



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LÍVIA MOREIRA GENARO

Resposta anti-inflamatória na Paracoccidioidomicose: caracterização da citocina IL-27 na modulação da resposta imunológica.

Anti-inflammatory response in Paracoccidioidomycosis: characterization of IL-27 cytokine in the immune response modulation.

CAMPINAS

2019

LÍVIA MOREIRA GENARO

Resposta anti-inflamatória na Paracoccidioidomicose: caracterização da citocina IL-27 na modulação da resposta imunológica.

Anti-inflammatory response in Paracoccidioidomycosis: characterization of IL-27 cytokine in the immune response modulation.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, área de concentração Patologia Clínica.

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of State University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for Master Degree in Sciences. Clinical Pathology Area.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta

Co-orientadora: Dr^a. Luciana Pereira Ruas

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LÍVIA MOREIRA GENARO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA HELOISA DE SOUZA LIMA BLOTTA.

CAMPINAS

2019

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

G285r Genaro, Livia Moreira, 1993-
Resposta anti-inflamatória na paracoccidioidomicose : caracterização da citocina IL-27 na modulação da resposta imunológica / Livia Moreira Genaro. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Maria Heloisa de Souza Lima Blotta.

Coorientador: Luciana Pereira Ruas.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Interleucina-27. 3. Células dendríticas. 4. Células reguladoras do tipo Tr1. I. Blotta, Maria Heloisa de Souza Lima, 1953-. II. Ruas, Luciana Pereira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Anti-inflammatory response in paracoccidioidomycosis : characterization of IL-27 cytokine in the immune response modulation

Palavras-chave em inglês:

Paracoccidioidomycosis

Interleukin-27

Dendritic cells

Tr1 Cells

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Maria Heloisa de Souza Lima Blotta [Orientador]

Maria Luiza Moretti

Sandro Rogério de Almeida

Data de defesa: 22-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4640-6554>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5246440624401978>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LÍVIA MOREIRA GENARO

**ORIENTADOR: PROFA. DRA. MARIA HELOISA DE SOUZA LIMA
BLOTTA**

COORIENTADOR: DRA. LUCIANA PEREIRA RUAS

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. MARIA HELOISA DE SOUZA LIMA BLOTTA

2. PROFA. DRA. MARIA LUIZA MORETTI

3. PROF. DR. SANDRO ROGÉRIO DE ALMEIDA

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 encontra-se
no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do
Programa da FCM.

Data de Defesa:
22/08/2019

Agradeço a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada. Aos meus pais Miriam e Lucio, e ao meu querido Bruno que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.” Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Heloisa, por todos os ensinamentos e experiências transmitidas, essenciais para a minha formação e crescimento intelectual. Agradeço por abrir as portas do seu laboratório quando eu ainda estava na graduação e me permitir trabalhar com o que sempre desejei.

À minha co-orientadora Dra Luciana, por ter me acolhido tão bem desde a iniciação científica, não sendo somente orientadora, mas também amiga. Obrigada pela paciência e por me ensinar com muito carinho como atuar na bancada e a desenvolver senso científico.

Aos meus pais, especialmente durante essa etapa. Agradeço de coração o extenso apoio e amor que recebi de vocês. Por todos os sacrifícios feitos para que eu pudesse chegar aqui. Vocês são parte essencial desse trabalho.

Ao meu querido Bruno, que esteve ao meu lado desde o início sempre me apoiando e incentivando. Quero agradecer sua dedicação, amor, carinho e por fazer meus dias mais felizes.

À minha avó Celina, de longe a maior entusiasta desse trabalho. Obrigada pelas horas de conversa, preocupações e orações. Dedico esse trabalho à senhora. Ao meu amado avô Luiz (*in memoriam*), que apesar da distância física, esteve comigo em todos os momentos, me iluminando e me acolhendo. Fico feliz de poder realizar nosso sonho.

À minha querida Ida Maria, por me acompanhar nessa jornada desde o primeiro dia. Por ser meu ponto de apoio, de risos e alegrias. Obrigada por ser minha parceira-irmã, sem você jamais teria conseguido. À querida Luzia, pela confiança e carinho, por me apresentar à Dra. Maria Heloisa e por ser parte fundamental da minha vida acadêmica. Meu muito obrigada!

Às minhas amigas Mariana, Juliana e, especialmente Lilian, com quem cresci não só como pesquisadora, mas como ser humano. Obrigada pelas madrugadas, pelas incansáveis horas de bancada e pelos risos. Agradeço as inúmeras discussões de resultados, viagens, brincadeiras e nossas cantorias. Obrigada por todos os momentos incríveis que guardarei para sempre com muito carinho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pelos bons momentos durante esses seis anos que passamos juntos. Obrigada por me acolherem tão bem e por terem tornado o dia a dia mais feliz e divertido. Aos amigos tanto do Laboratório de Genética do Câncer quanto do Laboratório de Biologia Molecular da Cartilagem, pelos ensinamentos e trocas que muito contribuíram.

Ao setor de Microbiologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, pelo cuidado com as cepas de *P. brasiliensis* e à Anatomia Patológica pela disponibilização das biópsias nesse trabalho utilizadas.

Ao serviço de Bioestatística da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelas análises estatísticas dos dados obtidos nesse trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), por abrir as portas de seus laboratórios. Em especial ao Dr. Murilo de Carvalho, por toda ajuda e dedicação frente aos obstáculos enfrentados durante a padronização das Imunofluorescências.

Aos participantes desse estudos, pacientes e doadores. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão de Bolsa de Mestrado - Código de Financiamento 001, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 308746/2013-9.

RESUMO

A citocina IL-27, membro da família da IL-12, é secretada por células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas (DCs). Estudos recentes sugerem um papel anti-inflamatório para a IL-27, por meio da indução de células Tr1 produtoras de IL-10, capazes de inibir respostas do tipo Th1 e Th17. Nosso trabalho teve como objetivo investigar se a IL-27 e a indução de células Tr1 estão envolvidas na imunomodulação da paracoccidioidomicose, micose sistêmica de maior prevalência no Brasil. Para tal, avaliamos a presença de IL-27 no soro e biópsias de pacientes atendidos no HC/UNICAMP por ELISA, imunohistoquímica e imunofluorescência. A presença de células Tr1 (CD4⁺CD45RA⁻CD49b⁺LAG3⁺) no sangue periférico foi analisada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos específicos. Experimentos *in vitro* utilizando sangue periférico de doadores saudáveis foram realizados para verificar a capacidade de leveduras de *P. brasiliensis* em induzir a produção de IL-27 por DCs e macrófagos, bem como a polarização de linfócitos para o fenótipo Tr1. Nossos resultados mostram que pacientes com a forma aguda da PCM apresentam maiores concentrações séricas de IL-27 e uma maior porcentagem de células Tr1 no sangue periférico quando comparados a pacientes com a forma crônica da doença e doadores saudáveis. A citocina IL-27 também foi detectada em lesões de pacientes com PCM, sendo sua produção associada a DCs e macrófagos. Leveduras viáveis de *P. brasiliensis* da cepa Pb18 foram capazes de induzir a produção de IL-27 tanto por DCs como macrófagos. Em concordância, verificamos que DCs pulsadas com leveduras de Pb18 induzem uma maior frequência de linfócitos Tr1 *in vitro*. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a produção de IL-27 e a indução de células Tr1 podem contribuir para a resposta imunológica deficitária observada nas formas graves e disseminadas da doença.

Palavras-chaves: paracoccidioidomicose, IL-27, células dendríticas, Tr1

ABSTRACT

Interleukin-27, a cytokine of the IL-12 family, is secreted by antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells (DCs). Recent studies suggest an anti-inflammatory role for IL-27 by inducing IL-10 producing Tr1 cells capable of inhibiting Th1 and Th17 type responses. Our work aimed to investigate whether IL-27 and the induction of Tr1 cells are involved in the immunomodulation of paracoccidioidomycosis, the most prevalent systemic mycosis in Brazil. For this, we evaluated the presence of IL-27 in serum and biopsies of patients treated at a university hospital in Brazil by ELISA, immunohistochemistry, and immunofluorescence. The presence of Tr1 cells (CD4⁺CD45RA⁻CD49b⁺LAG3⁺) in the peripheral blood was analyzed by flow cytometry, using specific antibodies. *In vitro* experiments using peripheral blood from healthy donors were performed to verify the competence of *P. brasiliensis* yeast in inducing the production of IL-27, as well as the polarization of lymphocytes to the Tr1 phenotype. We found that patients with the acute form of PCM present higher serum concentrations of IL-27 and a higher percentage of Tr1 cells in the peripheral blood when compared to patients with the chronic form of the disease and healthy donors. The cytokine IL-27 was also detected in lesions of PCM patients, which was associated with DCs and macrophages. *P. brasiliensis* yeasts from the Pb18 virulent strain were able to induce IL-27 production by both DCs and macrophages. In agreement, we have found that DCs pulsed with Pb 18 yeasts induce a higher frequency of Tr1 lymphocytes in vitro. Altogether, our results suggest that IL-27 production and Tr1 cell induction may contribute to the deficient immune response seen in the severe and widespread forms of the disease.

Keywords: IL-27, Paracoccidioidomycosis, Tr1 cells, *Paracoccidioides brasiliensis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Órgãos acometidos em pacientes com paracoccidioidomicose	18
Tabela 2. Efeitos da IL-27 em macrófagos e linfócitos na tuberculose experimental.....	22

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AF – *Acute form*

AhR- hidrocarboneto de arila

APCs – Células apresentadoras de antígenos

BPBS – *BupH Phosphate buffered saline pack*

CF – *Chronic form*

CF-MF – *Chronic multifocal form*

CF-UF – *Chronic unifocal form*

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico

CuSO₄ – Sulfato de cobre

DAB – *3,3'-diaminobenzidine*

DCs – Células dendríticas / *Dendritic cells*

EBI3 – *Epstein-Barr virus-induced gene 3*

FA – Forma aguda

FC – Forma crônica

FC-MF – Forma crônica multifocal

FC-UF – Forma crônica unifocal

ICOS – Coestimulador indutor de células T

IDO – Indolamina 2,3 – dioxigenase

Pb18 – Cepa de *P. brasiliensis* com alta virulência

PBMC – *Peripheral blood mononuclear cells*

PBS-BSA – *Phosphate buffered saline with bovine serum albumin*

PBS-BSA-A – Tampão fosfato-salino com azida sódica e albumina bovina sérica / *Phosphated buffered saline with bovine serum albumin and sodium azide*

PCM – Paracoccidiodomicose / *Paracoccidiodomycosis*

PD1 – Proteína de morte celular programada 1

pDCs – Células dendríticas plasmocitóides

PRRs – Receptores de reconhecimento padrão / *Patterns recognition receptors*

rhIL-27- IL-27 recombinante / *IL-27 recombinant*

srlIL-27 – Receptor solúvel para IL-27 / *soluble receptor for IL-27*

SST-BSA – Solução salina tamponada com fosfato e albumina bovina sérica

T regs – Células T reguladoras / *Regulatory T cells*

TCR – Receptores de células T

Tr1 – Células T reguladoras do tipo 1 / *Type 1 regulatory cells*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Casuística	26
3.2. Quantificação de IL-27 no soro de pacientes com PCM e indivíduos saudáveis.....	27
3.3. Imunohistoquímica em biópsias de lesões de pacientes com PCM.....	27
3.4. Imunofluorescência em biópsias de lesões de pacientes com PCM.....	28
3.5. Análise da frequência das células Tr1 no sangue periférico por citometria de fluxo.....	29
3.6. Isolamento de células para os experimentos de cocultura e de indução da produção de IL-27.....	30
3.7. Diferenciação de monócitos em células dendríticas (DCs) e macrófagos.....	31
3.8. Cultivo e Obtenção de leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	31
3.9. Produção de IL-27 por DCs e macrófagos estimulados com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>	32
3.10. Coculturas de DCs e linfócitos	32
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO	60
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

9.ANEXO.....	67
9.1. Delineamento experimental.....	67
9.2. Aprovação comitê de ética.....	71

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica característica da América Latina, com maior número de casos encontrados no Brasil, Colômbia e Venezuela (1-3). A infecção é causada pela inalação de conídios dos fungos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, os quais se tornam capazes de causar a doença pela transição morfológica induzida pelo aumento da temperatura de 25°C (ambiente) para 37°C (corporal), a qual gera mudança na composição da parede celular fúngica e estabelecimento da doença (4). A PCM é a maior causa de mortalidade dentre as micoses sistêmicas no Brasil, sendo a oitava causa de mortalidade por doenças crônicas infecciosas (5). Segundo serviços de referência no atendimento a pacientes, infere-se que a incidência da doença varie de 3 a 4 novos casos/milhão (6). Inicialmente caracterizada como uma doença associada ao meio rural, principalmente em áreas produtoras de café, mudanças demográficas como urbanização, derrubadas de áreas florestais e abertura de novas fronteiras tem contribuído para o aumento da incidência da doença no meio urbano (7, 8).

A PCM apresenta-se sob duas formas clínicas principais, a forma juvenil ou aguda (FA) e a forma adulta ou crônica (FC) (tabela 1). A forma adulta, caracterizada pela presença de lesões mucocutâneas e comprometimento pulmonar (6), afeta, na maioria dos casos, indivíduos do sexo masculino trabalhadores rurais acima de 30 anos. Etilismo e tabagismo constituem fatores de risco para o desenvolvimento da doença. Muitos dos pacientes portadores dessa forma exerceram atividades agrícolas durante as duas primeiras décadas de vida, nas quais possivelmente adquiriram a infecção, entretanto as manifestações clínicas surgiram anos depois, muitas vezes quando já residiam em áreas urbanas (9). Por afetar trabalhadores em sua idade mais produtiva, a doença apresenta impacto importante na cadeia produtiva e na saúde pública.

A maior incidência da PCM em homens adultos é atribuída a fatores hormonais. Mulheres endocrinologicamente maduras, com níveis

adequados de estrogênio, apresentam proteção contra o *P. brasiliensis*, visto que o hormônio β estradiol impede a transição morfológica da fase micelial (forma infectante) em leveduriforme (forma patogênica). (10, 11).

Por outro lado, a forma aguda tem evolução rápida, ocorrendo em crianças e adultos jovens (abaixo de 30 anos) de ambos os sexos. Caracteriza-se pela disseminação do fungo para múltiplos tecidos e órgãos, acometendo linfonodos, fígado, baço e ossos (4, 6, 12).

