UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Estudo da interação de linfócitos B-1 com antígenos de Paracoccidioides brasiliensis

Vanessa Rosa Noal

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:

Professor Associado Sandro Rogério de Almeida

São Paulo 2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas

Estudo da interação de linfócitos B-1 com antígenos de Paracoccidioides brasiliensis

١,	an/	6002	Rosa	Moal
v	<i>a</i> 11	C220	NUSA	ואטמו

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador:

Professor Associado Sandro Rogério de Almeida

São Paulo 2009

Vanessa Rosa Noal

Estudo da interação de linfócitos B-1 com antígenos de Paracoccidioides brasiliensis

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Assoc. Sandro Rogério de Almeida
Orientador/presidente

1º. Examinador

2º. examinador

São Paulo,	 de 2009

Agradecimentos

A Deus ... "Porque sem mim, nada podeis fazer"... (João 15:5)

Ao meu marido Fábio, por sua amizade, apoio, companherismo, compreensão ... incondicionáveis ... (infinitas palavras para definir meu muito obrigada)

Aos meus pais José Carlos e Marta pela educação, carinho, amizade e preparo para a vida; aos meus irmãos Rafael e Marcelo pelo incentivo e pelas longas conversas

Ao meu orientador Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida, pela oportunidade e confiança concedida, por sua disponibilidade, pelos seus ensinamentos e ajuda indispensável para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório de micologia clínica, Gisele, Viviane, Daniele, Karla, Maria da Glória, Eliver, Rosana, Suelen, Karen, Talita, Lavínia, Telma e Sônia pela amizade e troca de experiências, que também fazem parte desta conquista e que muito me ensinaram

A todos os meus amigos, que acompanharam e incentivaram a realização deste trabalho

RESUMO

Diversos dados na literatura têm demonstrado a participação de linfócitos B-1 em diferentes fenômenos imunológicos, tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa. Para melhor entendermos a ativação da resposta imune eficaz contra fungos patogênicos, pesquisamos a interação entre os linfócitos B-1 e o Paracoccidioides brasiliensis (P. brasiliensis), uma vez que este expressa moléculas antigênicas que podem ser reconhecidas pelo sistema imune. Utilizamos preparação antigênica do P. brasiliensis obtida de sua superfície leveduriforme denominada de CFA (antígeno livre da parede do fungo) e células leveduriforme do fungo. Observou-se que a maioria das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias de células totais aderentes peritoneais eram constituídos por linfócitos B-1; estas células expressam altos níveis de MHC-II (100%) e CD80 (90%). Contudo, não houve expressão significativa da molécula co-estimuladora CD86. Pela análise fenotípica, os linfócitos B-1 podem atuar como células apresentadoras de antígeno pois expressam CD80, CD86 e MHC-II; então realizamos o ensaio de proliferação celular utilizando linfócitos B-1 como células apresentadoras de antígenos e observamos proliferação celular de linfócitos TCD4⁺ significativa. Em relação às citocinas, analisamos a secreção de IL-10 e TNF-α do sobrenadante da cultura de linfócitos B-1 sem nenhum estímulo e observamos que estas células secretam tanto IL-10 quanto TNF-α; após estímulo de CFA, os valores aumentam significantemente. Analisamos a expressão de TLR-2, TLR-4, MyD88 e IL-10, por RT-PCR, dos linfócitos B-1 na presença de CFA. Encontramos expressão de TLR-2, MyD88 e IL-10 nas células com e sem estímulo. Analisamos a migração dos linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c após estímulo intraperitoneal (ip) com leveduras de *P.b.* Decorridas 5 horas, foi observada grande diminuição dos linfócitos B-1 na cavidade peritoneal, que permanecia por 24 horas e 7 dias pós-infecção. Para melhor compreendermos a migração dos linfócitos B-1, foram utilizados camundongos CBA/N Xid (desprovidos de linfócitos B-1), cujo o peritônio foi reconstituído com linfócitos B-1, sendo infectados ip com leveduras de *P brasiliensis*. Os resultados demonstram que, após a infecção, os linfócitos B-1 migram da cavidade peritoneal para o baço. Também, observou-se aumento no número de células T com fenótipo de célula regulatória (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). Nossos resultados sugerem que a elevada produção de IL-10 por células B-1, mediada provavelmente



ABSTRACT

Innumerous data published in the literature have shown the involvement of B-1 cells in different immunological phenomena, both in the innate immnune response and the adaptive immune response. To better understand the activation of effective immune response against pathogenic fungi, we researched the interaction between B-1 cells and Paracoccidioides brasiliensis (P. brasiliensis), since it expresses that antigenic molecules can be recognized by the immune system. We used antigenic preparation of *P. brasiliensis* obtained from the surface of yeast called CFA (cell free antigen) and yeast cells of the fungus. It was observed that most cells in the cell culture supernatant 4 days of total adherent peritoneal cells consisted of B-1 cells, these cells express high levels of MHC-II (100%) and CD80 (90%). However, no significant expression of co-stimulatory molecule CD86 was observed. After phenotypic analysis, the cells B-1 can act as anyigen-presenting cells because they express C80, CD86 and MHC-II, then realized proliferation assay using B-1 cells as antigen presenting cells inducing was performed, and our results showed the significant proliferation of CD4 T cells. Regarding cytokines, we analyzed the secretion of IL-10 and TNF-α in culture supernatant of B-1 cells without stimulation and found that these cells secrete both IL-10 and TNF-α, after stimulation of CFA. We analyzed the expression of TLR-2, TLR-4, MyD88 and IL-10 by RT-PCR, of the B-1 cells in the presence of CFA. We found expression of TLR-2, MyD88 and IL-10 cells with and without stimulus. We analyzed the migration of peritoneal B-1 cells after intraperitoneal (ip) infection with yeast from P. brasiliensis. After 5 hours, high decrease of B-1 cells in the peritoneal cavity was observed, which remained for 24 hours and 7 days post-infection. To better understand the migration of B-1 cells, we used mice CBA/N Xid (destitute of B-1 cells), reconstituted with B-1 cells, and infected with yeast P. brasiliensis. The results show that after the infection, the B-1 cells migrate from the peritoneal cavity to the spleen. Also, there was an increase in the number of T cells with regulatory cell phenotype (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺). Our results suggest that high production of IL-10 by B-1 cells, probably mediated by the binding of TLR-2, along with the ability of B-1 cells in activating T lymphocytes, with the ability to migrate from the peritoneum to the spleen and activate T regulatory cells, could favor the survival of the fungus in the host.

Keywords: Paracoccidioides brasiliensis. B-1 cells . Migration. T regulatory cell.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. METODOLOGIA	31
3.1. Animais	31
3.2. Fungo	31
3.3. Antígeno (preparação do CFA)	31
3.4. Dosagem de proteínas	32
3.5. Análise da composição do antígeno	32
3.6. Preparação do inóculo para a infecção intraperitoneal	32
3.7. Infecção intratraperitoneal	33
3.8. Determinação da viabilidade celular	33
3.9. Obtenção de células aderentes totais peritoneais	33
3.10. Obtenção de linfócitos B-1	33
3.11. Imunofenotipagem dos linfócitos B-1 por citometria de fluxo	34
3.12. Imunofenotipagem de linfócitos B-1 após estímulo com CFA de P. bras	siliensis35
3.13. Ensaio de detecção de citocinas	35
3.14. Ensaio de proliferação de células totais aderentes peritoneais	36
3.15. Ensaio de proliferação de linfócitos B-1	37
3.16. Ativação de linfócitos T CD4 ⁺ por linfócitos B-1	37
3.16.1. Imunização de camundongos com <i>P. brasiliensis</i>	37
3.16.2. Purificação de linfócitos TCD4 ⁺	38
3.16.3. Ensaio de proliferação celular	38
3.17. Análise da expressão de RNAm de TLR-2, TLR-4, MyD88 e IL-10 de l	infócitos B-1
após estímulo com CFA	39
3.17.1. Extração de RNA total	39
3.17.2. Quantificação do RNA total	40
3.17.3. Síntese de cDNA	40
3.17.4. RT-PCR semiguantitativo	40

	3.18. Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos
	BALB/c infectados ip com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>
	3.19. Migração de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos CBA/N Xid,
	reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de P. brasiliensis, para o
	baço
	3.19.1. Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal e do baço de
	camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com
	leveduras de <i>P. brasiliensis</i>
	3.20. Caracterização de células T regulatórias do baço de camundongos CBA/N Xid,
	reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de P. brasiliensis44
	3.21. Análise estatística
4.	RESULTADOS47
	4.1. Análise do CFA em gel de poliacrilamida
	4.2. Ensaio de proliferação celular de células totais aderentes peritoneais estimuladas com
	diferentes concentrações de CFA
	4.3. Caracterização fenotípica das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias de
	células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c, após estímulo com CFA de
	P. brasiliensis
	4.4. Ensaio de proliferação celular de linfócitos B-1
	4.5. Análise das moléculas co-estimuladoras e do MHC-II do sobrenadante da cultura
	celular de 4 dias de células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c, após
	estímulo com CFA de <i>P. brasiliensis</i>
	4.6. Quantificação de citocinas produzidas por linfócitos B-1, após estímulo com CFA de
	P. brasiliensis63
	4.7. Resposta proliferativa de células TCD4 ⁺ <i>in vitro</i> na presença de linfócitos B-1 e CFA
	64
	4.8. Expressão de mRNA de TLR-2, TLR-4, MyD88 e IL-10 em linfócitos B-1 estimulados
	com CFA
	4.9. Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos
	BALB/c estimulados ip com leveduras de <i>P. brasiliensis</i>
	4.10. Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal e do baço de
	camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras
	de <i>P. brasiliensis</i>

.11. Análise de células T regulatórias do baço de camundongos CBA/N Xid,
econstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de P. brasiliensis
DISCUSSÃO80
CONCLUSÕES9
FERÊNCIAS92

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose profunda, de natureza granulomatosa, que compromete preferencialmente o tecido pulmonar, o sistema linfático, o tecido mucocutâneo e, por contiguidade, qualquer outro órgão (WANKLE & LONDERO, 1994).

A PCM foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolpho Lutz, em pacientes que apresentavam lesões na mucosa oral. Posteriormente, em 1912, Splendore consegue isolar o fungo causador da doença descrita por Lutz, denominando-o de *Zimonema brasiliensis*. Desde então, esta patologia recebeu várias denominações, entre elas "blastomicose brasileira" e, logo em seguida, "Blastomicose sulamericana", pois foram relatados casos isolados em outros países da América do Sul. Somente em 1930, Almeida cria um novo gênero dentro do reino *Fungi* – o *Paracoccidioides*, oficializando o nome do agente causador da PCM como *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), nome utilizado até os dias de hoje.

Segundo Lacaz (2002), a posição sistemática do P. brasiliensis é:

Reino Fungi

Filo ou Divisão Eumycota

Subdivisão Deuteromycotina

Classe *Hyphomycetes*

Ordem *Moniliales*

Família *Moniliaceae*

Gênero Paracoccidioides

Espécie brasiliensis

O *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico; as condições que favorecem o seu dimorfismo seriam variações térmicas (MACKINNON, 1960; NEGRONI, 1968;

BORELLI, 1972; RESTREPO, 1985). Em relação às características morfológicas, o fungo se apresenta sob a forma de levedura, quando cultivado a 37°C, ou em vida parasitária. No exame direto, pode-se verificar a presença de células ovaladas (com 1-30µm de diâmetro) ou multibrotantes, com aspecto de "roda de leme". Em vida saprofítica, ou quando cultivado a 25°C, o *P. brasiliensis* apresenta-se sob a forma de micélio, com hifas hialinas delgadas e septadas (LACAZ *et al.*, 1991).

Geograficamente, a doença está restrita a países da América Latina. Porém, a prevalência da micose distribui-se em áreas endêmicas como: Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia (FRANCO *et al.*, 1987; RESTREPO, 1990), sendo a micose sistêmica mais comum no Brasil (WALKE & LONDERO, 1994).

Coutinho et al. (2002) publicaram um estudo sobre 3.181 óbitos por PCM ocorridos no Brasil entre 1980 e 1995. Neste período, a micose destacou-se como a oitava causa de mortalidade por doença predominantemente crônica, entre as patologias infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. A taxa média de mortalidade anual foi de 1,45 casos por milhão de habitantes. A região Sul apresentou a maior taxa regional, enquanto o Sudeste apresentou tendência à queda. A região Centro-Oeste apresentou o segundo coeficiente mais elevado do país, com tendência de ascensão. A doença prevaleceu como endêmica nas áreas rurais e a taxa de mortalidade predominou em indivíduos do sexo masculino. Um dado mais recente da literatura, mostrou que a doença ocupa o décimo lugar dentre as doenças infecciosas crônicas que mais matam no Brasil (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; PRADO et al., 2009). Embora sejam necessários estudos mais acurados para se definir a origem urbana da micose, temse notado que sua presença nessas áreas é devida à migração de indivíduos infectados das áreas rurais que adoecem nos grandes centros, onde são

diagnosticados. Estima-se que aproximadamente 10 milhões de pessoas foram infectadas e que mais de 2% delas poderão desenvolver a doença (WANKLE & LONDERO, 1994). A progressão da infecção fúngica causada por *P. brasiliensis* é mais comum nos homens com idade entre 30 e 60 anos, na proporção de 13 homens para 1 mulher em áreas endêmicas (LACAZ *et al.*, 1994).

A suspeita de que a proteção nas mulheres fosse devida à influência hormonal foi apoiada pela observação de que a transformação do micélio (infectante) para a forma de levedura (doença) era inibida pelo hormônio 17-β estradiol. O mecanismo pelo qual o 17-β estradiol atua no *P. brasiliensis* seria o bloqueio da síntese de proteínas que se expressam durante a transformação da fase de micélio para levedura; deste modo, o estrógeno pode interferir na patogenicidade do fungo (LOOSE *et al.*, 1983).

O habitat natural do agente etiológico é exógeno ao ser humano; no entanto, ainda permanece pouco conhecido (RESTREPO, 1985). Estudos relatam o isolamento do fungo a partir de amostras do solo, sugerindo que este é o mais provável nicho ecológico do parasita (ALBORNOZ, 1971; NEGRONI, 1966; SILVA-VERGARA & MARTINEZ, 1990; RESTREPO et al., 2001). Também encontramos relatos de que o fungo tenha sido isolado de fezes de pinguim (GARCIA et al., 1993) e de ração de cachorro (FERREIRA et al., 1990) além do solo (ALBORNOZ, 1971; SILVA-VERGARA et al., 1998).

No hospedeiro humano, acredita-se que o fungo penetre pelas vias aéreas superiores, pela inalação de conídios, provocando um complexo primário pulmonar. Estas lesões podem regredir, com destruição do fungo, ou progredir, disseminando pela via linfática ou hematogênica para outros órgãos (RESTREPO & MONCADA, 1972). Acredita-se que os conídios e não fragmentos miceliais sejam os propágulos

infectantes naturais (SALAZAR *et al.*, 1988). O papel do conídio como agente infectante é sugerido pelo seu tamanho reduzido (3,5 a 5 µm), que é compatível com a formação de aerosol e deposição alveolar.

Uma vez que o sistema imune entra em contato com o fungo, vários fatores podem ser coadjuvantes no mecanismo de manifestação da PCM, dentre eles: carência alimentar protéica, susceptibilidade genética ao fungo, fadiga, alcoolismo, tabagismo, doenças de base concomitantes, clima, etc (RESTREPO & MONCADA, 1972). Após a inalação de propágulos infectantes, há formação de complexo primário pulmonar, com possível disseminação por via linfática e hematogênica de leveduras para diversos focos em outros órgãos e sistemas (FRANCO et al., 1987; GIRALDO et al., 1976). A progressão da infecção para a doença depende do tamanho do inóculo, características de patogenicidade e virulência do fungo, bem como da qualidade e da integridade do sistema imunológico do hospedeiro e, possivelmente, de fatores genéticos (Revisado por BRUMMER et al., 1993).

A classificação clínica da PCM compreende a PCM-infecção e a PCM-doença (FRANCO et al., 1987). Em pacientes com PCM-infecção, a resposta imunológica apresenta-se satisfatória e o desenvolvimento do foco infeccioso é contido, embora ocorra o desenvolvimento de uma resposta imune específica, evidenciada pelo teste intradérmico com paracoccidioidina (LACAZ et al., 1959). Grande parte dos indivíduos que entram em contato com o fungo consegue manter a infecção e não desenvolver a doença. Este fato é evidenciado pela alta taxa de moradores de áreas endêmicas que apresentam teste cutâneo de hipersensibilidade do tipo tardia (HTT) positivo para antígenos do fungo, mas não apresentam qualquer sintoma da doença (BETHLEM et al., 1999). Nesta situação, lesões fibróticas são formadas no pulmão (complexo primário pulmonar) ou em tecidos mucocutâneos e o foco infeccioso pode

desaparecer (FRANCO *et al.*, 1987). Nestes locais, o fungo permanece em latência, portanto viável. Após período prolongado de tempo, em decorrência do desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro, a infecção pode progredir para PCM-doença (FRANCO *et al.*, 1987).

A PCM tem muitas características clínica, e logo que se estabelece pode apresentar-se clinicamente de diferentes maneiras, com grande potencial para disseminar-se, dependendo da competência do sistema imune do hospedeiro, do balanço hormonal e da idade. Duas principais formas clínicas da doença são reconhecidas: a forma tipo aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulta) (LONDERO & RAMOS, 1990; Revisado por BRUMMER *et al.*, 1993).

A forma clínica tipo aguda ou subaguda (tipo juvenil) da doença apresenta disseminação sistêmica, com hipertrofia do baço, fígado, linfonodos e alteração da medula óssea. Esta forma clínica representa cerca de 3 a 5 % dos casos, sendo mais frequente em jovens de ambos os sexos (FRANCO *et al.*, 1989; Revisado por BRUMMER *et al.*, 1993). Estudos histopatológicos mostram a presença de processo inflamatório inespecífico, com granulomas frouxos, pouco organizados, contendo numerosos fungos viáveis (FRANCO, 1987).

Pacientes que apresentam a forma aguda ou subaguda da doença pertencem ao pólo anérgico ou negativo da PCM (LACAZ et al., 1982). Geralmente, suas respostas imunes mediadas por células estão severamente deprimidas, ao passo que a resposta imune humoral é mantida com alto título de anticorpos, tanto específicos quanto inespecíficos, pois a ativação é policional de células B. A histopatologia revela a infiltração de macrófagos nos tecidos, com grande número de células leveduriformes multibrotantes de *P. brasiliensis*, com ou sem formações de granuloma (FRANCO et al., 1987). Os pacientes apresentam predomínio de

citocinas do padrão Th2, eosinofilia e resposta imune celular suprimida (MOTA *et al.*, 1985; BENARD *et al.*, 1997).

A forma crônica (tipo adulta) da PCM representa a maioria dos casos e é frequente em indivíduos do sexo masculino na faixa entre 30 e 60 anos. Esta forma é caracterizada por apresentar evolução lenta e manifestações pulmonares evidentes em 90% dos adultos, sendo que em 25% dos casos os doentes apresentam lesões restritas aos pulmões (forma unifocal). Em outros casos, os doentes podem apresentar forma disseminada da doença com comprometimento principalmente das mucosas, da pele e dos linfonodos (forma multifocal) (Revisado por BRUMMER *et al.*, 1993). Pacientes com a forma crônica ou adulta menos grave apresentam níveis elevados de citocinas do padrão Th1 (IFN-γ), sugerindo certo controle da infecção e doença menos grave (BAIDA *et al.*, 1999).

Diferentes graus de depressão da resposta imune celular dos pacientes são associados com as diferentes formas clínicas da PCM (MOTA *et al.*, 1985; FRANCO *et al.*, 1987).

Do ponto de vista da resposta imunológica, os pacientes paracoccidioidomicóticos têm sido classificados em duas formas polares (LACAZ et al, 1982):

- 1) um pólo **hiperérgico**, que se apresenta como uma forma benigna da doença, apresentando lesões mais restritas, na qual a infecção é localizada, o hospedeiro apresenta resposta imune celular preservada, baixos títulos de anticorpos. Os achados histopatológicos mostram a formação de granulomas epitelióides compactos contendo poucos fungos;
- 2) um pólo **anérgico**, que se apresenta como uma forma maligna da micose, com disseminação da infecção, resposta celular deprimida e altos níveis de anticorpos

específicos. Os achados histopatológicos, apresentam áreas de inflamação granulomatosa mista (frouxa e supurativa) com extensas áreas de necrose e abundantes células do fungo.

O *P. brasiliensis* pode ser isolado de várias fontes, tais como: escarro, aspirado brônquico ou lavado broncoalveolar, material granulomatoso da base de úlceras, crostas ou material de suas extremidades, pus dos linfonodos, LCR (líquor), medula óssea ou aspirados de linfonodos ou amostras de biópsias (Revisado por BRUMMER *et al.*, 1993).

O exame direto das amostras biológicas com KOH a 10% pode evidenciar os elementos fúngicos (LACAZ, 1994b; Revisado por BRUMMER *et al.*, 1993), nas quais o tamanho e a gemulação múltipla distinguem *P. brasiliensis* de fungos de outras micoses sistêmicas, proporcionando especificidade satisfatória para o diagnóstico micológico direto (SIDRIM, 2004).

