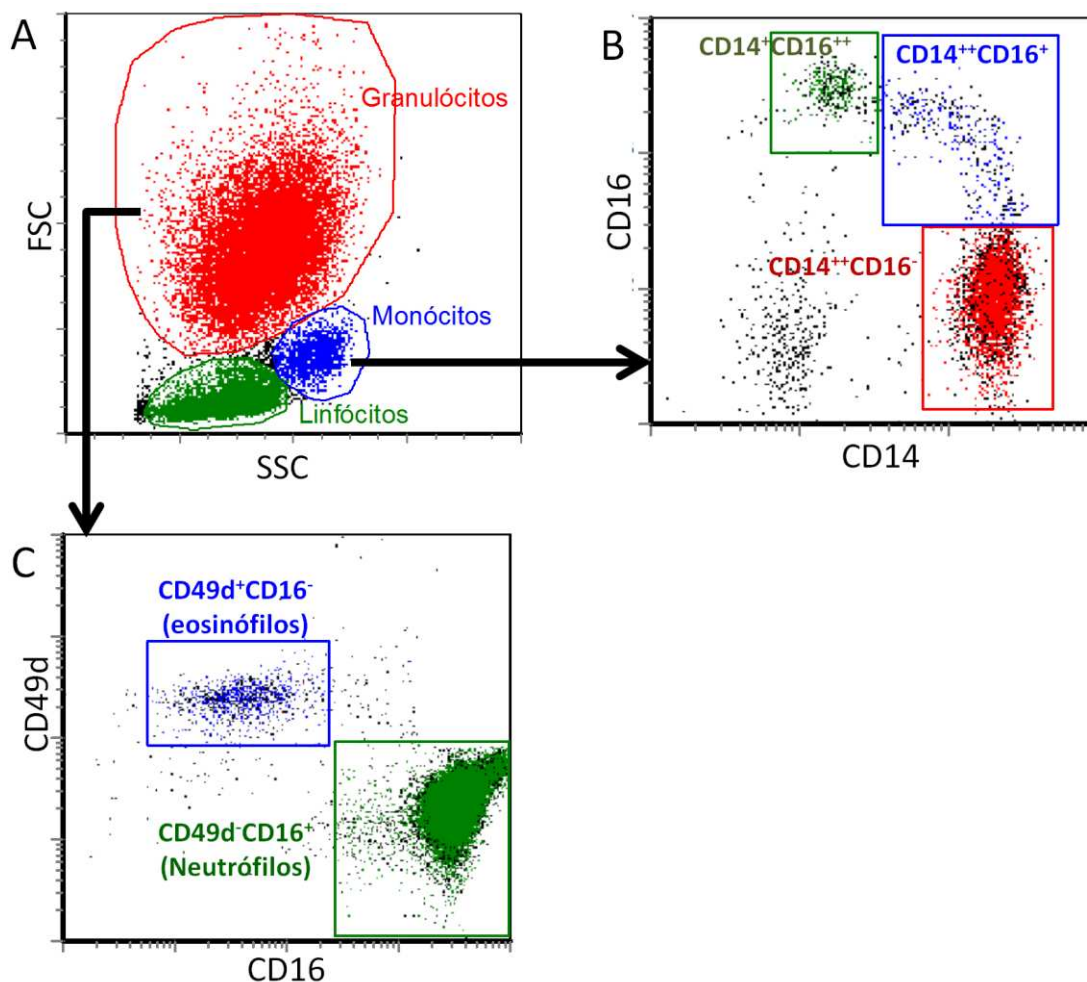


Figura 1: Gráficos representativos da estratégia utilizada para a determinação da frequência (%) das subpopulações de monócitos e granulócitos no sangue periférico de pacientes com paracoccidioidomicose e indivíduos do grupo controle. Em um primeiro momento foi gerado um gráfico do tipo “dot-plot” (A), no qual as populações de linfócitos (verde), monócitos (azul) e granulócitos (vermelho) foram determinadas de acordo com as suas características de dispersão quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) (A). A partir desse gráfico foram gerados outros “dot-plots” nos quais foram analisadas as subpopulações de monócitos (B) e granulócitos (C). Para os monócitos (B) foi realizada a marcação de células com os anticorpos anti-CD16 e anti-CD14. Nesse gráfico foram então delimitadas as populações de células $CD14^{+}CD16^{++}$ (monócitos não-clássicos - em verde); células $CD14^{++}CD16^{+}$ (monócitos intermediários - em azul) e células $CD14^{++}CD16^{-}$ (monócitos clássico - em vermelho). Para os granulócitos (C) foi realizada a marcação de células com os anticorpos anti-CD16 e anti-CD49d, sendo delimitadas as populações de eosinófilos ($CD49d^{+}CD16^{-}$ - em azul) e de neutrófilos ($CD49d^{-}CD16^{+}$ - em verde). Os resultados finais foram expressos como a porcentagem de células positivas para cada parâmetro.

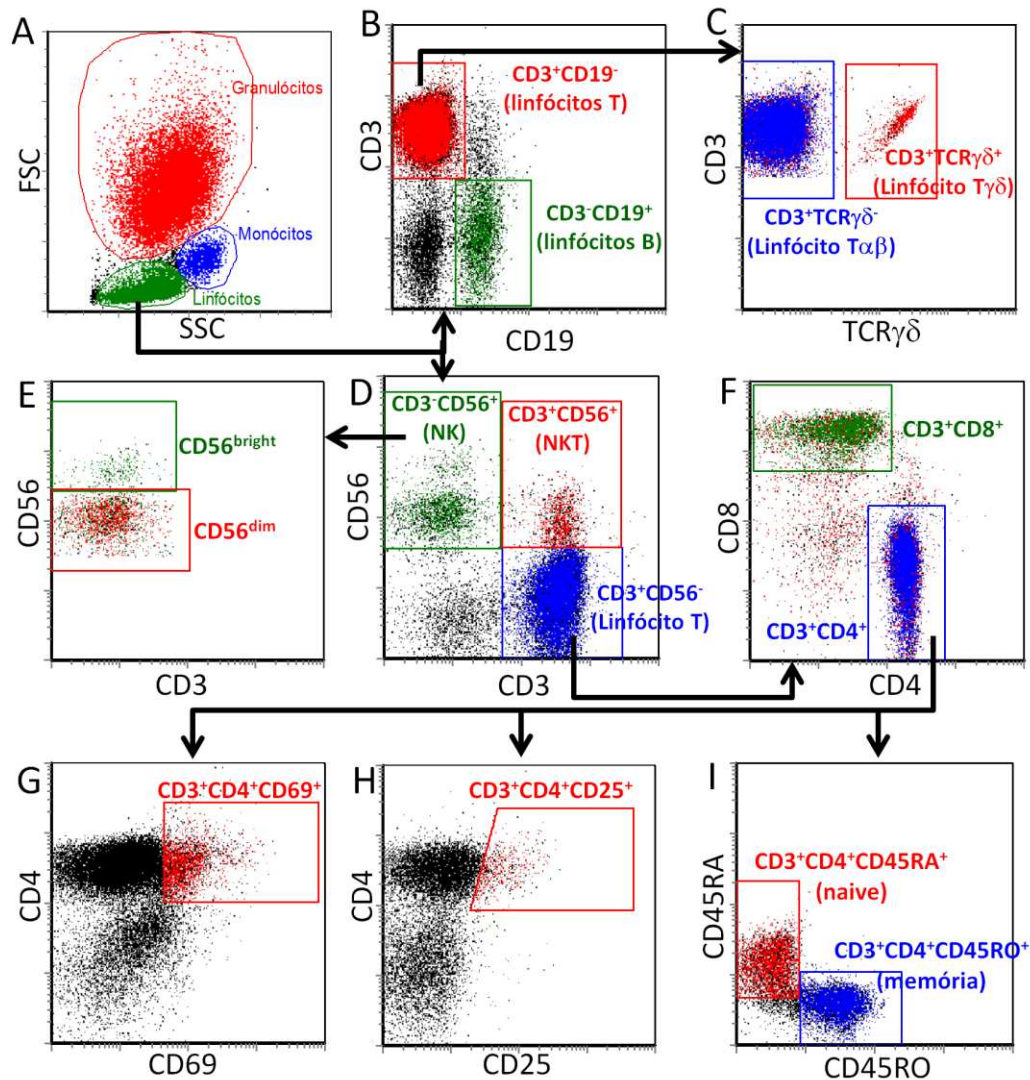
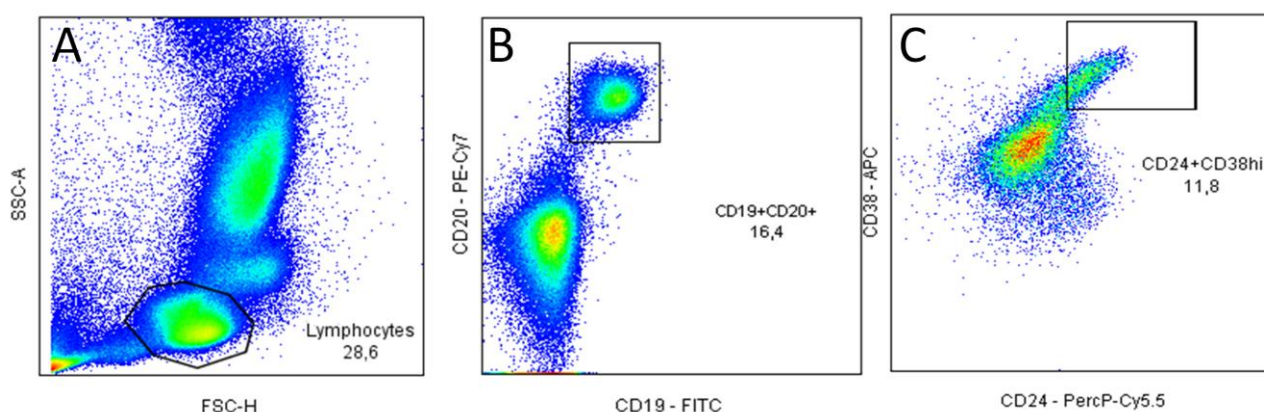


Figura 2: Gráficos representativos da estratégia utilizada para a determinação da frequência (%) das subpopulações de linfócitos no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose e indivíduos do grupo controle. Em um primeiro momento foi gerado um gráfico do tipo “dot-plot” (A), no qual as populações de linfócitos (verde), monócitos (azul) e granulócitos (vermelho) foram determinadas de acordo com as suas características de dispersão quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC) (A). A partir desse gráfico foram gerados outros “dot-plots” nos quais foram analisadas as subpopulações de linfócitos T ($CD3^+CD19^-$) e linfócito B ($CD3^-CD19^+$) (B). Também foram determinadas as subpopulações de quanto à expressão de CD56 (D), tendo sido delimitadas as subpopulações de células NK ($CD3^-CD56^+$); células NKT ($CD3^+CD56^+$) e linfócitos T ($CD3^+CD56^-$). A partir da região de células NK ($CD3^-CD56^+$) foi gerado novo gráfico para análise das populações com alta expressão de CD56 ($CD56^{bright}$) e baixa expressão de CD56 ($CD56^{dim}$) (E). A partir da populações expressando somente CD3, foi gerado novo gráfico para análise da expressão de CD4 e de CD8 (F). Finalmente, para análise da expressão de marcadores de ativação (CD25 e CD69) determinação das populações de linfócitos naive e de memória, partir da região de linfócitos $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$, foram gerados novos gráficos para análise de CD69

(G), CD25 (H) e CD45RA e CD45RO (I). Os resultados finais foram expressos como a



porcentagem de células positivas para cada parâmetro.

Figura 3: Gráficos representativos da estratégia utilizada para a determinação da frequência (%) das subpopulações de linfócitos B no sangue periférico de pacientes com paracoccidiodomicose e indivíduos do grupo controle. A região dos linfócitos foi delimitada de acordo com a distribuição FSC e SSC (A). A partir desta região foi determinada a população CD19⁺CD20⁺ (B), e desta população foi identificada a população de células CD24⁺CD38^{high} (C).

3.5 Imunofluorescência para avaliação fenotípica de linfócitos B purificados.

Para a análise das células utilizadas nos experimentos *in vitro*, após a realização das culturas, as células foram coletadas e submetidas à marcação de superfície pela incubação com os seguintes anticorpos: CD19 (FITC); CD86 (PE); CD40 (PercP); CD80 (APC); CD20 (PE-Cy7); MHC II (HLA-DR - APC-Cy7); CD25 (FITC); CD73 (PercP); CD71 (APC-Cy7); CD24 (PercP); CD38 (APC); CD27 (PE); TGF- β (LAP - APC). Após a marcação de superfície, foram adicionados 150 μ L de PBS-B-A a cada tubo, e então centrifugados a 300g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e as células novamente lavadas. Em seguida, as células foram ressuspensas em 200 μ L de formaldeído (2%). Em seguida, as células foram incubadas com tampão de permeabilização (PBS-Saponina 5%) por 20 minutos a 4°C no escuro. Então, foi adicionado o anticorpo anti-IL-10 marcado com fluorocromo e incubados por 30 minutos a 4°C. Passado o período de incubação, foi adicionado 150 μ L tampão de permeabilização

e centrifugado a 300g por 10 minutos. Após isso, as células foram ressuspensas em 150 μ L de formaldeído (2%). A aquisição de células foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto/Becton & Dickson). A análise dos resultados foi realizada em programa específico (FACSDiva – BD Biosciences), onde analisou-se a porcentagem de células positivas e/ou a intensidade média de fluorescência (IMF) de cada marcador.