Tabela 1. Órgãos acometidos em pacientes com paracoccidioidomicose

Órgãos	Formas Clínicas	
	Aguda	Crônica
Pulmão	-	+
Brônquio/traqueia	-	+
Linfonodomegalia		
Generalizada	+	-
Localizada	+	+
Boca, faringe, laringe		
Mucosa oral	-	+
Laringe	-	+
Mucosa nasal	-	+
Glândulas adrenais	-	+
Sistema nervoso central	-	+
Fígado	+	+
Baço	+	-
Pele	-	+

Fonte: Adaptação de Shikanai-Yasuda et al, 2017. (6)

As diferentes formas clínicas da doença são acompanhadas por respostas de defesa características. Na forma aguda, pacientes apresentam deficiência da resposta imunológica celular caracterizada pela inibição da linfoproliferação e produção aumentada de citocinas do perfil Th2/Th9, com ação inibitória sobre macrófagos. Também caracteriza esta forma clínica a produção de altos níveis de anticorpos, principalmente das classes IgE e IgG4, e eosinofilia (13-15).

A forma crônica varia dentro de um espectro que vai desde formas localizadas e brandas a quadros mais graves com o envolvimento de

múltiplos órgãos. Pacientes portadores da forma crônica unifocal (FC-UF) apresentam sintomas mais brandos devido a uma resposta Th1 preservada, que permite a formação de granulomas que restringem parcialmente a replicação do fungo, sendo associada às respostas Th-17 e Th-22 (14, 16, 17). Já a forma crônica multifocal (FC-MF) apresenta uma imunossupressão similar àquela descrita em pacientes com a FA, o que contribui para um quadro mais grave da doença devido à influência de respostas tipo Th2 e Th9, as quais promovem ativação de linfócitos B, secreção de anticorpos específicos, eosinofilia e formação de granulomas frouxos, incapazes de conter a disseminação do fungo (15, 17).

Indivíduos moradores de áreas endêmicas para PCM podem se infectar pelo *Paracoccidioides*, mas não desenvolver a doença, apresentando reatividade cutânea a antígenos do fungo (14, 16). Nestes indivíduos prevalece a resposta Th1, caracterizada pela produção de citocinas ativadoras de macrófagos como IFN- γ e alta resposta proliferativa de linfócitos (14, 16).

A resposta imunológica durante uma infecção fúngica deve eliminar o patógeno, ao mesmo tempo que limita o dano tecidual e restaura a homeostase. Reações inflamatórias intensas são descritas principalmente em pacientes com a FA da PCM levando a uma falha na resposta ao tratamento e a disseminação do fungo para vários órgãos e tecidos (18). Corticoesteróides foram utilizados com sucesso como terapia adjunta especialmente em formas graves da doença, como na neuroparacoccidioidomicose. A droga, devido aos seus efeitos imunossupressores, ajuda a diminuir o dano tecidual e a resposta inflamatória exacerbada presente nos pacientes, resposta esta que pode se agravar com as terapias antifúngicas convencionais (19, 20). Neste contexto, mecanismos de contenção da resposta inflamatória devem ser acionados pelo sistema imunológico de forma a controlar a destruição celular desenfreada, porém otimizar a resposta antifúngica.

Estudos envolvendo a participação de células T reguladoras (Tregs) e citocinas anti-inflamatórias na PCM demonstraram que pacientes

portadores de PCM ativa, principalmente nas formas mais disseminadas da doença, apresentam alta produção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β , sendo associadas a uma redução na produção de IFN- γ e TNF- α (14, 15, 21-23). Sugere-se que células Tregs participem da imunossupressão observada em pacientes com PCM, uma vez que pacientes com a doença ativa apresentam uma maior quantidade dessas células quando comparados aos indivíduos tratados. Os mecanismos envolvidos nessa imunossupressão estão relacionados ao desequilíbrio na produção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β , aumento na expressão de CTLA-4 nos linfócitos circulantes e aumento na apoptose de células T efectoras através da interação Fas-Fas-L (24, 25). Esses achados confirmam a relação entre as formas mais graves da doença e a depressão na resposta imunológica do tipo celular, determinante para a progressão da doença.

Recentemente, Araújo e colaboradores demonstraram que a infecção por *P. brasiliensis* em camundongos induz a maturação de células dendríticas plasmocitóides (pDCs) com função tolerogênica, pois estas expressam a enzima Indolamina 2,3-Dioxigenase (IDO) e estão relacionadas a maior atividade das Tregs (26), fato que colaboraria para o sucesso do patógeno e o estabelecimento da doença.

Além das células Treg, a supressão da imunidade observada em algumas doenças infecciosas também foi associada a um aumento da frequência de células reguladoras do tipo 1 (Tr1) (27, 28), caracterizadas pela ausência da expressão do fator de transcrição FOXP3 de forma constitutiva (29). Entretanto, quando ativadas, as células Tr1 podem apresentar uma expressão transiente do FOXP3, porém em níveis menores do que aqueles expressos pelas Tregs tradicionais (30-32). As células Tr1 também são caracterizadas pela expressão de CD49b e LAG3 (33) e pela secreção de grandes quantidades de IL-10 e TGF- β (33, 34). Outras moléculas de superfície presentes nesta população celular são CTLA-4, PD-1 (35) e ICOS (36).

Groux e colaboradores (33) demonstraram o papel indispensável

da LAG-3, uma proteína de membrana com efeito regulatório negativo no sinal de transdução mediado pelo TCR, e que na forma solúvel, ativa as células dendríticas aumentando a resposta antígeno-específica em células T murinas (31, 37, 38). Células Tr1 suprimem as respostas de células T e de células apresentadoras de antígenos (APCs) pela via de secreção da IL-10. As propriedades imunossupressoras das células Tr1 contribuem para a regulação negativa da resposta imunológica responsável por manter a tolerância e supressão de doenças autoimunes. Com base nestas características, as células Tr1 têm sido sugeridas como um potencial tratamento para várias desordens imuno-relacionadas (39).

Citocinas da família da IL-12 como IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35 são moléculas heterodiméricas com importante função na estimulação e regulação da resposta imunológica (40, 41). A IL-27, molécula heterodimérica composta pelas subunidades p28 e EBI3, é produzida e secretada por macrófagos e células dendríticas após a ativação de receptores de reconhecimento padrão como TLR3, TLR4 e TLR9 por produtos microbianos (42-45). Inicialmente sugeriu-se que a IL-27 atuava apenas na expansão de células pró-inflamatórias do tipo Th1 através ativação dos fatores de transcrição STAT1 e T-bet entretanto, foi demonstrado que camundongos deficientes para o receptor da IL-27 (IL-27ra^{-/-}) desenvolvem respostas pró-inflamatórias exageradas associadas às células T. Estes achados permitiram constatar o envolvimento direto da IL-27 na inibição da inflamação tecidual, exercendo uma ação anti-inflamatória capaz de limitar a destruição tecidual durante processos infecciosos e inflamatórios (46).

Os primeiros estudos indicando os efeitos anti-inflamatórios da IL-27 em doenças infecciosas e inflamatórias foram realizados em camundongos IL-27^{-/-} ou EBI3^{-/-} que apresentaram alta produção de citocinas Th2 durante a asma experimental e infecções por *Trypanosoma cruzi* (47-49). Na mesma linha, Villarino e colaboradores observaram que camundongos deficientes do receptor da IL-27 (IL-27R) infectados com *Toxoplasma gondii* desenvolveram células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de

IFN- γ durante a fase aguda da infecção, sendo essa resposta suficiente para controlar a replicação parasitária (46).

A ativação de células TCD4⁺ *naïve* na presença da IL-27 resulta na diferenciação de células reguladoras do tipo Tr1 produtoras de IL-10, as quais podem suprimir inflamação e autoimunidade. Além de atuar na polarização celular, exercem influência na inibição da diferenciação em células Th17 e em células T reguladoras FOXP3⁺ (Tregs) (42, 50-52). Inicialmente descrita como citocina da resposta Th2, IL-10 é reconhecida pela sua variedade de propriedades biológicas, dentre as quais a limitação das respostas inflamatórias *in vivo* (33, 53, 54). De fato, camundongos IL-10^{-/-} e IL-27^{-/-} infectados com *T. cruzi* ou *Leishmania donovani* apresentam dano tecidual grave, associado à resposta inflamatória excessiva, sugerindo uma possível relação entre as duas citocinas na contenção da inflamação exacerbada (48, 55).

Na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, foi demonstrado que a IL-27 modula negativamente a resposta de macrófagos por meio da supressão de TNF- α e IL-12, citocinas necessárias para a aumentar a produção de IFN- γ em macrófagos e, conseqüentemente, ativá-los (32, 56, 57). Dado o papel da IL-27 como reguladora positiva da produção de IL-10 por células Tr1, foi observado que camundongos deficientes em IL-10 são mais resistentes à *M. tuberculosis* quando comparados a controles selvagens (58). Outra via de atuação da IL-27 inclui a sua capacidade de suprimir diretamente as células Th17, por meio da inibição da expressão de ROR γ T e sinalização de IL-6 (revisto por (32) (Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da IL-27 em macrófagos e linfócitos na tuberculose

experimental.

Células	Efeitos da IL-27
Macrófagos	Inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias Induz a produção de citocinas anti-inflamatórias Inibe a acidificação do fagossomo Suprime a resposta Th1
Células T	Induz a diferenciação de células Tr1 produtoras de IL-10 Induz a proliferação e manutenção das células Tr1 Suprime o desenvolvimento de células Th17

Fonte: Adaptado de Abdalla et al, 2015 (32)

Poucos trabalhos na literatura avaliaram o papel da IL-27 em infecções fúngicas. Recentemente, Patin e colaboradores demonstraram que IL-27 é produzida por células mielóides em resposta a *Candida* spp. Camundongos deficientes do receptor de IL-27 infectados por *Candida parapsilosis* apresentaram um melhor *clearance* do fungo acompanhado a um aumento de IFN- γ e IL-17 (59), sugerindo um importante papel da citocina na supressão da imunidade celular.

Bedke e colaboradores demonstraram que células Tr1⁺ humanas e de camundongos produzem uma maior quantidade de IL-10 e são capazes de suprimir a expansão de células T antígeno específicas durante a infecção por *Aspergillus fumigatus* *in vitro* e *in vivo*. Também verificaram que em camundongos a diferenciação de células Tr1 foi dependente da presença do receptor hidrocarboneto de arila (AhR), do fator de transcrição

c-Maf e de IL-27 (60).

Tendo em vista a participação da IL-27 no controle da resposta inflamatória, e trabalhos na literatura envolvendo o papel dessa citocina e das células Tr1 na resposta contra patógenos fúngicos, o presente trabalho teve por objetivo investigar se a IL-27 e a indução de células Tr1 estão implicadas no processo de modulação da resposta imunológica na paracoccidioidomicose.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a participação da IL-27 na infecção humana pelo *P. brasiliensis*

2.2. Objetivos Específicos

- Quantificar a IL-27 no soro de pacientes com PCM e doadores saudáveis.
- Verificar a presença da IL-27 e avaliar o infiltrado celular em biópsias de lesões de pacientes com PCM.
- Avaliar a frequência de células Tr1 no sangue periférico de pacientes com PCM e doadores saudáveis.
- Verificar se leveduras de *P. brasiliensis* são capazes de induzir a produção de IL-27 por DCs e macrófagos de doadores saudáveis
- Verificar se DCs obtidas a partir de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis e pulsadas com leveduras de *P. brasiliensis* são capazes de estimular a polarização de linfócitos para o perfil Tr1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram incluídas amostras de soros de pacientes com ambas as formas da PCM atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP), e de doadores saudáveis. O diagnóstico de PCM foi estabelecido pelo achado do fungo em exame direto ou histopatológico e/ou sorologia. Os soros foram armazenados na soroteca do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular.

Cortes histológicos de biópsias de pacientes com PCM arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP foram utilizados para detecção de IL-27 e caracterização do infiltrado celular. Para a reação de Imunohistoquímica, foram incluídas biópsias de linfonodos de 4 pacientes portadores da FA e biópsias de mucosa oral de 4 pacientes com FC, obtidas com finalidade diagnóstica. Para a reação de Imunofluorescência, foram incluídas 6 biópsias de linfonodos de pacientes com a FA da PCM.

Para a quantificação e caracterização das células Tr1 foram incluídos no estudo pacientes com PCM, atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP) de março de 2017 a março de 2019. Foram selecionados pacientes que apresentavam a doença ativa (sintomas clínicos e exames laboratoriais compatíveis com a doença em atividade), sendo recrutados antes do início do tratamento ou dentro do primeiro mês de tratamento. O grupo controle foi constituído de familiares de pacientes e alunos do laboratório de pesquisa. Ambos grupos (pacientes e controles) se enquadraram quanto aos critérios de inclusão (não estar em uso de antialérgicos, anti-inflamatórios ou antibióticos, além de não apresentar outras doenças inflamatórias ou infecciosas concomitantes, doenças alérgicas, autoimunes ou neoplasias). Cada indivíduo foi informado sobre sua participação na pesquisa, assinando um termo de consentimento pós-informação (CAAE: 67805216.8.0000.5404), de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP.

Para os experimentos *in vitro*, que envolveram a estimulação de DCs e macrófagos com leveduras de *P. brasiliensis* e co-culturas com linfócitos T, foi utilizado somente sangue periférico de doadores saudáveis.

O cálculo do tamanho amostral, bem como os testes estatísticos foram realizados pelo serviço de Bioestatística da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

3.2. Quantificação de IL-27 no soro de pacientes com PCM e indivíduos saudáveis.

Para a quantificação da concentração de IL-27 no soro, sangue periférico (9mL) de 27 pacientes portadores da forma aguda e 51 pacientes portadores da forma crônica (23 com a forma multifocal e 28 com a forma unifocal) da PCM atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (HC-UNICAMP) e de 20 doadores saudáveis foi coletado em tubo seco. Para a obtenção do soro, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, 720 x g em temperatura ambiente. Os soros foram utilizados para a quantificação de IL-27 por ELISA (DuoSet - R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3. Imunohistoquímica em biópsias de lesões de pacientes com PCM

Para as reações de imunohistoquímica foram utilizados cortes histológicos (5 a 7 μ M de espessura) de linfonodos e mucosa oral de pacientes com incluídos em parafina. Foi realizada a recuperação antigênica com Trilogy (Cell Marque) em panela a vapor, durante 45 minutos. Procedeu-se então ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10v (Dinâmica) durante 15 minutos, seguido de lavagem com água destilada e incubação com bloqueio de proteína (Dako, Carpinteria, EUA) por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram

incubadas com o anticorpo primário anti-IL-27 (Sigma), *overnight*, em câmara úmida. O anticorpo primário foi diluído em solução de salina tamponada com fosfato e soro albumina bovina a 2% (SST-BSA) e dispensados sobre os cortes.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas com SST e incubadas com um polímero contendo peroxidase (Envision, Dako, Carpinteria, EUA). As reações foram reveladas pela adição do substrato cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA) a 0,6%, seguida da ativação com peróxido de hidrogênio 30v durante 5 minutos e coloração nuclear com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich Chemical) por 1 minuto. Após o término da reação, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com Entelan (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, EUA). O controle negativo consistiu em uma lâmina do mesmo tecido analisado, na qual o anticorpo primário foi substituído por SST-BSA.