A demonstração do *P. brasiliensis* em preparações a fresco, com ou sem corantes, não oferece dificuldade, pois o microrganismo se apresenta com sua morfologia característica (LACAZ, 2002). O diagnóstico da PCM baseia-se no achado de leveduras com múltiplos brotamentos, birrefringentes, características do *P. brasiliensis*, no material clínico e no seu isolamento em cultura (Revisado por BRUMMER *et al.*, 1993). Quando os órgãos internos são atingidos, os testes sorológicos são muito importantes para o diagnóstico rápido da PCM (BLUMER *et al.*, 1984). Um dos testes mais utilizados na identificação do *P. brasiliensis* é o da imunodifusão em gel de ágar (YARZABAL, 1971; NEGRONI *et al.*, 1976; CAMARGO *et al.*, 1988).

Com o intuito de estudar as diferenças entre as duas principais formas clínicas da PCM do ponto de vista imunológico, um modelo experimental foi proposto baseado em linhagens murinas geneticamente resistentes ou susceptíveis. Neste modelo, proposto por Calich et al. (1985), camundongos da linhagem B10.A mostraram-se susceptíveis à infecção por P. brasiliensis e, portanto, correspondem, no modelo humano, à forma aguda, severa da doença. Já os camundongos A/Sn ou A/J são considerados resistentes e representam a forma crônica. A resposta imune a antígenos do fungo foi estudada neste modelo experimental e os resultados mostraram os animais resistentes apresentavam imunidade que aparentemente normal, ou seja, com presença de macrófagos ativados durante todo o processo infeccioso e com poucas lesões teciduais. Por outro lado, os animais susceptíveis mostraram depressão da resposta celular, altos níveis de anticorpo anti-P. brasiliensis e comprometimento de vários órgãos (CALICH et al., 1988).

Neste modelo experimental de PCM, a resistência à infecção em camundongos A/Sn está relacionada com a produção de níveis elevados de IFN-γ no decorrer da infecção, padrão este compatível com uma resposta do tipo Th1. A susceptibilidade de camundongos B10.A está relacionada com a baixa produção de IL-2 e IFN-γ no início da infecção, seguida de produção elevada de IL-5, IL-10 e TNF-α, padrão característico de uma resposta do tipo Th2 (Revisado por CALICH & KASHINO, 1998).

O *P. brasiliensis* sintetiza diversas substâncias, como polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos, lipídeos e glicoproteínas, que reúnem características físico-químicas e biológicas para atuarem como antígenos. Estudos de imunoprecipitação com soros de pacientes com PCM demonstraram que apenas a glicoproteína com 43 kDa (gp43) era imunorreativa por 100% dos soros de PCM e não reagia com soros normais (PUCCIA & TRAVASSOS, 1991). Posteriormente, verificou-se que a gp43 era o principal componente antigênico presente nas frações anteriormente descritas

por Restrepo e Moncada (1974) e Yarzabal *et al.* (1977). Desde então, este componente antigênico do fungo, considerado um marcador sorológico da PCM, vem sendo utilizado no sentido de aumentar a especificidade e a sensibilidade dos testes sorológicos (CAMARGO *et al.*, 1994). Títulos de anticorpos anti-gp43 têm sido usados para monitorar a resposta de pacientes ao tratamento. A titulação de anticorpos é utilizada como parâmetro para avaliar a terapêutica e determinar o prognóstico da doença. O aumento dos níveis de anticorpos está correlacionado à severidade da doença (BIAGIONI *et al.*, 1984).

A ativação de uma resposta imunológica é consequência de uma série de interações envolvendo diferentes tipos celulares. Para que ocorra uma resposta mediada por linfócitos T, é necessário que estes interajam com células apresentadoras de antígenos (APC) (células dendríticas, linfócitos B e macrófagos), proliferem e se diferenciem em células efetoras, pois, embora os linfócitos T reconheçam antígenos com alta especificidade, não são capazes de iniciar uma resposta imune (Th1/Th2) (STEINMAN, 1991; BANCHEREAU *et al.*, 2000; LANZAVECCHIA & SALLUTO, 2001).

É importante salientar que uma resposta imune celular efetiva envolve ativação da célula T através de dois sinais: o primeiro, que se relaciona ao reconhecimento do peptídeo antigênico no contexto do Complexo Principal de Histocompatibilidade pelo receptor da célula T, e o segundo sinal, também denominado coestimulação, que se relaciona a várias moléculas presentes na superfície da célula apresentadora de antígeno (molécula B7), interagindo com correceptores da célula T (CD28 e CTLA-4) (DUBEY et al., 1995; SWAIN et al., 1999). Está estabelecido que, para se ter ativação de células T, é importante que ocorra uma interação entre TCR-

MHC/peptídio, além dos sinais co-estimuladores fornecidos pelas moléculas CD80/CD86 (LENSCHOW *et al.*, 1996).

O desenvolvimento predominante de uma população de células T (Th1 ou Th2) durante uma infecção é extremamente importante, pois certos patógenos são mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo celular (Th1) e outros mais efetivamente controlados por uma resposta do tipo humoral (Th2) (SHER & COFFMAN, 1992).

As células Th podem se diferenciar em diversos tipos de células efetoras Th1, Th2 e Th17. Estas células são caracterizadas pela produção de citocinas. As células que modulam uma resposta preferencialmente do tipo Th1 secretam IFN-γ e ativam macrófagos e outros tipos celulares contra patógenos intracelulares. As células Th2 secretam IL-4, IL-5 e IL-13 (STETSON *et al.*, 2004). As células Th17 secretam IL-17 e estão envolvidas na proteção contra bactérias extracelulares e fungos (LEIBUNDGUT-LANDMANN *et al.*, 2007).

A detecção específica de microrganismos por células da imunidade inata é mediada por receptores de reconhecimento de padrão (PRR – pattern recognition receptor), que reconhecem estruturas microbianas denominadas de padrões moleculares associados à patógenos (PAMP – pathogen-associated molecular pattern). Os receptores do tipo toll (TLR – Toll-like receptor), são essenciais PRR que reconhecem estruturas microbianas, medeiam a resposta inflamatória e também regulam a resposta adaptativa (TAKEDA et al., 2003; WEST et al., 2006). Componentes estruturais altamente conservados presentes na parede das células fúngicas, como β-glucanas, quitina e manana, são críticos para o crescimento e a sobrevivência dos fungos e constituem PAMP ideais, reconhecidos por TLR expressos em fagócitos e células dendríticas.

Dados recentes da literatura demonstram o envolvimento de TLR com a síntese de algumas citocinas na resposta imune inata. A ativação desta resposta mediada pelo reconhecimento, via TLR, representa uma interação entre as respostas do sistema imune inato e adquirido, através da resposta de células T "auxiliares". O reconhecimento de microrganismos por TLR2 medeia sinais que preferencialmente induzem polarização para Th2; entretanto, a ativação de TLR4 leva principalmente à proliferação de células Th1 (RE & STROMINGER, 2001). A estimulação específica dos TLR resulta no aumento de IL-10 ou IL-12, polarizando a resposta de células T para Th1 ou Th2 (QI & DENNING, 2003).

Alguns trabalhos na literatura mostraram que Yersinia enterocoloitica, Candida albicans, Aspergillus fumigatus e Borrelia burgodorferi utilizam TLR2 para induzir a secreção de IL-10, levando à imunossupressão do hospedeiro através da geração de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (DITERICH et al., 2003; NETEA et al., 2003 e NETEA et al., 2004). A ligação de TLR-2 pode ter efeito protetor ou deletério na infecção por Candida albicans, contribuindo tanto para a desativação de macrófagos, pela secreção de altos níveis de IL-10, como pelo controle da resposta inflamatória, pela indução de células T CD4⁺CD25⁺ com função regulatória (Netea et al., 2004). Sutmuller et al. (2006) demonstraram que o reconhecimento via TLR-2 pode levar à indução de células T reguladoras (Treg), importantes no controle da resposta imunológica. Células T reg com atividade supressora foram descritas em infecções fúngicas tanto humanas (CAVASSANI et al., 2006) como experimentais (MONTAGNOLI et al., 2002; 2006; HORI et al., 2002).

As células T reguladoras foram primeiramente descritas no controle de células autorreativas, principalmente nas autoimunidades (SAKAGUCHI *et al.*, 2007). Os experimentos de Sakaguchi *et al.* (1995) mostraram que as células T CD4⁺

provenientes de baço e de linfonodos de camundongos BALB/c, que não expressam a molécula CD25 (cadeia α do receptor da IL-2), induziam o desenvolvimento de uma série de doenças autoimunes, quando transferidas para camundongos atímicos. Esse processo era revertido quando se transferiam concomitantemente linfócitos T CD4⁺CD25⁺ para esses camundongos. A partir daí, o fenótipo associado às células T reguladoras era CD4⁺CD25⁺. Entretanto, a identificação de um gene expresso nas células T reguladoras humanas e de camundongos facilitou a caracterização dessa subpopulação celular. Esse gene, que é exclusivamente expresso nas células T reguladoras, denominado Foxp3, transcreve para um fator de transcrição denominado "scurfin" e está ativado apenas nestas células (HORI et al., 2003; KHATTRI et al., 2003). Mutações no gene Foxp3 culminam no desenvolvimento de doenças linfoproliferativas fatais (BENNETT et al., 2001; WILDIN et al., 2002). Células T CD4⁺CD25⁻ transfectadas com Foxp3 foram capazes de prevenir o desenvolvimento de gastrite ou colite autoimune, quando transferidas para camundongos imunodeficientes (HORI et al., 2003). Fontenot et al. (2003) demonstraram que a deleção do gene Foxp3 em camundongos leva ao desenvolvimento espontâneo de doenças autoimunes nestes animais. A partir de então, as células T reg passaram a ser caracterizadas não somente pela presença de CD25 como principalmente pela presença de Foxp3 (HORI et al., 2003; FONTENO et al., 2003).

Algumas características imunológicas das células T reg as diferenciam das demais células T, como, por exemplo, a baixa capacidade de proliferação frente a estímulos *in vitro* e a capacidade de suprimir respostas de células T CD4⁺ e TCD8⁺ (SURI-PAYER *et al.*, 1998) através do contato celular (THORNTON *et al.*, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 1998).

Dependendo do TLR ativado, as células apresentadoras de antígenos induzem diferentes respostas imunológicas. O TLR-4 promove a produção de quimiocina IP10 (proteína induzida de IFN-γ), a qual também é associada com a resposta tipo Th1. A diferença de indução de IL-12 por TLR-2 e TLR-4 tem sido mostrada por macrófagos murinos (HIRSCHFELD *et al.*, 2001). Estudos recentes demonstraram importante envolvimento dos TLR no reconhecimento de fungos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Coccidioides posadasii* e *Cryptococus neoformans* (SHOHAM *et al.*, 2001; NETEA *et al.*, 2002; BELLOCHIO *et al.*, 2004; YAUCH, 2004; VIRIYAKOSOL *et al.*, 2005).

Na infecção por *Candida albicans* a mudança do fungo da forma de levedura para a forma filamentosa é um passo fundamental para que a infecção seja bem sucedida. Quando se analisa a composição da parede celular observa-se que as leveduras apresentam grande quantidade de β-glucanos expostos, enquanto que nas formas filamentosas isto não ocorre (HEINSBROEK *et al.*, 2005). Estudos de infecção demonstram que a forma de levedura ativa células fagocíticas por meio da combinação de TLR-2 e dectina-1, levando ao aumento da ativação de fatores de transcrição, como o NFκB, e à produção de citocinas pró-inflamatórias importantes para o controle da infecção (HEINSBROEK *et al.*, 2005; NETEA *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2007). Por outro lado, as formas filamentosas não interagem com a dectina-1, ativam as células apenas via TLR-2, induzindo estado de supressão da resposta inflamatória, que leva a diminuição da capacidade de controle da infecção (TAYLOR *et al.*, 2007).

Células dendríticas de camundongos susceptíveis à infecção pelo *P. brasiliensis* apresentam aumento elevado na expressão de TLR-2 associado à produção de níveis elevados de IL-10 e TNF-α, enquanto que as células dendríticas de

camundongos resistentes apresentam menor expressão de TLR-2 e baixa produção de ambas as citocinas, demonstrando que o agente etiológico da PCM apresenta mecanismos capazes de modular a resposta imunológica inata via TLR-2 (FERREIRA et al., 2007).

Em camundongos deficientes de TLR, bem como de moléculas sinalizadoras associadas aos TLR, ficou claro que tanto o TLR-2 como o TLR-4 podem ativar NFkB e induzir a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimuladoras por macrófagos e células dendríticas, demonstrando sua participação na resposta imune inata e no direcionamento da resposta adaptativa (BELLOCHIO et al., 2004). Todos os TLR (exceto TLR-3) utilizam vias de sinalização intracelular que são dependentes do recrutamento da molécula adaptadora MyD88 (AKIRA e TAKEDA, 2004). Desta forma, camundongos deficientes em MyD88 também apresentam alta susceptibilidade à infecção por *Candida albicans* devido à atividade fagocítica deficiente e à baixa produção de citocinas (BELLOCHIO et al., 2004; VILLAMON et al., 2004a).

As células B são consideradas apresentadoras de antígeno, pois são capazes de capturar partículas antigênicas através de um receptor de superfície de natureza IgM, na qual a interação destes receptores com o antígeno leva à endocitose do complexo e ao processamento antigênico, resultando na apresentação do peptídio na superfície da célula via molécula MHC de classe II, podendo ser reconhecido por linfócitos T auxiliares CD4+ (ABBAS, 2005).

Uma das principais funções de todas as células B e sua progênie é produzir e secretar anticorpos, mas há diferenças significativas entre as células B maduras em relação à ontogenia, à fisiologia, ao fenótipo, à localização anatômica e à origem das linhagens (HERZEMBERG *et al.*, 1986).

As células B-1 foram descritas inicialmente em pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) de células B, nas quais foi observada a presença de linfócitos B que expressavam o marcador CD5 em sua superfície (MANOHAR *et al.*, 1982). Em 1982, Calligaris-Cappio descreveu a presença do marcador CD5 em uma pequena população de linfócitos B normais; este marcador era comumente expresso em células T (BOUMSELL *et al.*, 1978;CALIGARIS-CAPPIO *et al.*, 1982).

Há mais de 20 anos (início da década de 1980), Hayakawa e Hardy identificaram novas células linfocíticas do tipo B e propuseram um novo grupo de linfócitos, dividindo-os em dois subgrupos: B-1 e B-2. Os linfócitos B-1 ainda são divididos em B-1a e B-1b e os linfócitos B-2 representam os "linfócitos B convencionais" descritos, até então, na literatura.

Entretanto, a descrição e caracterização fenotípica, a origem e a função destas células tornaram-se alvo de muitas controvérsias na literatura. Com dados obtidos em estudos de transferência adotiva de células, Herzenberg e colaboradores defendem a teoria de precursores distintos para as populações B-1 e B-2. A transferência de células do fígado fetal para camundongos irradiados foi capaz de reconstruir as duas subpopulações de células B, enquanto que a transferência de precursores da medula óssea limitava-se à re-população de células B-2 (HERZENBERG et al., 2000; KANTOR., 1993; HARDY., 1994). Portanto, ficou estabelecida a existência de duas linhagens progenitoras distintas, a primeira surgiria na fase fetal e estaria comprometida com o desenvolvimento de linfócitos B CD5⁺ e a segunda surgiria mais tardiamente, durante a hematopoiese na medula óssea adulta, e estaria comprometida com o desenvolvimento de linfócitos B convencionais (TUNG et al., 2007).

As três principais células B periféricas e maduras são: linfócitos B-1, linfócitos B-2 (ou células B foliculares - FO, devido à sua localização nos folículos do baço) e linfócitos B de zona marginal (B-MZ). Este último também reside no baço, envolvendo e limitando a polpa branca, separando-a da polpa vermelha (CASOLA, 2007; LOPES-CARVALHO, 2005; HARDY, 2006; HERZENBERG, 2000; TUNG *et al.*, 2007). As células B-1 que expressam CD5 são chamadas de B-1a, já as células que não expressam a molécula CD5 foram chamadas de B-1b (KANTOR *et al.*, 1992 e STALL *et al.*, 1992). Assim, ficou estabelecido quatro subtipos células B periféricas: B-1a, B-1b, B-2 (folicular) e B-ZM (B de zona marginal do baço).

Embora as características genéticas e moleculares expressas pelas células B-1 e B-2 sejam semelhantes, elas se diferenciam pelas suas características fenotípicas (HERZENBERG, 2000). Os linfócitos B-1 apresentam fenótipo de linfócitos B convencionais (B-220, IgM e IgD de superfície de membrana), de células T (CD5) e também de células macrofágicas (Mac-1 e F4/80). Dentro do subtipo B-1, as células B-1a e B-1b apresentam fenótipo quase idêntico; entretanto, células B-1a expressam a molécula de superfície Ly-1 (CD5), enquanto as células B-1b e B-2 convencionais não as expressam, permitindo a distinção entre as células B-1a, B-1b e B-2 convencionais (HERZEMBERG *et al.*, 1986). As células B-1 (B-1a e B-1b) podem, ainda, ser distinguidas das células B-2 por possuírem altos níveis de IgM e pouco de IgD (HAYAKAWA *et al.*, 1983).

Os linfócitos B-1 secretam citocinas pró e anti-inflamatórias; dentre as citocinas mais comumente expressas por estes linfócitos estão IL-10 e TNF-α (O'GARRA, 1992).

Uma importante característica identificada nas células B-1 foi sua capacidade de migrar de seus compartimentos específicos (peritônio) até o local de uma inflamação

aguda não específica, mostrado por Almeida *et al.* (2001). Outra evidência da migração das células B-1 é a considerável diminuição destes linfócitos na cavidade peritoneal e o aumento de ambas, B-1 e B-2, no baço após uma infecção (HERZEMBERG, 2000). Oliveira *et al.* (2009) demonstraram, ainda, que os linfócitos B-1b derivados de células peritoneais aderentes são capazes de migrar da cavidade peritoneal de animais reconstituídos com linfócitos B-1b para o foco inflamatório do processo de cicatrização.

Experiências com camundongos deficientes de células B-1 demonstraram que estes animais apresentam melhor resposta imune e geram inflamação e consequente granuloma mais compacto e efetivo após infecção por patógenos. Dados sugerem que estes linfócitos B-1 poderiam regular negativamente as células efetoras, como macrófagos, na eliminação dos patógenos. O fato de estas células migrarem até o foco inflamado, e produzirem quantidades significativas de IL-10 (O'GARRA, 1992), sustentaria esta hipótese (ALMEIDA *et al.*, 2001). A IL-10 tem a capacidade de suprimir a ativação de macrófagos, reduzindo a produção de IL-12. Esta inibição resulta na redução de IFN-γ e IL-12 por células TCD4⁺, o que consequentemente impediria o desenvolvimento da imunidade celular, necessário para a formação do granuloma, e promoveria a imunidade humoral.

Diversos experimentos utilizando camundongos Xid (X-linked immunodeficiency-imunodeficiência ligada ao cromossomo X), que são camundongos deficientes no cromossomo X do gene que regula a expressão de uma tirosina quinase (tirosina de Bruton) responsável pela maturação de linfócitos B, causando, em especial, ausência de linfócitos B-1, mostraram que estes camundongos têm células efetoras com alta atividade e, consequentemente, apresentam resistência às infecções por patógenos dependentes de resposta celular (RAWLINGS *et al.*, 1993). Entretanto, os

camundongos Xid possuem susceptibilidade inata à infecção por Salmonella typhimurium, que poderia ser explicada pela ausência de resposta humoral de IgA, mediada por linfócitos B-1, na lâmina própria do intestino (O'BRIEN *et al.*, 1981).

Os camundongos Xid, quando infectados com microrganismos que desenvolvem um processo inflamatório crônico seguido da formação de granuloma, mostram-se mais resistentes à infecção com formação de granuloma mais compacto e uma infecção menos disseminada. Nos últimos anos, vários trabalhos foram realizados utilizando camundongos Xid. Estes camundongos foram infectados e comparados com camundongos selvagens, para se avaliar a importância de linfócitos B-1 na evolução da doença. Neste sentido, vários agentes infecciosos já foram testados: *Trypanosoma cruzi, Paracoccidioides brasiliensis, Leishmania major.* Em todos os experimentos, os animais Xid foram mais resistentes, apresentaram granuloma mais compacto e organizado, que propiciou menor carga microbiológica nos órgãos e menor disseminação do patógeno (HOERAUF *et al.*, 1994; KIPNIS, 1998; MINOPRIO *et al.*, 1993).

Popi et al. (2008) demonstraram, através da transferência passiva de linfócitos B-1 para camundongos BALB/Xid (camundongos deficientes de linfócitos B-1), que estes animais eram mais susceptíveis à infecção por *P. b*rasiliensis. A carga fúngica em camundongos BALB/c e BALB/Xid (reconstituídos com linfócitos B-1) era significantemente maior quando comparada com à de camundongos BALB/Xid e o bloqueio da IL-10 conduzia para o melhor controle da infecção. Assim, os autores sugerem que a produção de IL-10 pelos linfócitos B-1 seria a maior responsável pela susceptibilidade à infecção.