3.6 Quantificação de citocinas por ELISA

Para quantificar a produção de IL-10 por linfócitos B, os sobrenadantes das culturas de células submetidas aos diferentes estímulos descritos foram avaliados por meio de ELISA (R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism (v.5.0). Para a comparação dos diferentes parâmetros (estímulos) foi utilizado o teste de Friedman com pós-teste de Dunn. Para a comparação de um mesmo parâmetro em grupos diferentes foi utilizado o teste Mann-Whitney (2 grupos), foram considerados significativos resultados com $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Quantificação relativa das populações de leucócitos (fenotipagem) circulantes por citometria de fluxo.

A fenotipagem das subpopulações de leucócitos no sangue periférico foi realizada somente em amostras de sangue coletadas antes do tratamento.

Não observamos diferenças significativas entre os grupos analisados em relação à frequência de granulócitos totais (figura 4A). Entretanto, quando analisamos separadamente a frequência de neutrófilos e eosinófilos, observamos que pacientes com PCM apresentaram uma frequência menor de neutrófilos (células $CD16^+CD49d^-$) do que indivíduos do grupo controle (figura 4B) e uma frequência aumentada de eosinófilos (células $CD16^-CD49d^+$), em relação aos indivíduos do grupo controle (figura 4C).

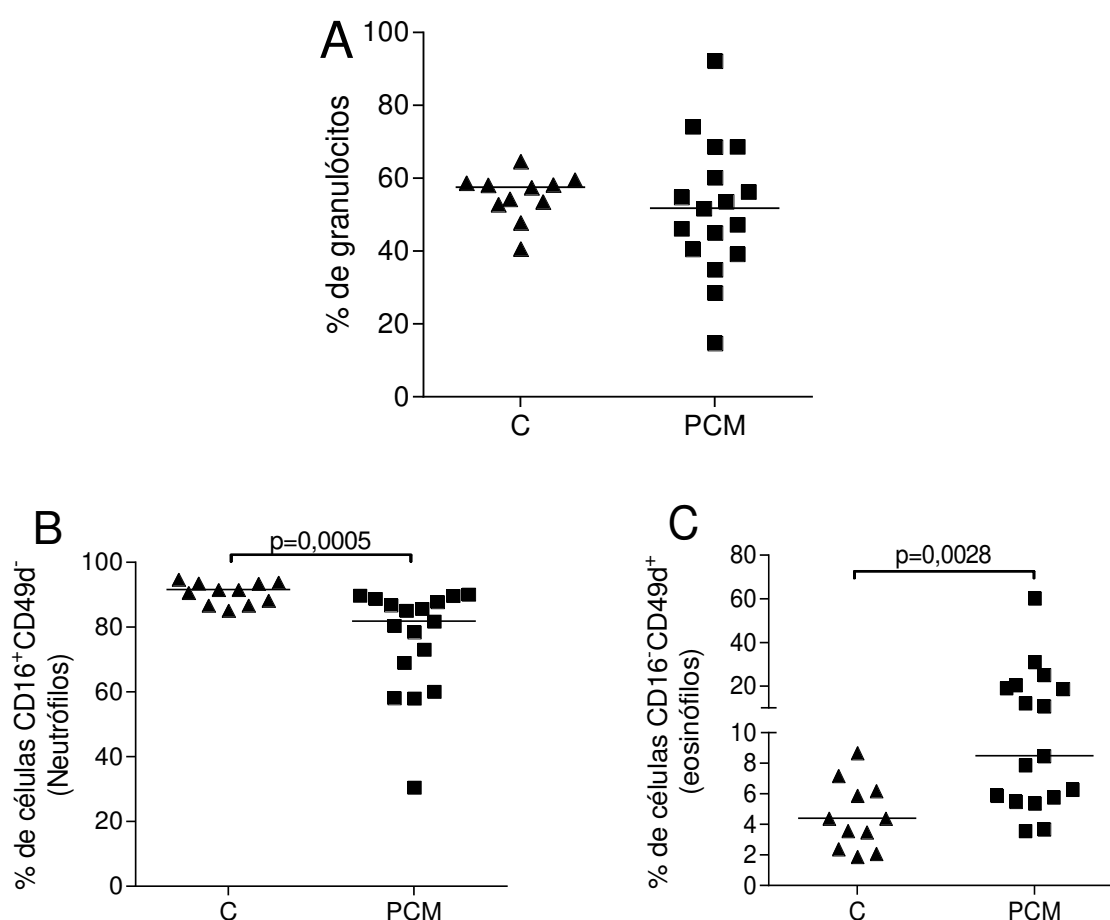


Figura 4 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) de granulócitos (A) e de células $CD16^+CD49d^-$ (neutrófilos - B) ou células $CD16^-CD49d^+$ (eosinófilos - C) no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

A análise dos monócitos demonstrou uma frequência menor dessas células nos pacientes com PCM quando comparada com indivíduos controle (figura 5A). Entretanto, não observamos diferenças significativas nas frequências das subpopulações de monócitos ($CD14^{++}CD16^{-}$ = clássicos - figura 5B; $CD14^{++}CD16^{+}$ = intermediários - figura 5C; $CD14^{+}CD16^{++}$ = não-clássicos - figura 5D) nos grupos analisados.

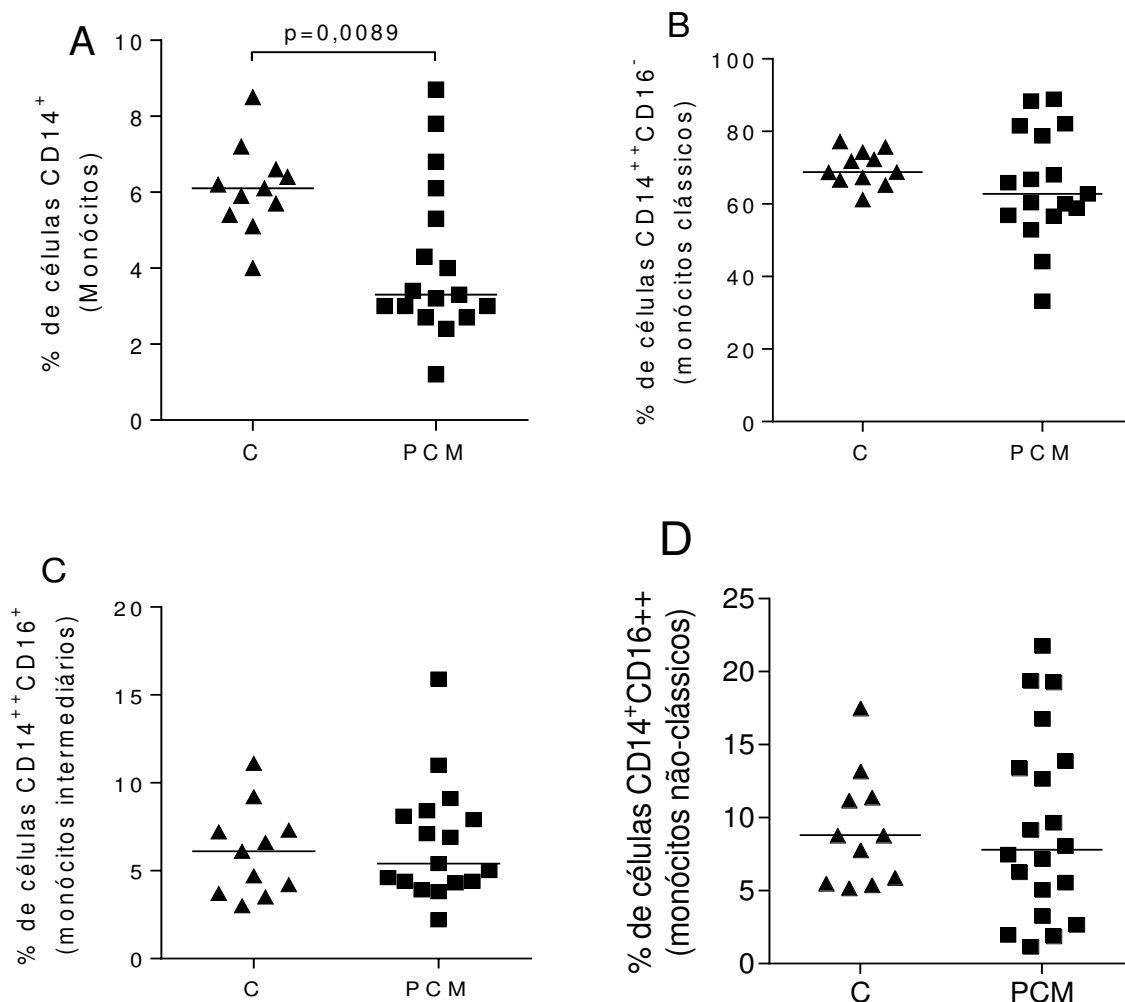


Figura 5 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) células no "gate" de monócitos (A) e suas subpopulações: células $CD14^{++}CD16^{-}$ (monócitos clássicos - B); células $CD14^{++}CD16^{+}$ (monócitos intermediários - C); células $CD14^{+}CD16^{++}$ (monócitos não-clássicos - D) no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

Em relação à população observada no "gate" de linfócitos, os dados demonstraram que pacientes com PCM apresentam uma menor porcentagem de células quando

comparados indivíduos do grupo controle (figura 6A). Quando analisamos as subpopulações de células majoritárias que são encontradas nessa região, observamos que pacientes apresentaram frequência de linfócitos T (células $CD3^+CD19^-$) diminuída em relação aos indivíduos do grupo controle (figura 6B). Não observamos diferenças significativas na frequência de células "Natural Killer" (NK - $CD3^-CD56^+$ - figura 6C) e na frequência de células NKT (células $CD3^+CD56^+$ - figura 6D).

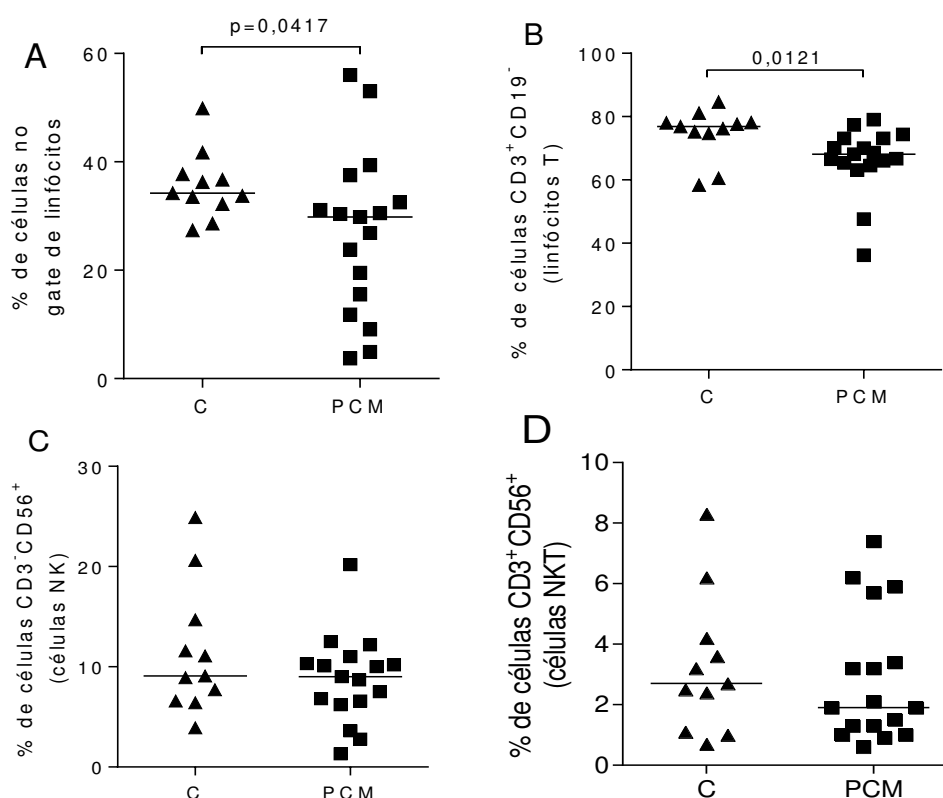


Figura 6 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) células no "gate" de linfócitos (A) e suas subpopulações: células $CD3^+CD19^-$ (linfócitos T - B); células $CD3^-CD56^+$ (células Natural Killer - C) e células $CD3^+CD56^+$ (células NKT - D) no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

Também analisamos a frequência de células NK com alta expressão de CD56 ($CD56^{\text{bright}}$) e baixa expressão de CD56 ($CD56^{\text{dim}}$) (figura 7A e 7B respectivamente), e não observamos diferenças estatísticas entre os grupos analisados.