As lâminas de IHQ foram analisadas por microscopia ótica (Olympus, modelo CX31RTSF, Japão) para a avaliação da composição do infiltrado inflamatório e da presença de IL-27. Foram analisados três campos diferentes e aleatórios em cada lâmina (aumento 400X), levando-se em consideração a presença do fungo. Para análise quantitativa selecionou-se a área positiva para IL-27 (marrom) e os resultados foram expressos em mm² utilizando o programa ImageJ® versão 1.52 (NIH, Maryland, EUA).

3.4. Imunofluorescência em biópsias de lesões de pacientes com PCM

Para as reações de imunofluorescência cortes histológicos (5 a 7µM de espessura) de linfonodos de pacientes com PCM foram dispostos em lâminas silanizadas e passaram por recuperação antigênica (100°C, 20 minutos) em solução Antigen Retrieval Buffer 1 (100X tampão citrato, pH

6,0) (Springs Bioscience, EUA) 3:1 em água Milli Q para facilitar a exposição dos epítomos antigênicos. As lavagens para retirada da parafina foram realizadas em tampão BupH Phosphate Buffered Saline Pack™ (BPBS) (0,1M fosfato de sódio, 0,15M cloreto de sódio, pH 6,8) (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os cortes foram colocados em solução de glicina (Promega, EUA), e em seguida foi realizado o bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão BPBS.

Os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpo policlonal de coelho anti-IL-27 humana (ab115671, Abcam, Reino Unido) diluído em tampão diluente (Spring Bioscience, EUA). Em seguida os cortes foram lavados e incubados com anticorpos de camundongo anti-CD68 humana ou anti-CD209/DC-SIGN humana (ambos da Biolegend, EUA), por 1 hora, para marcação de macrófagos e células dendríticas, respectivamente.

Após a incubação com os anticorpos primários os cortes foram lavados em BPBS e bloqueados novamente com albumina sérica bovina (BSA). Posteriormente os cortes foram incubados com os anticorpos secundários anti-Ig de coelho conjugado a Alexa 488 (Invitrogen, EUA) (verde) e anti-Ig de camundongo conjugado a Alexa 647 (Abcam, Reino Unido) (rosa). Para melhor caracterização e visualização, o núcleo celular (DNA) foi corado pelo reagente de Hoechst (Invitrogen, EUA). Para redução da auto fluorescência, os cortes foram tratados com CuSO₄ 10mM diluído em acetato de amônio 50mM (ph 5.0) durante 10 minutos, no escuro. Em seguida as lâminas foram lavadas e receberam meio de montagem (Dako, EUA).

Os cortes foram examinados em microscópio confocal SP8 (Leica, Alemanha) no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio/CNPEM).

3.5. Análise da frequência das células Tr1 no sangue periférico por citometria de fluxo

Para a determinação da frequência de células Tr1 o sangue periférico de pacientes com a forma ativa da PCM e de doadores saudáveis foi coletado em tubos contendo heparina sódica e centrifugado sobre uma

solução de Ficoll-Hypaque - densidade 1,077 (Sigma, EUA) por 30 minutos, 400 x g, em temperatura ambiente. As células mononucleares foram transferidas para um tubo falcon de 15mL, sendo submetidas a 2 lavagens com meio RPMI 1640 (300 x g, por 10 minutos, a 4°C). Após as lavagens, o número e a viabilidade das células foram estimados. As células foram então incubadas com um conjunto de anticorpos para para caracterização das células Tr1 (34), a saber anti-CD4-FITC, anti-CD49b-PE, anti-LAG3-PE-Cy7 e anti-CD45RA-PE-Cy5 (todos da Biolegend, EUA). Os anticorpos foram diluídos em 20µL de PBS- BSA-A (PBS – Albumina Bovina Sérica 0,1% - Azida Sódica 0,5%), seguido de incubação por 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após este período foram adicionados 20µL de PBS-BSA-A com posterior centrifugação por 10 minutos a 1250 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas (vórtex), seguidas pela adição de 200µL de formaldeído a 2% e analisadas em citômetro de fluxo (FACs Verse, BD Biosciences, EUA) com o programa FlowJo, versão 10 (FlowJo, LLC, EUA).

3.6. Isolamento de células para os experimentos de cocultura e de indução da produção de IL-27

O sangue periférico (70 - 80mL) de doadores saudáveis foi coletado em tubos contendo heparina sódica e as células mononucleares foram separadas por centrifugação em Ficoll-Hypaque. Em seguida, as CMSP foram incubadas com *beads* magnéticas, para a separação de monócitos (células CD14⁺) e linfócitos (CD3⁺). Monócitos foram isolados utilizando o sistema de seleção imunomagnética positiva MACs (*CD14 MicroBeads*) conforme instruções do fabricante (Miltenyi Biotech, Alemanha). Em seguida os monócitos foram diferenciados em DCs e macrófagos. Os linfócitos foram isolados por kit de seleção positiva imunomagnética (*CD3 MicroBeads*) e utilizados para experimentos de co-cultura (item 3.10).

3.7. Diferenciação de monócitos em células dendríticas (DCs) e macrófagos.

DCs e macrófagos foram diferenciados *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico de acordo com Sallusto and Lanzavecchia (29). Após a separação de CMSPs e purificação de monócitos (CD14⁺) por beads magnéticas, como descrito no item anterior, as células CD14⁺ foram incubadas em placas de 6 poços a 37°C durante 5 dias com RPMI suplementado adicionado das citocinas recombinantes IL-4 (rhIL-4) (50ng/mL) e rhGM-CSF (50ng/mL) (Peprotech, EUA) para diferenciação em DCs, e durante 7 dias com RPMI suplementado adicionado da citocina recombinante rhGM-CSF (50ng/mL) para diferenciação em macrófagos (Peprotech, EUA). No 2º dia as culturas receberam citocinas frescas, sem a troca do meio de cultura inicial. Após a diferenciação (5º dia e 7º dia), o fenótipo celular foi confirmado por citometria de fluxo.

3.8. Cultivo e Obtenção de leveduras de *P. brasiliensis*

Isolados de *P. brasiliensis* (Pb18 e Pb265) foram cultivados em meio Fava-Netto, a 36°C por 5-7 dias. Em seguida, as células leveduriformes foram ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) (pH 7,2) e separadas por agitação em vórtex com pérolas de vidro de 0,5 mm de diâmetro, durante 5 min. A suspensão celular foi incubada a 37°C durante 15 min e o sobrenadante recolhido. O número e a viabilidade foram determinados em câmara de Neubauer na presença de corante azul de tripan. Suspensões contendo mais de 85% de fungos viáveis foram utilizadas. Para o ensaio de produção de IL-27 *in vitro*, além das leveduras viáveis Pb18 e Pb265, foram utilizadas leveduras Pb18 mortas pelo calor (60°C por 1h). A viabilidade das células fúngicas foi determinada pelo corante azul tripan.

3.9. Produção de IL-27 por DCs e macrófagos estimulados com leveduras de *P. brasiliensis*

Após diferenciação (item 3.7), DCs e macrófagos foram estimulados com leveduras de *P. brasiliensis* (Pb18, Pb18 morto pelo calor ou Pb265) por 24h em estufa a 37°C e 5% CO₂. O sobrenadante foi então coletado e armazenado a -20°C para posterior determinação da concentração de IL-27 pela técnica de ELISA (Duoset-R&D Systems, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante.

3.10. Coculturas de DCs e linfócitos

Após a diferenciação a partir de monócitos (item 3.7) as DCs foram pulsadas *in vitro* com leveduras de *P. brasiliensis* por 2h na presença ou não de IL-27 (rhIL27). Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados linfócitos CD3⁺ obtidos dos mesmos doadores (item 3.6), na proporção de 1 DC para 5 linfócitos, para a avaliação da polarização para células Tr1. As coculturas foram mantidas por 5 dias em estufa, a 37°C. Os linfócitos foram imunofenotipados por citometria de fluxo com base na presença de LAG3, marcador da população de linfócitos Tr1.

4. RESULTADOS

Association between IL-27 and severe forms of paracoccidioidomycosis.

Lívia Moreira Genaro^{1,5}, Lilian de Oliveira Coser¹, Amauri da Silva Justo Junior¹, Livia Furquim de Castro¹, Plínio Trabasso², Ronei Luciano Mamoni¹, Ricardo Mendes Pereira³, Maria Letícia Cintra⁴, Luana Nunes Santos⁵, Murilo de Carvalho⁵, Luciana Pereira Ruas^{1,5}, Maria Heloisa de Souza Lima Blotta^{1*}

¹ Department of Clinical Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

² Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil

³ Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Pathologic Anatomy, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil

⁵ Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazilian Center for Research in Energy and Material, São Paulo, Brazil

***Corresponding author:**

Maria Heloisa de Souza Lima Blotta, BSc, MSc, PhD

Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas

Rua Vital Brasil, 50, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo

CEP: 13083-888, Campinas, São Paulo, Brazil

Tel.: +55 19 3521 8991

E-mail: heblotta@fcm.unicamp.br

Abstract

Interleukin-27, a cytokine of the IL-12 family, is secreted by antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells (DCs). Recent studies suggest an anti-inflammatory role for IL-27 by inducing IL-10 producing Tr1 cells capable of inhibiting Th1 and Th17 type responses. Our work aimed to investigate whether IL-27 and the induction of Tr1 cells are involved in the immunomodulation of paracoccidioidomycosis, the most prevalent systemic mycosis in Brazil. For this, we evaluated the presence of IL-27 in serum and biopsies of patients treated at a university hospital in Brazil by ELISA, immunohistochemistry, and immunofluorescence. The presence of Tr1 cells (CD4⁺CD45RA⁻CD49b⁺LAG3⁺) in the peripheral blood was analyzed by flow cytometry, using specific antibodies. *In vitro* experiments using peripheral blood from healthy donors were performed to verify the competence of *P. brasiliensis* yeast in inducing the production of IL-27, as well as the polarization of lymphocytes to the Tr1 phenotype. We found that patients with the acute form of PCM present higher serum concentrations of IL-27 and a higher percentage of Tr1 cells in the peripheral blood when compared to patients with the chronic form of the disease and healthy donors. The cytokine IL-27 was also detected in lesions of PCM patients, which was associated with DCs and macrophages. *P. brasiliensis* yeasts from the Pb18 virulent strain were able to induce IL-27 production by both DCs and macrophages. In agreement, we have found that DCs pulsed with Pb 18 yeasts induce a higher frequency of Tr1 lymphocytes *in vitro*. The results suggest that, in addition to Th2 cells previously described as immunosuppressive in severe forms of the disease, IL-27 and Tr1 cells may contribute to the deficient immune response observed in these patients.

Keywords: IL-27, Paracoccidioidomycosis, Tr1 cells, *Paracoccidioides brasiliensis*.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most prevalent a systemic mycosis in Latin America, with a great number of cases found in Brazil, Colombia, and Venezuela (1-3). PCM, caused by the dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*, is the major cause of mortality among systemic mycoses in Brazil, being the eighth cause of mortality due to chronic infectious diseases (4).

The wide spectrum of clinical manifestations of PCM is in accordance with different patterns of the immune response. The acute form (AF), characterized by the involvement of lymph nodes, liver, spleen, and bones in children and young adults (5), present a deficient cellular immune response associated with the inhibition of lymphoproliferative response, increased production of Th2/Th9 cytokines (6-9), such as IL-4, IL-5, IL-10, TGF- β , low levels of IFN- γ and TNF- α , and polyclonal activation of B lymphocytes with the predominant production of IgG4, IgE e IgA (3, 6, 7, 9-12). Meanwhile, the chronic form (CF) is characterized by the presence of mucocutaneous lesions and pulmonary involvement (5), affecting adults over 30 years. The CF patients develop a heterogeneous response with predominant participation of Th17/Th22 cells in addition to IFN- γ , TNF- α , IL-2 and variable amounts of IL-10 and IL-4 (6, 9, 11, 12). Patients with the unifocal CF present milder symptoms due to a preserved Th1 response, which allows the formation of granulomas that partially restrict fungal replication (7, 9). The CF multifocal presents immunosuppression similar to that described in AF patients, which contributes to the severity due to the influence of Th2 and Th9 responses (7, 9).

An intense inflammatory response is mainly described in AF patients, leading to a poor response to antifungal drugs and fungi dissemination to various organs and tissues (13). Corticosteroids were successfully used as adjunctive therapy especially in severe forms of the disease. Due to its immunosuppressive effects, the drug helps decrease tissue damage and exacerbated inflammatory response in patients, a response that can be aggravated by conventional antifungal therapies (13, 14). In this context, mechanisms of inflammatory response containment must be triggered by the immune system in order to control the intense cellular destruction but at

the same time optimize the antifungal response. Studies involving the participation of regulatory T cells (Tregs) and anti-inflammatory cytokines in PCM demonstrated that patients with active PCM, mainly in the most disseminated forms of the disease, presents a higher production of suppressor cytokines such as IL-10 and TGF- β , associated with a reduction in the production of IFN- γ and TNF- α (6, 7, 11, 12, 15).

It is suggested that Treg cells participate in the immunosuppression observed in patients with active PCM since they present a greater amount of these cells when compared to the treated individuals (16, 17). These findings confirm the relationship between the most severe forms of the disease and depression in the cellular immune response, determinant for the disease progression. The immune suppression observed in some infectious diseases was also associated with an increase in the frequency of type 1 regulatory cells (Tr1) (18, 19). These cells are characterized by the absence of expression of the transcription factor FOXP3 (20), expression of CD49b and LAG3 (21), besides the secretion of large amounts of IL-10 and TGF- β (21, 22). The immunosuppressive properties of Tr1 contribute to the negative regulation of the immune response, maintaining the tolerance and suppression in autoimmune diseases. Based on these characteristics, Tr1 cells have been suggested as a potential treatment for various immuno-related disorders (23).

Cytokines of the IL-12 family as IL-12, IL-23, IL-27, and IL-35 are heterodimeric molecules with an important function in the stimulation and regulation of immune response (24, 25). The IL-27, composed by subunits Ebi3 (Epstein-Barr virus-induced gene 3) and p28, was described as responsible for the induction of IL-10 production and inhibition of differentiation of Th17 (26). Thus, after the activation of macrophages and dendritic cells by patterns recognition receptors (PRRs), the production of IL-27 control the tissue inflammation, inhibiting the polarization of Th17 cells and promote the development of IL-10 producing-Tr1 cells limiting tissue destruction and inflammatory processes (26-32). IL-27 was also described as inducing macrophages deactivation. During the infection by *Mycobacterium tuberculosis*, IL-27 influences the effector function of macrophages once the treatment with IL-12 and the soluble receptor to IL-

27 (srIL-27) reduced the *M. tuberculosis* growth (33). The expression of IL-27 receptor (IL-27R) on T cells was associated with the increase of susceptibility to infection by *M. tuberculosis* and IL-27 receptor-deficient mice (IL-27R^{-/-}) showed a reduction on the bacterial load (34).