Os camundongos BALB/Xid apresentam aumento na resposta inflamatória aguda, atraso no processo de cicatrização e proeminente infiltrado neutrofílico. Estes dados

comprovam que células B-1b participam da resposta inflamatória e do processo de cicatrização, provavelmente por influenciar a cinética da fase inflamatória via da IL-10. Estes camundongos apresentam atraso no processo de cicatrização, quando comparados com o animal controle. Entretanto, quando estes camundongos foram reconstituídos com células B-1b apresentaram o mesmo tempo de cicatrização, quando comparado a animais controles (camundongos BALB/c) (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Devido à participação dos linfócitos B-1 na resposta imune, pelo fato destas células apresentarem características, como fagocitar, apresentar antígeno, secretar anticorpo, produzir IL-10, migrar de seus compartimentos específicos até o foco inflamatório, dentre outras, a melhor compreensão da participação dessas células na resposta imune contra *P. brasiliensis* seria extremamente importante, pois, de acordo com dados da literatura, tanto a resposta imune inata como a resposta imune adaptativa são importantes na PCM. Para isso, realizamos ensaios *in vitro*, para melhor caracterizarmos estas células fenotipicamente e funcionalmente, e também realizamos ensaios *in vivo*, para compreendermos a participação dos linfócitos B-1 na PCM.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a participação de linfócitos B-1 na infecção fúngica causada pelo *P. brasiliensis*.

2.2. Objetivos específicos

- I. Estudar a interação in vitro de células B-1 com CFA (antígeno livre da parede do fungo) de P. brasiliensis em relação à:
- a) determinação do fenótipo das células do sobrenadante da cultura de células totais aderentes peritoneais de 4 dias, sem estímulo e com estímulo de CFA, em relação à expressão de CD19, CD11b e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e expressão do MHC-II.
- b) produção de citocinas IL-10, IL-4, IFN-γ, TNF-α pelos linfócitos B-1 após estímulo com o CFA.
- c) capacidade proliferativa destas células e capacidade de apresentar antígeno para linfócitos TCD4⁺
- d) expressão dos receptores TLR-2 e TLR-4, da molécula adaptadora MyD88, e expressão de IL-10 por RT-PCR.
- II. Avaliar a capacidade *in vivo* dos linfócitos B-1 em migrar da cavidade peritoneal para o baço após estímulo intraperitoneal (ip) com leveduras de *P. brasiliensis*
- III. Determinar a geração de células T com fenótipo de célula T reguladora (CD4⁺CD25⁺Foxp3) no baço após estímulo ip com leveduras de *P. brasiliensis*

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens BALB/c, CBA, CBA/N Xid (desprovidos de linfócitos B-1) de 12 a 16 semanas de idade. Os animais foram obtidos do Biotério do Instituto da Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e do CEDEME da Universidade Federal de São Paulo, mantidos em padrão sanitário, livres de patógenos específicos (SPF – specific patogens free). Os camundongos foram sacrificados de acordo com critérios aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – CEEA – FCF.

3.2. Fungo

Foi utilizada a cepa virulenta *P. b.* 18 (KASHINO *et al.*, 1987) do *P. brasiliensis* para a obtenção do CFA (antígeno livre da parede de *P. brasiliensis*) a partir da superfície levefuriforme do fungo e para a preparação do inóculo utilizado nas infecções intraperitoneais. A cepa foi mantida em meio semi-sólido Sabouraud-dextrose-ágar (MERCK- ALEMANHA) em estufa, a 36°C, com repiques semanais.

3.3. Antígeno (preparação do CFA)

O fungo *P. b.* 18 na sua fase leveduriforme foi colocado em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) e agitado em vortex por aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado por 5

minutos a 2.000 rpm, do qual foi recolhido o sobrenadante para a obtenção do CFA (antígeno livre da parede do fungo) (CAMARGO *et al.*, 1991).

3.4. Dosagem de proteínas

As determinações protéicas foram realizadas segundo método proposto por Bradford (1976), no qual se utiliza "Coomassie Brilliant Blue" (CBB) G-250 (Sigma – St. Louis – Estados Unidos), como reativo, e albumina bovina (BSA) 1,0 mg/ml, como padrão.

3.5. Análise da composição do antígeno

A composição de proteínas do antígeno foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Os géis foram corados por impregnação pela prata, de acordo com Ansorge (1983).

3.6. Preparação do inóculo para a infecção intraperitoneal

Células fúngicas da cepa *P. b.* 18 foram coletadas em 10mL de PBS (pH 7,2), deixando-se decantar as partículas maiores, o sobrenadante foi coletado e a contagem do número destas células leveduriformes foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer.

3.7. Infecção intratraperitoneal

Os animais foram infectados por injeção intraperitoneal (ip) com suspensão contendo 1x10⁶ células/mL de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* em volume final de 200 µl de PBS.

3.8. Determinação da viabilidade celular

Para a determinação da viabilidade celular foi utilizado o corante azul de Trypan.

3.9. Obtenção de células aderentes totais peritoneais

As células totais da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c foram obtidas por meio de lavagens com meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)-1640. Foram injetados 7mL de meio RPMI mais 1 mL de ar na cavidade peritoneal e, em seguida, o mesmo volume foi retirado com auxílio de pipeta de bulbo. A solução de lavagem foi transferida para uma placa de Petri e incubada por 40 minutos em estufa de 37°C com 5% de CO₂. O sobrenadante foi descartado e as células aderentes utilizadas para a realização do ensaio.

3.10. Obtenção de linfócitos B-1

Foram feitas lavagens na cavidade peritoneal de camundongos (BALB/c), injetando-se 7 mL de meio RPMI-1640 e 1mL de ar. Em seguida, o mesmo volume foi retirado com auxílio de uma pipeta de bulbo. A solução de lavagem foi transferida para uma placa de Petri e incubada por 40 minutos em estufa de 37°C com 5% CO₂. O sobrenadante foi desprezado e as células aderentes foram ressuspensas em meio

RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por mais 4 dias. Após este período, recolhemos somente o sobrenadante para a obtenção de linfócitos B-1.

3.11. Imunofenotipagem dos linfócitos B-1 por citometria de fluxo

Após a obtenção de linfócitos B-1, como descrito anteriormente, o fenótipo destas células foi analisado incubando-se as células com anticorpos específicos para cada marcador. Foram utilizados os seguintes marcadores: anti-CD19-PE (clone eBIO 1D3), anti-CD11b-FITC (clone M1/70), anti-CD80-PE (clone 16-10A 1), anti-CD86-FITC (clone GL1), anti-I-A/I-E-PE (clone M5-114.15.2).

As células marcadas foram deixadas no gelo por 15 minutos, em seguida foram lavadas e centrifugadas. As células foram ressuspensas em PBS mais 3% de soro fetal bovino contendo 10 μg/mL de iodeto de propídio (IP). As células marcadas com IP foram consideradas mortas e, consequentemente, excluídas de todas as análises de células.

A leitura foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o aparelho FacScalibur (Becton & Dickison, C.A). Foram analisados 10.000 eventos. Os resultados foram analisados com auxílio do *software FlowJo* (Treestar.com, EUA).

Para analisar os resultados utilizamos a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO), (ROEDERER *et al.*, 2001). Pela qual os controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpo/marcadores, exceto aquele que será analisado. Os valores obtidos são considerados limites do FMO das células e todos os valores de fluorescência acima deste limite são considerados verdadeiros positivos.

3.12. Imunofenotipagem de linfócitos B-1 após estímulo com CFA de P. brasiliensis

Os linfócitos B-1 caracterizados pelo fenótipo descrito anteriormente foram estimulados com CFA (diferentes concentrações) por 24 horas. Após este período foi avaliada a expressão dos marcadores CD19, CD11b, CD80, CD86, MHC-II empregando-se a técnica de citometria de fluxo acima descrita.

O sobrenadante da cultura foi coletado e estocado a -80°C para a dosagem de citocinas pelo método ELISA de captura.

3.13. Ensaio de detecção de citocinas

As citocinas IL-10, IL-4, TNF-α e IFN-γ foram quantificadas a partir dos sobrenadantes de cultura de linfócitos B-1 obtidos de camundongos BALB/c. As células foram cultivadas em placas de 24 orifícios, estimuladas com diferentes concentrações de CFA; após 24 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -80 C até o uso. Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS (lipopolissacarídeos). A técnica utilizada nos ensaios foi ELISA de captura, utilizando-se anticorpos monoclonais de captura e detecção contra as citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (Preprotech Inc). As condições adotadas nos ensaios foram as seguintes:

As placas de microtitulação de 96 orifícios foram sensibilizadas com anticorpos de captura diluídos em PBS e mantidas em temperatura ambiente de um dia para o outro. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS 1X – Tween 20 a 0,05%. Foi adicionado às placas PBS contendo 1% de BSA em PBS, para promover o bloqueio de sítios livres do plástico, e mantidos por 1 hora à temperatura ambiente; em seguida as placas foram lavadas 4 vezes com PBS 1X – Tween 20 a 0,05%. As

citocinas recombinantes, utilizadas para realizar a curva padrão, foram diluídas em PBS 1X – Tween 20 a 0,05% contendo 0,1% de BSA e incubadas nas placas por 2 horas em temperatura ambiente. Os sobrenadantes de cultura das amostras foram também incubados nos orifícios por este mesmo período, quando então todos os orifícios foram lavados 4 vezes com PBS – Tween 20 a 0,05%.

Foram adicionados os anticorpos de detecção conjugados à biotina, diluídos em PBS 1X — Tween 20 a 0,05% contendo 0,1% de BSA e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Os orifícios foram lavados 4 vezes. As placas foram incubadas com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente, após este período foram realizadas 4 lavagens da placa com PBS 1X — Tween 20 a 0,05% contendo 0,1% de BSA. A revelação foi realizada com o-fenilenodiamina 1mg/mL, diluída em tampão fosfato 0,4M citrato de sódio 0,4M PH 5,3, por 15-30 minutos. O bloqueio da reação foi feito com H₂SO₄ 4N e a leitura das densidades ópticas (DO) foi feita em leitor automático, em comprimento de onda de 492nm. As concentrações de cada citocina foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear, da curva padrão obtida com citocinas recombinantes de camundongos.

3.14. Ensaio de proliferação de células totais aderentes peritoneais

Após a obtenção das células totais aderentes peritoneais pelo método anteriormente descrito, estas foram ajustadas para a concentração de 2x10⁵ células/mL e plaqueadas na presença de diferentes concentrações do antígeno CFA (2 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, 20μg/mL, 30 μg/mL). As culturas foram mantidas pelos períodos de 16 horas, 4 e 7 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂; nas últimas 16 horas antes se de completar cada período de tempo foi acrescentado 1 μCi de

timidina triciada à cultura. Como controle positivo foi utilizado LPS (100ng/mL). Após a incubação, as células foram coletadas em coletor automático de células (*Cell harvester*) e a radioatividade incorporada foi mensurada em contador de partículas beta (Liquid Scintillation Counter, 1205 betaplate, Wallac).

3.15. Ensaio de proliferação de linfócitos B-1

Após a obtenção dos linfócitos B-1 pelo método já descrito anteriormente, estas células foram ajustadas e plaqueadas para a concentração de 2x10⁵ células/mL; posteriormente, estas células foram estimuladas com diferentes concentrações de CFA (0,2μg/mL, 0,5μg/mL, 1μg/mL, 2μg/mL, 5μg/mL – dados não mostrados – e 10 μg/mL, 20μg/mL, 30 μg/mL – dados mostrados). As culturas foram mantidas pelos períodos de 24 e 72 horas em estufa de CO₂ a 37°C; 16 horas antes de se completar cada tempo foi adicionado 1μCi de timidina triciada à cultura. Como controle positivo foi utilizado o LPS (100ng/mL). Após a incubação, as células foram coletadas em um coletor automático de células (*Cell harvester*) e a radioatividade incorporada foi mensurada em contador de partícula beta (Liquid Scintillation Counter, 1205 betaplate, Wallac).

3.16. Ativação de linfócitos T CD4⁺ por linfócitos B-1

3.16.1. Imunização de camundongos com P. brasiliensis

Os camundongos BALB/c foram imunizados subcutâneamente no coxim plantar com uma emulsão que continha: 50 µg do antígeno de *P. brasiliensis* denominado de CFA (suspensão de antígenos livres da parede do *P. b*), emulsificado em adjuvante de Freud completo (Sigma – St. Louis, EUA), na proporção de 1:1,

contidos em um volume final de 50µL. Após 7 dias, os camundongos foram sacrificados e os linfonodos inguinais e poplíteos retirados. As células T CD4⁺ foram purificadas e utilizadas no experimento.

3.16.2. Purificação de linfócitos TCD4⁺

Os linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos, imunizados como descrito anteriormente, foram retirados e macerados. Os linfócitos TCD4⁺ foram purificados através de seleção positiva em coluna magnética utilizando anti-CD4 marcado com "Microbeads" (MACS – Germany), separando-se assim de outros componentes celulares. As células foram ajustadas para a concentração desejada e plaqueadas para a realização do ensaio de proliferação celular.

3.16.3. Ensaio de proliferação celular

Após purificação, os linfócitos TCD4⁺ foram plaqueados à concentração de 1,5x10⁵ células TCD4⁺/mL por orifício, na presença de 5x10⁴ linfócitos B-1/mL, previamente irradiados (700 rad). Em seguida foram acrescentadas à cultura diferentes concentrações de CFA (20ng/mL, 30ng/mL, 0,5 μg/mL e 1 μg/mL). As células foram incubadas por 72 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C; nas últimas 16 horas foi acrescentado 1μCi de timidina triciada (Amershan Biosciences – Reino Unido) à cultura. Como controle positivo foi utilizado o mitógeno fitoemaglutinina (PHA) (20μg/mL). Após a incubação, as células foram recolhidas em um coletor automático de células (*Cell harvester*) e a radioatividade incorporada foi mensurada em contador de partículas beta (Liquid Scintillation Counter, 1205 betaplate, Wallac).

3.17. Análise da expressão de RNAm de TLR-2, TLR-4, MyD88 e IL-10 de linfócitos B-1 após estímulo com CFA

3.17.1. Extração de RNA total

Os linfócitos B-1 foram plaqueados na concentração de 1x10⁶ células/mL e estimulados com CFA na concentração de 0,5µg/mL pelo período de 4 horas. Logo após este período foram submetidos à extração de RNA pelo reagente Trizol (Invitrogen – Aukland, New Zealand). Este reagente é uma solução monofásica de fenol e isoticionato de quanidina, o qual extrai RNA livre de DNA.

A placa foi centrifugada e o sobrenadante foi guardado para a dosagem de citocinas. As células foram ressuspendidas em 1mL de Trizol para cada 10⁷células de camundongos BALB/c e foram submetidas à forte agitação. Posteriormente, o material foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 200 μL de clorofórmio; então agitamos vigorosamente, com as mãos, por 15 segundos, e incubamos por 3 minutos à temperatura ambiente. Centrifugamos o material (4°C – 12.000g – 15 minutos), desta forma, o conteúdo foi separado em 3 fases fases: fenol-clorofórmio, interfase (DNA) e fase aquosa (RNA). A fase aquosa foi transferida para outro tubo; adicionamos 500 μL de álcool isopropílico e agitamos vigorosamente, para a precipitação do RNA. Após forte agitação, o material foi incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Centrifugamos novamente (4°C –15.000g – 10 minutos), desprezando o sobrenadante, ficando somente com o RNA precipitado.

Posteriormente, o RNA foi lavado com 1 mL de Etanol 75%; centrifugado (4°C – 7.500g – 5 minutos). Secamos o pellet por 20 minutos e ressuspendemos em 20µL de água livre de RNAse (DEPC). O material foi aquecido por 65°C por 10 minutos e imediatamente colocado no gelo. Foi utilizada uma alíquota de 1 µL de RNA para

realizar a dosagem de RNA no aparelho Nano Drop e, em seguida, as preparações de RNA total foram estocadas à temperatura de -80°C até o uso.

3.17.2. Quantificação do RNA total

Uma alíquota de cada preparação de RNA extraído foi quantificada pelo método espectrofotométrico a 260nm. A pureza foi avaliada em comprimento de onda de 280/260nm (Beckman DU 640 spectrophometer, Roche, EUA).

3.17.3. Síntese de cDNA

Após a quantificação do RNA, foi sintetizado o cDNA, utilizando o *kit SuperScript* (Invitrogen, CA, EUA). Cada reação de 10μL de volume final continha 1μL de Oligo dT, 1μL de 10mm dNTP mix e volume variável de RNA para cada amostra. Esta reação foi incubada a 65°C durante 5 minutos e, logo após, resfriada no gelo, por pelo menos 1 minuto. Um segundo "mix" contendo 2,5μL de 1x RT Buffer, 5μL de 25mm MgCl₂, 5μL de 0,1 M DTT e 1,25 μL de "RNase OLIGO" foi adicionado à reação. A reação foi incubada a 42°C por 2 minutos, logo após, foi adicionado 1μL de Super Script II RT, sendo incubado a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos. No final da reação foi adicionado 1μL de RNAse H e incubado a 37°C por 20 minutos para remover as fitas de RNA que não foram convertidas a cDNA. As preparações de cDNA obtidas foram estocadas a -20°C até o uso.

3.17.4. RT-PCR semiquantitativo

O cDNA sintetizado foi submetido à técnica de RT-PCR semiquantitativo. As sequências de cDNA utilizadas foram obtidas no Gen Bank, (Wang et al., 2000),

com número de acesso para TLR-2: AF124741 e para TLR-4: AF095353. Os primers do RT-PCR TLR-2: 5'-ACAGCTTACTGTGACTCTCCGCC para -3' 5'GGTCTTGGTGTTATTATCTTGCGC-3'. Os primers utilizados para TLR-4 foram 5'-GACCTCAGCTTCAATGGTGC-3' e 5'-TATCAGAAATGCTACAGTGGATACC-3'. Os CACCTGTGTCTGGTCCATT-3' primers para MyD88 foram: 5'-IL-10 CGCAGGATAACTGGGAAAGT-3'. foram: 5'-Os primers para CCAGTTTTACCTGGTAGAAGTGATG-3' е 5'TGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGAC-3'. Os primers para HPGRT foram: 5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3' e 5'-GCTCCTGAAAAGACCTCT-3'. As reações foram padronizadas para volume de 30μL, contendo 22μL de Platinum mix, 1,3μL de MgCl₂, 0,1μL de enzima Taq DNA polimerase e 0,6 μL de água DEPC. Logo em seguida, foram acrescentados 2µL da amostra de cDNA, 2µL de primer-forward e 2µL de primer-reverse. As amplificações foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) programado para um ciclo LID- 105°C, 94°C, por 5 minutos, 94°C, por 1 minuto, para a completa desnaturação. Seguiam-se Tm de 1 minuto e 30 segundos (temperatura de anelamento) e 72°C por 1 minuto (para extensão), Go to step 2 x 36 ciclos e 72°C, por 3 minutos, 4°C, por 2 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, utilizando TBE 0,5 (Trisma base 0,1 M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM) como tampão de corrida. As amostras foram coradas em brometo de etídio (10µg/mL) e visualizadas em luz UV. Como controle positivo, utilizamos a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HPGRT), presente em todas as células eucariontes.

3.18. Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*

Primeiramente, foi preparada a suspensão contendo 1x10⁶ células/mL de leveduras viáveis de *P. brasiliensis* contidas em 200 µL de PBS de volume final, que foram utilizadas para a realização da infecção ip de camundongos BALB/c.

Os camundongos foram infectados ip pelos períodos de 1 hora, 5 horas, 24 horas e 7 dias. Como controle foram utilizados camundongos nas quais, nos períodos acima citados, foram injetados 200 µL de PBS estéril na cavidade peritoneal.

Após o período determinado, estes camundongos foram sacrificados e foram feitas lavagens na cavidade peritoneal, injetando-se 7 mL de meio RPMI e 1mL de ar. Em seguida, o mesmo volume foi retirado com auxílio de uma pipeta de bulbo.

O fenótipo destas células foi analisado incubando-se as células com anticorpos específicos para cada marcador. Foram utilizados os seguintes marcadores: anti-CD19-PE (clone eBIO 1D3), anti-CD11b-FITC (clone M1/70).

Estas células marcadas foram deixadas no gelo por 15 minutos, em seguidas foram lavadas e centrifugadas. As células foram ressuspensas em PBS mais 3% de soro fetal bovino.

A leitura foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o aparelho FacsCanto. Foram analisados 100.000 eventos. Os dado gerados, foram analisados com auxílio do *software FlowJo* (Treestar.com, EUA) utilizando, metodologia já descrita.

3.19. Migração de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*, para o baço

3.19.1. Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal e do baço de camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*

Primeiramente, foram realizadas lavagens com meio de cultura RPMI na cavidade abdominal dos camundongos CBA/N para a obtenção dos linfócitos B-1. Após a obtenção dos linfócitos B-1 pelo método já descrito, aproximadamente 2x10⁴ células/mL foram ressuspendidas em 200 µL de PBS estéril e transferidas intraperitonealmente para cada camundongo CBA/N Xid. Após o período de 24 horas, estes camundongos foram infectados via ip com 10⁶ células/mL de leveduras do P. brasiliensis, diluída em volume final de 200 µL de PBS estéril. Após 5 horas de infecção, os animais foram sacrificados e foram obtidas as células da cavidade peritoneal e do baço. Para a obtenção das células do baço, este órgão foi macerado e mantido pelo período de 20 minutos em estufa com 5% de CO2 a 37°C na presença de tampão de digestão, contendo 0,7μg/mL de colagenase IV (SIGMA -ALDRICH - St. Louis). As partículas maiores foram removidas, passando-se a suspensão de células através de uma membrana de gaze estéril. Após este período, as células foram lavadas com tampão hemolítico por duas vezes e foram marcadas com anticorpos específicos para cada marcador. Como controle foram utilizados camundongos CBA/N Xid (nos quais foram injetados ip 200 µL de PBS estéril) e camundongos CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1 e sem infecção).

