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

Participação de linfócitos B-1 na criptococose experimental

Eliver Eid Bou Ghosn

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo

2004

18047

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010340

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

G427p Ghosn, Eliver Eid Bou
Participação de linfócitos B-1 na criptococose experimental /
Eliver Eid Bou Ghosn. -- São Paulo, 2004.
77p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas.

Orientador: Almeida, Sandro Rogério de

1. Fungos : Doenças : Imunologia 2. Relação hospedeiro-
parasita I. T. II. Almeida, Sandro Rogério de, orientador.

616.969079 CDD

Eliver Eid Bou Ghosn

Participação de linfócitos B-1 na criptococose experimental

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

~~Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida~~
orientador/presidente

Profº. Dr. Mario Mariano

Profº. Dr. Momtchilo Russo

São Paulo, 16 de Dezembro de 2004.

Desde minha juventude, aprendi a admirar duas figuras muito especiais na minha vida, que com paciência e sabedoria me ajudaram a descobrir dimensões mais profundas e a escolher meus caminhos com maior liberdade. Pai e Mãe, pela paciência e confiança eu vos devoto meu amor e vos dedico esta dissertação.

Antonios Eid Bou Ghosn e Jeanette Bou Ghosn

Cheguei até esta Universidade em busca de um Orientador e aqui encontrei um amigo, companheiro sempre presente e paciente, que ao longo destes dois anos me deu conhecimento e o caminho da sabedoria, me transformando em um verdadeiro amante da pesquisa. Obrigado professor **Sandro Rogério de Almeida** pela confiança para realização deste trabalho e espero que esta parceria dure por muitos anos.

Nagib Antoan, Cida e Nassim Anthony, é um imenso prazer crescer, rir e aprender com vocês. Ter três figuras tão especiais e excêntricas como irmãos é um privilégio e um prazer para poucos.

Neste departamento conheci muitos professores e dentre eles uma linda pesquisadora me chamou a atenção. Uma profissional de sucesso que aprendi a admirar e respeitar. Porém, durante estes anos na pós-graduação tive o imenso prazer de poder trabalhar ao seu lado e muita coisa aprender. É sempre delicioso ouvi-la e logo sua beleza tornou-se desnecessária diante de tanta personalidade, carisma e energia contagiante. À professora titular **Ana Campa**, obrigado pela amizade e orientação. Agradeço também sua aluna Maria Rita Rodrigues pela colaboração na realização dos ensaios de "burst" oxidativo e a Alziana Pedrosa pela amizade e apoio.

Tudo isso não seria possível sem a ajuda gratuita de uma amiga indispensável durante minha aventura na pesquisa. É impossível descrever minha pós-graduação sem mencionar seu nome em vários momentos. Ela me trouxe até a USP, me apresentou a pesquisa, a amizade e principalmente o prazer de sorrir. Inteligente e dona de uma beleza indiscreta, é impossível não estar próximo dela. Uma vez eu lhe disse: "a nossa amizade é como a natureza, permite ciclos, mas jamais chegará ao fim".

Marina Reis de Moura Campos, obrigado pela amizade.

Maria da Glória Teixeira de Sousa, minha admiração pelo nordeste. Obrigado pelas madrugadas na USP, sempre ao meu lado e me ajudando na elaboração da minha dissertação. E obrigado, principalmente, por suportar minhas crises.

Pelo sorriso, amizade e indispensável ajuda, agradeço aos meus amigos e grupo
de trabalho:

**Andrea Arruda, Edgar Belintani, Karen Spadari Ferreira (bonita e legal),
Márcia Hayakawa, Maria da Glória Teixeira de Sousa, Marina Reis de Moura
Campos, Rosana Cícera do Nascimento, Sônia Buratto, Tânia Sueli de
Andrade, Tatiana Ometto, e Viviane Mazo,**
pelo amor e ódio de cada dia.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Criptococose	1
1.2. Imunopatogenia da criptococose	4
1.3. Sistema fagocitário mononuclear	8
1.4. Fagócitos mononucleares derivados de linfócitos B-1	10
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
3.2. Tamanho da cápsula das cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
3.3. Camundongos.....	18
3.4. Obtenção de linfócitos B-1	18
3.4.1. Obtenção de macrófagos	18
3.4.2. Obtenção de complemento	19
3.5. Ensaio de fagocitose	19
3.5.1. Ensaio de viabilidade	20
3.5.2. Análise do “burst” oxidativo	20
3.5.3. Análise da atividade peroxidásica	21
3.5.4. Produção de Óxido Nítrico	21
3.6. Infecção experimental	22
3.6.1. Índice de mortalidade dos camundongos infectados.....	22
3.6.2. Unidades Formadoras de Colônia (UFC)	22
3.7. Dosagem de citocinas	22
3.8. Quantificação de linfócitos B-1 nos órgãos dos camundongos BALB/c	23
3.9. Análise Estatística	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. <i>Cryptococcus neoformans</i>	25
4.2. Tamanho da cápsula das cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i>	25