The anti-inflammatory role of IL-27 was also described in other infectious disease. In the experimental model of visceral leishmaniasis, IL-27 has been associated with susceptibility through modulation the Th1/Th17 profile (35). Patients with visceral leishmaniasis presents high serum levels of this cytokine (36). In the experimental model of *Plasmodium berghei* infection IL-27R^{-/-} mice had a higher percentage of T CD4⁺ memory cells on spleen and liver and an increase of IL-2, resulting in pathogen clearance and control of the infection (37).

The few studies that have addressed the role of IL-27 on fungal infections indicate that the control of infection is associated with reduced production of the IL-27, while higher levels of this cytokine are related to the development of the disease (38). In fact, IL-27 was described to suppress the protective response to *Candida parapsilosis* once IL-27R^{-/-} infected mice had higher serum levels of pro-inflammatory cytokines, IFN- γ and IL-17, resulting in control of the infection (39). Considering the involvement of IL-27 in suppressing cell mediated immune responses and inducing Tr1 polarization, we aimed to evaluate its role in human paracoccidioidomycosis.

Materials and Methods

Casuistic

We included sera samples, peripheral blood and biopsies specimens from patients with proven PCM attended at the Hospital de Clínicas of State University of Campinas (UNICAMP). PCM diagnosis was established by fungus detection in biological samples. The study only included PCM patients recruited before the beginning or within the first month of treatment. Patients in use of anti-inflammatory or antibiotics, or with concomitant inflammatory, infectious, autoimmune diseases or cancer were excluded.

For some experiments, we use peripheral venous blood from healthy donors. This study was approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (CAAE 67805216.8.0000.5404), all participants wrote informed consent.

Serum IL-27

Peripheral venous blood was collected from healthy donors (controls) and from PCM patients in clot activator tubes. The samples were centrifuged 2500 rpm for 10 minutes at room temperature. The serum was used for IL-27 quantification by ELISA (Duoset-R&D Systems, United States), according to the manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry

Slides with histological sections of lymph nodes and oral mucosa from PCM patients were immersed in 5% Trilogy solution (Sigma-Aldrich) and placed in a steamer for 15 min in order to deparaffinize, hydrate, and recover the antigens. Endogenous peroxidase was blocked with hydrogen peroxide (H₂O₂) 10v, followed by washing with distilled water and incubating with protein block (Dako – USA). The slides were incubated overnight with the primary monoclonal antibody against IL-27 (ab115671, Abcam, UK) and then washed with Phosphate Buffered Saline with bovine serum albumin 2% (PBS-BSA). The slides were incubated with a polymer containing peroxidase (Envision, Dako – USA) and revealed by the addition of 0,6% chromogen substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution (Sigma-Aldrich Chemical – USA), followed by activation with hydrogen peroxide 30v and nuclear staining with Harris hematoxylin (Sigma-Aldrich – USA). The sections were dehydrated, diaphanized and assembled with Entelan (Sigma-Aldrich – USA). The sections were examined by optical microscope (Nikon, Japan). For quantitative analysis, the IL-27 positive area (brown stained) was selected, and the results were expressed in mm² using the program ImageJ®.

Immunofluorescence

Histological sections of lymph nodes from 6 patients with PCM were included in silanized slides and antigen retrieved to exposure the antigenic

epitopes. The sections were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-IL-27p28 polyclonal antibody (ab115671, Abcam, UK), and then was added anti-CD68 or anti-CD209 / DC-SIGN antibodies, produced in mice (both from Biolegend, USA) for 1 hour. Subsequently, the cuts were incubated in secondary antibodies conjugated to Alexa 488 (anti-rabbit, Invitrogen, USA) (green staining) and Alexa 647 (anti-mouse, Abcam, UK) (pink staining). For better characterization and visualization, the cell nucleus (DNA) was stained by Hoechst reagent (Invitrogen, USA). In order to reduce the auto fluorescence, the sections were treated with CuSO₄ 10mM diluted in ammonium acetate buffer 50mM (ph 5) for 10 minutes in the dark. The sections were washed and examined under confocal microscopy SP8 (Leica, Germany).

Frequency of Tr1 Cells

Peripheral blood mononuclear cells from PCM patients and healthy were stained with a set of surface-labeling antibodies anti-human CD4-FITC, anti-human CD49b-PE, anti-human LAG3-PE-Cy7 and anti-human CD45RA-PE-Cy5 (all from Biolegend, USA) diluted in PBS-BSA-A (PBS – Bovine Serum Albumin 0,1% - Sodium Azide 0,5%), followed by incubation for 30 minutes at 4°C in the dark. After wash, 2% formaldehyde was added and the cells were analyzed by flow cytometer (FACs Verse, BD Biosciences, USA). The analysis was carried out using the FlowJo program, version 10 (FlowJo, LLC, USA).

***P. brasiliensis* yeast cells**

Isolates of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18 and Pb265) were cultivated on Fava-Netto medium, at 36°C for 5-7 days and used as previously described (40). After, yeast cells were resuspended in sterile phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.2) and separated by Vortex agitation with 0.5-mm-diameter glass beads, for 5 min. The cell suspension was incubated at 37°C for 15 min and the supernatant was collected. The number and the viability of the fungal cells were determined in a Neubauer chamber in the presence of trypan blue dye. Suspensions containing more

than 85% of viable fungi were used. Alternatively, *P. brasiliensis* yeast were heat-killed at 60°C for 1h and used in some experiments.

Purification of CD14⁺ and CD3⁺ cells and differentiation of CD14⁺ cells into macrophages and dendritic cells (DCs).

Monocytes (CD14⁺ cells) and T lymphocytes (CD3⁺ cells) were isolated from PBMCs of healthy using positive immunomagnetic selection system (MACs® - Miltenyi Biotech, Germany), according to the manufacturer's instructions. We obtained populations with >95% purity evaluated by flow cytometry (data not shown). Dendritic cells (DCs) were differentiated from monocytes (CD14⁺ cells) with treatment with human recombinant cytokines IL-4 (50 ng/mL) and GM-CSF (50 ng/mL) (Biolegend) (added at day 0 and 2) for 5 days. Macrophages were differentiated from monocytes (CD14⁺ cells) by treatment with GM-CSF (50 ng/mL) (Biolegend) (added at day 0 and 2) for 7 days. The cells were evaluated by microscopy and flow cytometry to confirm the differentiation (data not shown). The cells were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco – Thermo Fisher Scientific – USA), supplemented with 2mM L-glutamine, inactivated fetal calf serum (10%), 100U/mL gentamycin and 1mM sodium pyruvate (all from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, United States).

Quantification of IL-27 production by *P. brasiliensis* yeasts

After differentiation, DCs and macrophages were stimulated with *P. brasiliensis* yeasts cells (Pb18, Pb18 heat-killed or Pb265) and maintained at 37°C with 5% CO₂ for 24h. The cell phenotype was confirmed by flow cytometry (supplementary figure 2 and 3, and supplementary table 1 and 2), and the supernatant was stored at -20°C until use. The production of IL-27 by DCs and macrophages was determined in culture supernatants by ELISA (Duoset-R&D Systems, United States), according to the manufacturer's instructions.

Coculture

Monocyte-derived DCs were treated (or not) with recombinant IL-27 (rhIL27) and stimulated (or not) with *P. brasiliensis* yeasts cells for 2 hours. Subsequently, the culture supernatant was removed and autologous T cells (CD3⁺ cells) were added (ratio 1 DC: 10 lymphocytes) and maintained for 5 days at 37°C with 5%CO₂. The cell pellet was collected and stained with antibodies anti- CD4-FITC, CD49b-PE, LAG3-PE-Cy7 and CD45RA-PE-Cy5 (all from Biolegend, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (Jandel Corporation). The normal distribution of quantitative variables was verified by the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests. Continuous variables with non-normal distribution were expressed as median and analyzed by the Mann-Whitney test for comparison of two independent groups or by the Kruskal-Wallis test for 3 or more groups, with Dunn's post test. Comparisons between two or more continuous variables in the same group were made by applying the Friedman test, with Dunn's post test. Results were considered statistically significant when the probability was less than 5% ($p < 0.05$).

Results

Donors' characteristics:

Table 1 shows the clinical characteristics of the study groups [patients with PCM, acute (AF, n=9) and chronic (CF, n=12) form and healthy donors (n=21)]. Healthy donors presented an average age of 32 years old and among patients, the average age was 11 years old for FA and 46 years old to CF. The AF patients predominantly presented lymph nodes involvement, while CF patients presented skin followed by lungs involvement.

Table 1.
Clinical characteristics of study groups

Characteristics	Acute Form	Chronic Form	Healthy Donors
Sex (Male/Female)	5/4	8/4	7/14
Age (years, mean $\pm$ SD)	11,7 $\pm$ 5,13	46,8 $\pm$ 6,2	32,4 $\pm$ 8,8
Affected organs			
Lymph nodes	7	3	N/A
Lungs	2	8	N/A
Skin	2	8	N/A
Liver	2	0	N/A
Spleen	1	0	N/A
N/A: Not applicable			

Sera from patients with severe of PCM have elevated levels of serum IL-27

The concentration of IL-27 in sera of patients with acute form (AF), chronic multifocal form (CF-MF) and chronic unifocal form (CF-UF) of PCM as well in healthy controls (C) were evaluated by ELISA (Figure 1). A higher concentration of IL-27 was found in patients with severe forms of PCM (AF and CF-MF) when compared to patients with milder forms of the disease (chronic unifocal form) and healthy donors.

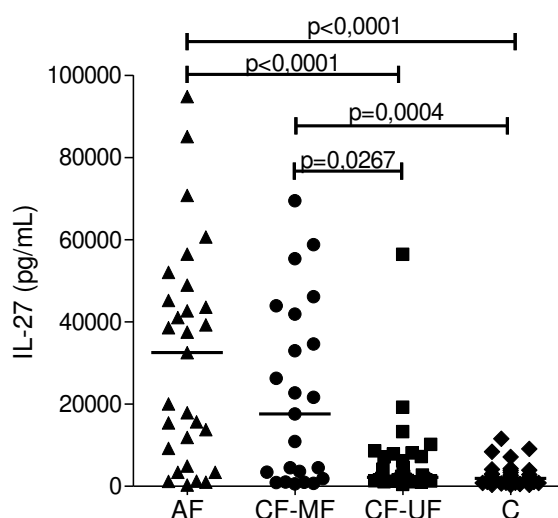


Figure 1. IL-27 concentrations in sera from patients with different clinical forms of PCM and healthy donors. Serum from patients with different clinical forms of PCM was used for quantification of IL-27 by ELISA. AF: Acute form (n=29), CF-MF: Chronic Multifocal Form (n=24), FC-UF: Chronic Unifocal Form (n=30) and C: healthy donors (n=40). The bars represent the median. Kruskal Wallis test, with Dunn post-test. $p < 0.05$.

IL-27 detection in lymph nodes and oral mucosa from patients with PCM

For IL-27 detection in tissues, immunohistochemistry assay was performed in lymph nodes and oral mucosa sections of patients with acute and chronic forms, respectively. Figure 2 is representative of lymph node sections of patients with AF (A and B) and oral mucosa of patients with CF of PCM (C and D), in which the presence of IL-27⁺ cells (brown staining) was detected mainly inside granulomas. The measurement of IL-27 positive area (brown staining - E) showed a higher expression of the cytokine in lymph nodes compared with oral mucosa.

Detection of IL-27 in association with antigen-presenting cells

In order to detect IL-27 as well the composition of the cell infiltrate in lymph nodes of PCM patients we performed confocal microscopy in the biopsies of 6 patients. We observed IL-27 in association with DCs, as well as macrophages (Figure 3). DCs (A) and macrophages (B) were marked in pink (Alexa 647), in addition to cytoplasmic IL-27, labelled in green (Alexa 488).

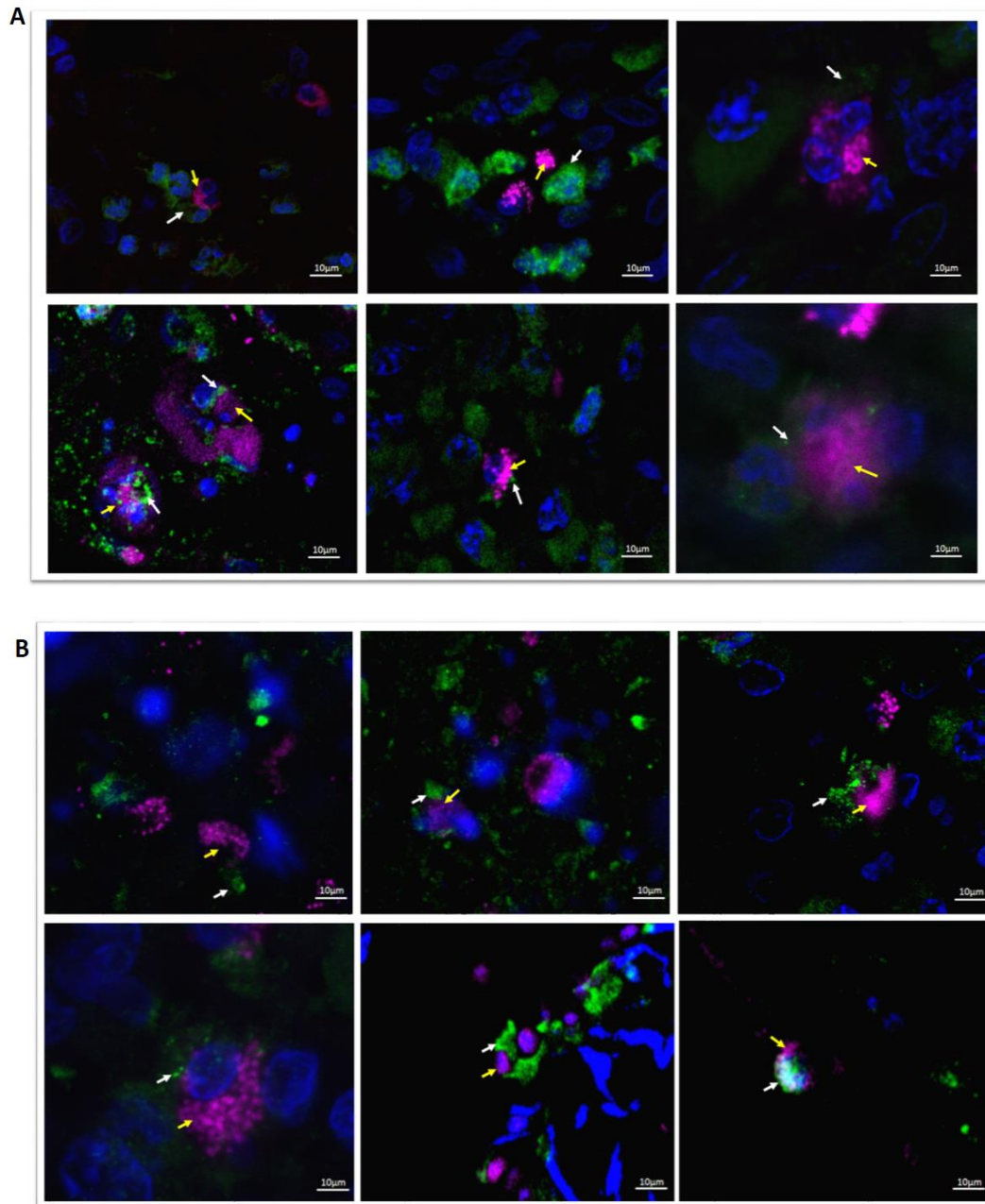


Figure 3. Antigen presenting cells associated with IL-27 in lymph node biopsies of PCM patients. Detection of antigen presenting cells and IL-27 in lymph nodes (n=6) of patients with PCM by confocal immunofluorescence. In both panels, yellow arrow indicates antigen-presenting cells in tissues (dendritic cells in panel A and macrophages in panel B). These cells were found adjacent to IL-27 (white arrow). The nuclei were stained with DAPI.