O fenótipo destas células foi analisado incubando-se as células com anticorpos específicos para cada marcador. Foram utilizados os seguintes marcadores: anti-

CD19-PE (clone eBIO 1D3), anti-CD11b-FITC (cloneM1/70) e anti-IgM-PerCP-Cy5.5 (clone R6-60.2).

Estas células marcadas foram deixadas no gelo por 15 minutos, em seguida foram lavadas e centrifugadas. As células foram ressuspensas em PBS mais 3% de soro fetal bovino.

A leitura foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o aparelho FacsCanto. Foram analisados 100.000 eventos. Os dado gerados, foram analisados com auxílio do *software FlowJo* (Treestar.com, EUA) utilizando, metodologia já descrita.

3.20. Caracterização de células T regulatórias do baço de camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*

Primeiramente, foram realizadas lavagens com meio de cultura RPMI na cavidade abdominal dos camundongos CBA para a obtenção dos linfócitos B-1. Após a obtenção dos linfócitos B-1, pelo método já descrito, aproximadamente 2x10⁴ destas células foram ressuspendidas em **PBS** estéril transferidas intrapeitonealmente para cada camundongo CBA/N Xid. Após período de 24 horas, estes camundongos foram infectados com 10⁶ leveduras de P. brasiliensis (diluída em PBS estéril) por via ip num volume final de 200 µL. Após 5 horas de infecção, os animais foram sacrificados. O baço foi retirado, macerado e mantido por 20 minutos em estufa com 5% de CO2 a 37°C na presença de tampão de digestão (0,7µg/mL de colagenase IV e 30µg/mL de DNase I pancreática bovina tipo IV). As partículas maiores foram removidas passando a suspensão de células através de uma membrana de gaze estéril. Em seguida, as células foram lavadas com tampão hemolítico por duas vezes e foram marcadas com anticorpos específicos para cada marcador. Como controle foram utilizados camundongos nos quais foram injetados intraperinealmente 200 µL de PBS estéril e camundongos CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1 e sem infecção.

As células foram marcadas para as moléculas de superfície utilizando os anticorpos específicos para cada marcador. Foram utilizados os seguintes marcadores: anti-CD4-APC (clone RM4-5) e anti-CD25-APC Cy7 (clone PC 61). Estas células marcadas foram deixadas no gelo por 15 minutos e, em seguida, foram lavadas com PBS acrescido de 3% de soro fetal bovino. A seguir, foram realizadas a fixação e a permeabilização das células para proceder a marcação para Foxp3, utilizando o anticorpo anti-Foxp3-ALEXAFLUOR 488 (clone 150/E4). A fixação e a permeabilização foram realizadas utilizando o kit "Foxp3 Staining Buffer Set" (e-Bioscience), seguindo as instruções do fabricante (descritas a seguir): As células foram fixadas utilizando-se a solução Fix Perm (1 volume do concentrado e 3 volumes do diluente), na qual foram adicionados 100 µL em cada tubo e mantidos no gelo pelo período de 20 minutos em seguida; as células foram permeabilizadas utilizando-se o Buffer de permeabilização, na qual foram adicionados 100 µL em cada tubo, por cima do que já tinha. Os tubos foram centrifugados a 4°C a 450 x g por 5 minutos; em seguida o sobrenadante foi descartado e os tubos rapidamente vortexados. Após estes procedimentos, foi realizada a marcação intracelular, adicionando o anticorpo Foxp3, por 20 minutos a 4°C;

Após a marcação intracelular, as células foram lavadas com 100 μL do buffer de permeabilização, centrifugadas a 450 x g, 4°C por 5 minutos; em seguida o sobrenadante foi descartado, os tubos vortexados e o pellet foi ressuspendido em 300 μL de PBS + 3% de soro fetal bovino. Estas células marcadas foram deixadas

no gelo por 15 minutos, em seguida foram lavadas e centrifugadas. As células foram ressuspensas em PBS mais 3% de soro fetal bovino para a leitura.

A leitura foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o aparelho FacsCanto. Foram analisados 100.000 eventos. Os dado gerados, foram analisados com auxílio do *software FlowJo* (Treestar.com, EUA) utilizando, metodologia já descrita.

3.21. Análise estatística

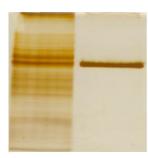
A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism 5.0, utilizando-se o teste T Student para comparação entre dois grupos. Valores de p<0,05 indicam significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1. Análise do CFA em gel de poliacrilamida

Após a obtenção do CFA, como descrito anteriormente, analisamos a composição protéica, pela técnica de eletroforese SDS-PAGE a 10% de poliacrilamida. A coluna 1 mostra o CFA (suspensão de antígenos livres da parede do *P. brasiliensis*) obtido do sobrenadante do fungo agitado em vortex. Observamos que o CFA é constituído por moléculas protéicas com diversas frações de diferentes pesos moleculares que, segundo dados da literatura, variam de 10 a 110 kDa, destacando a presença da glicoproteína de 43kDa (gp43), que é uma das frações majoritárias. A coluna 2 mostra o principal componente antigênico do fungo a gp43 (glicoproteína de 43kDa), purificado.

Coluna 1 Coluna 2



Coluna 1 - CFA de leveduras de *P. brasiliensis*Coluna 2 - banda da gp43 purificada

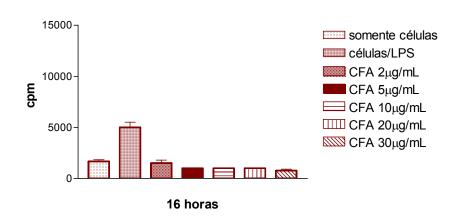
Figura 1: **Análise da composição protéica do antígeno (CFA)**. Análise da composição protéica de uma preparação antigênica de *P. brasiliensis*, pela técnica de eletroforese SDS-PAGE a 10% de acrilamida. Coluna 1 - antígeno livre da parede do fungo (CFA), Coluna 2 - banda da gp43 purificada.

4.2. Ensaio de proliferação celular de células totais aderentes peritoneais estimuladas com diferentes concentrações de CFA

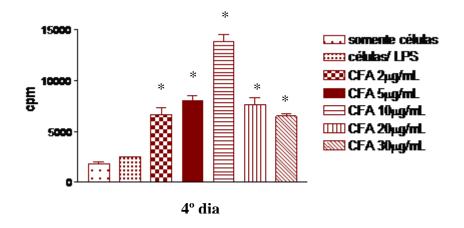
As células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c foram estimuladas com diferentes concentrações de CFA (2 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL,

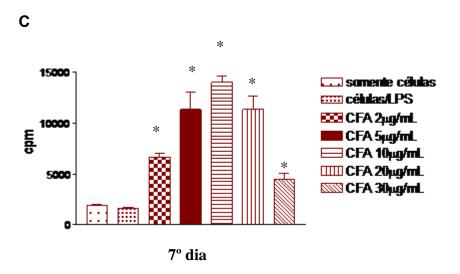
20μg/mL, 30 μg/mL) e mantidas em cultura por 16 horas (tempo inicial zero), quatro e sete dias de cultura. Como controle foram utilizadas células sem nenhum estímulo e células estimuladas com 100ng/mL de LPS. Os resultados mostraram que as células totais aderentes peritoneais, após serem estimuladas com diferentes concentrações de antígeno, não proliferam no tempo zero (Figura 2 A), mas no quarto (Figura 2 B) e no sétimo dias (Figura 2 C); observamos proliferação celular significativa principalmente quando a concentração de 10μg/mL foi utilizada.

Α



В





Figuras 2: Ensaio de linfoproliferação de células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c, estimuladas com CFA. As células totais aderentes peritoneais foram estimuladas com diferentes concentrações de CFA (2 μg/mL, 5 μg/mL, 10 μg/mL, 20μg/mL, 30 μg/mL). **Figura (2 A)** tempo inicial de cultura de 16 horas. **Figura (2 B)** tempo de cultura de 4 dias. **Figura (2 C)** tempo de cultura de 7 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores são significativos comparando as células totais aderentes peritoneais sem estímulo com as células totais aderentes peritoneais com estímulo (CFA), *p < 0,05.

4.3. Caracterização fenotípica do sobrenadante da cultura celular de 4 dias de células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c, após estímulo com CFA de *P. brasiliensis*

Foram analisadas a expressão de moléculas de superfície das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias das células aderentes totais peritoneais de camundongos BALB/c por citometria de fluxo. Os marcadores utilizados para caracterizar o fenótipo destas células foram: CD19, CD11b.

Foi utilizado iodeto de propídio (IP) para controle de viabilidade. Portanto, todas as células que se apresentaram positivas para IP (células mortas) foram excluídas da análise.

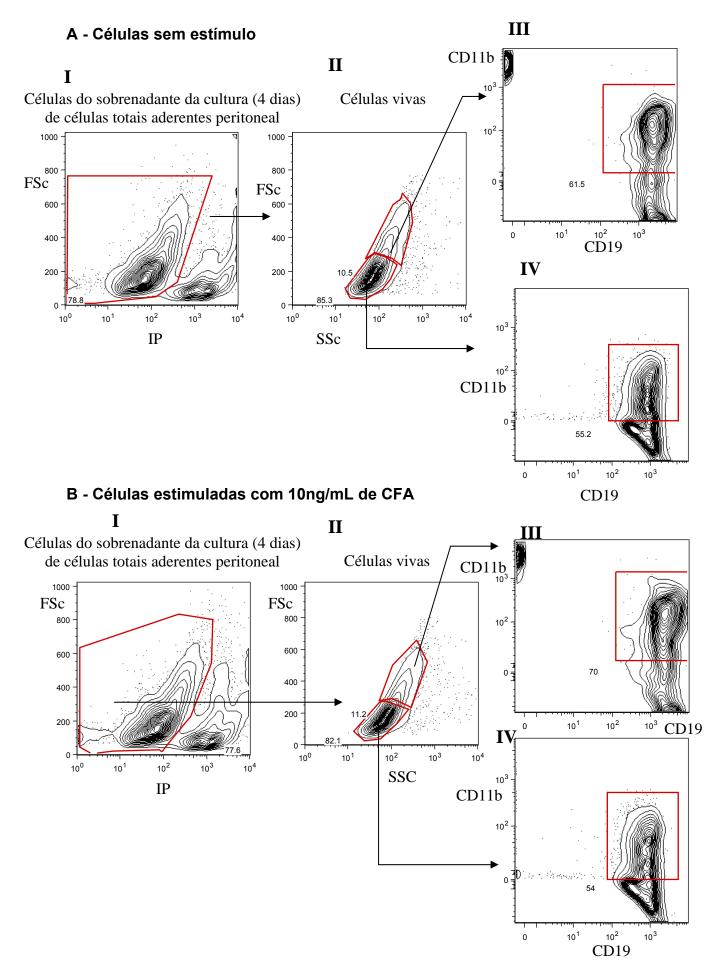
Para analisar os resultados utilizamos a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO), pela qual os controles FMO são determinados através da marcação das células com todos os anticorpos/marcadores, exceto aqueles que serão analisados. Os valores obtidos são considerados limites do FMO das células e todos os valores de fluorescência acima deste limite são considerados verdadeiros positivos.

Observamos que aproximadamente 80% das células foram negativas para IP (células vivas) (Figura 3 A - I) e foram incluídas no quadrante das análises. A partir do quadrante das células vivas (Figura 3 A - II), a análise foi realizada segundo os parâmetros de tamanho (FSc - forward Scatter) e granulosidade (SSc - Side Scatter). A população celular da cavidade peritoneal foi dividida em duas para a análise: uma população FSc^{high} (células grandes) e uma SSc^{low} (pouco granulosas). Segundo dados previamente descritos em nosso laboratório, observou-se que estas células B-1, ao invés de grandes, são duas ou mais células B-1 aderidas entre si, sendo cada uma destas células do tamanho característico de linfócitos. Estas células foram consideradas doublets de linfócitos B-1, ou seja, uma forte e estável aderência entre duas células B-1, e a outra população FSc^{low} (células pequenas) e SSc^{low} (pouco granulosas) que são consideradas células B-1 únicas (singlets).

Assim, de acordo com o fenótipo da população FSc^{high} e SSc^{low}, foi possível observar que 61,5% das células são positivas para CD19 e CD11b (Figura 3 A – III). O fenótipo da população FSc^{low} e SSc^{low} mostrou que 55,2% das células são positivas para CD19 e CD11b (Figura 3 A – IV). De acordo com estes dados, podemos observar que a maioria das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias das células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c apresentam um fenótipo de linfócitos B-1 (CD19⁺CD11b⁺). Os dados da análise fenotípica destas

células podem ser melhor observados na Tabela 1 (análise fenotípica dos linfócitos B-1 sem estímulo).

Em seguida, analisamos o fenótipo destas células, após estímulo de 24 horas com CFA de *P. brasiliensis* (Figura 3 B). Primeiramente, padronizamos a concentração de CFA que seria utilizada nos experimentos, utilizando iodeto de propídio para verificar a viabilidade celular. Foi possível observar que, conforme aumentávamos a dose do antígeno (µg/mL), as células perdiam a viabilidade (dados não mostrados). A partir destes dados foram utilizadas concentrações menores do antígeno nos experimentos. Sendo que, quando utilizamos a concentração de 10 ng/mL, aproximadamente 70% das células permaneciam viáveis. Os resultados demonstram que não houve alteração significativa nas moléculas de superfície destas células após estímulo com CFA de *P. brasiliensis* (Figura 3 B – III e IV). Os dados da análise fenotípica destas células podem ser melhor observados na Tabela 2 (análise fenotípica dos linfócitos B-1 após estímulo de 10 ng/mL de CFA de *P. brasiliensis*).



Figuras 3: Caracterização da expressão das moléculas de superfície das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias das células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c sem estímulo (Figura 3 A) e com estímulo de 10ng/mL (Figura 3 B) de CFA de *P. brasiliensis*. Através de citometria de fluxo, analisamos a expressão de CD19 e CD11b. A leitura das amostras foi realizada no aparelho FACS e os dados foram analisados no *software FlowJo*. A metodologia utilizada na análise foi quadrantes para determinar as populações celulares. I - Células do sobrenadante da cultura celular (4 dias) de células totais aderentes peritoneais, marcadas com lodeto de Propídio; II - células vivas, divididas em duas populações: uma população FSc^{high} e SSc^{low} e uma população FSc^{low} e SSc^{low} (CD19⁺CD11b⁺); IV - população FSc^{low} e SSc^{low} (CD19⁺CD11b⁺).

Tabela 1: Imunofenotipagem das células do sobrenadante da cultura de 4 dias de células totais aderentes peritoneais = linfócitos B-1

Linfócitos B-1	CD19 [†] CD11b [†]
FSc ^{high} e SSc ^{low}	61,5%
FSc ^{low} e SSc ^{low}	55.2%

^{*} Os resultados estão apresentados como porcentagem de células positivas.

Tabela 2: Imunofenotipagem das células do sobrenadante da cultura de 4 dias de células totais aderentes peritoneais = linfócitos B-1 estimulados com CFA de *P. brasiliensis* por período de 24 horas

Linfócitos B-1	CD19 ⁺ CD11b ⁺
FSc ^{high} e SSc ^{low}	70%
FSc ^{low} e SSc ^{low}	54%

^{*} Os resultados estão apresentados como porcentagem de células positivas.

^{*} Os resultados das figuras III e IV foram analisados a partir dos "limites do FMO das células" e todos valores de fluorescência acima deste valor foram considerados verdadeiros positivos; assim, os "gates" das figuras III e IV representam valores positivos para a população CD19 e CD11b.

4.4. Ensaio de proliferação celular de linfócitos B-1

Após a caracterização fenotípica das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias, das células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c, como sendo a maioria linfócitos B-1, realizamos o ensaio de proliferação celular, utilizando esta população enriquecida de linfócitos B-1 a qual foi estimulada com diferentes concentrações de CFA (10 μg/mL, 20 μg/mL, 30 μg/mL), por períodos de 24 e 72 horas. Como controle positivo as células foram estimuladas com 100ng/mL de LPS.

Os resultados demonstram que as concentrações de antígenos utilizadas não foram mitogênicas para estas células, pois não houve proliferação celular significativa nesta população celular após estímulo com CFA.

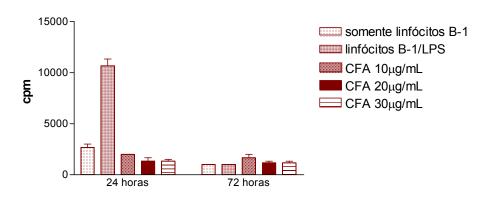


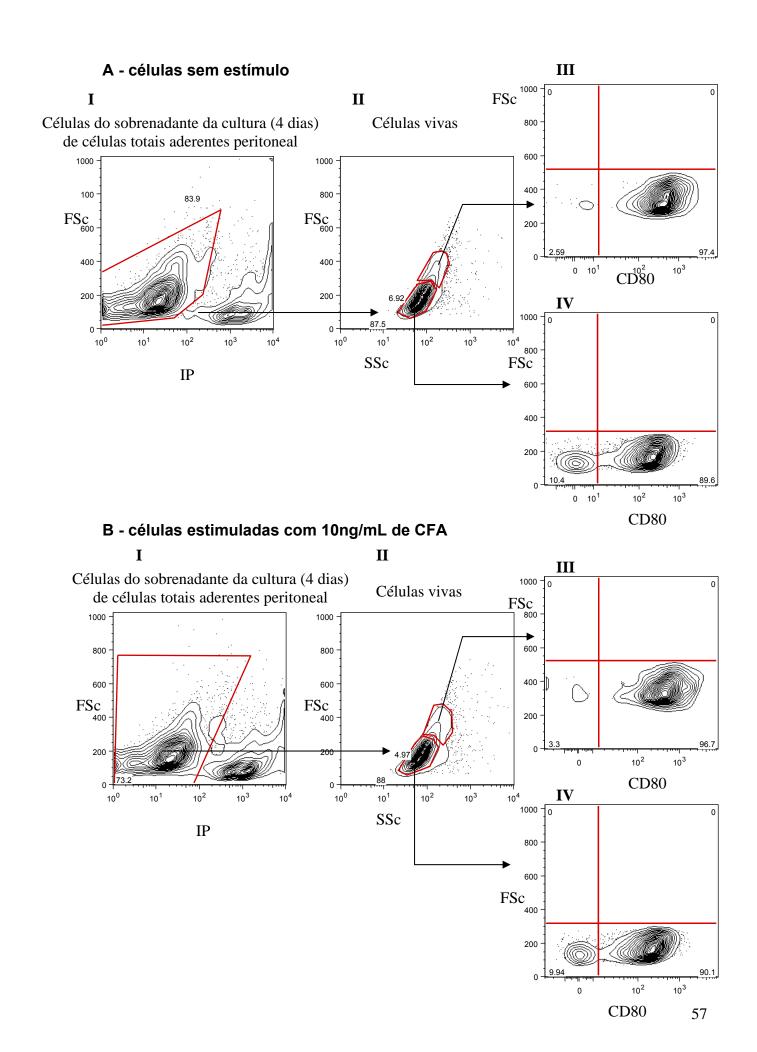
Figura 4: Proliferação celular de linfócitos B-1 estimulados com diferentes concentrações de CFA. Os linfócitos B-1 foram estimulados com diferentes concentrações de CFA (10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL) pelos períodos de 24 horas e 72 horas (Figura 5). Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS. Os dados representam experimentos realizados em triplicata

4.5. Análise das moléculas co-estimuladoras e do MHC-II das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias de células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c, após estímulo com CFA de *P. brasiliensis*

Após caracterizarmos as células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias das células totais aderentes peritoneais como sendo a maioria linfócitos B-1, analisamos a expressão das suas moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e a expressão de MHC-II. A população FSc^{high} e SSc^{low} apresentou alta expressão de CD80 (97,4%) (Figura 5 A – III); não houve expressão significativa de CD86 (19,7%) (Figura 6 A – III). Em relação à expressão de MHC-II, 100% das células expressam MHC-II, sendo que esta população foi dividida em uma população positiva mais *high* e uma população positiva mais *low* (Figura 7 A – III). A população FSc^{low} e SSc^{low} apresentou alta expressão de CD80 (89,6%) (Figura 5 A – IV); não houve expressão significativa da molécula co-estimuladora CD86 (6,5%) (Figura 6 A – III). Em relação à expressão de MHC-II, 100% das células expressaram MHC-II, sendo que esta população foi dividida em uma população positiva mais *high* e uma população positiva mais *low* (Figura 7 A – IV). Os dados da análise fenotípica destas células podem ser melhor observados na Tabela 3 (análise fenotípica dos linfócitos B-1 sem estímulo).