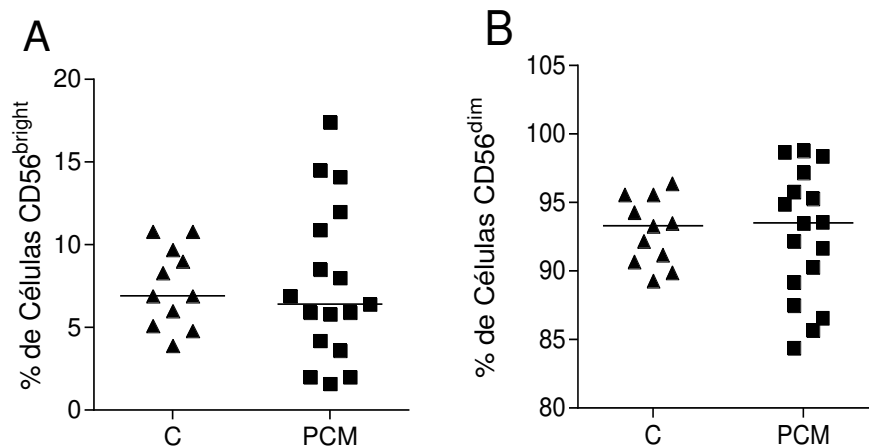


Figura 7 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) células CD56^{bright} (A) e células CD56^{dim} (B) no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

Quando analisamos as subpopulações de linfócitos T CD3⁺ não encontramos diferenças estatísticas nas frequências de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ (figura 8A) e T CD3⁺CD8⁺ (figura 8B) entre os grupos analisados. Todavia, observamos que pacientes com a doença apresentam uma maior frequência de linfócitos T CD3⁺TCRγδ⁺ (figura 8C) do que indivíduos controle. Também observamos que pacientes do grupo PCM apresentam menor frequência de linfócitos T apresentando o TCRγδ⁻ (figura 8D).

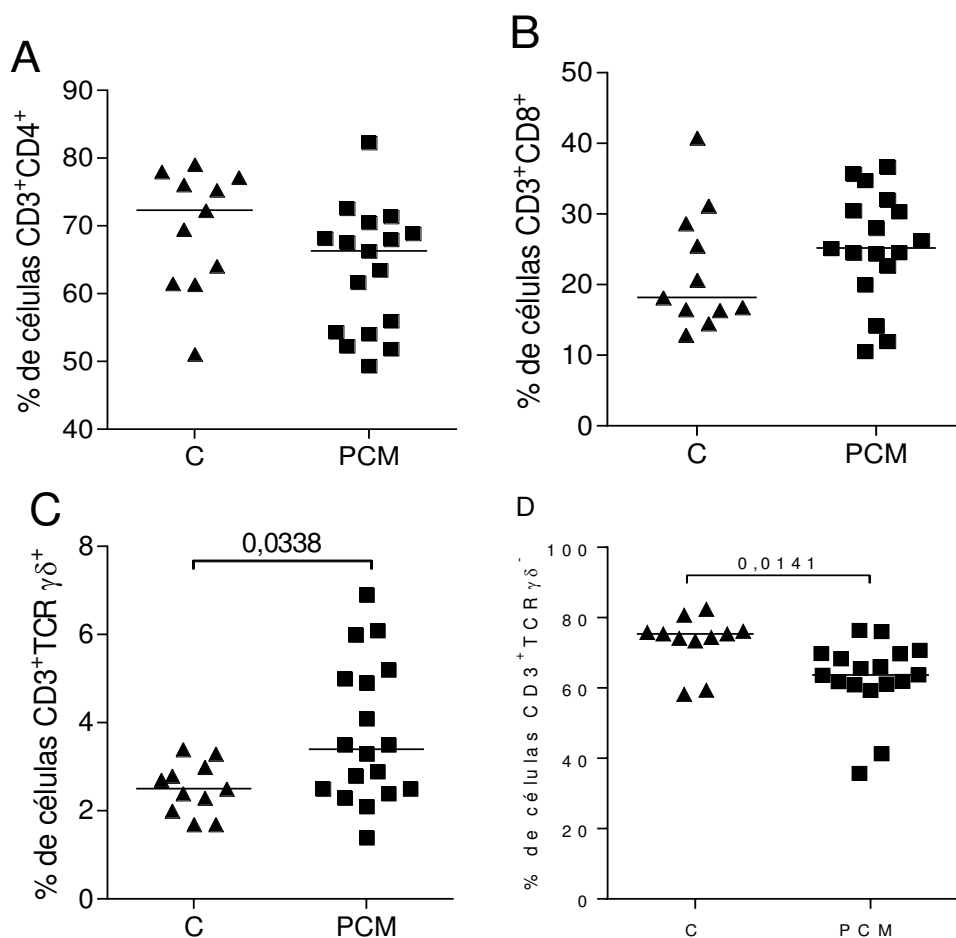


Figura 8 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) células $CD3^+CD4^+$ (A); células $CD3^+CD8^+$ (B); $CD3^+TCR\gamma\delta^+$ (C); $CD3^+TCR\gamma\delta^-$ (D) no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

Também analisamos a frequência de linfócitos T expressando os marcadores de ativação CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) e CD69. Como pode ser observado na figura 9, pacientes com PCM apresentam uma maior frequência de linfócitos T $CD3^+CD25^+$ quando comparados a indivíduos do grupo controle (figura 9A) e maior frequência de células $CD3^+CD4^+CD25^+$ em comparação a indivíduos do grupo controle (figura 9C). De modo inverso, os dados demonstraram que o marcador de ativação precoce CD69, foi mais frequente nas células $CD3^+$ e $CD3^+CD4^+$ de indivíduos controle quando comparados a pacientes com PCM (figuras 9B e 9D) respectivamente. Não

observamos diferenças nas frequências de células $CD3^+CD8^+CD25^+$ e $CD3^+CD8^+CD69^+$ entre os grupos analisados (figuras 9E e 9F).

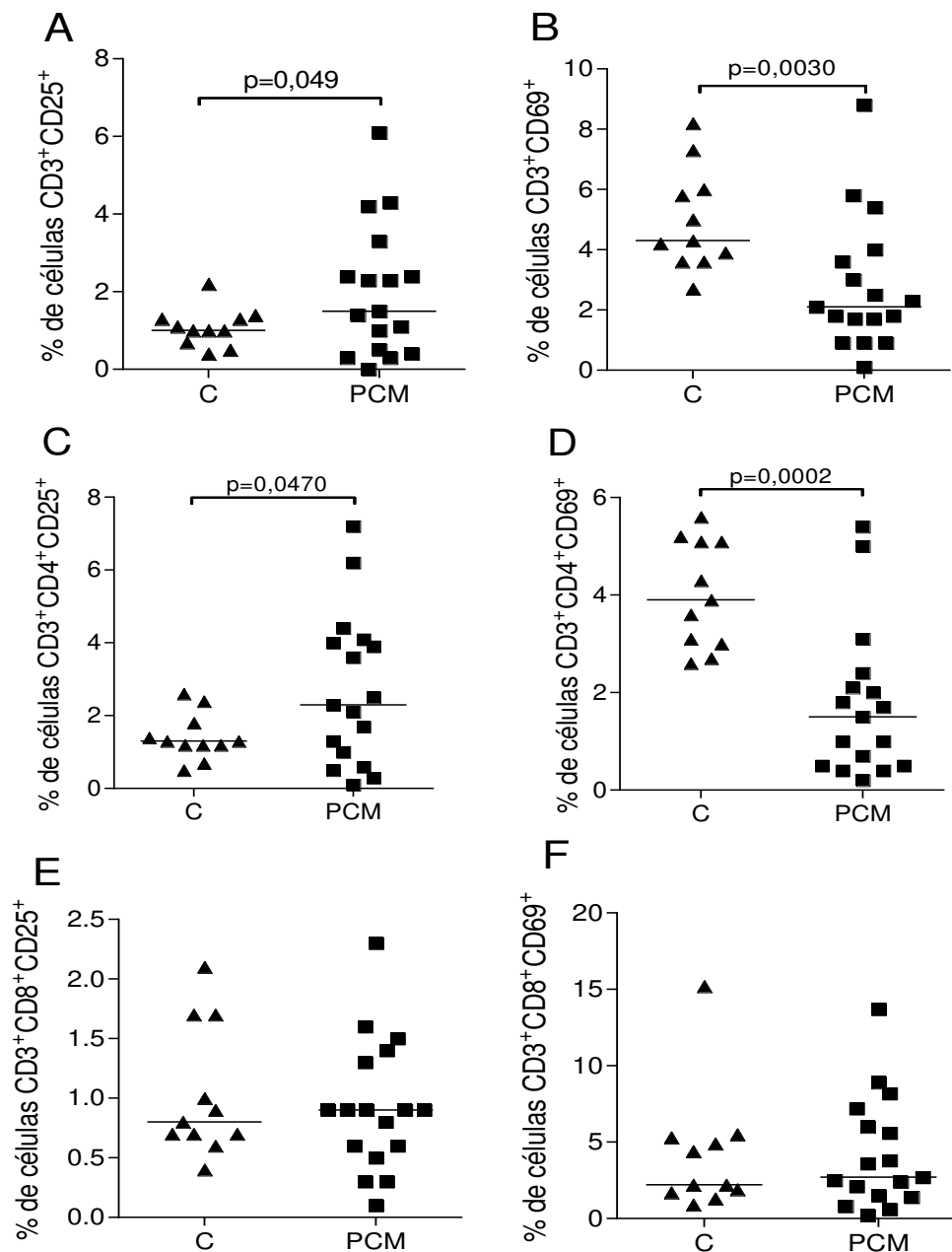


Figura 9 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) células $CD3^+CD25^+$ (A); células $CD3^+CD69^+$ (B); $CD3^+CD4^+CD25^+$ (C); $CD3^+CD4^+CD69^+$ (D); $CD3^+CD8^+CD25^+$ (E); $CD3^+CD8^+CD69^+$ (F) no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

Também analisamos a frequência de linfócitos T $CD3^+$ expressando marcadores de células "naïve" ($CD45RA$) e de células de memória ($CD45RO$). Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos analisados (figura 10A-D).

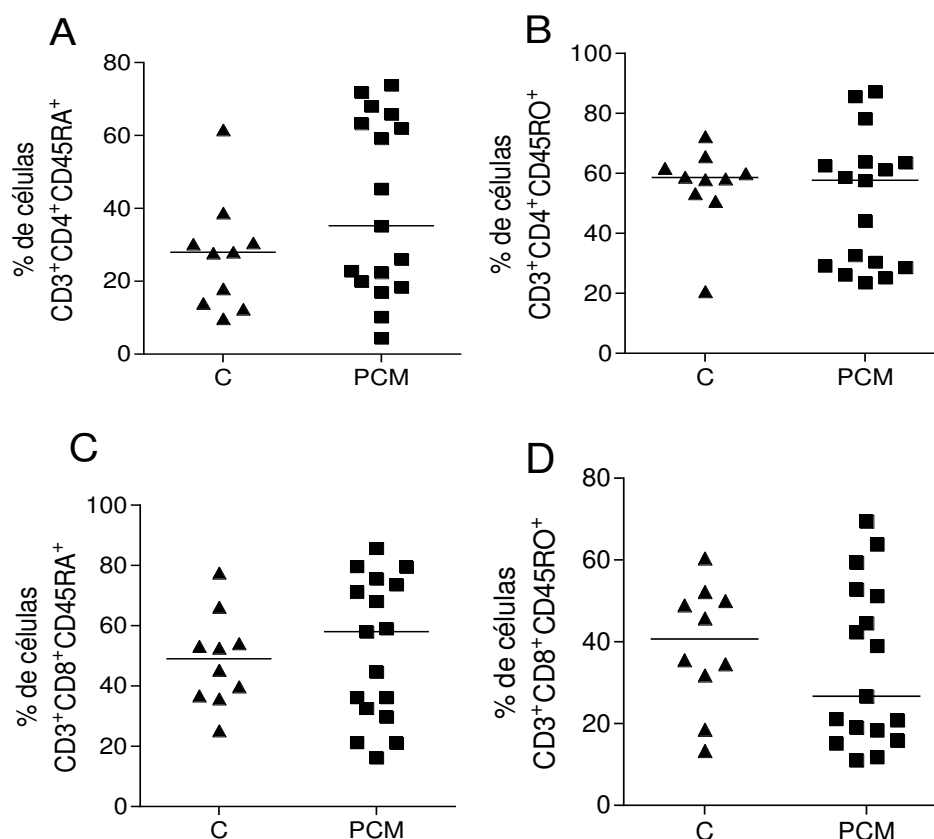


Figura 10 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) células $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ (A); $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ (B); $CD3^+CD8^+CD45RA^+$ (C); $CD3^+CD8^+CD45RO^+$ (D) no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

Em relação à população de linfócitos B circulantes ($CD3^-CD19^+$), observamos que pacientes com PCM apresentam maior frequência, quando comparados à indivíduos do grupo controle (figura 11A). Porém, não observamos diferença na porcentagem de células de memória, caracterizadas pelo fenótipo $CD19^+CD27^+$ (figura 11B).