The frequency of Tr1 cells is elevated in patients with the AF of PCM

After detecting the presence of IL-27 in the serum and in lesions of PCM patients, we quantified the frequency of Tr1 cells ($CD4^+CD45RA^-CD49b^+LAG3^+$) by flow cytometry (Figure 4). For this, peripheral blood of 20 patients with PCM was collected, being 9 of them with AF and 12 with CF, and 21 healthy donors. Our results showed that patients with AF presented a higher frequency of $CD4^+CD45RA^-CD49b^+LAG3^+$ cells when compared to patients with CF and healthy controls. In addition, we observed that patients with CF had a Tr1 cell frequency very similar to healthy donors.

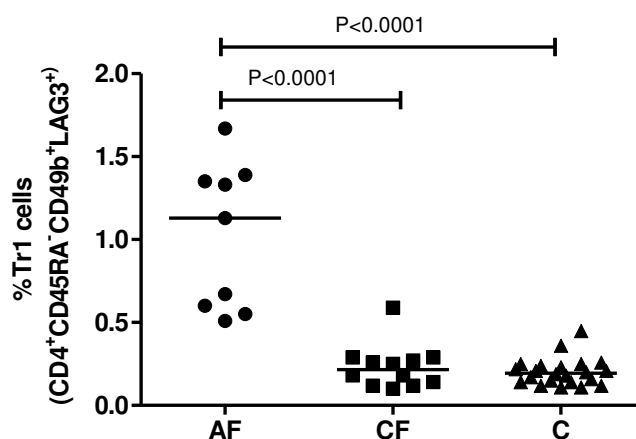


Figure 4. Frequency of Tr1 cells in the peripheral blood of patients with PCM and controls. Peripheral blood were collected from patients and healthy donors and mononuclear cells were stained with Tr1-specific antibodies. The frequency of Tr1 positive cells were analyzed by flow cytometry. AF: acute form (n= 9); CF: chronic form (n=12); C: healthy controls (n=21). The horizontal bars represent the median. Kruskal Wallis test with Dunn post-test. $p < 0.05$.

P. brasiliensis yeast cells induce IL-27 production by macrophages and DCs

In order to verify if yeasts of *P. brasiliensis* are capable of inducing IL-27 production by antigen-presenting cells, dendritic cells and macrophages from healthy donors were stimulated with different yeast preparations

(Pb18, Pb18 heat-killed or Pb265) for 24h. Afterward, the IL-27 production was quantified by ELISA. We found that both dendritic cells and macrophages produce IL-27 in the presence of viable yeasts of Pb18. The avirulent Pb265 strain and heat killed Pb18 yeast were not capable to induce IL-27 by these cells

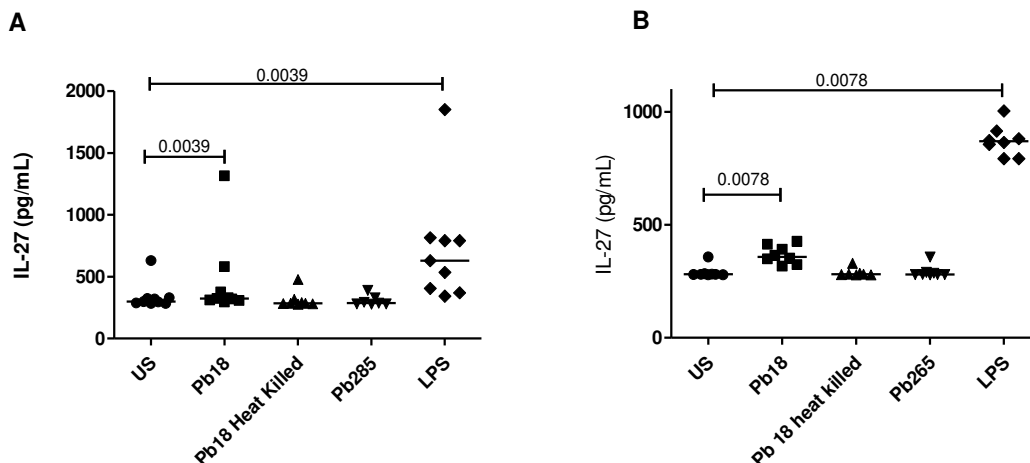


Figure 5. IL-27 production induced by *P. brasiliensis* yeasts. DC (A) and macrophages (B) derived from healthy donors were stimulated for 24h with different strains of *P. brasiliensis* and the supernatant was used for IL-27 quantification by ELISA. Pb18: high virulence strain; Pb18 heat killed: high virulence strain killed by heat; Pb265: low virulence strain; LPS: lipopolysaccharide; US: unstimulated. The horizontal bars represent the median. Paired t-test. $p < 0.05$.

***P. brasiliensis* yeast cells induce polarization of Tr1 cells**

Since we found that viable Pb18 yeast induces IL-27 production by DC and macrophages, we verified whether yeasts of *P. brasiliensis* are able to induce Tr1 polarization in vitro. For that, we performed cocultures of lymphocytes and DCs from 11 healthy donors stimulated or not with Pb18 strain, followed by specific Tr1 immunophenotyping ($CD4^+CD45RA^-CD49b^+LAG3^+$). As seen in Figure 6, we found that the addition of Pb18 in the cells induced the polarization to the Tr1 profile when compared to non-stimulated cells. As expected, the addition of IL-27 also promoted Tr1 polarization.

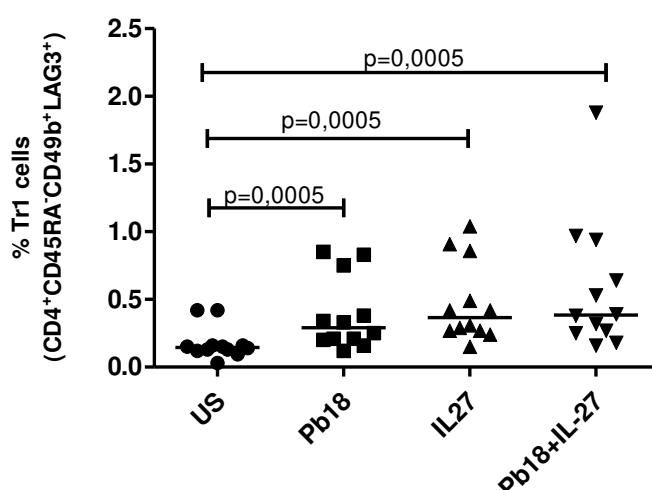


Figure 6. Induction of Tr1 cells by DCs stimulated with Pb18 and IL-27.

T lymphocytes from healthy controls (n=12) were co-cultured with stimulated DCs (Pb18) or not (US) for 2h and analyzed for the Tr1 (CD4+CD45RA-CD49b+LAG3+) profile by flow cytometry. The horizontal bars represent the median. Friedman test, with Dunn post-test. $p < 0.05$.

Discussion

Our study aimed to verify the participation of cytokine IL-27 in human infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. We initially found that patients with the acute form of PCM had higher serum IL-27 concentrations when compared to patients with the chronic form of the disease and healthy controls. In addition, we detected IL-27 in lesions of patients with PCM in both the oral mucosa and lymph nodes. It is well established that patients with the most severe and widespread forms of PCM have suppression of cellular immune response (6, 24, 25). In this context, the production of IL-27 a cytokine capable of inhibiting Th1 and Th17 responses, could contribute to the deficient antifungal response. Higher IL-27 production, evidenced by higher serum cytokine concentrations in patients with acute and chronic multifocal PCM could impact macrophage activation by inhibiting Th1 response (64-66) and / or suppressing the Th17 response (67), leading to the most severe condition of the disease. Several studies have shown that human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* are downmodulated by IL-27 that is able to inhibit TNF- α and

IL-12 as well as by the induction of anti-inflammatory cytokine IL-10 and inhibition of phagosomic acidification (47-49, 53). It has also been described that the suppressive effect of IL-27 may occur through the induction of IL-10 producing Tr1 cells (42, 68, 69).

Thus, our next step was to verify the presence of Tr1 cells in the peripheral blood of patients with both clinical forms of PCM and compare them to control subjects. Our results showed that patients with AF have a higher frequency of Tr1 cells than CF patients and healthy controls. These findings suggest that there is a relationship between the immunosuppressive profile found in the more severe and widespread forms of PCM and the high frequency of Tr1 cells in peripheral blood. Moreover, they agree with the findings of higher serum concentration and the detection of IL-27 predominantly in lymph nodes of patients with the AF of PCM.

To investigate whether IL-27 is directly induced by the presence of *P. brasiliensis*, we performed in vitro assays in which we verified the ability of dendritic cells and macrophages to produce IL-27 when stimulated with fungal yeast. For these experiments we tested strains Pb18 (high virulence), Pb265 (low virulence) and heat-killed Pb18 yeasts. Viable yeasts from the Pb18 strain were able to induce IL-27 production by both macrophages and DCs, while low virulence strain fungi as well as heat-killed Pb18 yeasts did not have the same effect.

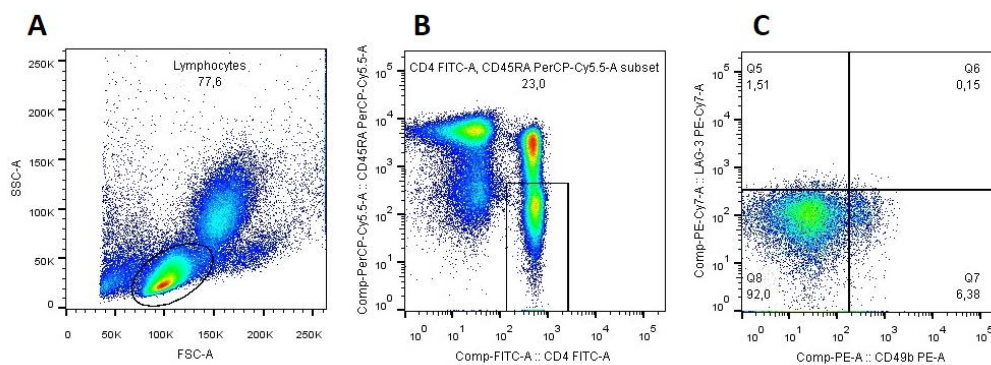
These findings indicate a direct relationship between the presence of the pathogen and active disease and the induction of IL-27 production.

Finally, coculture experiments showed that in the presence of DCs pulsed with *P. brasiliensis*, lymphocytes polarized to the Tr1 regulatory profile, like that induced by recombinant IL-27. In fact, we found an increase in the frequency of CD4 + CD49b + LAG3 + CD45RA + cells, a phenotype that characterizes the Tr1 population, both in the presence of fungal-pulsed DCs and IL-27.

Our study showed a novel component of the fungus-induced inhibitory response represented by IL-27-induced Tr1 cells. In fact, despite their low frequency in the peripheral blood, Tr1 cells, through the production of IL-10, could contribute to the imbalance of cellular immune response and consequent to the worsening and spread of PCM.

In summary, our results showed that patients with the acute form of PCM have higher serum IL-27 concentrations and a higher percentage of Tr1 cells when compared to patients with chronic disease form and healthy controls. Cytokine IL-27 was also detected in lesions of patients with PCM and in the supernatant of in vitro stimulated DCs and macrophages with viable Pb18 yeasts. Cocultures of DCs and T lymphocytes showed the induction of Tr1 cell polarization in the presence of *P. brasiliensis* yeasts. These results indicate that IL-27-induced Tr1 cells may be one of the mechanisms that result in the deficient immune response observed in severe and widespread forms of the disease.

Supplementary Figures



Supplementary figure 1. Analysis of Tr1 cells by flow cytometry. (A) dot-plot graph demonstrating the lymphocyte population gate based on size (FSC-A) and granularity (SSC-A); **(B)** Selection of the CD4 + and CD45RA- lymphocyte population; **(C)** Determination of the percentage of LAG-3 and CD49b double positive cells.

Supplementary Table 1: Monocyte differentiation in macrophages according to the geometric mean by specific markers.

Markers	Macrophages Geometric Mean	Monocytes Geometric Mean
CD68	80,5	30,4
CD80	65,5	48,4
CD11b	329	157
MHC II	12980	12539

Supplementary Table 2: Monocyte differentiation in dendritic cells according to the geometric mean by specific markers.

Marker	Dendritic Cells Geometric Mean	Monocytes Geometric Mean
CD14	349	6,99
CD11c	254	9,52
CD1a	182	7,68
MHC II	71,1	6,59
CD86	110	12,8

Financial support

This study was financially supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) – Finance Code 001, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil #308746/2013-9.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Goveia A, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(3):390-4.
2. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun.* 1989;57(8):2289-94.
3. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical microbiology reviews.* 1993;6(2):89-117.
4. San-Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1993;31(2):99-113.
5. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(5):715-40.
6. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaiordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2002;4(2):139-44.
7. Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Medical mycology.* 2002;40(2):153-9.
8. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2001;13(4):248-52.
9. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH, Longhi LN, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect.* 2013;67(5):470-85.
10. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):209-21.
11. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine.* 2005;32(1):20-9.
12. Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 2006;35(3-4):207-16.
13. Benard G, Campos AF, Netto LC, Gonçalves LG, Machado LR, Mimicos EV, et al. Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? *Med Mycol.* 2012;50(6):641-8.
14. Gryscek RC, Pereira RM, Kono A, Patzina RA, Tresoldi AT, Shikanai-Yasuda MA, et al. Paradoxical reaction to treatment in 2 patients

with severe acute paracoccidioidomycosis: a previously unreported complication and its management with corticosteroids. *Clin Infect Dis*. 2010;50(10):e56-8.

15. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol*. 2006;177(9):5811-8.

16. Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 2010;78(10):4392-401.

17. Calich VLG, Mamoni RL, Loures FV. Regulatory T cells in paracoccidioidomycosis. *Virulence*. 2018;1-12.

18. KM. C. Regulatory T cells in hepatitis C virus infection.: . *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*; 2007. p. S327-30.

19. Koch K, Koch N, Sandaradura de Silva U, Jung N, Schulze zur Wiesch J, Fätkenheuer G, et al. Increased Frequency of CD49b/LAG-3(+) Type 1 Regulatory T Cells in HIV-Infected Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(12):1238-46.

20. Vieira PL CJ, Minaee, S ONE, Barrat FJ, Boonstra A et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*; 2004. p. 5986-93.

21. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389(6652):737-42.

22. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:39-68.

23. Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(5):566-71.

24. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*. 2012;13(8):722-8.

25. Thompson A, Orr SJ. Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections. *Cytokine*. 2018.

26. El-behi M, Ciric B, Yu S, Zhang GX, Fitzgerald DC, Rostami A. Differential effect of IL-27 on developing versus committed Th17 cells. *J Immunol*. 2009;183:4957-67.

27. Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, et al. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity*. 2003;19(5):645-55.

28. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2006;7(9):929-36.

29. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol*. 2007;8(12):1380-9.

30. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka

- LA, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1363-71.
31. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2009;183(4):2435-43.
 32. Pot C, Apetoh L, Awasthi A, Kuchroo VK. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of Th17 cells by IL-27. *Semin Immunol.* 2011;23:438-45.
 33. Robinson CM, Nau GJ. Interleukin-12 and interleukin-27 regulate macrophage control of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 2008;198(3):359-66.
 34. Torrado E, Fountain JJ, Liao M, Tighe M, Reiley WW, Lai RP, et al. Interleukin 27R regulates CD4⁺ T cell phenotype and impacts protective immunity during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine.* 2015;212(9):1449-63.
 35. Quirino GF, Nascimento MS, Davoli-Ferreira M, Sacramento LA, Lima MH, Almeida RP, et al. Interleukin-27 Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17-Neutrophil Response. *Infection and immunity.* 2016.
 36. Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos ML, Cunha LC, Lino MT, de Oliveira MF, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS neglected tropical diseases.* 2016;10(1):e0004375.
 37. Gwyer Findlay E, Villegas-Mendez A, O'Regan N, de Souza JB, Grady LM, Saris CJ, et al. IL-27 receptor signaling regulates memory CD4⁺ T cell populations and suppresses rapid inflammatory responses during secondary malaria infection. *Infection and immunity.* 2014;82(1):10-20.
 38. Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity.* 2012;37(6):960-9.
 39. Patin EC, Jones AV, Thompson A, Clement M, Liao CT, Griffiths JS, et al. IL-27 Induced by Select *Candida* spp. via TLR7/NOD2 Signaling and IFN-beta Production Inhibits Fungal Clearance. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2016;197(1):208-21.
 40. Kashino SS, Calich VL, Burger E, Singer-Vermes LM. In vivo and in vitro characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia.* 1985;92(3):173-8.
 41. Borghi M, Renga G, Puccetti M, Oikonomou V, Palmieri M, Galosi C, et al. Antifungal Th Immunity: Growing up in Family. *Front Immunol.* 2014;5:506.
 42. Casadevall A, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2003;1(1):17-24.
 43. Romani L, Puccetti P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol.* 2006;14(4):183-9.
 44. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):275-88.
 45. Wüthrich M, Deepe GS, Klein B. Adaptive immunity to fungi. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:115-48.
 46. Pagliari C, Sotto MN. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. *Am J Dermatopathol.* 2003;25(2):107-12.
 47. Holscher C, Holscher A, Ruckerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T,

- et al. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol.* 2005;174(6):3534-44.
48. Robinson CM, Jung JY, Nau GJ. Interferon-gamma, tumor necrosis factor, and interleukin-18 cooperate to control growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Cytokine.* 2012;60(1):233-41.
 49. Iyer SS, Ghaffari AA, Cheng G. Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. *J Immunol.* 2010;185(11):6599-607.
 50. Abdalla AE, Li Q, Xie L, Xie J. Biology of IL-27 and its role in the host immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Biol Sci.* 2015;11(2):168-75.
 51. Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon-gamma-mediated pathways. *J Exp Med.* 2007;204(1):141-52.
 52. Zhang J, Qian X, Ning H, Yang J, Xiong H, Liu J. Activation of IL-27 p28 gene transcription by interferon regulatory factor 8 in cooperation with interferon regulatory factor 1. *J Biol Chem.* 2010;285(28):21269-81.
 53. Pirhonen J, Siren J, Julkunen I, Matikainen S. IFN- α regulates Toll-like receptor-mediated IL-27 gene expression in human macrophages. *J Leukoc Biol.* 2007;82(5):1185-92.
 54. Robinson CM, Nau GJ. Interleukin-12 and interleukin-27 regulate macrophage control of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 2008;198(3):359-66.
 55. Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, et al. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L.* major infection. *Immunity.* 2001;15(4):569-78.
 56. Kraft JD, Horzempa J, Davis C, Jung JY, Pena MM, Robinson CM. Neonatal macrophages express elevated levels of interleukin-27 that oppose immune responses. *Immunology.* 2013;139(4):484-93.
 57. Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1372-9.
 58. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, et al. IL-27 blocks ROR γ c expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol.* 2009;182(9):5748-56.
 59. Hirahara K, Ghoreschi K, Yang XP, Takahashi H, Laurence A, Vahedi G, et al. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. *Immunity.* 2012;36(6):1017-30.
 60. Abbas AK, Lichtmann AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology.* Philadelphia: Elsevier Saunders 2018.

5. DISCUSSÃO

Nosso trabalho teve por objetivo verificar a participação da citocina IL-27 na infecção humana pelo *Paracoccidioides brasiliensis*. Constatamos inicialmente que pacientes com a forma aguda da PCM apresentavam maiores concentrações séricas de IL-27 quando comparados aos pacientes com a forma crônica da doença e controles saudáveis. Além disso, detectamos IL-27 em lesões de pacientes com PCM tanto na mucosa oral como em linfonodos.

Está bem estabelecido que pacientes portadores das formas mais graves e disseminadas da PCM apresentam supressão da resposta imunológica celular (6, 24, 25). Neste contexto, a produção de IL-27, citocina com capacidade de inibir as respostas Th1 e Th17, poderia contribuir para a resposta antifúngica deficitária. Adicionalmente, a indução da produção de uma citocina com propriedades anti-inflamatórias teria um efeito no restabelecimento da homeostasia do hospedeiro. Estudos em pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica demonstraram concentrações séricas elevadas de IL-27, principalmente naqueles com quadro exacerbado (61). De maneira similar, concentrações elevadas de IL-27 no lavado broncoalveolar foram encontradas em pacientes asmáticos com as formas mais graves da doença (62).

Nossas análises histológicas (imunohistoquímica e imunofluorescência) evidenciaram a presença de IL-27 em associação com macrófagos e DCs. A produção de IL-27 por células mielóides foi descrita em vários estudos, como o de Pflanz *et al* (2002) que, a partir da análise de painéis de cDNA humano e de camundongos por RT-PCR, detectou maior expressão gênica das subunidades p28 e EBI3, que compõem a molécula completa da IL-27, principalmente em monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos (63).

Uma maior produção de IL-27, evidenciada por concentrações séricas mais elevadas da citocina em pacientes com a forma aguda e a forma crônica multifocal da PCM poderia ter impacto na ativação de macrófagos

pela inibição da resposta Th1 (64-66) e/ou na supressão da resposta Th17 (67), levando à condição mais grave da doença. Vários estudos mostraram que macrófagos humanos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* têm sua resposta modulada negativamente pela IL-27. A ação da IL-27 ocorre a partir da supressão de TNF- α e IL-12, citocinas necessárias para ativação de macrófagos, assim como para indução da produção de citocinas anti-inflamatórias e inibição da acidificação fagossômica (47-49, 53). Baseado nesses achados, Abdalla *et al* (2015) analisaram e comprovaram o papel imunossupressor da IL-27 sobre a resposta efetora de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* em experimentos nos quais neutralizaram a citocina pelo tratamento com receptor solúvel de IL-12 e IL-27 (srIL-27).

Além dos mecanismos acima descritos, por meio da indução coordenada do fator de transcrição c-Maf, da produção de IL-21 e do coestimulador ICOS, a IL-27 atua também induzindo células Tr1 produtoras de IL-10 (42, 68-70). Quando ativadas, essas células secretam IL-10, que limita a intensidade das respostas imunológicas mediante a inibição da expressão de moléculas de MHC-II, moléculas coestimulatórias e da produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por APCs, diminuindo assim a resposta de células T efetoras (34, 71).

Desta forma, nosso próximo passo foi verificar a presença de células Tr1 no sangue periférico de pacientes com ambas formas clínicas da PCM e compará-los aos indivíduos controles. Nossos resultados mostraram que pacientes com FA apresentam maior frequência de células Tr1 quando comparados a pacientes com FC e controles saudáveis. Observamos também uma frequência similar entre pacientes portadores da FC e controles saudáveis. Esses achados sugerem haver uma relação entre o perfil imunossupressor encontrado nas formas mais graves e disseminadas da PCM e a frequência elevada de células com perfil Tr1 no sangue periférico. Além disso estão de acordo com os achados de maiores concentrações séricas e locais de IL-27.

Para investigar se a IL-27 é induzida diretamente pela presença do *P. brasiliensis*, realizamos ensaios *in vitro* no qual verificamos a capacidade

de células dendríticas e macrófagos em produzir IL-27 quando estimulados com leveduras do fungo. Para estes experimentos testamos leveduras das cepas Pb18 (alta virulência), Pb265 (baixa virulência) e leveduras Pb18 mortas pelo calor. Leveduras viáveis da cepa Pb18 foram capazes de induzir a produção de IL-27 tanto por macrófagos como por DCs, enquanto fungos da cepa de baixa virulência, bem como leveduras Pb18 mortas pelo calor não tiveram o mesmo efeito.

Esses achados indicam haver uma relação direta entre a presença do patógeno que caracteriza a doença em atividade e a indução da produção da IL-27.

Por fim, para verificar se leveduras de *P. brasiliensis* eram capazes de induzir a polarização de células Tr1 realizamos experimentos de cocultura nos quais células dendríticas de doadores saudáveis foram pulsadas com cepa virulenta de *P. brasiliensis* e cultivadas com linfócitos autólogos. Nossos achados mostraram que na presença de *P. brasiliensis*, os linfócitos polarizaram para o perfil regulatório Tr1, semelhante ao induzido pela IL-27 recombinante. Por meio de ensaios de citometria de fluxo verificamos um aumento da frequência de células CD4⁺CD49b⁺LAG3⁺CD45RA⁺, fenótipo que caracteriza a população Tr1, tanto na presença de DCs pulsadas com o fungo como de IL-27. Os resultados obtidos nos ensaios de cocultura estão de acordo com os achados *ex vivo* de uma maior frequência de células Tr1⁺ em pacientes com a FA da PCM, sugerindo que esse subtipo celular contribui com o estado de imunossupressão que caracteriza esta forma da doença.

Vários estudos avaliaram o papel das células T reguladoras clássicas (Foxp3⁺) nas respostas de defesa ao *P. brasiliensis* tanto doença humana (23, 72) como nos modelos experimentais (73-76). Em especial na PCM humana, os mecanismos envolvidos na imunossupressão observada principalmente nas formas mais graves e disseminadas da doença têm sido relacionados à produção de citocinas supressoras como a IL-10 (16). Pacientes com PCM ativa apresentam um número elevado de células Treg

no sangue periférico, quando comparados a indivíduos tratados e controles saudáveis (24, 25). Além disso, essas células T reguladoras apresentam expressão elevada da molécula CTLA-4 indicando sua participação na supressão da resposta imunológica observada na doença (24).

Além da resposta mediada por Treg, vários estudos mostraram que pacientes portadores da FA apresentam um perfil de resposta Th2 com uma maior produção de IL-4, IL-5 e IL-10, confirmando a presença de um ambiente supressor nessa forma da doença (14). Neste contexto, os resultados do presente trabalho mostraram um novo componente da resposta inibitória induzida pelo fungo representado pelas células Tr1 induzidas por IL-27. De fato, apesar de sua baixa frequência no sangue periférico as células Tr1, por meio da produção de IL-10 poderiam contribuir para o desequilíbrio da resposta imune celular e, conseqüente, para o agravamento e a disseminação da PCM.

Em resumo nossos resultados mostraram que pacientes com a forma aguda da PCM apresentam maiores concentrações séricas de IL-27 e uma maior porcentagem de células Tr1 quando comparados aos pacientes com a forma crônica da doença e controles saudáveis. A citocina IL-27 também foi detectada em lesões de pacientes com PCM e no sobrenadante de DCs e macrófagos estimulados *in vitro* com leveduras viáveis de Pb18. Coculturas de DCs e linfócitos T mostraram a indução da polarização de células Tr1 na presença de leveduras de *P. brasiliensis*.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que células Tr1 induzidas por IL-27 podem constituir um dos mecanismos que resultam na resposta imunológica deficitária observada nas formas graves e disseminadas da doença.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism (Jandel Corporation). Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram utilizados para avaliação da normalidade dos dados. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição não normal foram expressas em mediana e analisadas pelo teste de Mann-Whitney para comparação de dois grupos independentes ou pelo teste Kruskal-Wallis para 3 ou mais grupos, com pós-teste de Dunn. As comparações entre duas ou mais variáveis contínuas no mesmo grupo foram feitas aplicando-se o teste de Friedman, com pós-teste de Dunn. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaïordanou PM, Goveia A, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(3):390-4.
2. Brummer E, Hanson LH, Restrepo A, Stevens DA. Intracellular multiplication of *Paracoccidioides brasiliensis* in macrophages: killing and restriction of multiplication by activated macrophages. *Infect Immun.* 1989;57(8):2289-94.
3. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(2):89-117.
4. San-Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1993;31(2):99-113.
5. Coutinho ZF SD, Lazera M et al., Brazil Pmi, (1980–1995). Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980–1995). *Cad. Saude Publica* 2002. p. 1441–54.
6. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(5):715-40.
7. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira MeM, Bosco SeM, Bagagli E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(4):e0004606.
8. Vieira GeD, Alves TaC, Lima SM, Camargo LM, Sousa CM. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(1):63-8.
9. Lacaz, Porto, Martins, Heins-Vaccari, Melo. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT, editors. *Tratado de micologia médica lacaz.*: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda 2002. 639-729. p.
10. Bisinelli Júlio C. TFQ, A. Sobrinho Josias, Rapoport Abrão. Manifestações estomatológicas da paracoccidioidomicose. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2001. p. 683-7.
11. Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* 1988;56(3):711-3.
12. Araújo MS S, S. C. O. M. Epidemiologic study of patients with paracoccidioidomycosis in an endemic region of Minas Gerais. *Revista Pós-Grad.* 2000:22-6.
13. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008;165(4-5):209-21.
14. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti CC, Papaïordanou PM, Blotta MH. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 2002;4(2):139-44.
15. Mamoni RL, Nouér SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2002;40(2):153-9.
16. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression

associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001;13(4):248-52.

17. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH, Longhi LN, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. *J Infect*. 2013;67(5):470-85.

18. Benard G, Campos AF, Netto LC, Gonçalves LG, Machado LR, Mimicos EV, et al. Treatment of severe forms of paracoccidioidomycosis: is there a role for corticosteroids? *Med Mycol*. 2012;50(6):641-8.

19. Benard G, Costa AN, Ravanini J, Goulart S, Nicodemo EL, Barbas CS, et al. Fatal acute respiratory distress syndrome in a patient with paracoccidioidomycosis: first case report. *Med Mycol*. 2010;48(3):542-5.

20. Gryschek RC, Pereira RM, Kono A, Patzina RA, Tresoldi AT, Shikanai-Yasuda MA, et al. Paradoxical reaction to treatment in 2 patients with severe acute paracoccidioidomycosis: a previously unreported complication and its management with corticosteroids. *Clin Infect Dis*. 2010;50(10):e56-8.

21. Mamoni RL, Blotta MH. Flow-cytometric analysis of cytokine production in human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2006;35(3-4):207-16.

22. Mamoni RL, Blotta MH. Kinetics of cytokines and chemokines gene expression distinguishes *Paracoccidioides brasiliensis* infection from disease. *Cytokine*. 2005;32(1):20-9.

23. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol*. 2006;177(9):5811-8.

24. Ferreira MC, de Oliveira RT, da Silva RM, Blotta MH, Mamoni RL. Involvement of regulatory T cells in the immunosuppression characteristic of patients with paracoccidioidomycosis. *Infect Immun*. 2010;78(10):4392-401.

25. Calich VLG, Mamoni RL, Loures FV. Regulatory T cells in paracoccidioidomycosis. *Virulence*. 2018;1-12.

26. Araújo EF, Medeiros DH, Galdino NA, Condino-Neto A, Calich VL, Loures FV. Tolerogenic Plasmacytoid Dendritic Cells Control *Paracoccidioides brasiliensis* Infection by Inducing Regulatory T Cells in an IDO-Dependent Manner. *PLoS Pathog*. 2016;12(12):e1006115.

27. KM. C. Regulatory T cells in hepatitis C virus infection.: *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*; 2007. p. S327-30.

28. Koch K, Koch N, Sandaradura de Silva U, Jung N, Schulze zur Wiesch J, Fätkenheuer G, et al. Increased Frequency of CD49b/LAG-3(+) Type 1 Regulatory T Cells in HIV-Infected Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(12):1238-46.

29. Vieira PL CJ, Minaee, S ONE, Barrat FJ, Boonstra A et al. IL-10- secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*; 2004. p. 5986-93.

30. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002;129(4):263-76.

31. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med*. 2013;19(6):739-46.

32. Abdalla AE, Li Q, Xie L, Xie J. Biology of IL-27 and its role in the host immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Biol Sci*. 2015;11(2):168-75.

33. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.

Nature. 1997;389(6652):737-42.

34. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:39-68.

35. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 2004;199(11):1567-75.

36. Häring B, Lozza L, Steckel B, Geginat J. Identification and characterization of IL-10/IFN-gamma-producing effector-like T cells with regulatory function in human blood. *J Exp Med*. 2009;206(5):1009-17.

37. Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordignon C, Narula S, Roncarolo MG. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol*. 2002;32(8):2237-45.

38. Triebel F. LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination. *Trends Immunol*. 2003;24(12):619-22.

39. Zeng H, Zhang R, Jin B, Chen L. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(5):566-71.

40. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol*. 2012;13(8):722-8.

41. Thompson A, Orr SJ. Emerging IL-12 family cytokines in the fight against fungal infections. *Cytokine*. 2018.

42. Batten M, Li J, Yi S, Kljavin NM, Danilenko DM, Lucas S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2006;7(9):929-36.

43. Bosmann M, Haggadone MD, Hemmila MR, Zetoune FS, Sarma JV, Ward PA. Complement activation product C5a is a selective suppressor of TLR4-induced, but not TLR3-induced, production of IL-27(p28) from macrophages. *J Immunol*. 2012;188(10):5086-93.

44. Hause L, Al-Salleh FM, Petro TM. Expression of IL-27 p28 by Theiler's virus-infected macrophages depends on TLR3 and TLR7 activation of JNK-MAP-kinases. *Antiviral Res*. 2007;76(2):159-67.

45. Wirtz S, Becker C, Fantini MC, Nieuwenhuis EE, Tubbe I, Galle PR, et al. EBV-induced gene 3 transcription is induced by TLR signaling in primary dendritic cells via NF-kappa B activation. *J Immunol*. 2005;174(5):2814-24.

46. Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H, et al. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity*. 2003;19(5):645-55.

47. Dokmeci E, Xu L, Robinson E, Golubets K, Bottomly K, Herrick CA. EBI3 deficiency leads to diminished T helper type 1 and increased T helper type 2 mediated airway inflammation. *Immunology*. 2011;132(4):559-66.

48. Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A, et al. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity*. 2003;19(5):657-67.

49. Yoshimoto T, Yasuda K, Mizuguchi J, Nakanishi K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J Immunol*. 2007;179(7):4415-23.

50. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-

inflammatory T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1380-9.

51. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1363-71.

52. Murugaiyan G, Mittal A, Lopez-Diego R, Maier LM, Anderson DE, Weiner HL. IL-27 is a key regulator of IL-10 and IL-17 production by human CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2009;183(4):2435-43.

53. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol.* 1993;150(2):353-60.

54. Gerosa F, Paganin C, Peritt D, Paiola F, Scupoli MT, Aste-Amezaga M, et al. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med.* 1996;183(6):2559-69.

55. Rosas LE, Satoskar AA, Roth KM, Keiser TL, Barbi J, Hunter C, et al. Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to leishmania donovani infection but develop severe liver immunopathology. *Am J Pathol.* 2006;168(1):158-69.

56. Robinson CM, Jung JY, Nau GJ. Interferon-gamma, tumor necrosis factor, and interleukin-18 cooperate to control growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Cytokine.* 2012;60(1):233-41.

57. Robinson CM, Nau GJ. Interleukin-12 and interleukin-27 regulate macrophage control of Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.* 2008;198(3):359-66.

58. Murray PJ, Young RA. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 1999;67(6):3087-95.

59. Patin EC, Jones AV, Thompson A, Clement M, Liao CT, Griffiths JS, et al. IL-27 Induced by Select Candida spp. via TLR7/NOD2 Signaling and IFN- β Production Inhibits Fungal Clearance. *J Immunol.* 2016;197(1):208-21.

60. Bedke T, Iannitti RG, De Luca A, Giovannini G, Fallarino F, Berges C, et al. Distinct and complementary roles for Aspergillus fumigatus-specific Tr1 and Foxp3⁺ regulatory T cells in humans and mice. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(8):659-70.

61. Angata T, Ishii T, Gao C, Ohtsubo K, Kitazume S, Gemma A, et al. Association of serum interleukin-27 with the exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rep.* 2014;2(7).

62. Xie M, Mustovich AT, Jiang Y, Trudeau JB, Ray A, Ray P, et al.

63. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4⁺ T cells. *Immunity.* 2002;16(6):779-90.

64. Holscher C, Holscher A, Ruckerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T, et al. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J Immunol.* 2005;174(6):3534-44.

65. Yoshida H, Hamano S, Senaldi G, Covey T, Faggioni R, Mu S, et al. WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection. *Immunity.* 2001;15(4):569-78.

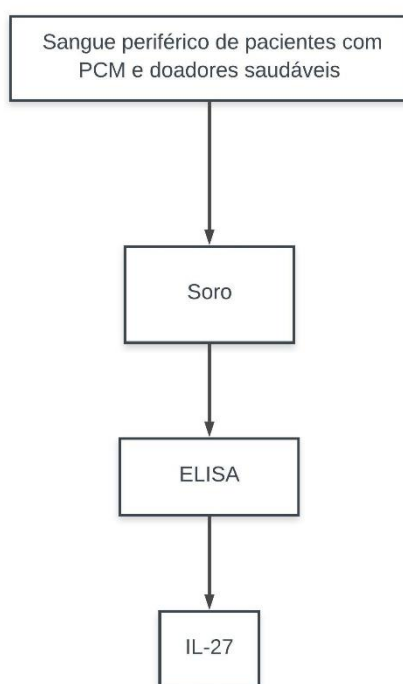
66. Kraft JD, Horzempa J, Davis C, Jung JY, Pena MM, Robinson CM. Neonatal macrophages express elevated levels of interleukin-27 that oppose immune responses. *Immunology.* 2013;139(4):484-93.

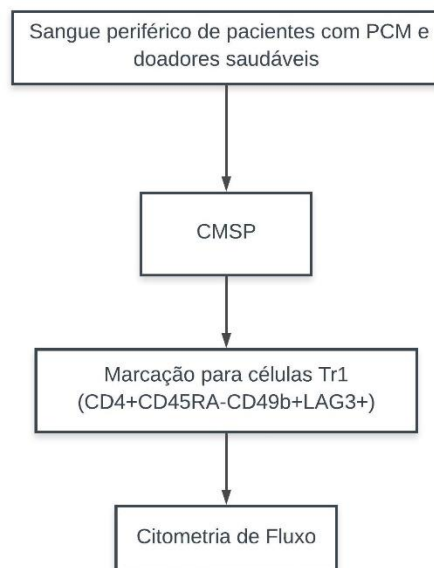
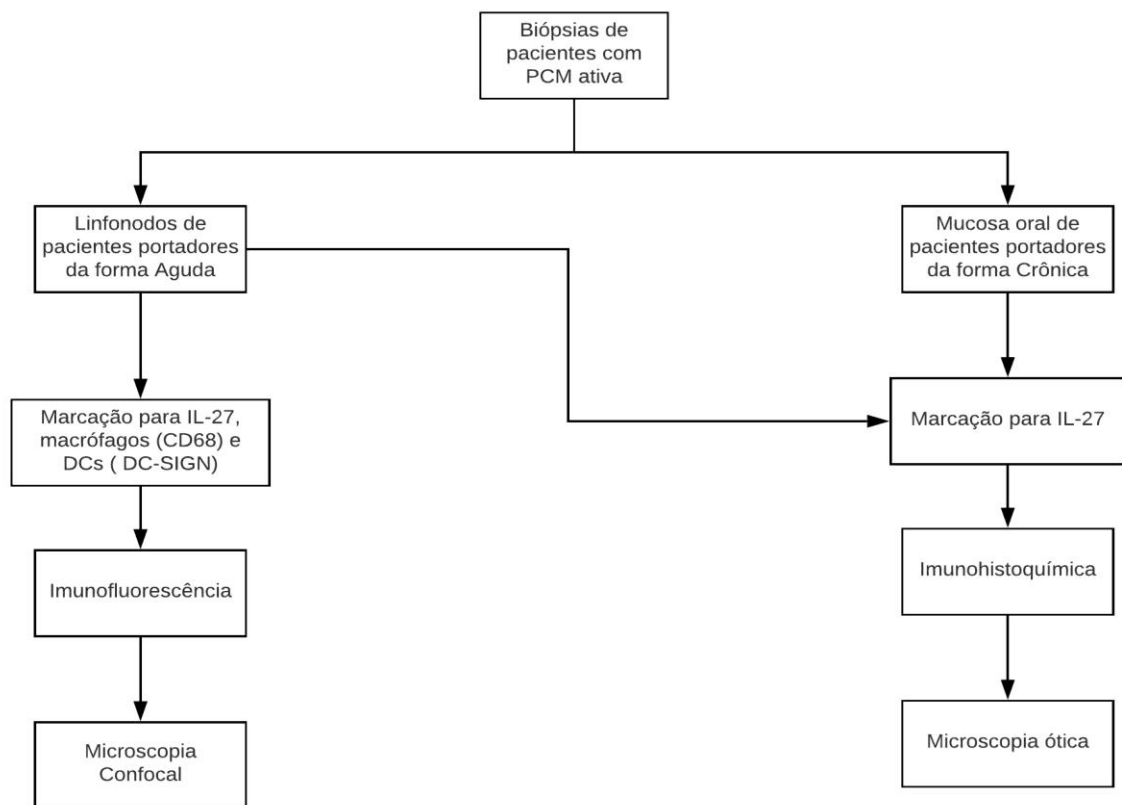
67. Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, et al. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;179(5):3268-75.