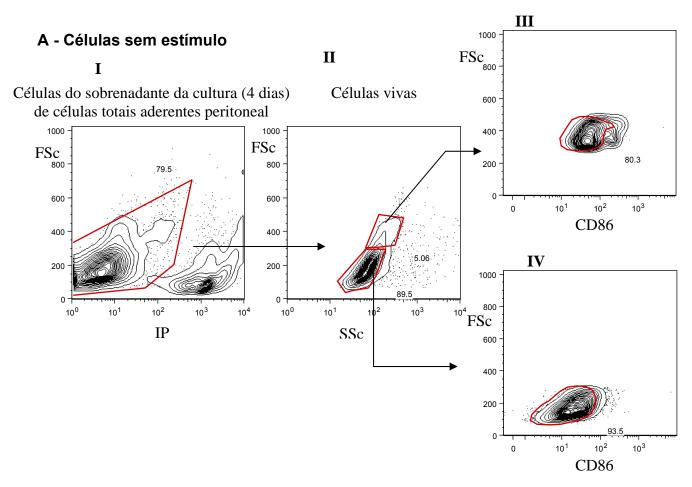
Analisamos a expressão das moléculas co-estimuladoras e a expressão de MHC-II, destas células, após estímulo de 24 horas com CFA de *P. brasiliensis* (Figura 5 B, Figura 6 B e Figura 7 B). Os resultados demonstram que não houve alteração significativa nas moléculas de superfície destas células após estímulo com CFA de *P. brasiliensis*. Os dados da análise fenotípica destas células podem ser

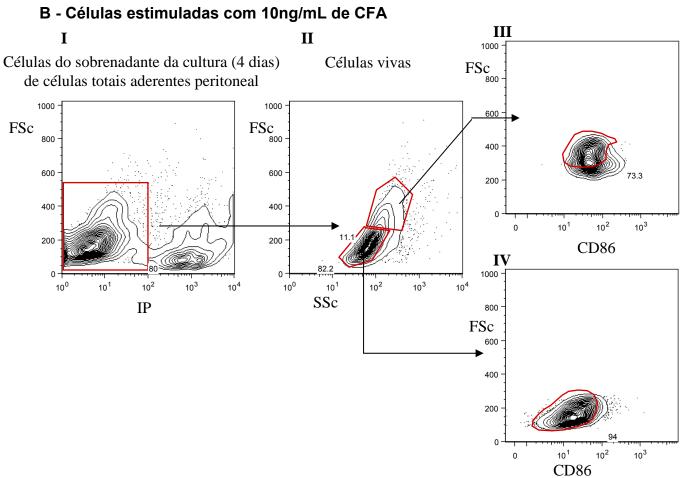
melhor observados na Tabela 4 (análise fenotípica dos linfócitos B-1, após estímulo de 10 ng/mL de CFA de P.b).



Figuras 5: Caracterização da expressão das moléculas de superfície das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias das células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c sem estímulo (Figura 5 A) e com estímulo de 10ng/mL (Figura 5 B) de CFA de *P. brasiliensis*. Através de citometria de fluxo, analisamos a expressão de CD80. A leitura das amostras foi realizada no aparelho FACS e os dados foram analisados no *software FlowJo*. A metodologia utilizada na análise foi de quadrantes para determinar as populações celulares. I - células do sobrenadante da cultura celular (4 dias) de células totais aderentes peritoneais, marcadas com lodeto de Propídio; II - células vivas, divididas em duas populações: uma população FSc^{high} e SSc^{low} e uma população FSc^{low} e SSc^{low} (CD80); IV - população FSc^{low} e SSc^{low} (CD80).

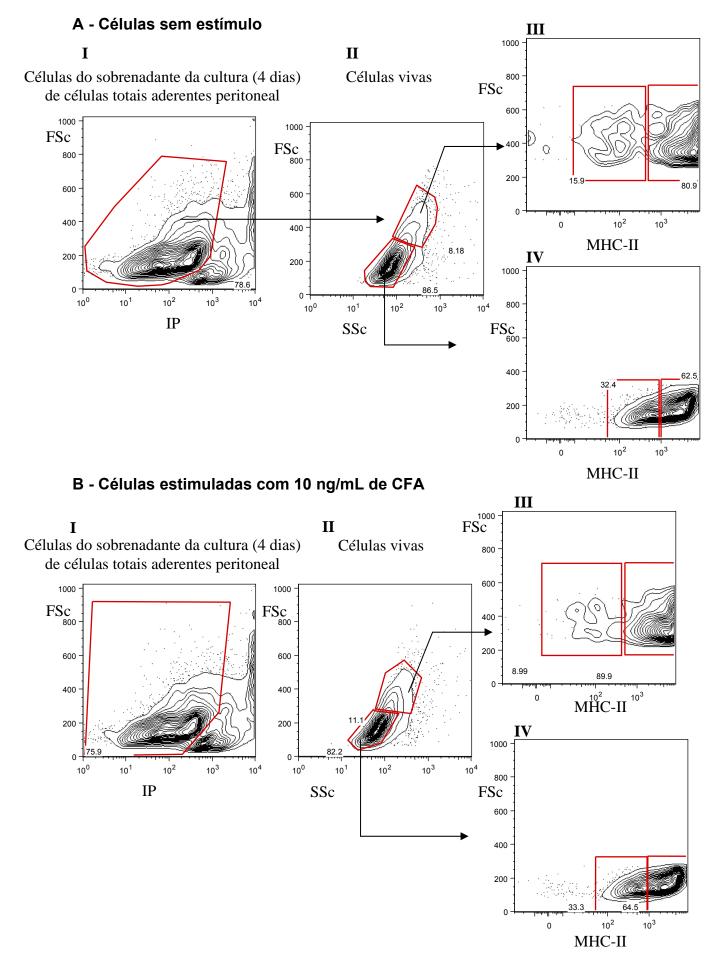
* Os resultados das figuras **III** e **IV** foram analisados a partir dos "limites do FMO das células" e todos os valores de fluorescência acima deste valor foram considerados verdadeiros positivos; assim, as figuras **III** e **IV** estão dividas em quadrantes, dividindo a população em negativa (FMO) e positiva.





Figuras 6: Caracterização da expressão das moléculas de superfície as células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias das células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c sem estímulo (Figura 6 A) e com estímulo de 10ng/mL (Figura 6 B) de CFA de *P. brasiliensis*. Através de citometria de fluxo, analisamos a expressão de CD86. A leitura das amostras foi realizada no aparelho FACS e os dados foram analisados no *software FlowJo*. A estratégia utilizada na análise foi de *gating* para determinar as populações celulares. I - células do sobrenadante da cultura celular (4 dias) de células totais aderentes peritoneais, marcadas com lodeto de Propídio; II - células vivas, divididas em duas populações: uma população FSc^{low} e SSc^{low} e uma população FSc^{low} e SSc^{low} (CD86). IV - população FSc^{low} e SSc^{low} (CD86).

* Os resultados das figuras III e IV foram analisados a partir dos "limites do FMO das células" e todos os valores de fluorescência acima deste valor foram considerados verdadeiros positivos; assim, os gates das figuras III e IV representam valores negativos (FMO) para a população CD86, somente os valores acima destes gates são considerados positivos.



Figuras 7: Caracterização da expressão das moléculas das células de superfície do sobrenadante da cultura celular de 4 dias das células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c sem estímulo (Figura 7 A) e com estímulo de 10ng/mL (Figura 7 B) de CFA de *P. brasiliensis.* Através de citometria de fluxo, analisamos a expressão de MHC-II. A leitura das amostras foi realizada no aparelho FACS e os dados foram analisados no *software FlowJo*. A metodologia utilizada na análise foi de quadrantes para determinar as populações celulares. I -células do sobrenadante da cultura celular (4 dias) de células totais aderentes peritoneais, marcadas com lodeto de Propídio; II - células vivas, divididas em duas populações: uma população FSc^{low} e SSc^{low} e uma população FSc^{high} e SSc^{low}); III - população FSc^{high} e SSc^{low} (MHC-II); IV - população FSc^{low} e SSc^{low} (MHC-II).

Tabela 3: Imunofenotipagem das células do sobrenadante da cultura de 4 dias de células totais aderentes peritoneais = linfócitos B-1

Linfócitos B-1	CD80 ⁺	CD86 ⁺	MHC-II ⁺
FSc ^{high} e SSc ^{low}	97.4%	19.7%	100% (dividida em duas populações positivas: MHC-II ^{high} : 80.9%, MHC-II ^{low} : 15,9%
FSc ^{low} e SSc ^{low}	89,6%	6,5%	100%(dividida em duas populações positivas: MHC-II ^{high} : 62,5%, MHC-II ^{low} : 32,4%

^{*} Os resultados estão apresentados como porcentagens de células positivas.

Tabela 4: Imunofenotipagem das células do sobrenadante da cultura de 4 dias de células totais aderentes peritoneais = linfócitos B-1 estimulados com CFA de *P. brasiliensis* por período de 24 horas

Linfócitos B-1	CD80 ⁺	CD86 ⁺	MHC-II ⁺
FSc ^{high} e SSc ^{low}	96,7%	26,7%	100% (dividida em duas populações positivas: MHC-II ^{high} : 89,9%, MHC-II ^{low} : 8,99%
FSc ^{low} e SSc ^{low}	90,1%	6%	100%(dividida em duas populações positivas: MHC-II ^{nigh} : 64,5%, MHC-II ^{low} : 33,3%

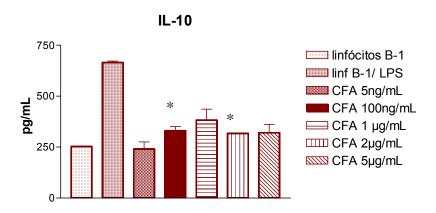
^{*} Os resultados estão apresentados como porcentagens de células positivas.

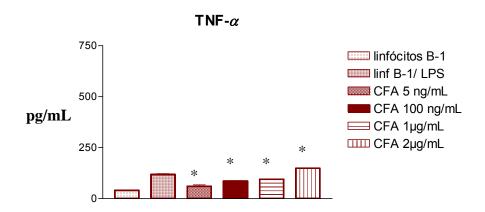
^{*} Os resultados das figuras III e IV foram analisados a partir dos "limites do FMO das células" e todos valores de fluorescência acima deste valor foram considerados verdadeiros positivo; assim, os *gates* das figuras III e IV representam valores positivos para a população MHC-II, onde temos duas populações positivas MHC-II^{ligh} e MHC-II^{low}.

4.6. Quantificação de citocinas produzidas por linfócitos B-1, após estímulo com CFA de P. brasiliensis

As citocinas IL-10, TNF-α, IL-4 e IFN-γ foram quantificadas a partir do sobrenadante de cultura de linfócitos B-1 obtidos de camundongos BALB/c. As células foram estimuladas com diferentes concentrações de CFA por 24 horas. Logo em seguida, a placa foi centrifugada e o sobrenadante recolhido para a quantificação das citocinas pelo método ELISA de captura. Como controle positivo, as células foram estimuladas com LPS por 24 horas.

Os resultados demonstram que os linfócitos B-1, sem nenhum estímulo, secretaram IL-10 e TNF- α (figura 8); quando estas células foram estimuladas com CFA, observamos que os valores aumentam significativamente, quando comparados com as células sem estímulo. Não foram observados valores significativos na secreção de IL-4 e de IFN-γ por linfócitos B-1, mesmo quando estimulados com CFA (dados não mostrados).





Figuras 8: Produção de citocinas IL-10 e TNF- α por linfócitos B-1 estimulados com CFA de *P. brasiliensis* por 24 horas. Após 24 horas de cultura celular de linfócitos B-1 com diferentes concentrações de CFA (5ng/mL, 100ng/mL, 1μg/mL, 2μg/mL e 5μg/mL), o sobrenadante foi recolhido e utilizado nos experimentos para a quantificação das citocinas IL-10 e TNF- α por ELISA de captura. Como controle positivo as células foram estimuladas com 100ng/mL de LPS. Os valores são significativos comparando linfócitos B-1 sem estímulo e linfócitos B-1 com estímulo (CFA). Os experimentos foram realizados em triplicata , *p < 0,05.

4.7. Resposta proliferativa de células TCD4⁺ in vitro na presença de linfócitos B-1 e CFA

Células TCD4⁺, purificadas de linfonodos poplítios e inguinais de camundongos BALB/c previamente imunizados com CFA de *P.brasiliensis* e adjuvante completo de Freud, foram cultivadas na presença de linfócitos B-1 e em seguida estimuladas com diferentes concentrações de CFA. Como controle positivo, utilizamos o mitógeno fitoemaglutinina (PHA) (20µg/mL).

Os resultados mostraram aumento significativo da proliferação de células TCD4⁺, quando estas foram cultivadas na presença de células B-1 e CFA, sugerindo que os linfócitos B-1 apresentaram o antígeno (CFA) a linfócitos T CD4⁺ previamente sensibilizados.

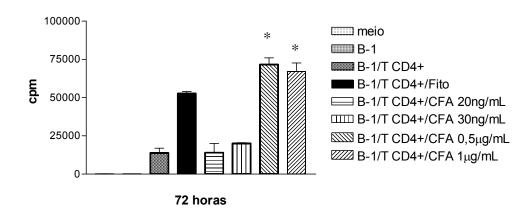


Figura 9: **Ensaio de linfoproliferação de linfócitos T CD4**[†]. Células TCD4[†] purificadas de linfonodos poplítios e inguinais de camundongos BALB/c, previamente imunizados com CFA, foram cultivadas *in vitro* na presença de linfócitos B-1 e estimuladas com diferentes concentrações do antígeno. Como controle positivo, utilizamos fitoemaglutinina (PHA). Os valores são significativos, comparando linfócitos B-1 e TCD4[†] sem estímulo com linfócitos B-1 e TCD4[†] com estímulo de CFA. Os experimentos foram realizados em triplicata com *p<0,05.

4.8. Expressão de mRNA de TLR-2, TLR-4, MyD88 e IL-10 em linfócitos B-1 estimulados com CFA

Sabemos que os receptores do tipo toll são importantes no reconhecimento de alguns fungos e no direcionamento da resposta imune. Por isso, analisamos a expressão dos receptores do tipo toll (TLR-2 e TLR-4), a expressão da molécula adaptadora MyD88 e a expressão de IL-10 por RT-PCR em linfócitos B-1 (obtidos por metodologia já descrita) estimulados com 0,5 µg/mL de CFA por 4 horas. Primeiramente, foi realizada a extração de RNA total, a síntese de cDNA e RT-PCR semiquantitativo. Como controle utilizamos HPGRT, presente em todas células eucariontes.

Os resultados mostraram que os linfócitos B-1, sem estímulo (1) e com estímulo (2), expressam TLR-2, MyD88 e IL-10. Porém, não observamos a expressão de TLR-4 em linfócitos B-1, mesmo quando estimulados com CFA. Para avaliar se o primer de TLR-4 estava realmente funcionando, realizamos ensaios com macrófagos

estimulados com LPS, e nossos resultados mostraram expressão de TLR-4 (dados não mostrados).

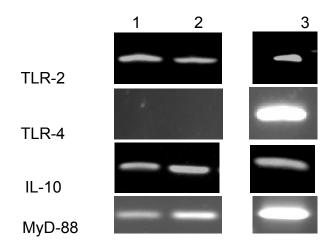


Figura 10: Expressão de TLR-2, TLR-4, MyD88 e IL-10. Analisamos a expressão de TLR-2, TLR-4, MyD88 e IL-10 por RT-PCR, em linfócitos B-1 sem estímulo (1) e com estímulo de CFA (2). Como controle, utilizamos HPGRT (3), presente em todas as células eucariontes.

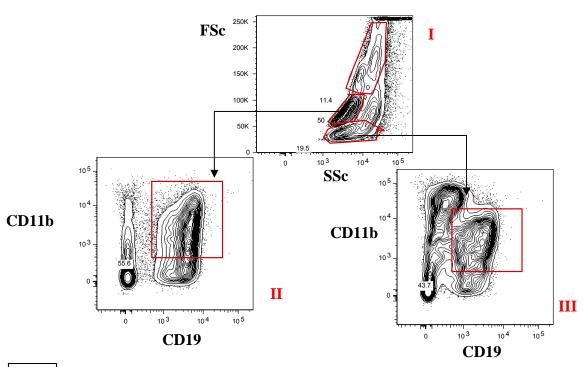
4.9. Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c estimulados ip com leveduras de *P. brasiliensis*

De acordo com os resultados obtidos até o momento, foi possível observar intensa interação entre antígenos de *P. brasiliensis* com linfócitos B-1 *in vitro*. Porém não sabíamos se essa interação também poderia ocorrer *in vivo*. Para isso, realizamos ensaios de infecção *in vivo*, na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, com leveduras de *P. brasiliensis*; em seguida, analisamos a população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal por citometria de fluxo. Nossos resultados demostraram que após 1 hora de infecção os linfócitos B-1 não respondiam ao estímulo (controle PBS: figura 11 A; infectados com leveduras de *P. brasiliensis*: figura 11 B); porém, após 5 horas de estímulo, ocorreu significante diminuição na população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal (controle PBS: figura 11 C;

infectados com leveduras de *P. brasiliensis:* figura 11 D); essa diminuição permanecia pelos períodos de 24 horas (controle PBS: figura 11 E; infectados com leveduras de *P. brasiliensis:* figura 11 F) e de 7 dias (controle PBS: figura 11 G; infectados com leveduras de *P. brasiliensis:* figura 11 H) após a infecção. Os resultados podem ser também observados na Tabela 5.

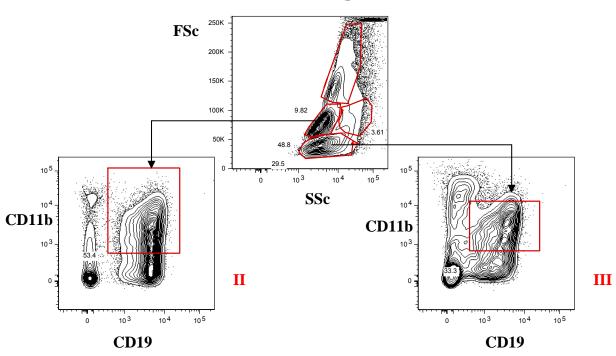
A

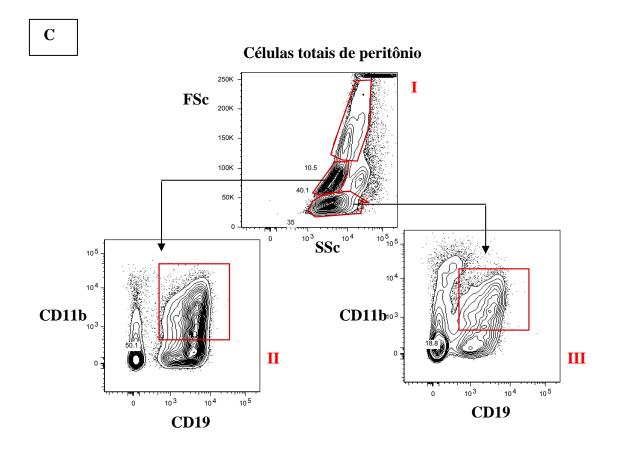
Células totais de peritônio

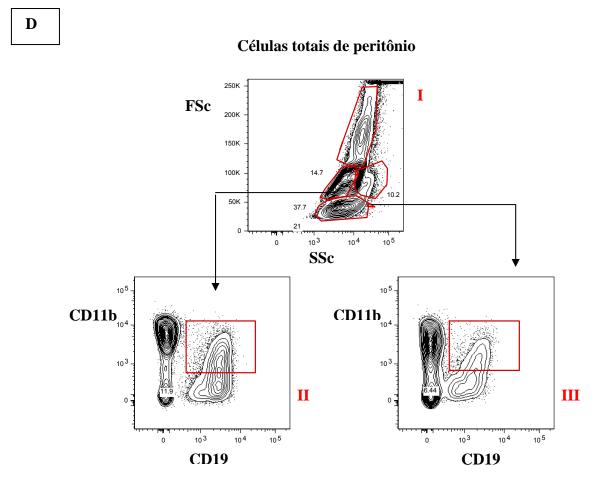


В

Células totais de peritônio

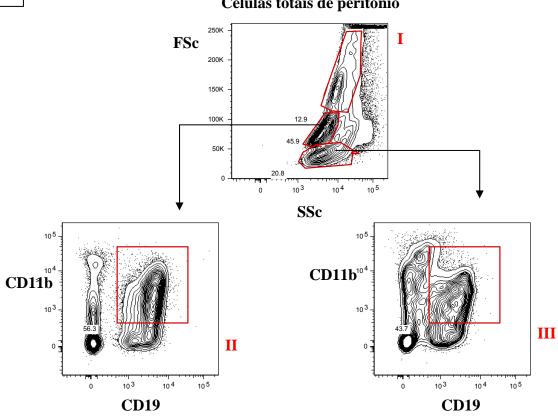






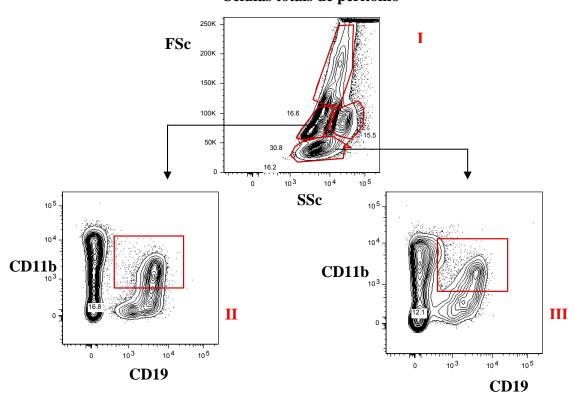


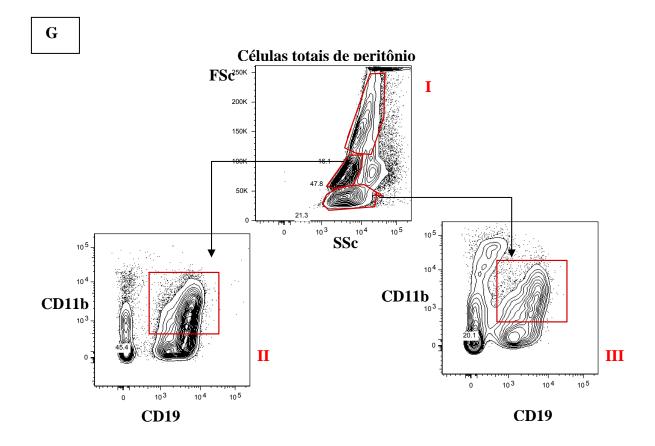
Células totais de peritônio

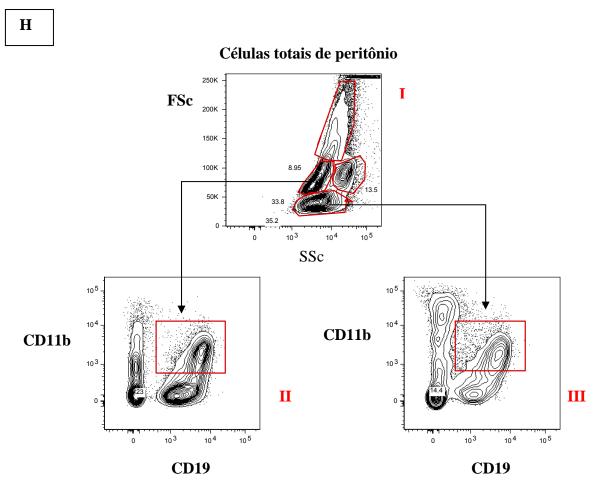


 \mathbf{F}

Células totais de peritônio







Figuras 11: Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c após estímulo ip com leveduras de *P. brasiliensis*. Foi realizada infecção ip com leveduras de *P. brasiliensis* e após 1 hora (**A** - controle PBS, **B** - infectado com *P. brasiliensis*), 5 horas (**C** - controle PBS, **D** - infectado com *P. brasiliensis*), 24 horas (**E** - controle PBS, **F** - infectado com *P. brasiliensis*) e 7 dias (**G** - controle PBS, **H** - infectado com *P. brasiliensis*), foram realizadas lavagens na cavidade peritoneal para a obtenção das células totais peritoneais e foi realizada a marcação para analisar a população de linfócitos B-1: **I** - Células totais de peritônio de camundongos BALB/c; **II** - Análise da população FSc^{high} e SSc^{low} de linfócitos B-1 presente nas células totais de peritônio utilizando os marcadores CD19 e CD11b; **III** - Análise da população FSc^{low} e SSc^{low} linfócitos B-1 presente nas células totais de peritônio utilizando os marcadores CD19 e CD11b; **III** - Análise da PCD11b.