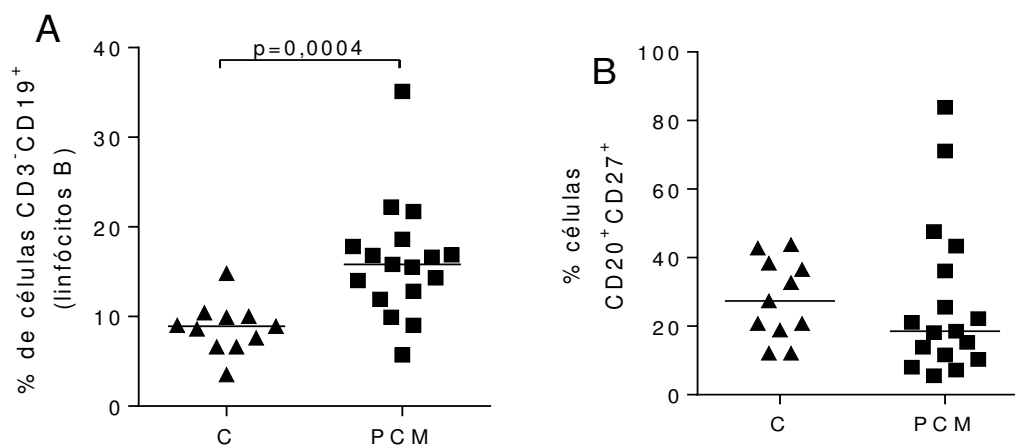


Figura 11 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) células CD3⁺CD19⁺(A) e CD19⁺CD27⁺ (B) no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

Quando comparamos a quantidade de células com fenótipo de linfócitos B regulatórios, caracterizados pelo fenótipo CD20⁺CD24⁺CD38^{high}, observamos que os pacientes possuem maior porcentagem dessas células que os indivíduos controles (figura 12).

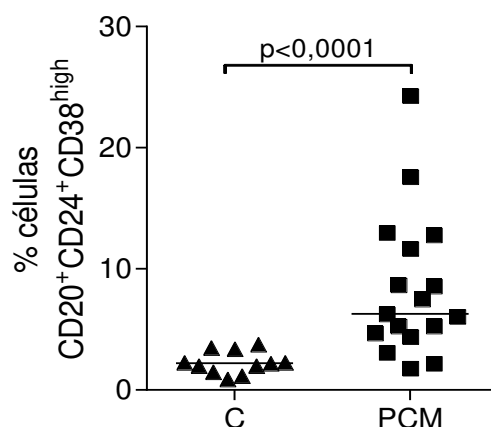


Figura 12 - Análise por citometria de fluxo da frequência (%) células CD20⁺CD24⁺CD38^{high} no sangue periférico de pacientes com PCM (n=17) e indivíduos do grupo controle (C - n=11). Teste estatístico: Mann-Whitney, os valores de p estão demonstrados sobre os colchetes. As barras horizontais representam a mediana. Valores expressos como porcentagem de células determinada conforme descrito em materiais e métodos.

4.2 Análise do fenótipo de linfócitos B purificados estimulados *in vitro*.

Após a fenotipagem das células circulantes, foram efetuadas culturas celulares para determinar o papel funcional dos linfócitos B. Foram utilizados experimentos utilizando células de 12 controles e 13 pacientes com doença ativa. As células foram mantidas sem estímulo ou foram estimuladas com ODN (ligante de TLR9), CD40L solúvel e DNA genômico ou gp43 de *P. brasiliensis* (estímulos específicos do fungo).

Conforme pode ser observado na figura abaixo, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão (Intensidade Média de Fluorescência - IMF) da molécula coestimulatória CD80 entre os dois grupos analisados (figura 13). Contudo, no dois grupos observamos que o estímulo com CpG-ODN aumentou significativamente a expressão de CD80 nas células (figura 13).

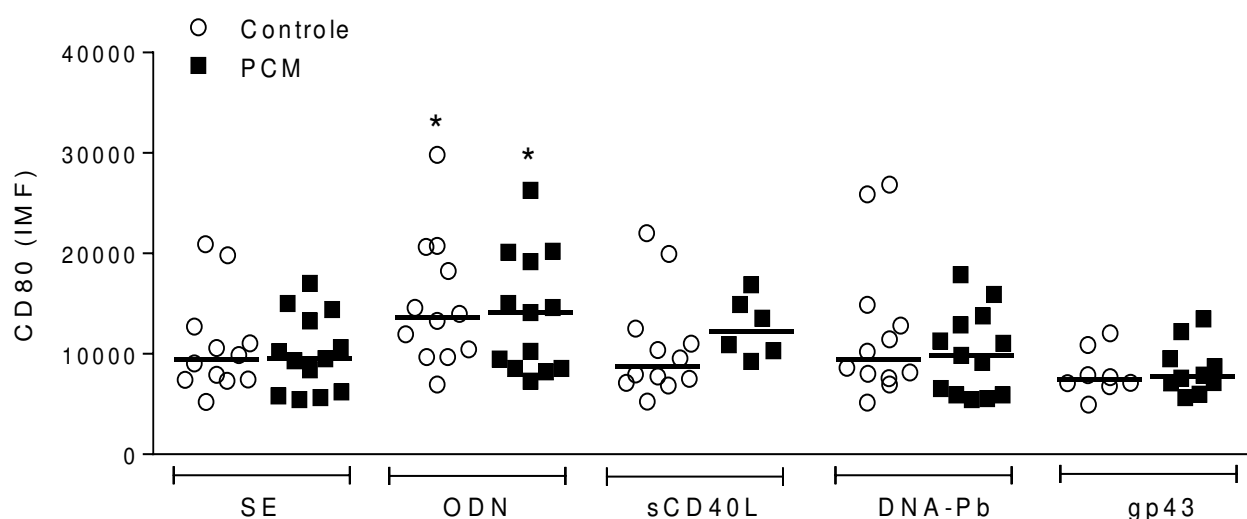


Figura 13 – Análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de CD80, por citometria de fluxo, em linfócitos B purificados de pacientes (n=13) e controles (n=12). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN - 1µg/mL), CD40L solúvel (sCD40L - 20ng/mL), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb - 10ng/mL) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 - 1µg/mL). Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. *<0,05 em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

A análise da expressão de CD86 apresentou resultados similares ao descrito para CD80. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (controle e paciente), mas o estímulo com CpG-ODN aumentou significativamente a expressão dessa molécula (figura 14).

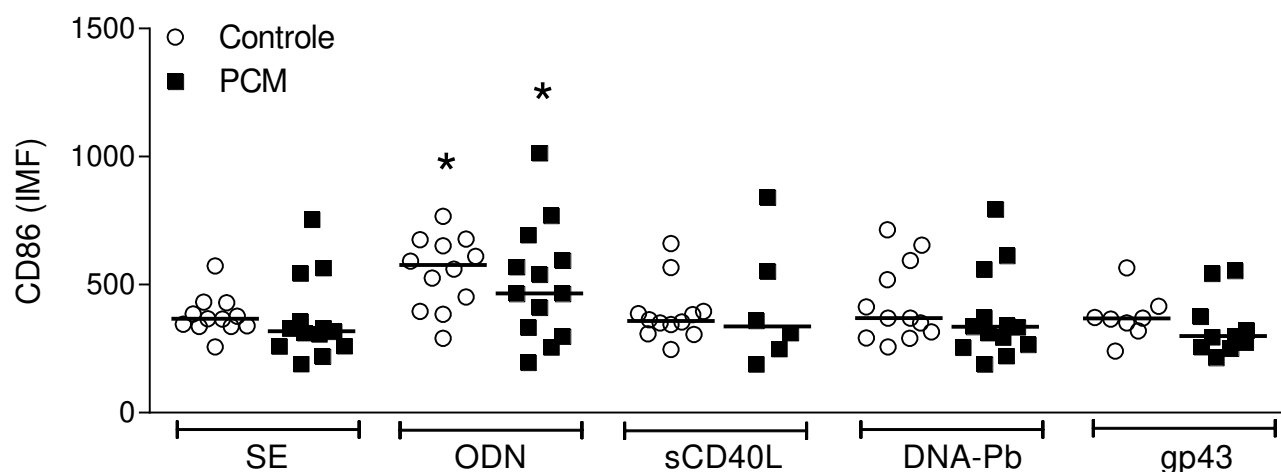


Figura 14 – Análise da intensidade média de fluorescência de CD86, por citometria de fluxo, em linfócitos B purificados de pacientes (n=13) e controles (n=12). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN - 1µg/mL), CD40L solúvel (sCD40L - 20ng/mL), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb - 10ng/mL) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 - 1µg/mL) Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. *<0,05 em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

A avaliação da expressão de MHC de classe II, cuja função é a apresentação de antígenos, mostrou que não houve diferenças significativas entre os grupos, e que o estímulo com CpG-ODN leva ao aumento da expressão nos dois grupos analisados (figura 15).

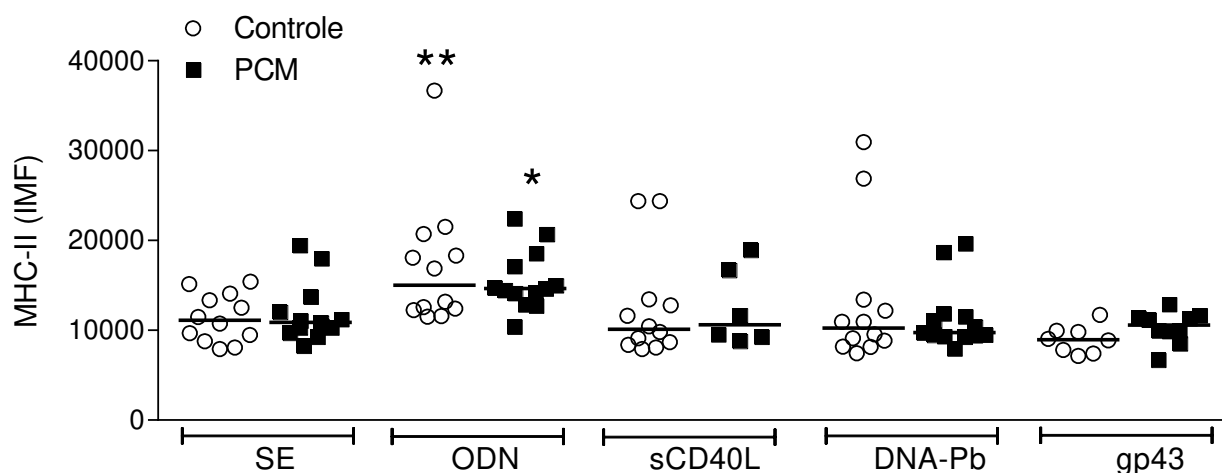


Figura 15 – Análise da intensidade média de fluorescência de MHC de Classe II, por citometria de fluxo, em linfócitos B purificados de pacientes (n=13) e controles (n=12). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN - 1µg/mL), CD40L solúvel (sCD40L - 20ng/mL), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb - 10ng/mL) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 - 1µg/mL) Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. *<0,05; **p<0,001 em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

Também analisamos a expressão de CD40, proteína da super família dos receptores TNF relacionada à interação dos linfócitos B com os linfócitos T via CD40L. Observamos que células de pacientes quando estimuladas com gp43 aumentam a expressão dessa molécula em comparação às células de indivíduos controle, mas não em comparação às células não estimuladas (figura 16). Também observamos que nos dois grupos, o estímulo com CpG-ODN resultou em aumento significativo da expressão de CD40 (figura 16).

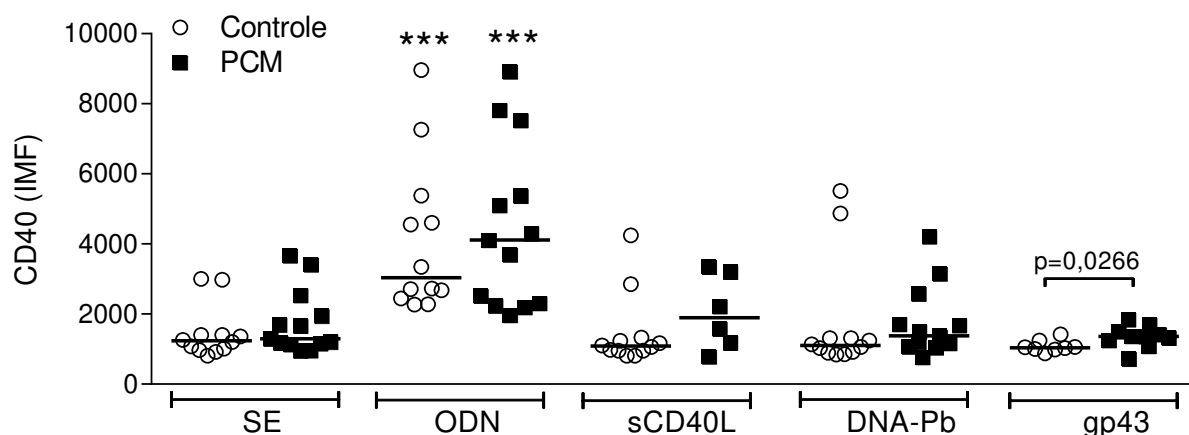


Figura 16 – Análise da intensidade média de fluorescência de CD40, por citometria de fluxo, em linfócitos B purificados de pacientes (n=13) e controles (n=12). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN - 1µg/mL), CD40L solúvel (sCD40L - 20ng/mL), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb - 10ng/mL) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 - 1µg/mL). Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. ***p<0,0001 em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

4.3 Avaliação da produção de IL-10 por linfócitos B purificados estimulados *in vitro*.

Após termos avaliado o efeito dos estímulos *in vitro* na expressão de moléculas de superfície, analisamos a produção de citocinas supressoras responsáveis pela atividade regulatória dos linfócitos Breg.