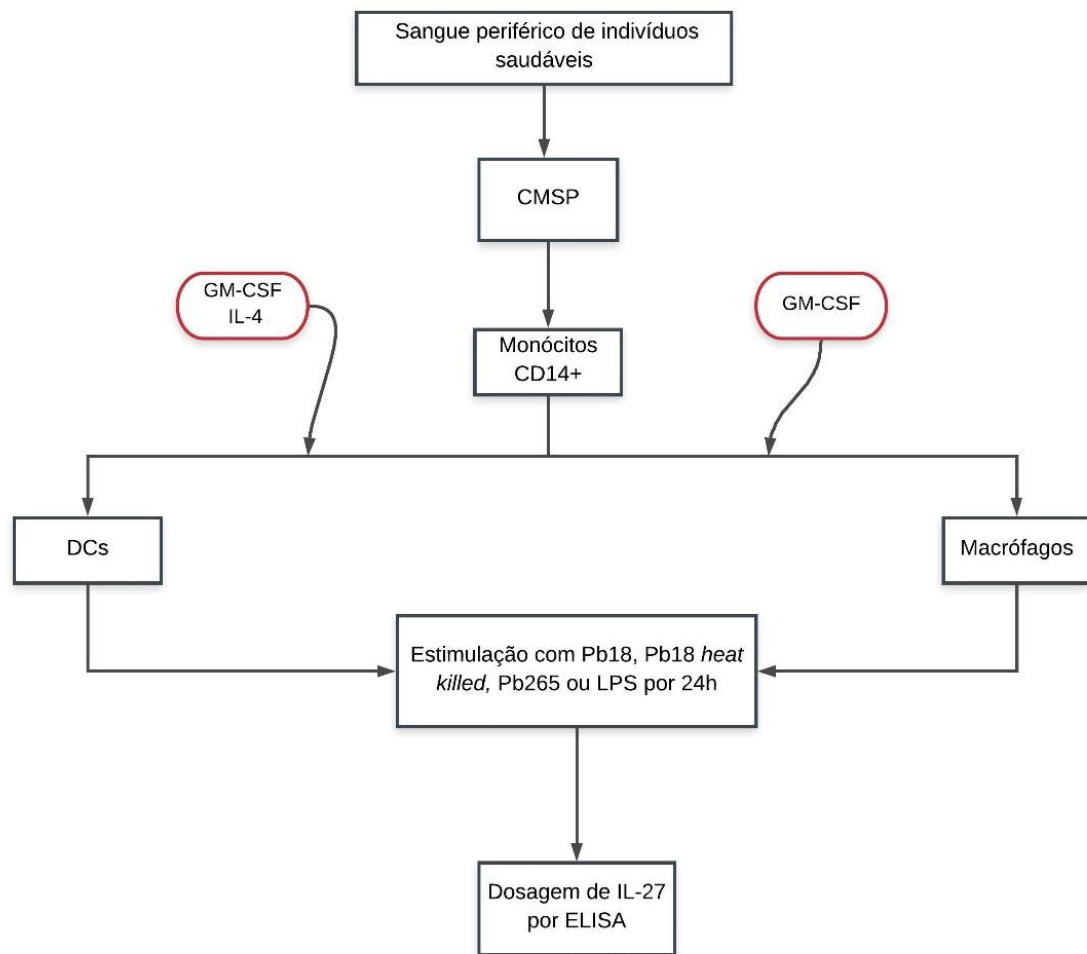
68. Diveu C, McGeachy MJ, Boniface K, Stumhofer JS, Sathe M, Joyce-Shaikh B, et al. IL-27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *J Immunol*. 2009;182(9):5748-56.
69. Hirahara K, Ghoreschi K, Yang XP, Takahashi H, Laurence A, Vahedi G, et al. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. *Immunity*. 2012;36(6):1017-30.
70. Pot C, Jin H, Awasthi A, Liu SM, Lai CY, Madan R, et al. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J Immunol*. 2009;183(2):797-801.
71. Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M, Gagliani N. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity*. 2018;49(6):1004-19.
72. Cardoso RM, Jham BC, do Carmo GM, Batista AC, de Oliveira FA, de Paula EC, et al. The relation between FoxP3(+) regulatory T cells and fungal density in oral paracoccidioidomycosis: a preliminary study. *Mycoses*. 2014;57(12):771-4.
73. Moreira AP, Cavassani KA, Massafra Tristao FS, Campanelli AP, Martinez R, Rossi MA, et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. *J Immunol*. 2008;180(5):3049-56.
74. Felonato M, Pina A, de Araujo EF, Loures FV, Bazan SB, Feriotti C, et al. Anti-CD25 treatment depletes Treg cells and decreases disease severity in susceptible and resistant mice infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One*. 2012;7(11):e51071.
75. Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VL. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol*. 2009;183(2):1279-90.
76. Galdino NAL, Loures FV, de Araújo EF, da Costa TA, Preite NW, Calich VLG. Depletion of regulatory T cells in ongoing paracoccidioidomycosis rescues protective Th1/Th17 immunity and prevents fatal disease outcome.

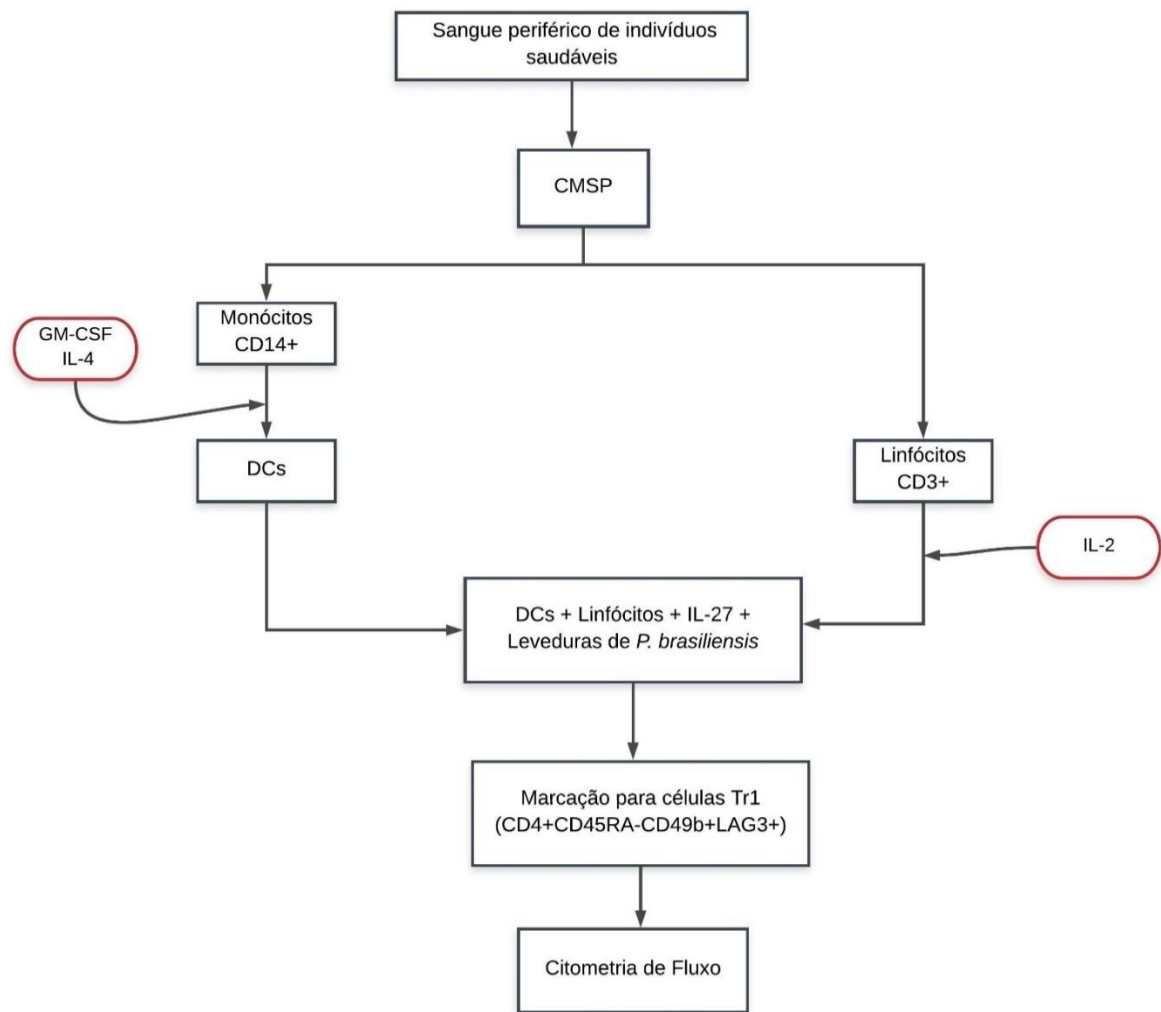
9. ANEXO

9.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL









9.2. APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resposta anti-inflamatória na Paracoccidiodomicose: caracterização da citocina IL-27 em células dendríticas.

Pesquisador: LIVIA MOREIRA GENARO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67805216.8.0000.5404

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.134.430

Apresentação do Projeto:

"As citocinas da família da IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35) vêm sendo amplamente estudadas, uma vez que participam de vários processos patológicos como autoimunidade, inflamação e câncer. A IL-12 e a IL-23 compartilham a subunidade p40 e tem atividade próinflamatória, enquanto que IL-27 e IL35 compartilham a subunidade EBI3 e tem atividade anti- inflamatória. A IL-27, composta pelas subunidades p28 e EBI3 é secretada por células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas (DCs) e macrófagos, e tem seus receptores (IL-27R) expressos em diversos tipos celulares, dentre eles células T naïve. Inicialmente descrita como próinflamatória, estudos recentes apontam o papel anti-inflamatório da IL-27, através da indução da produção de IL-10 em células T regulatórias do tipo 1 (Tr1), que inibe as respostas Th1 e Th17. Vários estudos abordaram a participação da IL-27 em doenças provocadas por fungos (Candida parapsilosis), bactérias (Mycobacterium tuberculosis) e protozoários (Plasmodium e Leishmania). A paracoccidiodomicose (PCM), causada pelo fungo dimórfico Paracoccidioides spp, é uma das principais micoses sistêmicas endêmicas da América Latina acometendo indivíduos imunocompetentes. Dados da literatura apontam que uma resposta imune celular efetiva, com participação das células Th1 conferem proteção na doença. Dados prévios de nosso grupo mostram que pacientes com formas graves e disseminadas de PCM apresentam concentrações

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: 2.134.430

séricas elevadas de IL-27 em comparação aos controles. Células dendríticas atuam na interface da resposta imune inata e adaptativa, pois ativam células T naive, determinando o balanço dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg, tendo papel essencial na imunopatologia da PCM. Nosso trabalho tem como objetivo caracterizar a resposta mediada por IL-27 na infecção pelo fungo *P. brasiliensis*, utilizando células dendríticas humanas cultivadas in vitro com leveduras fúngicas e em biópsia de pacientes como PCM, tendo em vista a identificação de mecanismos regulatórios que poderiam colaborar com a gravidade da doença”.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar alguns aspectos da resposta imunológica mediada pela citocina IL-27 na infecção pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos e/ou desconfortos associados aos procedimentos da pesquisa são dor e/ou a possibilidade de causar pequenas manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue (punção venosa). Foram identificados, ainda, riscos associados à confidencialidade (sigilo da identidade do participante). Os pesquisadores informam o compromisso de preservar a identidade dos participantes.

Benefícios: Não há benefícios diretos aos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa apresentada como trabalho de mestrado da pós-graduanda Livia Moreira Genaro, com orientação do Profa. Dra. Maria Heloisa S. L. Blotta (pesquisadora responsável). Nesta pesquisa, pretende-se caracterizar alguns aspectos da resposta imunológica mediada pela citocina IL-27 na infecção pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

Pretende-se incluir no estudo 70 participantes. Cinquenta participantes constituídos por 30 controles (comunidade universitária e parentes) e 20 casos, pacientes com paracoccidioidomicose em acompanhamento no Ambulatório de Moléstias Infeciosas do HC-Unicamp; todos quais serão submetidos à coleta de sangue periférico. Os outros 20 participantes serão constituídos por blocos de biópsias da coleção do Departamento de Anatomia Patológica de pacientes que não estão mais em acompanhamento. A coleta de sangue dos pacientes será realizada no Ambulatório de Moléstias Infeciosas após a consulta e a coleta de sangue dos participantes

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: 2.134.430

controle será realizada no serviço de coleta da Divisão de Patologia Clínica para os indivíduos do grupo controle.

Os ricos e/ou desconfortos associados aos procedimentos da pesquisa são a possibilidade de dor e/ou manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue (punção venosa) e riscos associados à confidencialidade (sigilo da identidade do participante). Os pesquisadores informam o compromisso de preservar a identidade dos participantes.

Solicita-se dispensa do TCLE para a inclusão dos participantes cujas amostras serão obtidas na coleção de blocos do Departamento de Anatomia Patológica. Justifica-se a solicitação com o argumento: "Esclarecemos que as biópsias que compõe o material de estudo deste trabalho foram obtidas da coleção do Bloário de Anatomia Patológica do HC Unicamp, são antigas e os pacientes não estão mais em acompanhamento. Para tanto, solicitamos a dispensa do uso do TCLE, exclusivamente, para estas amostras, pois não é mais possível contatar os pacientes para a obtenção do consentimento assinado. Serão utilizadas biópsias de 20 pacientes com paracoccidiodomicose, sendo 10 com a forma aguda (linfonodos) e 10 com a forma crônica (mucosa oral e/ou pele) da doença. Em anexo enviamos o documento de Dispensa do TCLE assinado pela Profa. Dra. Albina Altemani, responsável pelo banco de tecidos do serviço de Anatomia Patológica do HC-UNICAMP".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados:

1. Folha de rosto assinada pela pesquisadora responsável, Maria Heloisa S. L. Blotta e por Antônio Gonçalves de Oliveira Filho, Coordenador de Assistência do Hospital de Clínicas da Unicamp, instituição indicada como proponente.
2. Termo de consentimento Livre Esclarecido.
3. Formulário da Plataforma Brasil com as informações básicas sobre o projeto.
4. Projeto completo.
5. Atestado de matrícula da pesquisadora responsável.
6. Carta com respostas ao parecer consubstanciado 2.082.678 de 25 de maio de 2017.
7. Regulamento de biorrepositório.

Recomendações:

1. No caso da versão final impressa do TCLE ter duas ou mais folhas, o participante ou o representante legal pelo participante, bem como o pesquisador responsável deverão rubricar todas

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: 2.134.430

as folhas desse documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular no 003/2011/CONEP/CNS).

2. TCLE deve ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador.
3. Observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 466/12 CNS/MS.
4. Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (resolução 466/12).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa foi modificado e as questões levantadas pelo CEP no parecer consubstanciado 2.082.678 de 25 de maio de 2017 foram respondidas satisfatoriamente. Não há pendências ou inadequações.

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

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: 2.134.430

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 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_DO_PROJETO_822547.pdf	06/06/2017 16:49:33		Aceito
Outros	Carta.pdf	06/06/2017 16:45:22	LIVIA MOREIRA GENARO	Aceito
Outros	Dispensa.pdf	06/06/2017 16:45:05	LIVIA MOREIRA GENARO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	06/06/2017 16:41:10	LIVIA MOREIRA GENARO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/06/2017 16:40:52	LIVIA MOREIRA GENARO	Aceito

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: 2.134.430

Outros	AtestadoMatricula.pdf	17/04/2017 14:50:37	LIVIA MOREIRA GENARO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_LiviaMoreiraGenaro.pdf	17/04/2017 14:35:35	LIVIA MOREIRA GENARO	Aceito
Outros	OF_CEP_PRP_N_85_16.pdf	12/04/2017 16:24:44	Carlos Eduardo Cavalcante Barros	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PESQUISADOR_RESP.pdf	12/04/2017 16:24:44	Carlos Eduardo Cavalcante Barros	Aceito
Outros	Plataforma.pdf	12/04/2017 15:45:14	Maria Heloísa de Souza Lima Blotta	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	08/11/2016 15:40:01	Maria Heloísa de Souza Lima Blotta	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 23 de Junho de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(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