Tabela 5: Quantificação de linfócitos B-1 CD19⁺CD11b⁺ (definidos por citometria de fluxo) da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c após infecção ip com leveduras de *P. brasiliensis*

Linfócitos B-1	FSchigh e SSclow	FSc ^{low} e SSc ^{low}
CD19 ⁺ CD11b ⁺ (Controle	55,6%	43,7%
PBS 1 hora)		
CD19 ⁺ CD11b ⁺ (Infectado	53,4%	33,3%
P. brasiliensis 1 hora)		
CD19 ⁺ CD11b ⁺ (Controle	50,1%	18,8%
PBS 5 horas)		
CD19 ⁺ CD11b ⁺ (Infectado	11,9%	6,44%
P. brasiliensis 5 horas)		
CD19 ⁺ CD11b ⁺ (Controle	56,3%	43,7%
PBS 24 horas)		
CD19 ⁺ CD11b ⁺ (Infectado	16,8%	12,1%
P. brasiliensis 24 horas)		
CD19 ⁺ CD11b ⁺ (Controle	45,4%	20,1%
PBS 7 dias)		
CD19 ⁺ CD11b ⁺ (Infectado	23%	14,4%
P. brasiliensis 7 dias)		

4.10. Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal e do baço de camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*

Para melhor compreendermos a migração dos linfócitos B-1 da cavidade peritoneal, utilizamos camundongos deficientes destas células (CBA/N Xid). Foi realizada a reconstituição da cavidade peritoneal destes camundongos com linfócitos B-1 obtidos de camundongos CBA. Após a reconstituição do peritônio, os camundongos foram infectados ip com leveduras do *P. brasiliensis*. Em seguida, as células da cavidade peritoneal e do baço foram analisadas utilizando-se marcadores específicos para linfócitos B-1.

Os nossos resultados mostraram que após a infecção ip com leveduras de *P. brasiliensis*, não ocorreu alteração na população celular FSc^{high} e SSc^{low} (segundo dados do nosso laboratório, esta população é considerada *doublets* de linfócitos B-1, ou seja, duas células B-1 fortemente aderidas entre si) (Figura 12 III - B), porém ocorreu diminuição na população FSc^{low} e SSc^{low} (considerada uma única célula de linfócito B-1) (Figura 12 III - C), quando comparadas com a população celular de animais controle (Figura 12 II - B e 12 II - C). De acordo com estes resultados, foi possível observar diminuição dos linfócitos B-1 *singlets* (FSc^{low} e SSc^{low}) da cavidade peritoneal apos infecção ip com leveduras de *P. brasiliensis*, sugerindo que estas células migram para outros órgãos. O resultado da caracterização de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal pode ser verificado na Tabelas 6 (quantificação da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal).

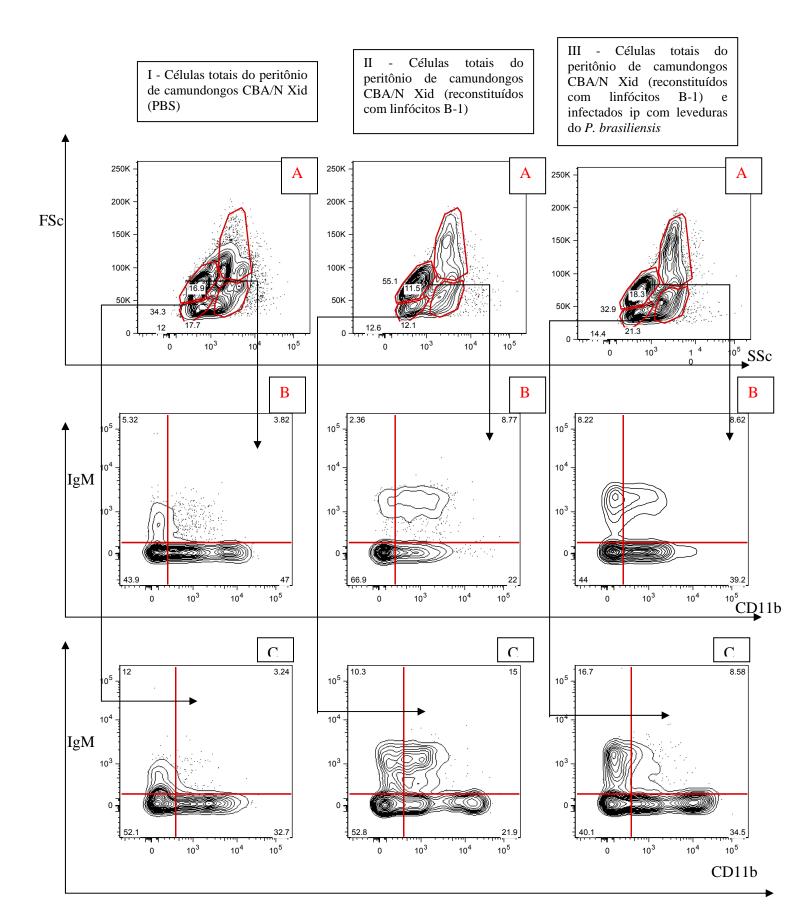
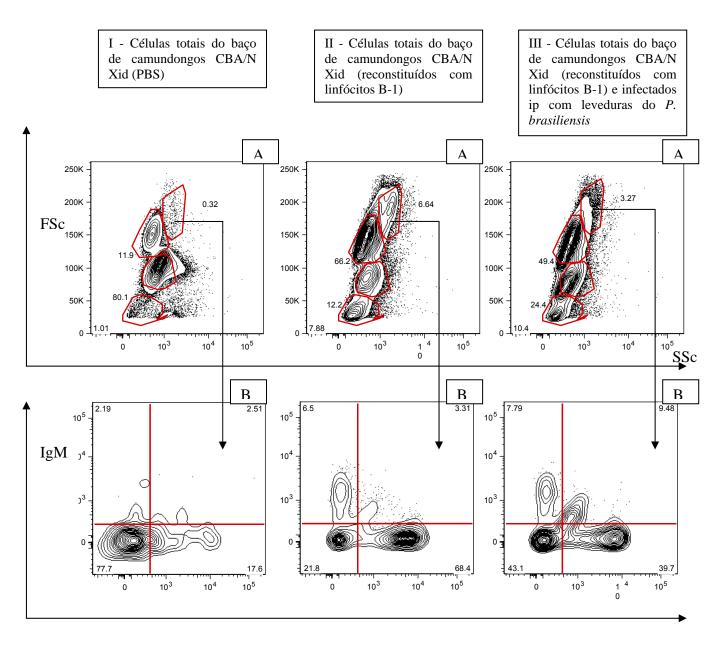


Figura 12: Análise da população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*). I - A) Células totais do peritônio de camundongos CBA/N Xid (PBS): FSc^{high} e SSc^{low} (duplas de linfócitos B-1) e FSc^{low} e SSc^{low} (uma única célula B-1); I - B) população de linfócitos B-1 FSc^{high} e SSc^{low} (IgM⁺CD11b⁺); II - A) Células totais do peritônio de camundongos CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1): FSc^{high} e SSc^{low}; FSc^{low} e SSc^{low}; II - B) população de linfócitos B-1 FSc^{high} e SSc^{low} (IgM⁺CD11b⁺); III - C) população de linfócitos B-1 FSc^{low} SSc^{low} (IgM⁺CD11b⁺); III - A) Células totais do peritônio de camundongos CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1) e infectados ip com leveduras do *P. brasiliensis*: FSc^{high} e SSc^{low}; FSc^{low} e SSc^{low}; III - B) população de linfócitos B-1 FSc^{high} e SSc^{low} (IgM⁺CD11b⁺); III - C) população de linfócitos B-1 FSc^{low} e SSc^{low} (IgM⁺CD11b⁺).

Tabela 6: Quantificação de linfócitos B-1 IgM⁺CD11b⁺ (definidos por citometria de fluxo) da cavidade abdominal de camundongos CBA/N Xid (PBS), CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1), CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*).

Linfócitos B-1	FSchigh, SSclow	FSc ^{low} , SSc ^{low}
IgM ⁺ CD11b ⁺ (CBA/N Xid	3,82%	3,24%
(PBS))		
IgM ⁺ CD11b ⁺ (CBA/N Xid	8,77%	15%
(reconstituídos com		
linfócitos B-1)		
IgM ⁺ CD11b ⁺ (CBA/N Xid	8,62%	8,58%
(reconstituídos com		
linfócitos B-1 e		
infectados ip com		
leveduras de <i>P.</i>		
brasiliensis))		

Analisamos a população de linfócitos B-1 do baço destes animais e foi possível observar aumento na população de linfócitos B-1, após estímulo ip com leveduras de *P. brasiliensis* (Figura 13 III - B), quando comparados com o controle (Figura 13 II - B), sugerindo, então, que após estímulo ip, os linfócitos B-1 (FSc^{low} e SSc^{low} = *singlets*) migram da cavidade peritoneal para o baço. O resultado da caracterização de linfócitos B-1 do baço pode ser verificado na Tabela 7 (quantificação da população de linfócitos B-1 do baço).



CD11b

Figura 13: Análise da população de linfócitos B-1 do baço de camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados com leveduras de *P. brasiliensis*. I - A) Células totais do baço de camundongos CBA/N Xid (PBS); I - B) população de linfócitos B-1 do baço (IgM⁺CD11b⁺); II - A) Células totais do baço de camundongos CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1); II - B) população de linfócitos B-1 (IgM⁺CD11b⁺); III - A) Células totais do baço de camundongos CBA/N Xid reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras do *P. brasiliensis*; III - B) população de linfócitos B-1 (IgM⁺CD11b⁺).

Tabela 7: Quantificação de linfócitos B-1 IgM⁺CD11b⁺ (definidas por citometria de fluxo) do baço de camundongos CBA/N Xid (PBS), CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1), CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*)

Linfócitos B-1	
IgM ⁺ CD11b ⁺ (CBA/N Xid (PBS))	2,51%
IgM ⁺ CD11b ⁺ (CBA/N Xid	3,31%
(reconstituídos com linfócitos B-1)	
IgM ⁺ CD11b ⁺ (CBA/N Xid	9,48%
(reconstituídos com linfócitos B-1	
e infectados ip com leveduras de	
P. brasiliensis))	

4.11. Análise de células T regulatórias do baço de camundongos CBA/N Xid reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*

Após analisarmos a migração de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal para o baço, observamos que ocorria pequeno aumento no número de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) neste órgão. Os dados podem ser observados na Tabela 8 (análise de células T regulatórias no baço).

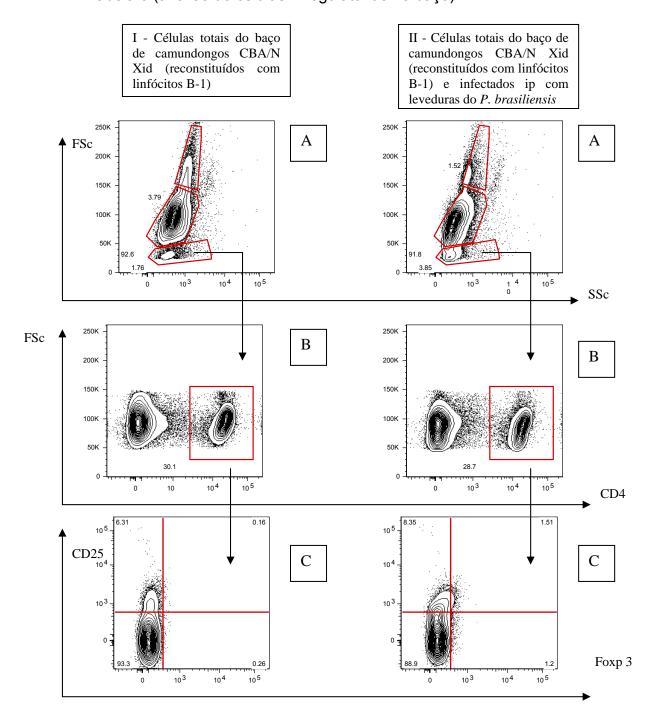


Figura 14: Análise da população de células T com fenótipo de célula T regulatória do baço de camundongos CBA/N Xid, reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados com leveduras de *P. brasiliensis*. I - A) células do baço de camundongos CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1); I - B) população de linfócitos CD4⁺; I - C) população de linfócitos CD25⁺Foxp3⁺; II - A) células do baço de camundongos CBA/N Xid reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados com leveduras do *P. brasiliensis*; *II - B*) população de linfócitos CD4⁺; II - C) população de linfócitos CD25⁺Foxp3⁺.

Tabela 8: Caracterização de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (definidas por citometria de fluxo) do baço de camundongos CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1), CBA/N Xid (reconstituídos com linfócitos B-1 e infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*)

% de células	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (CBA/N Xid	0,16%
(reconstituídos com linfócitos B-1)	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (CBA/N Xid	1,51%
(reconstituídos com linfócitos B-1 e	
infectados ip com leveduras de P.	
brasiliensis))	

5. DISCUSSÃO

Vários dados na literatura têm relacionado a participação de linfócitos B-1 com diferentes fenômenos imunológicos, tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa. No intuito de melhor entendermos a ativação de resposta imune eficaz contra fungos patogênicos, optamos neste trabalho por estudar a interação entre os linfócitos B-1 e o CFA do *P. brasiliensis*, uma vez que este expressa muitas moléculas antigênicas que podem ser reconhecidas pelo sistema imune.

San-Blas (1993) realizou um estudo no qual foi determinado que o polimorfismo do *P. brasiliensis* pode ser controlado pela síntese dos polissacarídeos, como os glucanos. O α-glucano é o principal polissacarídeo presente nas paredes celulares de leveduras, enquanto que na forma miceliana o β-glucano é o único polissacarídeo da categoria encontrado. Este pesquisador demonstrou também que as cepas mais virulentas do *P. brasiliensis* apresentam menor quantidade de β-glucano na composição de suas paredes, ao contrário das cepas com baixa virulência, que apresentam grande quantidade desse carboidrato e induzem à resposta inflamatória bastante intensa.

Estudos indicaram que o *P. brasiliensis* produz melanina, um fator importante relacionado com a virulência de vários outros patógenos. Estas informações nos sugerem que a composição da parede celular do *P. brasiliensis* pode estar relacionada com a modulação da resposta imune do hospedeiro, uma vez que estes componentes, em proporções variáveis, podem interagir com diferentes receptores da resposta imune inata, direcionando o sistema de defesa (MORAES & SCHAFFER, 2002).

Uma vez que o *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico e a mudança da forma miceliana para a forma de levedura é essencial para que a infecção seja bem sucedida (Revisado por BRUMMER *et al.*, 1993), optamos, neste trabalho, por utilizar uma preparação antigênica do *P. brasiliensis* obtida de sua superfície leveduriforme, denominada de CFA (antígeno livre da parede do fungo).

Primeiramente, para garantir que a população celular obtida do sobrenadante da cultura celular de 4 dias de células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c fosse constituída basicamente de linfócitos B-1, realizamos a análise fenotípica e funcional destas células. A análise fenotípica foi realizada pela técnica de citometria de fluxo e os dados foram analisados utilizando-se os parâmetros FSc e SSc.

De acordo com dados preliminares descritos em nosso laboratório, sabemos que as células B-1 CD11b⁺ são maiores, mais granulosas e expressam mais IgM e menos IgD de superfície quando comparadas com as células B-1 CD11b⁻. Estes linfócitos B-1 CD11b⁺ iniciam a formação de *doublets* (duas células B-1 fortemente aderidas entre si) presentes em grande concentração no peritônio de camundongos adultos (GHOSN, 2008). Assim, observamos em nossos resultados que os linfócitos B-1 da cavidade peritoneal são divididos em duas populações celulares. A primeira população, descrita pelos parâmetros FSC^{high} e SSc^{low}, que representa duplas de linfócitos B-1 (duas células fortemente aderidas entre si) e a populção FSC^{low} e SSc^{low}, que representa *singlets* (uma única célula) de linfócitos B-1. Após a análise foi possível constatar que aproximadamente 90% das células do sobrenadante da cultura celular de 4 dias de células totais aderentes peritoneais eram constituídas por linfócitos B-1. Não houve alteração significativa nas moléculas de superfície destas células após estímulo com CFA de *P. brasiliensis*.

Os linfócitos B são considerados células apresentadoras profissionais pois são capazes de capturar partículas antigênicas através de um receptor de superfície de isotipo IgM e apresentar o antígeno via molécula MHC-II. Está estabelecido que para se ter ativação de células T é necessária a interação TCR-MHC/peptídio, além do co-estímulo, fornecido por moléculas CD80/CD86 (LENSCHOW *et al.*, 1986). Em 2002, Vigna e colaboradores demostraram que células B-1b atuam como células apresentadoras de antígenos, expressando moléculas de MHC-II, CD80 e CD86, participando como ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa. De acordo com estes dados, analisamos a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e da molécula MHC-II dos linfócitos B-1. Os resultados demonstram que os linfócitos B-1 expressam altos níveis de MHC-II (100%) e CD80 (90%). Contudo, não houve expressão significativa da molécula co-estimuladora CD86. Quando estas células eram mantidas em cultura com CFA por 24 horas, observamos que houve aumento de CD86 na população FSC^{high} e SSc^{low}. Estes resultados demonstram que estas células apresentam ótimo fenótipo de célula apresentadora de antígeno.

Analisamos a capacidade proliferativa das células totais aderentes peritoneais de camundongos BALB/c e foi possível observar que, quando estas células foram estimuladas com CFA de *P. brasiliensis*, elas não proliferam no tempo zero; mas, no quarto e no sétimo dias, observamos proliferação celular significativa, principalmente quando utilizamos a concentração de 10µg/mL do CFA. Estes resultados podem ser devido à composição das células encontradas na cavidade peritoneal, uma vez que dados do nosso laboratório demonstram que as principais células encontradas na cavidade peritoneal são os linfócitos B-1, porém podem ser encontrados outros tipos celulares, como macrófagos, linfócitos B-2, células NK e pequena porcentagem de linfócitos T. Uma vez que o antígeno de *P. brasiliensis* interaja com receptores

destas células podem ocorrer a proliferação celular e a modulação da resposta imune do hospedeiro.

Após caracterizarmos o fenótipo das células do sobrenadante da cultura de 4 dias das células totais aderentes peritoneais, e observarmos que esta população é constituída basicamente de linfócitos B-1, realizamos o ensaio de proliferação celular apenas de linfócitos B-1 estimulados com CFA e observamos que a população enriquecida de linfócitos B-1 não foi capaz de proliferar, indicando que os componentes antigênicos do *P. brasiliensis* não são mitógenos para essas células.