Ao analisarmos os linfócitos B sem separação das subpopulações (células CD20⁺), observamos uma maior frequência de linfócitos B produtores de IL-10 no grupo de pacientes com PCM em comparação ao grupo controle, mesmo em células não estimuladas (SE - figura 17). Também observamos um aumento na porcentagem de células positivas para IL-10 no grupo de pacientes após o estímulo com derivados de *P. brasiliensis* (DNA genômico e gp43), em comparação às células não estimuladas, fato que não ocorreu com as células do grupo controle (figura 17). Também observamos que

o estímulo com CpG-ODN levou ao aumento da frequência de células IL-10⁺ nos dois grupos analisados (figura 17).

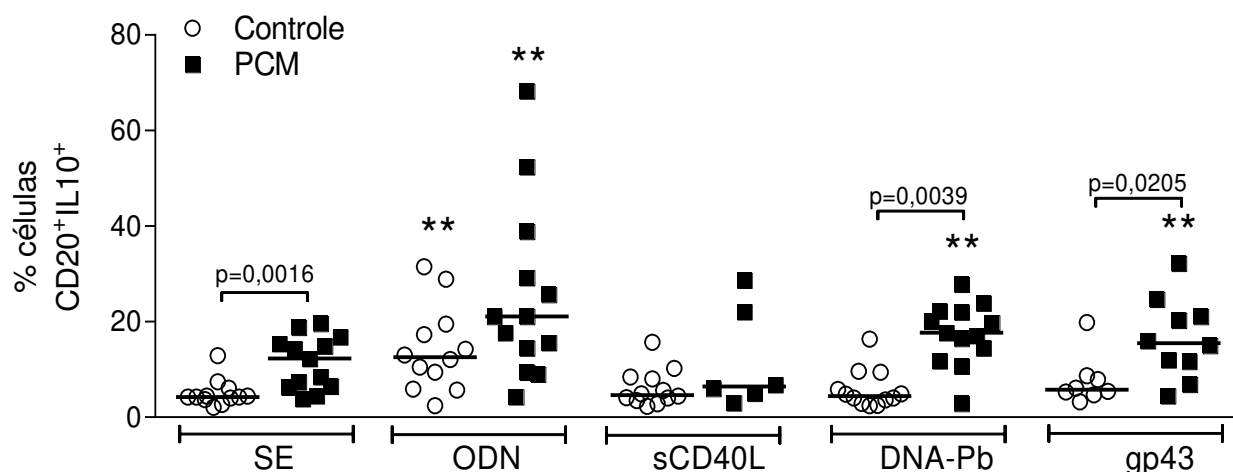


Figura 17 – Análise por citometria de fluxo da frequência de células CD20⁺IL-10⁺ em linfócitos B purificados de pacientes (n=13) e controles (n=12). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN - 1μg/mL), CD40L solúvel (sCD40L - 20ng/mL), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb - 10ng/mL) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 - 1μg/mL). Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. **p<0,001 em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

A seguir avaliamos a frequência de células produtoras de IL-10 nas diferentes subpopulações de linfócitos B normalmente associadas com um fenótipo regulatório (Breg). Observamos que na subpopulação CD20⁺CD24⁺CD38^{high}, somente após o estímulo com CpG-ODN houve aumento da frequência de células produtoras de IL-10 (em ambos os grupos), e que, de maneira diversa da que esperávamos, o grupo controle apresentou maior positividade para IL-10 do que o grupo de pacientes após esse estímulo (figura 18).

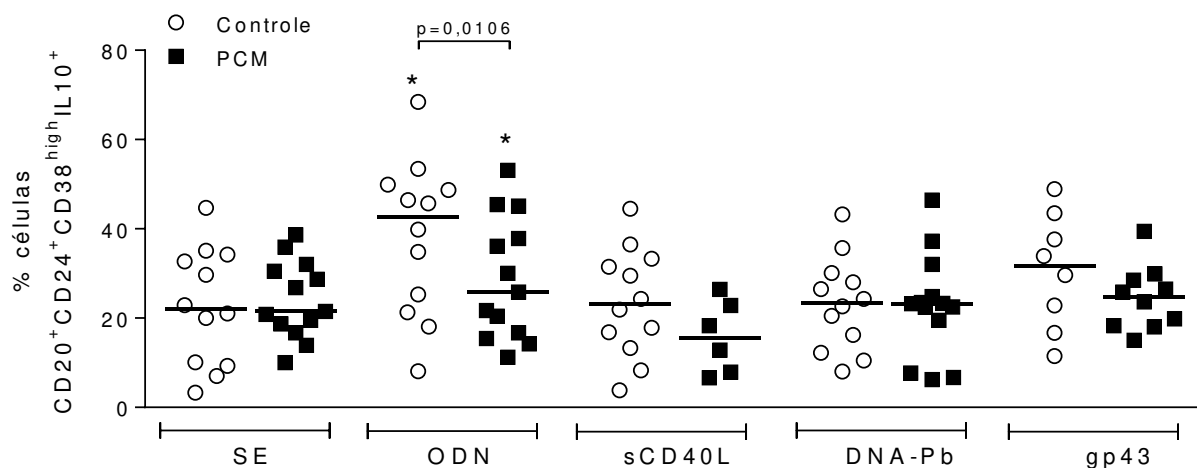


Figura 18 – Análise por citometria de fluxo da frequência de células $CD20^+CD24^+CD38^{high}IL-10^+$ em linfócitos B purificados de pacientes ($n=13$) e controles ($n=12$). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN - $1\mu g/mL$), CD40L solúvel (sCD40L - $20ng/mL$), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb - $10ng/mL$) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 - $1\mu g/mL$). Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. * $p<0,05$ em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

Ao avaliarmos a frequência de outra população descrita como apresentando atividade regulatória ($CD20^+CD25^+CD71^+$), observamos que mesmo sem estímulo e que após todos os estímulos utilizados, o grupo de pacientes com PCM apresentou frequência estatisticamente maior de células produtoras de IL-10 em comparação ao grupo controle (figura 19). Também foi possível identificar uma maior produção de IL-10 pelas células do grupo de pacientes após os estímulos específicos derivados de *P. brasiliensis* (DNA genômico e gp43) em comparação às células não estimuladas (SE), enquanto que somente o estímulo com CpG-ODN levou ao aumento da porcentagem de células IL-10⁺ no grupo controle (figura 19).

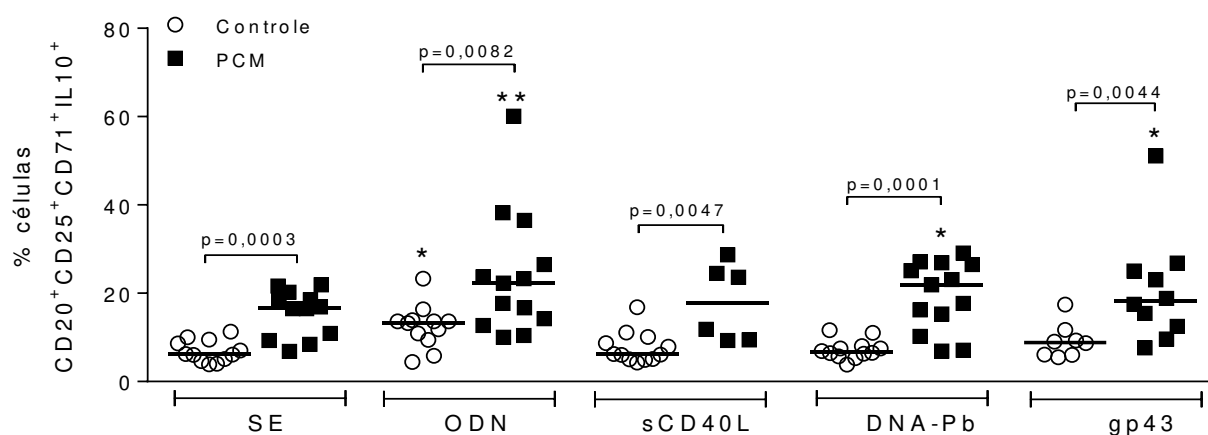


Figura 19: Análise por citometria de fluxo da frequência de células $CD20^+CD25^+CD71^+IL-10^+$ em linfócitos B purificados de pacientes ($n=13$) e controles ($n=12$). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN - $1\mu g/mL$), CD40L solúvel (sCD40L - $20ng/mL$), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb - $10ng/mL$) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 - $1\mu g/mL$). Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. $*p<0,05$ ou $**p<0,001$ em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

Também avaliamos a produção de TGF- β pela subpopulação $CD20^+CD25^+CD71^+$. Na figura abaixo (figura 20) é possível observar que em todas as condições analisadas as células de pacientes com PCM apresentaram maior positividade para essa citocina em comparação às células de indivíduos controle. Também encontramos uma maior frequência de células TGF- β^+ após o estímulo com gp43 e com CpG-ODN no grupo de pacientes em comparação às células não estimuladas. Enquanto que no grupo controle, novamente, somente o estímulo com CpG-ODN induziu aumento na frequência de células positivas para essa citocina (figura 20).

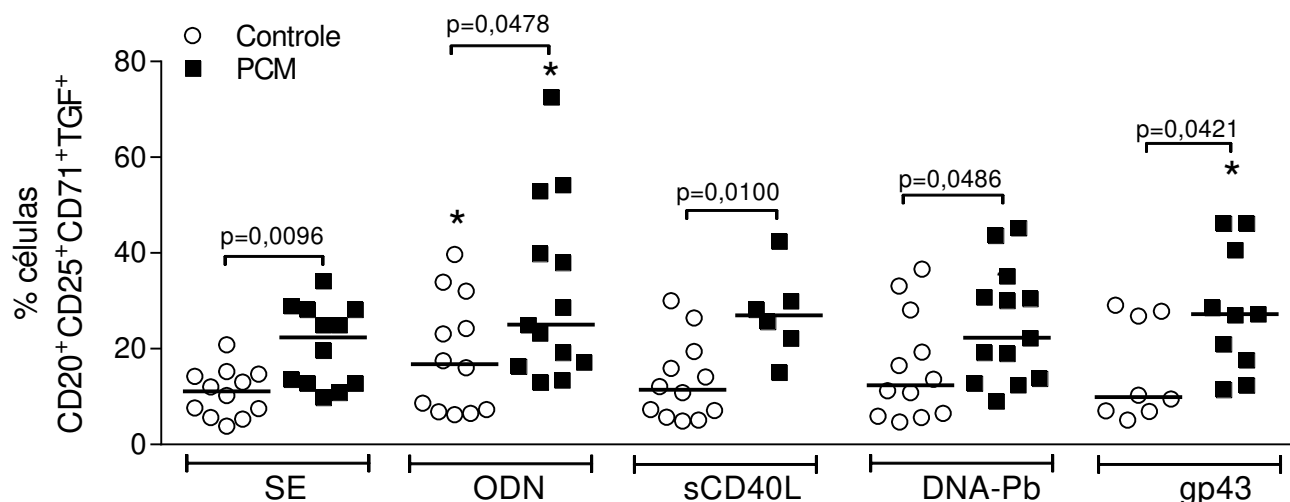


Figura 20: Análise por citometria de fluxo da frequência de células $CD20^+CD25^+CD71^+TGF-\beta^+$ em linfócitos B purificados de pacientes ($n=13$) e controles ($n=12$). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN - $1\mu g/mL$), CD40L solúvel (sCD40L - $20ng/mL$), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb - $10ng/mL$) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 - $1\mu g/mL$) Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. * $p<0,05$ em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

Após termos avaliado a produção de IL-10 por citometria de fluxo, analisamos a produção e secreção dessa citocina nos sobrenadantes das culturas de células. Conforme pode ser observado na figura 21, obtivemos que linfócitos B purificados de pacientes com PCM não estimulados (SE), estimulados com CD40L solúvel, DNA genômico de *P. brasiliensis* ou gp43 apresentam maior produção de IL-10 quando comparados com células do grupo controle (figura 21). Também foi possível observar que após o estímulo com CD40L ou gp43 as células de pacientes aumentaram a produção dessa citocina, enquanto que o estímulo com CpG-ODN levou ao aumento da produção nos dois grupos analisados (figura 21).

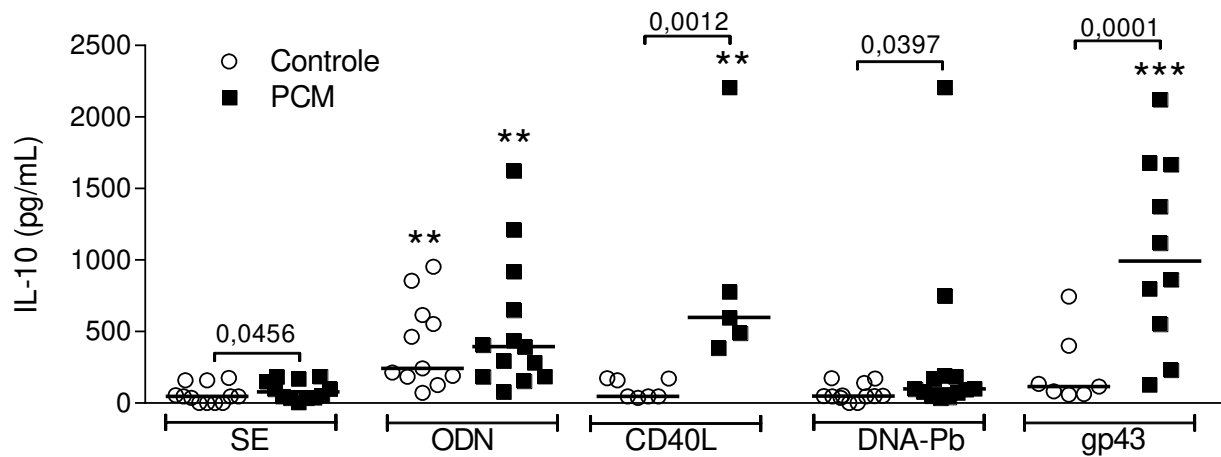


Figura 21: Análise por ELISA da produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas linfócitos B purificados de pacientes (n=13) e controles (n=12). Após a purificação as células foram mantidas sem estímulo (SE) ou estimuladas por 48 horas com CpG-ODN (ODN – 1 μ g/mL), CD40L solúvel (sCD40L – 20 ng/mL), DNA genômico de *P. brasiliensis* (DNA-Pb – 10 ng/mL) ou gp43 de *P. brasiliensis* (gp43 – 1 μ g/mL). Teste estatístico: Comparação entre os diferentes estímulos no mesmo grupo: Friedman com pós-teste de Dunn. **p<0,001 ou ***p<0,0001 em comparação com as células não estimuladas (SE) do seu respectivo grupo. Comparação entre os grupos: Mann-Whitney, valores de p são apresentados sobre os colchetes.

5. DISCUSSÃO

Tivemos como um dos objetivos nesse trabalho analisar a frequência e fenótipo de diferentes populações de leucócitos na circulação periférica de pacientes com PCM. Em relação aos granulócitos, observamos que pacientes com PCM apresentam uma menor frequência de neutrófilos e uma maior frequência de eosinófilos (CD16⁻CD49d⁺) em comparação aos indivíduos controle. A diminuição da frequência relativa de neutrófilos provavelmente é devida ao aumento da frequência de eosinófilos nesse grupo.

Os eosinófilos estão normalmente associados à resposta imunológica contra helmintos, e a uma resposta Th2 [20, 72-74]. Trabalhos anteriores, também já haviam descrito o aumento do número dessas células em pacientes com PCM, tanto na circulação periférica, quanto nas lesões causadas pelo fungo [21, 73]. Em granulomas de pacientes com PCM, é observada a presença de eosinófilos com grande produção de MBP (*Major Basic Protein*, do inglês), uma das proteínas mais abundantes nos grânulos do eosinófilo [75]. Aparentemente essa célula não é capaz de inibir o crescimento do fungo, mas por meio da secreção de seus grânulos poderia contribuir para danos teciduais observados nos pacientes [75]. Segundo Oliveira *et. al.* pacientes com PCM apresentam maior produção de IL-5 do que indivíduos saudáveis, sendo tal citocina, importante no recrutamento e ativação de eosinófilos [21]. Mais recentemente, alguns trabalhos demonstram que os eosinófilos também podem atuar como células moduladoras da resposta imunológica, induzindo a diferenciação de células Th2, principalmente pela sua capacidade de produzir citocinas como a IL-4 [76].

Observamos que pacientes com PCM apresentam frequência menor de monócitos em comparação aos pacientes com a FC da doença. Essa menor quantidade de células poderia estar relacionada à supressão da resposta celular observada no pacientes com as formas mais graves da doença [21]. Em estudo anterior, foi observado que monócitos de pacientes com a PCM produziam espontaneamente mais TGF- β 1 que indivíduos

saudáveis [77]. Em relação às subpopulações de monócitos circulantes, Venturini *et al.* mostraram que pacientes com a forma ativa da PCM apresentam maior quantidade de monócitos com alta expressão de CD16 (CD16⁺), quando comparados a indivíduos saudáveis, e que o número dessas células retornam a níveis normais após o tratamento antifúngico, associando essa maior quantidade de células à uma maior resposta inflamatória observada nos pacientes [78]. Entretanto, não encontramos diferenças significativas nas frequências das diferentes populações de monócitos encontradas no sangue periférico (clássicos, não-clássicos e intermediários).

Após analisar as células da imunidade inata, foi efetuada a análise das células da imunidade adaptativa. Observamos que pacientes com a PCM apresentaram menor número relativo de linfócitos, e de células T CD3⁺ comparada a indivíduos saudáveis. De maneira contrária, os pacientes também apresentaram elevação da frequência de linfócitos B (CD19⁺).

A análise da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ não apresentou diferença significativa. Já quando foi verificada a constituição de seu TCR, observamos que há uma diminuição da frequência de células com TCR constituído de subunidades α e β nos pacientes, quando comparado a indivíduos saudáveis. Também observamos uma maior quantidade de células com TCR constituído de subunidades γ e δ em pacientes quando comparamos com indivíduos controle. Os linfócitos TCR $\gamma^+\delta^+$ são caracterizados como células que atuam como uma "ponte" entre a imunidade inata e adaptativa, produzindo grandes quantidade de IL-17 e IFN- γ promovendo respostas do tipo Th17 e Th1, respectivamente [79], mas também podem ser fontes de citocinas supressoras como IL-10 e IL-4 nas fases mais tardias da resposta imunológica [79]. Embora não existam trabalhos analisando essas células na PCM, estudo experimental na criptococose, demonstrou que as células (T $\gamma\delta$) são fontes importantes de IL-17, contribuindo para uma

evolução mais lenta da doença [80], dessa forma estudos mais detalhados e funcionais precisariam ser feitos para determinar o papel desempenhado pelas células T $\gamma\delta$ na PCM.

Em relação aos marcadores de ativação (CD25 e CD69) e marcadores que caracterizam linfócitos naive e de memória/efetores (CD45RA e CD45RO respectivamente), observamos diferença significativa entre os grupos na análise do CD25 e CD69. Os pacientes apresentaram maior quantidade de células com fenótipo CD3⁺CD25⁺ e CD3⁺CD4⁺CD25⁺. O CD25 é a subunidade α do receptor da IL-2, uma citocina muito importante para ativação e manutenção dos linfócitos T, ficando claro que essas células no grupo de pacientes estão mais ativadas via IL-2 do que o grupo controle. Já na análise das células com fenótipo CD3⁺CD69⁺ e CD3⁺CD4⁺CD69⁺, observamos um maior numero de células circulantes no grupo controle em comparação ao grupo de pacientes. O CD69 é um marcador de ativação precoce e também atua como molécula coestimulatória para ativação e proliferação celular, a qual pode ativar as células da imunidade adaptativa de forma ideal para a eliminação do fungo.

Dentre as populações de leucócitos circulantes analisadas, a frequência de linfócitos B (como mencionado acima) foi a que apresentou maior alteração nos pacientes com PCM (ao lado do aumento dos eosinófilos). Como mencionado, pacientes com PCM, particularmente os com as formas mais graves, apresentam baixa ativação de linfócitos T e ativação policlonal de linfócitos B [20, 21, 24, 81], com prevalência de uma resposta do tipo Th2 [12]. Essa resposta leva à hipergamaglobulinemia e produção de diferentes classes de imunoglobulinas, além da produção de citocinas características desse tipo de resposta (IL-4, IL-5 e IL-10). Biagioni et al (1984) demonstraram a ativação policlonal de células B através da dosagem de IgG anti-*P. brasiliensis* e da IgA e IgM total no soro de pacientes com PCM, encontrando correlação entre o aumento da produção de IgG específica e a gravidade da doença [82].

Também observamos que os linfócitos B após estímulo com CpG-ODN apresentaram maior expressão de moléculas de superfície, relacionadas com a apresentação de antígeno. Estudos recentes demonstraram que os linfócitos B podem atuar como células apresentadoras de antígeno tanto na resposta antiviral, quanto na resposta antitumoral [83, 84]. Observou-se que na resposta imune ao vírus da Influenza, o linfócito B pode desempenhar o papel de APC e desencadear uma resposta protetora independente da presença de células dendríticas [83].

Rossetti e colaboradores realizaram um experimento com linfócitos B, T e células dendríticas de pacientes com câncer na região cervical e observaram que os linfócitos B desses pacientes apresentaram maior capacidade de apresentação de antígeno após estímulos com sCD40L e IL-4. Também se observou que os linfócitos B ativados com anti-CD40 desempenharam papel fundamental na ativação de linfócitos T, o que não ocorreu com as células dendríticas, demonstrando que o linfócito B pode ser utilizado como um possível alvo terapêutico em na imunoterapia contra o câncer [84].

Em modelo experimental com o fungo *Encephalitozoon cuniculi*, o linfócito B-1 atuou na apresentação de antígenos, e levou a uma resposta imunológica efetiva para a eliminação do patógeno e diminuição dos sintomas e lesões em camundongos induzindo a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ além da produção de citocinas como IL-4, IL-6, TNF- α e IFN- γ [85].

Já em relação as células B com fenótipo descrito como característicos de células regulatórias (Breg - CD20⁺CD24⁺CD38^{high}), encontramos aumento na frequência dessa subpopulação nos pacientes com PCM em relação ao controle, indicando uma possível ativação e proliferação dessas células induzida pela infecção. Essa maior quantidade de células regulatórias na circulação poderia estar associada ao processo de supressão da

resposta imunológica celular observada nos pacientes com PCM, principalmente naqueles com as formas mais graves da doença [10, 12, 21].

Em outras infecções já foi demonstrado que o linfócito B regulatório possui um papel deletério, auxiliando na disseminação do patógeno devido a sua atividade imunossupressora [86]. Em pacientes com HIV, há um aumento das células Breg produtores de IL-10, sendo que o número de Bregs, apresenta correlação positiva com a carga viral, enquanto que o tratamento efetivo com anti-retrovirais leva à diminuição do número dessas células na circulação [64]. Outros estudos, demonstraram que as células Bregs atuam, principalmente por meio da produção de IL-10, na redução a atividade de linfócitos T CD8⁺ específicos para antígenos derivados do HIV, e na indução da expressão de marcadores de exaustão celular, como a molécula PD-1 (*Programmed Death 1*) [87, 88].

Camundongos BALB/c infectados pelo *Plasmodium chabaudi chabaudi*, apresentaram maior quantidade de linfócitos Bregs na no baço, além de produzir maiores quantidades de IL-10, do que camundongos C57BL/6 [89].

Na leishmaniose, as células Bregs desempenham papel importante na suscetibilidade à infecção. Células B estimuladas *in vitro* com *Leishmania major* produzem grandes quantidades de IL-10, e a transferência adotiva dessas células leva ao desenvolvimento de uma resposta Th2, envolvida na suscetibilidade à doença [90]. Além disso, foi demonstrado que linfócitos B presentes em linfonodos de camundongos suscetíveis (BALB/c), produzem grandes quantidades de IL-10 após a infecção, o que não ocorre em camundongos resistentes (C57BL/6) [90]. O papel das células Bregs também foi demonstrado na esquistossomose por *Schistosoma haematobium*, onde foi observado que linfócitos B de indivíduos com a infecção crônica, quando cocultivados *in*

vitro com linfócitos T levam à diminuição da ativação e produção de citocinas (IFN- γ e IL-17) por células T CD4⁺, principalmente pela produção de IL-10 e TGF- β [91].

Como mencionado, na PCM experimental, embora não existam trabalhos caracterizando especificamente a população Breg, alguns estudos demonstram que linfócitos B produtores de IL-10, classificados como B1 (CD19⁺CD5⁺) estão relacionados à suscetibilidade à infecção [41], influenciando a resposta de células inatas (macrófagos) e na diferenciação de linfócitos T para Th2 [42].

A ativação de linfócitos Breg por agentes infecciosos ainda não foi completamente elucidada, mas estudos sugerem que o reconhecimento de PAMPs por receptores do tipo Toll [69] ou a interação entre linfócitos T e B via CD40L-CD40 sejam as principais vias [67, 68]. Nossos resultados mostraram que tanto células B purificadas de pacientes, quanto células de indivíduos controle podem ser ativadas pelo ligante de TLR9 (CpG-ODN), levando ao aumento da expressão de moléculas associadas à apresentação de antígenos (MHC II) e coestimulação (CD80, CD86 e CD40).

Além disso, o estímulo com o agonista do TLR9 levou ao aumento da produção de IL-10 por células de pacientes e controles, tanto quando analisamos os linfócitos B de maneira geral (células CD20⁺), quanto como analisamos as subpopulações de linfócitos descritas como Breg -CD20⁺CD24⁺CD38^{high} e CD20⁺CD25⁺CD71⁺. Na PCM o TLR9 aparentemente desempenha um papel regulatório, uma vez que camundongos deficientes para esse receptor apresentam uma maior resposta inflamatória inicial ao fungo, o que leva a uma desregulação da resposta adaptativa subsequente [92].

É interessante notar que, embora os estímulos com gp43 ou com DNA genômico de *P. brasiliensis* não tenha levado a alterações significativas na expressão de moléculas de superfície nos linfócitos B purificados, a presença desses estímulos induziu o aumento

da produção de IL-10 e de TGF- β pelas células dos pacientes com PCM (particularmente da subpopulação CD20⁺CD25⁺CD71⁺), mas não de controles.