Por outro lado, como observamos na análise fenotípica dos linfócitos B-1 que estes podem atuar como células apresentadoras de antígeno, pois expressam CD80, CD86 e MHC-II, realizamos o ensaio de proliferação celular utilizando linfócitos B-1 (irradiados) como células APC e observamos proliferação celular dos linfócitos TCD4⁺ significativa, sugerindo, assim, que os linfócitos B-1 apresentam antígenos aos linfócitos TCD4⁺ e que a resposta da célula T seja iniciada pelo reconhecimento dos complexos peptídio-MHC na superfície desta APC, estimulando a resposta proliferativa dos linfócitos T.

Em relação às citocinas, que são proteínas importantes na determinação de uma resposta imune eficiente, analisamos a secreção de IL-10 e de TNF-α do sobrenadante da cultura de linfócitos B-1 sem nenhum estímulo e observamos que estas células secretam tanto IL-10 quanto TNF-α. Quando estas células foram estimuladas com CFA ou LPS, foi possível observar que os valores aumentaram significantemente. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois O'Garra (1992) demonstrou que os linfócitos B-1 secretam citocinas pró e anti-inflamatórias e dentre as citocinas comumente expressas por linfócitos B-1 estão IL-10 e TNF-α. Kawamura e Furue (1995) demonstraram que a expressão das moléculas co-

estimuladoras B7.1 e B7.2 é modulada por várias citocinas Th1 e Th2, de modo que a IL-10 inibe a molécula CD86. Com base na literatura, poderíamos, em parte, justificar os resultados encontrados até o momento, pelas quais a alta produção de IL-10 pelos linfócitos B-1 poderia ter efeito autócrino de inibição da expressão de CD86.

Vários estudos associam a IL-10 à resposta deficiente ao *P. br*asiliensis. Altas concentrações de IL-10 são detectadas no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico de pacientes de PCM, quando estimuladas com antígeno de *P.brasiliensis*, enquanto em culturas de células de pacientes tratados os níveis são bem menores (DINIZ *et al.*, 2001). Neworal *et al.* (2003) observaram aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF-β, em linfonodos de pacientes com a forma juvenil da PCM, sugerindo que a estimulação da produção destes fatores pode representar um mecanismo de escape do fungo, tornando os macrófagos refratários aos efeitos estimuladores do IFN-γ e contribuindo para a evolução da doença. A IL-10 está envolvida na limitação de respostas inflamatórias e, portanto, é considerada uma citocina imunorreguladora. Além disso, está envolvida no processo de diferenciação das células T reguladoras (MOORE *et al.*, 2001; ASADULLAH *et al.*, 2004).

Componentes estruturais altamente conservados presentes na parede das células fúngicas, como β-glucanas, quitina e manana, são críticos para o crescimento e a sobrevivência dos fungos e constituem PAMP ideais, reconhecidos por TLR expressos em fagócitos e células dendríticas. Estudos demonstram a importância do reconhecimento dos TLR e a consequente fagocitose de patógenos para a completa ativação das células, permitindo, assim, o desenvolvimento das

funções efetoras das células fagocíticas (BLANDER MEDZHITOV, 2006; BLANDER, 2007).

Dados da literatura, demonstram que o reconhecimento de manana de *Candida* via TLR4 ativa a via de sinalização e de produção de quimiocinas, levando, então, à proteção do hospedeiro. Já o carboidrato glucana de *Candida* liga-se à dectina-1, ativa TLR2, induz citocinas anti-inflamatórias e, consequentemente, leva ao aumento da susceptibilidade (NETEA *et al.*, 2004).

Dados do nosso laboratório, demonstrados por Ferreira *et al.* (2007), sugerem que a produção de TNF-α está diretamente ligada à expressão de TLR-4, enquanto que a produção de IL-10 está relacionada com o receptor TLR-2 e, consequentemente, com a susceptibilidade à paracoccidioidomicose.

O TLR-2 é um dos PRR com maior variedade de ligantes descritos, reconhecendo PAMP de diferentes tipos de patógenos, devido, em grande parte, a sua capacidade de agir em conjunto com outras moléculas de TLR, como TLR-1 e TLR-6 (AKIRA e TAKEDA, 2004). Assim, o TLR-2 pode dar origem a diferentes tipos de resposta por parte das células que expressam essa molécula, originando tanto uma resposta pró-inflamatória (com produção de TNF-α), como respostas anti-inflamatórias, principalmente pela indução da produção de IL-10, que podem ser utilizadas por alguns patógenos como mecanismos de escape (NETEA *et al.*, 2006; PATHAK *et al.*, 2007).

Devido à grande importância da produção dos receptores do tipo toll, neste trabalho analisamos a expressão de TLR-2, TLR-4, MyD88 e IL-10, por RT-PCR, dos linfócitos B-1 estimulados com CFA. Os nossos resultados mostraram expressão de TLR-2, MyD88 e IL-10 nas células B-1 com e sem estímulo. Não foi observada a expressão de TLR-4, mesmo quando estimulamos as células com 100 ng/mL de

LPS por 4 horas. Estes resultados podem estar relacionados com um dos mecanismos de escape de certos fungos patogênicos por TLR, pela imunossupressão mediada por TLR-2, através da indução da produção de IL-10, que podem ser utilizadas por alguns patógenos como possível mecanismo de escape, favorecendo a sobrevivência do fungo e levando à susceptibilidade à paracoccidioidomicose.

Uma importante característica identificada nas células B-1 foi sua capacidade de migrar de seus compartimentos específicos (peritônio) até o local de uma inflamação aguda não específica, mostrada por Almeida *et al.* (2001). Outra evidência da migração destas células B-1 é a considerável diminuição destes linfócitos na cavidade peritoneal e o aumento de ambas, B-1 e B-2, no baço após uma infecção (HERZENBERG., 2000).

Yang et al. (2007) demonstraram que o LPS intravenoso é capaz de induzir a migração de células B-1 do peritônio para o baço. Estas células recém-migradas expressam CD11b nos mesmos níveis detectados nas células B-1 que estão no peritônio. Diferentemente das células B-1 residentes no baço, as quais transformanse em plasmócitos logo nas primeiras horas após o estímulo, as células B-1 que migram do peritônio para o baço precisam iniciar o processo de proliferação celular para depois transformarem-se em plasmócitos. Mediante estímulo inflamatório, como, por exemplo, injeção de 15 µg de LPS por via intravenosa (iv), as células do peritônio são rapidamente atingidas e respondem em poucos minutos. Já na primeira hora, as células B-2 desaparecem do peritônio; logo em seguida, desaparecem também alguns macrófagos e células T. Apenas após 4 horas de estímulo *in vivo* é que os linfócitos B-1 começam a desaparecer e este processo deve estar relacionado com a sua migração para outros órgãos, já que,

concomitantemente, aumenta o número absoluto de células B-1 no baço (GHOSN, 2008). Esta capacidade de migração nos despertou o interesse do papel que estas células desenvolveriam na inflamação.

Por isso, analisamos a capacidade de migração dos linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c após estímulo ip com leveduras de *P. brasiliensis*, uma vez que dados da literatura demonstram a capacidade destas células em migrarem de seus compartimentos específicos para órgãos linfóides secundários. Em nossos resultados, foi possível demonstrar que os linfócitos B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, após serem infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*, não respondem depois de 1 hora de estímulo, mas, após 5 horas, 24 horas e 7 dias da infecção, observarmos que estas células respondiam rapidamente ao estímulo, pois, passadas 5 horas da infecção, foi possível observar grande diminuição na população de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal, mantendo-se por pelo menos 7 dias.

De acordo com estes resultados, nós nos indagamos para qual órgão estas células poderiam estar migrando e qual o papel que estariam desenvolvendo na resposta imune. Em busca de respostas, reconstituímos a cavidade peritoneal de camundongos CBA/N Xid (camundongos desprovidos de linfócitos B-1) com linfócitos B-1 e, após o período de 24 horas, os animais foram infectados intraperitonealmente com leveduras de *P. brasiliensis*. Após 5 horas, foram realizadas lavagens na cavidade peritoneal e foi retirado o baço destes animais. Os resultados demonstraram que não houve alteração na população FSc^{high} e SSc^{low} (duplas de linfócitos B-1), porém ocorreu diminuição na população FSc^{low} e SSc^{low} (única célula de linfócito B-1), indicando que estas células estariam migrando para outros órgãos. Assim, analisamos a população de linfócitos B-1 do baço e

observamos aumento destas células neste órgão, sugerindo que, após 5 horas de estímulo ip com leveduras de *P. brasiliensis*, os linfócitos B-1 FSc^{low} e SSc^{low} (únicas células de linfócitos B-1) migram da cavidade peritoneal para o baço.

Um estudo publicado recentemente mostrou que a expressão de CD11b nas células apresentadoras de antígenos (APC) facilita a indução de tolerância periférica e a geração de linfócitos T reguladores (Treg) (EHIRCHIOU et al., 2007). Considerando que o linfócito B-1, assim como toda célula B, pode agir como uma APC, poder-se-ia especular que o subtipo de B-1, que expressa CD11b, pode representar, de fato, um subtipo funcional de célula B, responsável pela indução de uma determinada resposta imune adaptativa. Zhong et al. (2007) demonstraram que o bloqueio da molécula CD86 em células B-1 é suficiente para que estas células comecem a induzir a proliferação e a diferenciação de células T reg. Na PCM, aparentemente, as células T reg naturais apresentam papel importante na supressão da resposta imunológica celular observada nos pacientes com a doença ativa. Cavassani (2006) e Moreira (2008) demonstraram que o número de células Treg aumenta em pacientes com a doença ativa, tanto na circulação periférica quanto em infiltrado dos tecidos. Outra característica que pode colaborar com a participação de células Treg na PCM é o fato de que pacientes com ambas as formas clínicas da doença apresentam produção elevada de IL-10 em relação aos indivíduos controles (OLIVEIRA et al., 2002; MAMONI & BLOTTA, 2005). A IL-10 está envolvida na limitação de respostas inflamatórias e, portanto, é considerada uma citocina imunorreguladora. Além disso, está envolvida no processo de diferenciação das células T reguladoras (MOORE et al., 2001; ASADULLAH et al., 2004).

Netea *et al.* (2004) demonstraram que o número de células T regulatórias na circulação de camundongos TLR2^{-\-1}, mas não de TLR4^{-\-1}, era significantemente

reduzido quando comparado com animais controle. Sutmuller *et al.* (2006) demonstraram que o número de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ em camundongos TLR2^{-\--} é significantemente reduzido quando comparado com camundongos controle, demonstrando, assim, uma ligação entre as células T regulatórias e TLR-2.

Considerando os dados da literatura, em conjunto com os dados obtidos neste trabalho, no qual observa-se que os linfócitos B-1: a) expressam altos níveis de CD80 e MHC-II, b) possuem baixa expressão de CD86, c) secretam IL-10, d) expressam TLR-2, e) possuem capacidade de apresentar antígeno e f) demonstram capacidade de migrar do peritônio para o baço após estímulo ip, investigamos se os linfócitos B-1 poderiam ativar células T regulatórias.

Para avaliar a geração de células T com fenótipo de célula T reguladora, reconstituímos a cavidade peritoneal de camundongos CBA/N Xid (desprovidos de linfócitos B-1) com linfócitos B-1 e após 24 horas estes animais foram infectados ip com leveduras de *P. brasiliensis*. As células da cavidade peritoneal foram obtidas e marcadas para as moléculas de superfície CD4 e CD25 e para o fator de transcrição Foxp3. Após observarmos que estas células migravam da cavidade peritoneal para o baço, foi observado também que ocorria pequeno aumento no número de células T com fenótipo de célula T reguladora (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) no baço.

Assim, de acordo com nossos resultados, podemos sugerir que a elevada produção de IL-10 por células B-1, mediada provavelmente pela ligação de TLR-2, juntamente com a capacidade dos linfócitos B-1 em ativar linfócitos T e sua capacidade de migrar do peritônio para o baço e ativar células T regulatórias, as quais têm a capacidade de suprimir uma resposta imune efetora, poderiam favorecer a sobrevivência de células fúngicas nos animais, levando à maior susceptibilidade à

doença. Essa hipótese também poderia ser justificada pelo maior controle da infecção de *P. brasiliensis* em camundongos Xid, de modo que estes animais, quando reconstituídos com linfócitos B-1, aumentam a susceptibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis*.

6. CONCLUSÕES

- → A população enriquecida de linfócitos B-1 não se prolifera em cultura celular após estímulo com CFA.
- → Os linfócitos B-1 expressam CD80, CD86 e MHC-II, caracterizando um fenótipo de célula apresentadora de antígeno. Após estímulo com CFA, estas células foram capazes de estimular a proliferação de linfócitos TCD4.
- → Quanto à produção de citocinas, os linfócitos B-1 secretam IL-10 e TNF-α; mas quando estas células são estimuladas com CFA os valores aumentam significantemente.
- → Os linfócitos B-1, sem estímulo e com estímulo de CFA, expressam TLR-2, MyD88 e IL-10. Porém, não expressam TLR-4.
- → Após estímulo ip com leveduras de *P. brasiliensis.*, os linfócitos B-1 migram da cavidade peritoneal para o baço e induzem aumento na população de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.
- → Os resultados sugerem que a elevada produção de IL-10 por células B-1, mediada provavelmente pela ligação de TLR-2, juntamente com a capacidade dos linfócitos B-1 em ativar linfócitos T e com a capacidade de migrar do peritônio para o baço e ativar células T regulatórias, poderiam favorecer a sobrevivência de células fúngicas nos animais, levando à maior susceptibilidade à doença.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular.** 5^a ed. Rio de Janeiro: Ed Revinter, 2005.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.499-511, 2004.

ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v.2, p.248-252, 1971.

ALMEIDA, F.P. Estudos comparativos do granuloma coccidiódico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, v.5, p.125-141, 1930.

ALMEIDA, S.R.; AROEIRA, L.S.; FRYMULLER, E.; DIAS, M.A.A.; BOGSAN, C.S.B.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflamatory exudate. **International Immunology**, v.13, p.1193-1201, 2001.

ANSORGE, W. Fast visualization of protein bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate. **Electrophoresis**, v.82, p.235-242, 1983.

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infection and Immunity**, v.66, p.5587-5591, 1998.

ASADULLAH, K.; SABAT, R.; FRIEDRICH, M.; VOLK, H.D.; STERRY, W. Interleukin-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. **Current Drug Targets**, v.3, n.2, p.185-192, 2004.

BAIDA, H.; BISELLI, P.J.; JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G.M.B.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S.; BENARD, G. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and form paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v.1, p.273-278, 1999.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUES, S.; LIU, Y.J.; PULENDRA, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v.18, p.767-811, 2000.

BELLOCHIO, S.; MONTAGNOLI, C.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; ROSSI, G.; MAMBULA, S.S.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A.; LEVITZ, S.M.; ROMANI, L. The

contribution of Toll/like/ IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. **Journal of Immunology**, v.172, n.5, p.3059-3069, 2004.

BENARD, G.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; JUVENALE, M.; MIRANDA, E.T.; DUARTE, A.J.S. Immunosupression in Paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. **Journal of Infectious Diseases**, v.175, p.1263-1267, 1997.

BETHLEN, E.P.; CAPONE, D.; MARANHÃO, B.; CARVALHO, C.R.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v.5, p.319-325, 1999.

BIAGIONI, L.; SOUZA, M.J.; CHAMMA, L.G.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; MOTA, N.G.; FRANCO, M. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, p.617-621, 1984.

BLANDER, J.M. Signaling and phagocytosis in the orchestration of host defense. **Cellular Microbiology**, v.9, p.290-299, 2007.

BLANDER, J.M.; MEDZHITOV, R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. **Nature**, v.440, p.808-812, 2006.

BLUMER, S.O.; JALBERT, M.; KAUFMAN, L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p.404-407, 1984.

BORELLI, D. Some etiological aspects of paracoccidiodomycosis. In: Pan American Health Organization. **Scentific Publication**, 254: 59-64, 1972.

BOUMSELL, L.; BERNARD, A.; LEPAGE, V.; DEGOS, L.; LEMERLE, J.; DAUSSET, J. Some chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulins share determinants with T cells. **European Journal of Immunology**, v.8, p.900-904, 1978.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRUMMER, E.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, p.89-117, 1993.

- CALICH, V.L.G.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGUER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v.66, p.585-594, 1985.
- CALICH, V.L.G.; FAZIOLI, R.A.; TEIXEIRA, H.C.; RUSSO, M.; SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; VAZ, C.A.C. Mechanisms of host-resistence to *Paracoccidioides brasiliensis*. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY, 10, Barcelona, 1988. **Proceedings**. Barcellona: J.M. Torres-Rodrigues, J.R. Prous Science, p.154-159, 1988.
- CALICH, V.L.G.; KASINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.615-623, 1998.
- CALICH, V.L.G.; PINA, A.; FELONATO, M.; BERNADINO, S.; COSTA, T.A.; LOURDES, F.V. Toll-like receptors and fungal infections: the role of TLR-2, TLR-4 and MyD88 in paracoccidioidomycosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.53, p.1-7, 2008.
- CALIGARIS-CAPPIO, F.; GOBBI, M.; BOFIL, M.; JANOSSY, G. Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. **Journal of Experimental Medicine**, v.155, p.623-628, 1982.
- CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, J.L.; CAMPOY, S.P. & TRAVASSOS, L.R. Production of Paracoccidioides brasiliensis exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin Microbiol.** 26: 2147-2150, 1988.
- CAMARGO, Z.P.; TABORDA, C.P.; RODRIGUES, E.G.; TRAVASSOS, L.R. The use of cell free antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.29, n.1, p.31-38, 1991.
- CAMARGO, Z.P.; GESZTESI, J.L.; SARAIVA, E.C.; TABORDA, C.P.; VICENTINI, A.P.; LOPES, J.D. Monoclonal capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2377-2381, 1994.
- CASOLA, S. Control of peripheral B-cell development. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.143-149, 2007.
- CAVASSANI, K.A.; CAMPANELLI, A.P.; MOREIRA, A.P.; VANCIM, J.O.; VITALI, L.H.; MANEDE, R.C.; MARTINEZ, R.; SILVA, J.S. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **Journal of Immunology**, v.177, n.9, p.5811-5818, 2006.

- CHEN, L.; WANG, S. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocytes response. **Microbes and Infection**, v.6, p.759-766, 2004.
- CHEN, Z.J.; SHIMIZU, F.; WHEELER, J.; NOTKINS, A.L. Polyreactive antigenbinding B cells in the peripheral circulation are IgD + and B7. **European Journal of Immunology**, v.26, n.12, p.2916-2923, 1996.
- COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, n.5, p.1441-1454, 2002.
- DINIZ, S.N.; CISALPINO, P.S.; FREIRE, A.T.F.; SILVA-TEIXEIRA, D.N.; CONTIGLI, C.; RODRIGUES Jr., V.; GOES, A.M. *In vitro* granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Human Immunology**, v.62, n.8, p.799-808, 2001.
- DITERICH, I.; RAUTER, C.; KIRSCHNING, C.J. AND HARTUNG, T. Borrelia burgdorferi-induced tolerance as a model of persistence via immunosuppession. **Infect Immun**. 71: 3979-3985, 2003.
- D'OSTIANI, C.F.; DEL SERO, G.; BACCI, A.; MONTAGNOLI, C.; SPRECA, A.; MENCACCI, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; ROMANI, L. Dendritic cells dicciminate between yeast and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity *in vitro* and in *vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v.191, p.1661-1674, 2000.
- DUBEY, C.; CROFT, M.; SWAIN, S.L. Costimulatory requeriment of naïve CD4 + T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naïve CD4 T cell activation but both are required for optimum response. **Journal of Immunology**, v.155, p.45-57, 1995.
- EHIRCHIOU, D.; XIONG, Y.; Xu, G.; CHEN, W.; SHI, Y.; ZHANG, L. CD11b facilites the development of peripheral tolerance by suppessing Th17 differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, v.204, p.1519-1524, 2007.
- FAVA NETTO, C.; RAPHAEL, A. A reação intradérmica com polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*, na blastomicose sul-americana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.3, p.161-165, 1961.
- FERREIRA, M.S.; FREITAS, L.H.; LACAZ, C.S.; DEL NEGRO, G.M.; MELO, N.T.; GARCIA, N.M.; ASSIS, C.M.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably

contaminates with soil in Uberlandia, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.28, p.253-256, 1990.

FERREIRA, K.S.; BASTOS, K.R.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S.R. Interaction between *Paracoccidioides brasiliensis* and pulmonary dendritic cells induces interleukin-10 production and toll-like receptor-2 expression: possible mechanisms of susceptibility. **Journal of Infectious Diseases**, v.196, p.1108–1115, 2007.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v.4, n.4, p.330-336, 2003.

FORNAJEIRO, N.; MALUF, M.L.; TAKAHACHI, G.; SVIDZINSKI, T.I. Paracoccidioidomycosis epidemiological survery using gp43 in two cities of northwestern region of Parana Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.191-193, 2005.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G.S. Paracoccidioidomycosis: a rently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.20, p.129-132, 1987.

FRANCO, M.F.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BACCHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.T.; MONTENEGRO, M.R. Paracoccidiodomycosis. **Bull Clin Trop Med Commun Dis**, v.4, p. 185-221, 1989.

FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. The B.7 – CD28 Superfammily. **Nature Reviews Immunology**, v.2, p.116-126, 2002.