A gp43 é o antígeno imunodominante do *P. brasiliensis*, sendo que a maioria dos pacientes apresenta a produção de anticorpos específicos contra essa glicoproteína [26-29]. A secreção de gp43 pelo fungo já foi descrita como um possível mecanismo de escape do sistema imunológico, levando à inibição dos mecanismos efetores de macrófagos [93]. De acordo com Ferreira et al. o tratamento de camundongos resistentes (A/J) ou susceptíveis (B10.A) com gp43 purificada influencia a polarização de linfócitos TCD4⁺, levando à diferenciação de células Th2 com altas produções de IL-4 e IL-10, e a uma maior disseminação do fungo [30]. Como mencionado, o TLR9 tem como principal ligante sequências não metiladas de dinucleotídeos compostos por Citosina e Guanina (CpG-ODN), já identificadas no DNA do *P. brasiliensis* como imunoestimulatórias [94, 95].

Dessa forma, nossos resultados indicam que a estimulação de linfócitos B pode contribuir para a supressão da resposta imunológica observada nos pacientes com PCM, principalmente pela produção de IL-10, como descrito para outras doenças infecciosas. Sabe-se que a IL-10 exerce diversos efeitos sobre os macrófagos, dentre os quais o aumento da capacidade fagocítica [96, 97]. Entretanto, a presença da IL-10 também reduz a habilidade desses fagócitos na destruição dos patógenos por eles fagocitados, levando a uma diminuição da produção de ânion superóxido e NO [98-100], principais mecanismos efetores para a destruição do fungo.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos com a fenotipagem de leucócitos circulantes confirmam dados publicados anteriormente, nos quais foram demonstrados uma maior quantidade de eosinófilos e de linfócitos B na circulação periférica de pacientes com PCM em comparação aos indivíduos controle.

Observamos que os linfócitos B estimulados via TLR-9 apresentaram maior expressão de moléculas de superfície relacionadas a apresentação de antígeno.

Nossos resultados também mostraram que os pacientes com PCM apresentam maior frequência de células B apresentando fenótipo regulatório ($CD20^+CD24^+CD38^{high}$) na circulação periférica. Além disso, células B purificadas de pacientes estimuladas *in vitro* apresentaram maior capacidade de produção de IL-10. Esta produção foi induzida pelo agonista específico de TLR9 (CpG-ODN), bem como por moléculas derivadas de *P. brasiliensis*, como DNA ou gp43 (antígeno imunodominante).

Em conclusão, nossos resultados, embora preliminares, indicam que as células B poderiam participar como células reguladoras no PCM humano, contribuindo para a supressão da resposta imunológica celular observada em pacientes com PCM ativa. Essas células podem também desempenhar o papel de apresentadoras de antígeno, polarizando a resposta imunológica de acordo com a ativação dos linfócitos T.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. San-Blas, G. and E. Burger, *Experimental medical mycological research in Latin America - a 2000-2009 overview*. Rev Iberoam Micol, 2011. **28**(1): p. 1-25.
2. Teixeira, M.M., et al., *Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus*. Mol Phylogenet Evol, 2009. **52**(2): p. 273-83.
3. Munoz, J.F., et al., *Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of Paracoccidioides*. mSphere, 2016. **1**(5).
4. Gegembauer, G., et al., *Serology of paracoccidioidomycosis due to Paracoccidioides lutzii*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(7): p. e2986.
5. Marques, S.A., *Paracoccidioidomycosis*. Clin Dermatol, 2012. **30**(6): p. 610-5.
6. Shikanai-Yasuda, M.A., et al., *Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis*. Rev Soc Bras Med Trop, 2017: p. 0.
7. Brummer, E., E. Castaneda, and A. Restrepo, *Paracoccidioidomycosis: an update*. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(2): p. 89-117.
8. Franco, M.e.a., *Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms*. Rev Soc Bras Med Trop, 1987. **20**(2): p. 129-32.
9. Benard, G., et al., *Severe acute paracoccidioidomycosis in children*. Pediatr Infect Dis J, 1994. **13**(6): p. 510-5.
10. Castaneda, E., et al., *Impairment of cellular but not humoral immune responses in chronic pulmonary and disseminated paracoccidioidomycosis in mice*. Infect Immun, 1988. **56**(7): p. 1771-7.
11. Shikanai-Yasuda, M.A., et al., *[Guidelines in paracoccidioidomycosis]*. Rev Soc Bras Med Trop, 2006. **39**(3): p. 297-310.
12. de Castro, L.F., et al., *Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis*. J Infect, 2013. **67**(5): p. 470-85.
13. Vaz, C.A., L.M. Singer-Vermes, and V.L. Calich, *Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and nonvirulent Paracoccidioides brasiliensis isolates*. Am J Trop Med Hyg, 1998. **59**(6): p. 971-7.
14. Kashino, S.S., et al., *Resistance to Paracoccidioides brasiliensis infection is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN-gamma production*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(1): p. 89-97.
15. Cano, L.E., et al., *Pulmonary paracoccidioidomycosis in resistant and susceptible mice: relationship among progression of infection, bronchoalveolar cell activation, cellular immune response, and specific isotype patterns*. Infect Immun, 1995. **63**(5): p. 1777-83.
16. Cano, L.E., et al., *Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis*. Infect Immun, 1998. **66**(2): p. 800-6.
17. Benard, G., *An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis*. Mycopathologia, 2008. **165**(4-5): p. 209-21.
18. Mamoni, R.L. and M.H. Blotta, *Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes Paracoccidioides brasiliensis infection from disease*. Cytokine, 2005. **32**(1): p. 20-9.
19. Mamoni, R.L. and M.H. Blotta, *Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis*. Cytokine, 2006. **35**(3-4): p. 207-16.
20. Mamoni, R.L., et al., *Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis*. Med Mycol, 2002. **40**(2): p. 153-9.

21. Oliveira, S.J., et al., *Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls*. Microbes Infect, 2002. **4**(2): p. 139-44.
22. Musatti, C.C., et al., *In vivo and in vitro evaluation of cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis*. Cell Immunol, 1976. **24**(2): p. 365-78.
23. Benard, G., et al., *Responses of T and B lymphocytes to a Paracoccidioides brasiliensis cell wall extract in healthy sensitized and nonsensitized subjects*. Am J Trop Med Hyg, 1995. **53**(2): p. 189-94.
24. Chequer-Bou-Habib, D., et al., *Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. Polyclonal activation in paracoccidioidomycosis*. Mycopathologia, 1989. **108**(2): p. 89-93.
25. Benard, G., et al., *Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis*. Am J Trop Med Hyg, 1996. **54**(1): p. 7-12.
26. Marques da Silva, S.H., et al., *Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(8): p. 3675-80.
27. Saraiva, E.C., et al., *Paracoccidioides brasiliensis-gp43 used as paracoccidioidin*. J Med Vet Mycol, 1996. **34**(3): p. 155-61.
28. Lopes, J.D., et al., *Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of Paracoccidioides brasiliensis*. Braz J Med Biol Res, 1994. **27**(9): p. 2309-13.
29. Blotta, M.H. and Z.P. Camargo, *Immunological response to cell-free antigens of Paracoccidioides brasiliensis: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(3): p. 671-6.
30. Ferreira, K.S., J.D. Lopes, and S.R. Almeida, *Regulation of T helper cell differentiation in vivo by GP43 from Paracoccidioides brasiliensis provided by different antigen-presenting cells*. Scand J Immunol, 2003. **58**(3): p. 290-7.
31. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
32. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 4-12.
33. Steinman, L., *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 139-45.
34. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
35. O'Shea, J.J., et al., *Signal transduction and Th17 cell differentiation*. Microbes Infect, 2009. **11**(5): p. 599-611.
36. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune regulatory function of B cells*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 221-41.
37. Mauri, C. and M. Menon, *The expanding family of regulatory B cells*. Int Immunol, 2015.
38. Rosser, E.C. and C. Mauri, *Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function*. Immunity, 2015. **42**(4): p. 607-612.
39. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 639-50.
40. Yanaba, K., et al., *The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7459-72.

41. Popi, A.F., et al., *B-1 cells facilitate Paracoccidioides brasiliensis infection in mice via IL-10 secretion*. Microbes Infect, 2008. **10**(7): p. 817-24.
42. Marcelino Franca, K., et al., *B1 cells contribution to susceptibility in experimental paracoccidioidomycosis: immunoglobulin isotypes and repertoire determination*. Med Mycol, 2006. **44**(8): p. 755-66.
43. Zhu, H.Q., et al., *Impaired function of CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) regulatory B cells in patients with pemphigus*. Br J Dermatol, 2015. **172**(1): p. 101-10.
44. Aybar, L.T., et al., *Reduced CD5(+) CD24(hi) CD38(hi) and interleukin-10(+) regulatory B cells in active anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis permit increased circulating autoantibodies*. Clin Exp Immunol, 2015. **180**(2): p. 178-88.
45. Sumimoto, K., et al., *The role of CD19+ CD24high CD38high and CD19+ CD24high CD27+ regulatory B cells in patients with type 1 autoimmune pancreatitis*. Pancreatology, 2014. **14**(3): p. 193-200.
46. Flores-Borja, F., et al., *CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation*. Sci Transl Med, 2013. **5**(173): p. 173ra23.
47. Blair, P.A., et al., *CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients*. Immunity, 2010. **32**(1): p. 129-40.
48. de Masson, A., et al., *CD24(hi)CD27(+) and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2015. **125**(11): p. 1830-9.
49. van der Vlugt, L.E., et al., *CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide*. Clin Exp Allergy, 2014. **44**(4): p. 517-28.
50. van de Veen, W., et al., *IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 1204-12.
51. Ma, L., et al., *Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis*. Clin Rheumatol, 2014. **33**(2): p. 187-95.
52. Kim, J., et al., *Regulatory B cells are inversely associated with disease activity in rheumatoid arthritis*. Yonsei Med J, 2014. **55**(5): p. 1354-8.
53. Daïen, C.I., et al., *Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(8): p. 2037-46.
54. Ray, A. and S. Basu, *Regulatory B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. Methods Mol Biol, 2014. **1190**: p. 243-55.
55. Kinnunen, T., et al., *Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis*. J Clin Invest, 2013. **123**(6): p. 2737-41.
56. Ding, T., et al., *Regulatory B cell: New member of immunosuppressive cell club*. Hum Immunol, 2015.
57. Dhaeze, T., et al., *Humoral autoimmunity: A failure of regulatory T cells?* Autoimmun Rev, 2015.
58. Zhang, Y., N. Gallastegui, and J.D. Rosenblatt, *Regulatory B cells in anti-tumor immunity*. Int Immunol, 2015.
59. Biragyn, A., C. Lee-Chang, and M. Bodogai, *Generation and identification of tumor-evoked regulatory B cells*. Methods Mol Biol, 2014. **1190**: p. 271-89.
60. Zhang, Y., et al., *B cell regulation of anti-tumor immune response*. Immunol Res, 2013. **57**(1-3): p. 115-24.

61. Fremd, C., et al., *B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients*. Oncoimmunology, 2013. **2**(7): p. e25443.
62. Zhao, Q. and L.K. Jung, *Frequency of CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) regulatory B cells is decreased in peripheral blood and synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis: a preliminary study*. Pediatr Rheumatol Online J, 2018. **16**(1): p. 44.
63. Shen, P. and S. Fillatreau, *Suppressive functions of B cells in infectious diseases*. Int Immunol, 2015.
64. Liu, J., et al., *IL-10-producing B cells are induced early in HIV-1 infection and suppress HIV-1-specific T cell responses*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89236.
65. Zhang, M., et al., *Anti-tuberculosis treatment enhances the production of IL-22 through reducing the frequencies of regulatory B cell*. Tuberculosis (Edinb), 2014. **94**(3): p. 238-44.
66. Rong, H.M., et al., *IL-10 Producing B Cells Regulate Th1/Th17 Cell Immune Responses in Pneumocystis Pneumonia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018.
67. Poe, J.C., et al., *Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22464.
68. Mion, F., et al., *IL-10 production by B cells is differentially regulated by immune-mediated and infectious stimuli and requires p38 activation*. Mol Immunol, 2014. **62**(2): p. 266-76.
69. van der Vlugt, L.E., et al., *Toll-like receptor ligation for the induction of regulatory B cells*. Methods Mol Biol, 2014. **1190**: p. 127-41.
70. Liu, B.S., et al., *TLR-mediated STAT3 and ERK activation controls IL-10 secretion by human B cells*. Eur J Immunol, 2014. **44**(7): p. 2121-9.
71. Miles, K., et al., *A tolerogenic role for Toll-like receptor 9 is revealed by B-cell interaction with DNA complexes expressed on apoptotic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(3): p. 887-92.
72. Martinez, R. and M.J. Moya, *Primary complex of paracoccidioidomycosis and hypereosinophilia*. J Bras Pneumol, 2009. **35**(12): p. 1259-62.
73. Pereira, R.M., et al., *Paracoccidioidomycosis in children: clinical presentation, follow-up and outcome*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2004. **46**(3): p. 127-31.
74. Shikanai-Yasuda, M.A., et al., *[Bone marrow involvement and eosinophilia in paracoccidioidomycosis]*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 1992. **34**(2): p. 85-90.
75. Wagner, J.M., et al., *Localization of eosinophil granule major basic protein in paracoccidioidomycosis lesions*. Am J Trop Med Hyg, 1998. **59**(1): p. 66-72.
76. Rosenberg, H.F., K.D. Dyer, and P.S. Foster, *Eosinophils: changing perspectives in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 9-22.
77. Peracoli, M.T., et al., *Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis*. Microbes Infect, 2003. **5**(5): p. 413-8.
78. Venturini, J., et al., *Phenotypic and functional evaluations of peripheral blood monocytes from chronic-form paracoccidioidomycosis patients before and after treatment*. BMC Infect Dis, 2014. **14**: p. 552.
79. Chien, Y.H., C. Meyer, and M. Bonneville, *gammadelta T cells: first line of defense and beyond*. Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 121-55.
80. Wozniak, K.L., et al., *Induction of protective immunity against cryptococcosis*. Mycopathologia, 2012. **173**(5-6): p. 387-94.