GARCIA, N.M.; DEL NEGRO, G.M.; HEINS-VACCARI, E.M.; DE MELO, N.T.; DE ASSIS, C.M.; LACAZ, C.S. Paracoccidioidomycosis: a new sample isolated from feces of a penguim (Pygoscelis adeliae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n.3, p.227-235, 1993.

GIL, M.L.; GOZALBO, D. TLR-2 but not TLR-4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeast and hyphae. **Microbes and Infection**, v.8, p.2299-2304, 2006.

GIRALDO, R.; RESTREPO, A.; GUTIERREZ, F.; ROBLEDO, M.; LONDONO, F.; HERNANDEZ, H.; SIERRA, F.; CALLE, G. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. **Mycopathologia**, v.58, p.63-70, 1976.

GHOSN, B.E.E. Revisitando a cavidade peritoneal de camundongos: identificação de novos subtipos funcionais de linfócitos B-1 e macrófagos. São Paulo, 2008. 137p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêutica - Universidade de São Paulo.

HARDY, R.R.; HAYAKAWA, K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. **Advances in Immunology**, v.55, p.297-339, 1994.

HARDY, R.R. B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia. **Current Opinion in Immunology**, v.18, p.547-555, 2006.

HAYAKAWA, K.; HARDY, R.R.; PARKS, D.R.; HERZENBERG, L.A. The Ly-1B cell subpopulation in normal immunodefective, and autoimmune mice. **Journal of Experimental Medicine**, v.157, p.202-218, 1983.

HAYAKAWA, K.; HARDY, R.R. Development and function of B-1 cells. **Current Opinion in Immunology**, v.12, p.346-353, 2000.

HEINSBROEK, S.E.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Dectin-1 escape by fungal dimorphism. **Trends in Immunology**, v.26, p.352-354, 2005.

HERZENBERG, L.A.; STALL, A.M.; LALOR, P.A.; SIDMAN, C.; MOORE, W.A.; PARKS, D. The Ly-1B cell lineage. **Immunological Reviews**, v.93, p.81-102, 1986.

HERZENBERG, L.A. B-1 cells: the lineage question revisited. **Immunological Reviews**, v.175, p.9-22, 2000.

HIRSCHFELD, M.; WEIS, J.J.; TOSHCHAKOV, V.; SALKOWSKI, C.A.; CODY, M.J.; WARD, D.C.; QUERESH, N.; MICHALEK, S.M.; VOGEL, S.N. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonist results in differential gene expression in murine macrophages. **Infection and Immunity**, v.69, p.1477-1482, 2001.

HOERAUF, A.; SOLBACH, W.; LOHOFF, M.; ROLLINGHOFF, M. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. **International Immunology**, v.6, n.8, p.1117-1124, 1994.

HORI, S.; CARVALHO, T.L.; DEMENGEOT, J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by Pneumocystis carinni in immunodeficient mice. **European Journal of Immunology**, v.32, n.5, p.1282-1291, 2002.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Controlo f regulatory T cell development by the transcription factor *Foxp3*. **Science**, v.2999, p.1057-1061, 2003.

KANTOR, A.B.; STALL, A.M.; ADAMS, S.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A. Adoptive transfer of murine B-cell lineages. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.651, p.168-169, 1992.

KANTOR, A.B.; STALL, A.M.; ADAMS, S.; HERZENBERG, L.A; HERZENBERG, L.A. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.3320-3324, 1992.

KANTOR, A.B.; HERZENBERG, L.A. Origin of murine B cell lineages. **Annual Review of Immunology**, v.11, p.501-538, 1993.

KASHINO, S.S.; CALICH, V.L.C.; SINGER-VERMES, L.M.; ABRAHAMSOHM, P.A.; BURGER, E. Growth curves, morphology and ultrastructure of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **Mycopathologia**, v.99, n.2, p.119-128, 1987.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Seminars in Immunology**, v.19, p.24-32, 2007.

KAWAMURA, T.; FURUE, M. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 expression in Langerhans cells: differential regulation by T helper type 1 and T helper type 2 cytokines. **European Journal of Immunology**, v.25, p.1913-1917, 1995.

KIPNIS, A.P.J. Caracterização da infecção intraperitoneal de camundongos imunodeficientes Balb/xid, com *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, 1998. 201p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.

KHATTRI, R.; COX, T.; YASAYKO, S.A.; RAMSDELL, F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. **Nature Immunology**, v.4, n.4, p.337-342, 2003.

LACAZ, C.S.; PASSOS FILHO, M.C.R.; FAVA-NETO, C. & MACARRON, R. Contribuição, para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidino-positivos. **Rev Inst Med Trop S Paulo,** 1: 245-259, 1959.

LACAZ, C.S.; ZAMITH, V.A.; DEL NEGRO, G.; SIQUEIRA, A.M. Aspectos clínicos gerais. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomicose**. São Paulo: Sarvier, p.141-147, 1982.

- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8º Ed. São Paulo: Sarvier, 1991.
- LACAZ, C.S. Historical evolution of the knowledge n paracoccidioidomycosis and its ethiologic agent. In Franco, M., Lacaz, C. S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G; eds. Paracoccidiodomycosis. **CRC Press Boca Raton, da USA**, p. 1-11, 1994a.
- LACAZ, C.S. *Paracoccidioides brasiliensis*: morfologhy, evolucionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. Paracoccidiodomycosis. **Boca Raton: CRC Press**, p.13-22. 1994b.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACARI, E.M.; DE MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.
- LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cell**, v.106, n.3, p.263-266, 2001.
- LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; Gross, O.; ROBINSON, M.J.; OSORIO, F.; SLACK, E.C.; TSONI, S. V.; SCHWEIGHOFFER, E.; TYBULEWICZ, V.; BROWN, G.D.; RULAND, J.; REIS E SOUSA, C. SyK-and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce IL-17. **Nature Immunology**, v.8, n.6, p.630-638, 2007.
- LENSCHOW, D.J.; WALUNAS, T.L.; BLUESTONE, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Annual Review of Immunology**, v.14, p.233-258, 1996.
- LONDERO, A.T. Paracoccidioidomicose. I. Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **Jornal de Pneumologia**, v.12, p.41-60, 1986.
- LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. **Jornal de Pneumologia**, v.16, p.129-132, 1990.
- LOPES-CARVALHO, T.; FOOTE, J.; KEARNEY, J.F. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. **Current Opinion in Immunology**, v.17, p.244-250, 2005.
- LOOSE, D.S.; STOVER, E.P.; RESTREPO, A.; STEVANS, D.A.; FELDMAN, D. Estradiol binds to a receptor like cytosol and initiates a biological response in

Paracoccidioides brasiliensis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.80, p.7659-7663, 1983.

LUTHER, K.; TOROSANTUCCI, A.; BRAKHAGE, A.A.; HEESEMANN, J.; EBEL, F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 beta-glucan receptor and Toll-like receptor 2. **Cellular Microbiology**, v.9, p.368-381, 2007.

LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hypo-blastomycoses americanas. **Brasil-Médico**, v.22, p.141-144, 1908.

MACKINNON, J.E. Pathogenesis of south american blastomyces. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 53: 487-494, 1960.

MANOHAR, V.; BROWN, E.; LEISERSON, M.W.; CHUSED, M.T. Expression of Lyt-1 by a subset of B lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.129, p.532-538, 1982.

MANONI, R.L.; NOUER, A.S.; OLIVEIRA, S.J.; MUSATTI, C.C.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.S.L. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidiodomycosis. **Medical Mycology**, v.40, n.2, p.153-159, 2002.

McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, n.3, p.165-175, 1987.

MINOPRIO, P.; EI CHEIKH, M.C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O'GARRA, A. Xid- associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gama dependent. **Journal of Immunology**, v.151, p.4200-4208, 1993.

MONTAGNOLI, C.; BACCI, A.; BOZZA, S.; GAZIANO, R.; MOSCI, P.; SHARPE, A.H.; ROMANI, L. B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. **Journal of Immunology**, v.169, n.11, p.6298-6308, 2002.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO. F. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomicose**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.131-150.

MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptors. **Annual Review of Immunology**, v.19, p.683-765, 2001.

MORAES, C.B.; SCHAFFER, G.M.V. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. **Mycoses**, v.45, p174-179, 2002.

MOREIRA, A.P.; CAVASSANI, K.A.; TRISTAO, F.S.M.; CAMPANELLI, A.P.; MARTINEZ, R.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. CCR-5 dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. **Journal of Immunology**, v.180, n.5, p.3049-3056, 2008.

MOTA, N.G.S.; IWASSO, M.T.R.; PERAÇOLI, M.T.S.; AURI, R.C.; MENDES, R.P.; MARCONDES, J.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; FRANCO, M. Correlation between cell-mediates immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.79, p.765-772, 1985.

NEGRONI, P. Estúdios sobre la ecologia del *Paracoccidioides brasiliensis* em la Argentina. **Prensa Medica Argentina**, v.53, p.2381-2382, 1966.

NEGRONI, P. Estúdios sobre La ecologia Del Paracoccidioides brasiliensis em la Argentina. **El Tórax XVII**, p. 60-61, 1968.

NEGRONI, R; COSTA, M.R.I.E; BIANCHI, O. & GALIMBERT, R. Preparación y estúdio de um antígeno celular de Paracoccidioides brasiliensis útil para pruebas cutâneas. **Sabouraudia** 14: 265-273, 1976.

NEWORAL, E.P.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R.L.; NORONHA, I.L.; BLOTTA, M.H. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. **Cytokine**, v.21, p.234-241, 2003.

NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.A.; VONK, A.G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR-4 in the host defense against disseminated candidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v.185, p.1483-1489, 2002.

NETEA, M.G.; WARRIS, A.; VAN DER MEER, J.W.; FENTON, M.J.; VERVER-JANSSEN, T.J.; JACOBS, L.E.; ANDRESEN, T.; VERWEY, T.J. AND KULLBERG, B.J. Aspergillus fumigatus evades immune recognition during germination through loss of TLR 4 mediaded signal transduction. **J Infect Dis**, 188: 320-236, 2003.

- NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J.W.M.; KULLBERG, B.J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v.75, n.5, p.749-755, 2004.
- NETEA, M.G.; GOW, N.A.R.; MUNRO, C.A.; BATES, S.; COLLINS, C.; FERWERDA, G.; HOBSON, R.P.; BERTRAM, G.; HUGHES, H.B.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; BUURMAN, E.T.; GIJZEN, K.; WILLIAMS, D.L.; TORENSMA, R.; MCKINNON, A.; MACCALLUM, D.M.; ODDS, F.C.; VAN DER MEER, J.W.M.; BROWN, A.J.P.; KULLBERG, B.J. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and toll-like receptors. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.6, p.1642-1650, 2006.
- O'BRIEN, A.D.; SCHER, I. and METCALF, E.S. Genetically conferred defect in anti-Salmonella antibody formation renders CBA/N mice innately susceptible to *Salmonella typhimurium* infection. **J. Immunol**. 126(4): 1368-72, 1981.
- O'GARRA, A.; CHANG, R.; GO, N.; HASTINGS, R.; HAUGHTON, G.; HOWARD, M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. **European Journal of Immunology**, v.22, p.711-717, 1992.
- OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L.; MUSATTI, C.C.; PAPAIORDANOU, P.M.; BLOTTA, M.H. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparasion with infected and non-infected controls. **Microbes and Infection**, v.4, p.139-144, 2002.
- OLIVEIRA, H.C. **Participação de linfócitos B-1b no processo de cicatrização no camundongo.** São Paulo, 2009. 61p. Tese de Doutorado Escola Paulista de Medicina Universidade de São Paulo.
- PATHAK, S.K.; BASU, S.; BASU, K.K.; BANERJEE, A.; PATHAK, S.; BHATTACHARYYA, A.; KAISHO, T.; KUNDU, M.; BASU, J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of mycobacterium tuberculosis and TLR-2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nature Immunology**, v.8, n.6, p.610-618, 2007.
- POPI, A.F.; LOPES, D.J.; MARIANO, M. Gp43 from *Pracocidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. an evasion mechanism of the fungus. **Cellular Immunology**, v.218, p.87-94, 2002.
- POPI, A.F.; LOPES, D.J.; MARIANO, M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages *in vitro*. **Immunology**, v.113, p.348–354, 2004.

- POPI, A.F.; GODOY, C.L.; XANDER, P.; LOPES, D.J.; MARIANO, M. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasilien*sis infection in mice via IL-10 secretion. **Microbes and Infection**, v.10, n.7, p.817-824, 2008
- PRADO, M.; SILVA, M.B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS.; TABORA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of deadth or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.3, p.513-521, 2009.
- PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.J.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v.53, p.193-203, 1986.
- PUCCIA, R.; TAKAOKA, D.T.; TRAVASSOS, L. Purification of the 43kDa glicoprotein from the exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (Tom medium). **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.29, n.1, p.57-60, 1991.
- QI, H.; DENNING, T.L.; SOONG, L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial Toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. **Infection and Immunity**, v.71, p.3337-3342, 2003.
- RAWLINGS, D.J.; SAFFRAN, D.C.; TSUKADA, S.; LARGAESPADA, D.A.; GRIMALDI, J.C.; COHEN, L.; MOHR, R.N.; BAZAN, J.F.; HOWARD, M. AND COPELAND, N.G. Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. **Science**. 261:358-361, 1993.
- RE, F.; STROMINGER, J.L. Toll-like receptor 2 (TLR-2) and TLR-4 differentially activate human dendritic cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.37692-37699, 2001.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides braziliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.23, p.323, 1985.
- RESTREPO, A. Actualización sobre la paracoccidioidomycosis y su agente etiológico, 1986-1989. **Interciencia**, v.15, p.193-199, 1990.
- RESTREPO, A.; MONCADA, L.H. Indirect fluorescent-antibody and quantitative agar-gel tests for the sorological diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, p.132-137, 1972.

RESTREPO A.; MONCADA L.H. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. **Applied Microbiology**, v.28, n.1, p.138-144, 1974.

RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v.39, n.3, p.233-241, 2001.

ROEDERER, M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. **Cytometry**, 45:194-205, 2001.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptors α-chains (CD25). **Journal of Immunology**, v.155, p.1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; MIYARA, M. Regulatory T cells: a brief history and perspective. **European Journal of Immunology**, v.37, p.116-123, 2007.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; STEWANS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v.56, p.711-713, 1988.

SAN-BLAS, G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of Medical Research**, v.24, p.267-268, 1993.

SEON-AH, H.A.; TSUJI, M.; SUZUKI, K.; MEEK, B.; YASUDA, N.; KAISHO, T.; FAGARSAN, S. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.11, p.2541-2550, 2006.

SHER, A.; COFFMAN, R.L. Regulation of immunity to parasite by T cells and T cell-derived cytokines. **Annual Review of Immunology**, v.10, p.385-398, 1992.

SHOHAM, S.; HUANG, C.; CHEN, J.M.; GOLENBOCK, D.T.; LEVITZ, S.M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release en response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. **Journal of Immunology**, v.166, p.4620-4626, 2001.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores conteporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA, C.L.; ALVES, L.M.; FIGUEIREDO, F. Involvement of cell wall glucans in the Genesis and persistence of the inflamatory reaction caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology**, v.140, pt.5, p.1189-1194, 1994.

SILVA-VERGANA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FRITAS-SILVA, G.; LEITE, C.M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v.36, p.37-42, 1998.

SILVA-VERGANA, M.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo Dasypus movemcinctus in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopthologia**, v.144, p.131-133, 1990.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F.Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L.; GRUPO DE CONSULTORES EM PARACOCCIDIOIDOMICOSE. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, p.297-310, 2006.

SPLENDORE, A. Zymonematosis com localizazzione nella cavitá della bocca, osservada in Brasile. **Bulletin de la Societè de Pathologie Exotique et de Ses Filiales**, v.5, p.313-319, 1912.

STALL, A.M.; ADAMS, S.; HERZEMBERG, L.A.; KANTOR, A.B. Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.651, p.33-43, 1992.

STEINMAN, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annual Review of Immunology**, v.9, p.271-296, 1991.

STETSON, D.B.; VOEHRINGER, D.; GROGAN, J.L.; XU, M.; REINHARDT, R.L.; SCHEU, S.; KELLY, B.L.; LOCKSLEY, R.M. TH2 cells: orchestrating barrier immunity. **Advances in Immunology**, v.83, 163-189, 2004.

SURI-PAYER, E.; AMAR, A.Z.; THORNTON, A.M.; SHEVACH, E.M. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. **Journal of Immunology**, v.160, n.3, p.1212-1218, 1998.

SUTMULLER, R.P.M.; DEN BROK, M.H.M.G.M.; KRAMER, M.; Bennink, E.J.; Toonen, L.W.J.; Kullberg, B.-J.; Joosten, L.A.; Akira, S.; Netea, M.G.; Adema, G.J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.2, p.485-494, 2006.

SWAIN, S.L.; HU, H.; HUSTON, G. Class II: independent generation of CD4 memory T cells from effectors. **Science**, v.286, p.1381-1383, 1999.

TAKAHASHI, T.; KUNIYASU, Y.; TODA, M.; SAKAGUCHI, N.; ITOH, M.; IWATA, M.; SHIMIZU, J.; SAKAGUCHI, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen. **Journal of Experimental Medicine**, v.192, n.2, p.303-310, 2000.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual Review of Immunology**, v.21, p.335-376, 2003.

TAYLOR, P.R.; TSONI, S.V.; WILLMENT, J.A.; DENNEHY, K.M.; ROSAS, M.; FINDON, H.; HAYNES, K.; STEELE, C.; BOTTO, M.; GORDON, S.; BROWN, G.D. Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. **Nature Immunology**, v.8, n.1, p.31-38, 2007.

THORNTON, A.M.; SHEVACH, E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. **Journal of Experimental Medicine**, v.188, n.2, p.287-296, 1998.

TUNG, J.W.; HERZENBERG, L.A. Unraveling B-1 progenitors. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p.150-155, 2007.

UNANUE, E.R.; ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other acessory cells. **Science**, v.236, p.551-557, 1987.

VAN DER GRAAF, C.A.A.; NETEA, M.G.; VERSCHUEREN, I.; VAN DER MEER, J.W.M.; KULLBERG, B.J. Differential cytokine production and toll-like receptors signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidea and hyphae. **Infection and Immunity**, v.73, p.7458-7464, 2005.

VIGNA, A.F.G.; GODOY, L.C.; ALMEIDA, S.R.; MARIANO, M.; LOPES, J.D. Characterization of B-1b cells as antigen presenting cells in the imune response to gp43 from *Paracoccidioides brasiliensis in vitro*. **Immunology Letters**, v.83, p.61-66, 2002.

VIGNA, A.F.; ALMEIDA, S.R.; XANDER, P.; FREYMULLER, E.; MARIANO, M.; LOPES, D.J. Granuloma formation *in vitro* requires B-1 cells and is modulated by *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 antigen. **Microbes and Infection**, v.8, p.589–597, 2006.

- VILLAMÓN, E.; GOZALLO, D.; ROIG, P.; O'CONNOR, J.E.; FRADELIZI, D.; GIL, M.L. Toll-like receptor 2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. **Microbes and Infection**, v.6, p.1-7, 2004a.
- VILLAMÓN, E.; GOZALLO, D.; ROIG, P.; O'CONNOR, J.E.; FRADELIZI, D.; GIL, M.L. Toll-like receptors 2 is dispensable for acquire host immune rresistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. **Microbes and Infection**, v.6, p.542-548, 2004b.
- VIRIYAKOSOL, S.; FIERER, J.; BROWN, G.D.; KIRLAND, T.N. Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadassi* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. **Infection and Immunity**, v.73, p.1553-1560, 2005.
- WANG, X.; MOSER, C.; LOUBOUTIN, J.P.; LYSENKO, E.S.; WEINER, D.J.; WEISER, J.N.; WILSON, J.M. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenza* infction in mouse lung. **Journal of Immunology**, v.168, p.810-815, 2002.
- WANG, Z.; CHEN, Z.J.; WHEELER, J. SHEN, S.; NOTKINS, A.L. Characterization of murine polyreactive antigen binding B cells: presentation of antigens to T cells. **European Journal of Immunology**, v.31, n.4, p.1106-1114, 2001.
- WANKLE, B.; LONDERO, A.T. Epidemiology and Paracoccidiodomycosis infection. In: FRANCO, M.C.S. LACAZ, A. RESTREPO; G. DEL NEGRO, G.M.B., eds. **Paracocidiodomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.109-120
- WEST, A.P.; KOBLANSKY. A.A.; GHOSH, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.22, p.409-437, 2006.
- WILDIN, R.S.; SMYK-PEARSON, S.; FILIPOVICH, A.H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v.39, n.8, p.537-545, 2002.
- YANG, Y.; TUNG, J.W.; GHOSN, E.E.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A. Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.4542-4546, 2007.
- YARZÁBAL, L.A. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomicose sul americana revelados immunoeletroforesis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 130:320-327, 1971.

YARZÁBAL, L.A.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; FRUIT, J.; RIEUS, S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. **Sabouraudia**., v.15, p.79-85, 1977.

YAUCH, L.E.; MANSOUR, M.K.; SHOHAM, S.; ROTTMAN, J.B.; LEVITZ, S.M. Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans in vivo*. **Infection and Immunity**, v.72, p.5373-5382, 2004.

ZHONG, X.; GAO, W.; DEGAUQUE, N.; BAI, C.; LU, Y.; KENNY, J.; OUKKA, M.; STROM, T.B.; ROTHSTEIN, T.L. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. **European Journal of Immunology**, v.37, n.9, p.2400-2404, 2007.