81. Baida, H., et al., *Differential antibody isotype expression to the major Paracoccidioides brasiliensis antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis*. Microbes Infect, 1999. **1**(4): p. 273-8.
82. Biagioni, L., et al., *Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1984. **78**(5): p. 617-21.
83. Hong, S., et al., *B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4(+) T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen*. Immunity, 2018.
84. Rossetti, R.A.M., et al., *B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses*. PLoS One, 2018. **13**(7): p. e0199034.
85. da Costa, L.F.V., et al., *B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice*. Immunobiology, 2017. **222**(2): p. 218-227.
86. Dai, Y.C., J. Zhong, and J.F. Xu, *Regulatory B cells in infectious disease (Review)*. Mol Med Rep, 2017. **16**(1): p. 3-10.
87. Jiao, Y., et al., *Regulatory B cells correlate with HIV disease progression*. Microbiol Immunol, 2014. **58**(8): p. 449-55.
88. Siewe, B., et al., *Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8(+) T cell function in vitro*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(5): p. 811-8.
89. Han, X., et al., *Potential Role for Regulatory B Cells as a Major Source of Interleukin-10 in Spleen from Plasmodium chabaudi-Infected Mice*. Infect Immun, 2018. **86**(5).
90. Ronet, C., et al., *Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with Leishmania major through IL-10 production*. J Immunol, 2010. **184**(2): p. 886-94.
91. van der Vlugt, L.E., et al., *Interleukin 10 (IL-10)-producing CD1dhi regulatory B cells from Schistosoma haematobium-infected individuals induce IL-10-positive T cells and suppress effector T-cell cytokines*. J Infect Dis, 2014. **210**(8): p. 1207-16.
92. Menino, J.F., et al., *TLR9 activation dampens the early inflammatory response to Paracoccidioides brasiliensis, impacting host survival*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(7): p. e2317.
93. Flavia Popi, A.F., J.D. Lopes, and M. Mariano, *GP43 from Paracoccidioides brasiliensis inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus*. Cell Immunol, 2002. **218**(1-2): p. 87-94.
94. Amaral, C.C., et al., *Adjuvant effect of synthetic oligodeoxyribonucleotides (CpG-ODN) from the Paracoccidioides brasiliensis gp43 gene on the Th2-Th1 immunomodulation of experimental paracoccidioidomycosis*. Scand J Immunol, 2005. **62**(4): p. 325-33.
95. Souza, M.C., et al., *Immunostimulatory DNA from Paracoccidioides brasiliensis acts as T-helper 1 promoter in susceptible mice*. Scand J Immunol, 2001. **54**(4): p. 348-56.
96. Capsoni, F., et al., *IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(3): p. 351-8.
97. Spittler, A., et al., *IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis*. Immunology, 1995. **85**(2): p. 311-7.

98. Bogdan, C., Y. Vodovotz, and C. Nathan, *Macrophage deactivation by interleukin 10*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1549-55.
99. Oswald, I.P., et al., *IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor-beta to inhibit macrophage cytotoxic activity*. J Immunol, 1992. **148**(11): p. 3578-82.
100. Roilides, E., et al., *IL-10 exerts suppressive and enhancing effects on antifungal activity of mononuclear phagocytes against Aspergillus fumigatus*. J Immunol, 1997. **158**(1): p. 322-9.

8. ANEXOS

8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos B regulatórios na paracoccidiodomicose.

Pesquisador: Ronei Luciano Mamoni

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50875515.6.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.757.109

Apresentação do Projeto:

Parecer de apreciação de emenda.

Justificativa da Emenda:

Foi acrescentado o nome do aluno Dennis Henrique Leandro da Silva na equipe de pesquisa. Na época da submissão, o mesmo ainda não havia completado sua graduação o que impossibilitava a sua inclusão. Para a defesa da dissertação, segundo as normas da Pós-graduação da FMC/Unicamp, é necessário incluí-lo no parecer do Comitê de Ética.

Objetivo da Pesquisa:

Inalterado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Dennis Henrique Leandro da Silva foi incluído na plataforma Brasil como assistente de pesquisa e como membro da equipe de pesquisa.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.757.109

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para a emenda apresenta o documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1035386_E1.pdf de 12/06/2018 com a justificativa da emenda.

Projeto original aprovado em 02 de Dezembro de 2015. Não há nenhum relatório de acompanhamento do trabalho.

Recomendações:

Nenhum relatório de acompanhamento do projeto foi enviado segundo a recomendação do CEP "- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo. "-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Deve apresentar relatório.

Emenda aprovada com recomendação: deve apresentar relatório.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.757.109

aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_103538_6_E1.pdf	12/06/2018 13:56:27		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_modelo_CONEP.pdf	10/11/2015 10:21:13	Ronei Luciano Mamoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Pacientes.pdf	15/10/2015 15:15:12	Ronei Luciano Mamoni	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles.pdf	15/10/2015 15:14:59	Ronei Luciano Mamoni	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	15/10/2015 15:12:31	Ronei Luciano Mamoni	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostoassinada.pdf	15/10/2015 15:08:17	Ronei Luciano Mamoni	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 2.757.109

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 05 de Julho de 2018

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

8.2 TCLE de controles.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos B regulatórios na paracoccidioidomicose

Pesquisador responsável: Dennis Henrique Leandro da Silva

Orientador: Ronei Luciano Mamoni

Número do CAAE: 50875515.6.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos e deveres como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houverem perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica muito importante em nosso meio, mas alguns aspectos sobre como o nosso organismo reage e se defende (resposta imunológica) da infecção pelo fungo causador da doença (cujo nome científico é *Paracoccidioides brasiliensis*) ainda permanecem desconhecidos. O objetivo desse estudo é avaliar o papel de uma das células (chamadas de linfócitos B) que fazem parte do sistema de defesa do nosso organismo (sistema imunológico) e encontradas no sangue na resposta a esse fungo. Dessa forma pretendemos compreender melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa doença e dessa forma encontrar melhores formas de tratamento e intervenção para os indivíduos acometidos.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a doar aproximadamente 40-50mL de sangue (4 a 5 tubos de 10mL), que serão coletados uma única vez, não havendo necessidade de retorno. O sangue coletado será totalmente aproveitado (plasma e células sanguíneas) para a realização de diferentes metodologias. As células do sangue serão separadas e tratadas *in vitro* (no laboratório) com substâncias derivadas do fungo causador da Paracoccidioidomicose (*Paracoccidioides brasiliensis*) ou expostas ao fungo, e depois avaliadas quanto às suas funções. O plasma será usado para dosagem de algumas substâncias presentes no sangue e que tem papel na resposta de proteção (resposta imunológica) contra agentes infecciosos.

Desconfortos e riscos:

Você **não** deve participar deste estudo se estiver tomando ou tiver tomado nas últimas duas semanas: antialérgicos, anti-inflamatórios (incluindo corticoides) ou antibióticos. Também **não** deve participar se tiver alguma doença infecciosa, alérgica ou inflamatória em atividade (incluindo doença autoimune).

O sangue será coletado por pessoa habilitada, utilizando material completamente descartável. A coleta será feita por punção venosa (veia do braço), do mesmo modo que outras coletas realizadas para exames de sangue. Como em outras coletas, durante o procedimento poderá haver dor e/ou formação de hematoma no local da coleta, mas que não apresentam risco adicional em indivíduos saudáveis.

Benefícios:

Não haverá benefícios em curto prazo, mas como a pesquisa envolve um melhor entendimento da participação dos linfócitos B na resposta imunológica frente ao fungo *P. brasiliensis*, o estudo poderá embasar futuras pesquisas que possam ser aplicadas para o tratamento de pacientes.

Acompanhamento e assistência:

Como mencionado, a coleta será realizada uma única vez, sem necessidade de retorno. Os resultados obtidos nos experimentos realizados, não apresentam aplicação prática para o participante.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento:

Não haverá ressarcimento monetário pela participação no estudo, uma vez que os procedimentos serão realizados no intervalo das funções desempenhadas pelo participante, não havendo necessidade de deslocamento adicional ou interrupção de atividades. Após a coleta será fornecido a você um "lanche" composto por biscoitos, barra de cereais e achocolatado.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com Ronei Luciano Mamoni ou Dennis Henrique Leandro da Silva, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, situado no prédio FCM-08 (térreo) na Rua Vital Brasil, 50 - Barão Geraldo - Campinas/SP, telefone (19) 3521-8991, email: rmamoni@fcm.unicamp.br ou dennisleandro@live.com.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do participante ou nome e assinatura do responsável)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.
(Assinatura do pesquisador)

8.3 TCLE de pacientes.

Caracterização fenotípica e funcional de linfócitos B regulatórios na paracoccidioidomicose

Pesquisador responsável: Dennis Henrique Leandro da Silva

Orientador: Ronei Luciano Mamoni

Número do CAAE: 50875515.6.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de um estudo. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos e deveres como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houverem perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo.

Justificativa e objetivos:

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica muito importante em nosso meio, mas alguns aspectos sobre como o nosso organismo reage e se defende (resposta imunológica) da infecção pelo fungo causador da doença (cujo nome científico é *Paracoccidioides brasiliensis*) ainda permanecem desconhecidos. O objetivo desse estudo é avaliar o papel de uma das células (chamadas de linfócitos B) que fazem parte do sistema de defesa do nosso organismo (sistema imunológico) e encontradas no sangue na resposta a esse fungo. Dessa forma pretendemos compreender melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença e dessa forma encontrar melhores formas de tratamento e intervenção para os indivíduos acometidos.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a doar aproximadamente 40-50mL de sangue (4 a 5 tubos de 10mL), que serão coletados uma única vez, não havendo necessidade de retorno. O sangue coletado será totalmente aproveitado (plasma e células sanguíneas) para a realização de diferentes metodologias. As células do sangue serão separadas e tratadas *in vitro* (no laboratório) com substâncias derivadas do fungo causador da Paracoccidioidomicose (*Paracoccidioides brasiliensis*) ou expostas ao fungo, e depois avaliadas quanto às suas funções. O plasma será usado para dosagem de algumas substâncias presentes no sangue e que tem papel na resposta de proteção (resposta imunológica) contra agentes infecciosos.

Desconfortos e riscos:

Você **não** deve participar deste estudo se estiver tomando ou tiver tomado nas últimas duas semanas: antialérgicos e anti-inflamatórios (incluindo corticoides). Também **não** deve participar se tiver alguma doença infecciosa (exceto a Paracoccidioidomicose), alérgica ou inflamatória em atividade (incluindo doença autoimune).

O sangue será coletado por pessoa habilitada, utilizando material completamente descartável. A coleta será feita por punção venosa (veia do braço), do mesmo modo que outras coletas realizadas para exames de sangue. Como em outras coletas, durante o procedimento poderá haver dor e/ou formação de hematoma no local da coleta, mas que não apresentam risco adicional.

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos em curto prazo, mas como a pesquisa envolve um melhor entendimento da participação dos linfócitos B na resposta imunológica frente ao fungo *P. brasiliensis*, o estudo poderá embasar futuras pesquisas que possam ser aplicadas para o tratamento de pacientes.

Acompanhamento e assistência:

Como mencionado, a coleta será realizada uma única vez, sem necessidade de retorno, para procedimentos relacionados a esse projeto. O seu acompanhamento no Hospital de Clínicas da UNICAMP, não será alterado de nenhuma forma.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Como os resultados obtidos no estudo não apresentam aplicação prática para o participante, os mesmos não serão incluídos no prontuário médico.

Ressarcimento:

Não haverá ressarcimento monetário pela participação no estudo, uma vez que os procedimentos (coleta de sangue) serão realizados no momento (antes ou depois) da consulta ambulatorial agendada pelo participante.

Armazenamento de material:

Pedimos a sua permissão para armazenar o material biológico (sangue), visto que a PCM é uma doença pouco estudada, sendo muitas vezes difícil obter amostras de pacientes ainda com a doença em atividade (como é o seu caso). Dessa forma esse material poderá contribuir para estudos futuros. Por favor, analise e selecione uma das opções abaixo:

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com Ronei Luciano Mamoni ou Dennis Henrique Leandro da Silva, no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, situado no prédio FCM-08 (térreo) na Rua Vital Brasil, 50 - Barão Geraldo - Campinas/SP, telefone (19) 3521-8991, email: rmamoni@fcm.unicamp.br ou dennisleandro@live.com.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação no estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP): Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter sido esclarecimento sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do responsável)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)