4.3.	Ensaio de fagocitose	26
4.4.	Secreção de citocinas <i>in vitro</i>	28
4.5.	Análise da viabilidade de leveduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> após fagocitose	29
4.6.	Produção de Óxido Nítrico	31
4.7.	Análise do "burst" oxidativo	32
4.8.	Análise da atividade peroxidásica	34
4.9.	Análise da mortalidade dos camundongos BALB/c e BALB/xid	35
4.9.1.	Análise das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos órgãos baço, fígado e pulmão após a infecção com as duas cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i>	36
4.9.2.	Análise do padrão de citocinas presentes no macerado dos órgãos após infecção	39
4.10.	Quantificação de linfócitos B-1 nos órgãos dos camundongos BALB/c	50
5.	DISCUSSÃO	56
6.	CONCLUSÕES	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AA4.1 - molécula presente na superfície de células hematopoéticas indiferenciadas

AIDS - "Acquired Immunodeficiency Syndrome"

B/M ϕ - célula B com características macrofágicas

B-220 - antígeno comum de leucócitos

BALB/c - camundongo selvagem (controle) da linhagem BALB

BALB/xid - camundongo linhagem BALB com imunodeficiência ligada ao cromossomo X.

BCR - "B-Cell Receptor"

BSA - "Bovine Serum Albumine"

CBS - "Centraalbureau voor Schimmelcultures"

CD - "Cluster of Differentiation"

CO₂ - dióxido de carbono (gás carbônico)

CR - "Complement Receptor"

DO - Densidade Óptica

ELISA - "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"

ERN - Espécie Reativa de Nitrogênio

ERO - Espécie Reativa de Oxigênio

F4/80 - molécula presente na superfície de linhagem mielomonocítica

GalXM - Galactoxilomanana

GXM - Glucuronoxilomanana

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

HIV - "Human Immunodeficiency Virus"

HRP - "Horse Radish Peroxidase"

i.p. - intraperitoneal

IF - Índice Fagocítico

IFN- γ - interferon-gamma

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

L-929 - clone neoplásico de célula Fibroblasto

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

LLC - Leucemia Linfóide Crônica

Ly-1 - sinônimo para CD5. Presente em Linfócitos T

Ly6A - molécula presente na superfície de células hematopoéticas indiferenciadas

Mac-1 - integrina presente nas células macrofágicas. Realiza fagocitose e adesão. Sinônimo para CR3

M-CSF - "Monocyte-Colony Stimulation Factor"

mg - miligrama

MHC II - "Main Histocompatibility Complex II"

μL - microlitro

mL - mililitro

NFκB - "Nuclear Factor kappa B"

nm - nanograma

NO - "Nitric Oxide"

°C - graus Celsius

PBS - "Phosphate Buffered Saline"

pg - picograma

rpm - rotação por minuto

RPMI - meio de cultura "Roswell Park Memorial Institute – 1640"

SNC - Sistema Nervoso Central

TCD4⁺ - linfócito T "helper" (CD4⁺)

Th1 - T "helper" 1

Th2 - T "helper" 2

TLR - "Toll-like Receptor"

TNF-α - "Tumor Necrose Factor – alfa"

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

Xid - "X-linked immunodeficiency"

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica causada pela levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans* que acomete freqüentemente o meningoencéfalo de pacientes imunocomprometidos. No Brasil, cerca de 6% dos pacientes com AIDS desenvolvem a criptococose. A construção da resposta imune na criptococose envolve fagócitos e linfócitos T e B presentes no granuloma. Atualmente, são descritos três subtipos de linfócitos B: linfócitos B-1a, B-1b e B-2, o último conhecido como linfócito B "convencional". Os linfócitos B-1 (B-1a e B-1b) expressam concomitantemente imunofenótipo de macrófagos, células B e células T. Estes linfócitos receberam o nome de fagócitos mononucleares derivados de linfócitos B-1 e possuem a capacidade de migrar do peritônio até um foco inflamatório não específico, fagocitarem, expressarem antígeno e secretarem anticorpos e citocinas. Portanto, avaliamos a participação destes linfócitos B-1 na criptococose através de ensaios *in vitro* e *in vivo* com duas cepas diferentes de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* sorotipo A. Os linfócitos B-1 fagocitaram e destruíram as leveduras de *Cryptococcus neoformans*, principalmente na presença de complemento. Altas produções de NO encontradas no sobrenadante de cultura do ensaio de fagocitose associada à alta atividade peroxidásica e capacidade destes linfócitos em gerar EROs, poderiam justificar a alta atividade de "killing" encontrada nestes linfócitos B-1. Ainda, quando estimuladas com o fungo, os linfócitos B-1 secretaram principalmente IL-12 e IFN- γ , enquanto a IL-10 diminuiu significativamente. Na infecção experimental os camundongos BALB/xid, desprovidos de linfócitos B-1, apresentaram maior susceptibilidade à criptococose, com ambas as cepas, quando comparados aos camundongos BALB controle (BALB/c). Estes animais BALB/xid apresentaram maior carga fúngica nos órgãos baço, fígado e pulmão e morreram precocemente. A concentração de IL-10 foi maior nos órgãos dos camundongos BALB/xid, enquanto a IL-4 aumentou nos camundongos BALB/c. A concentração das citocinas de padrão Th1 (IL-12, IFN- γ e IL-2) consideradas protetoras na criptococose foi maior nos camundongos BALB/c. Além da produção de

citocinas protetoras, os órgãos dos camundongos BALB/c infectados com a cepa de menor cápsula apresentaram um maior população de linfócitos B-1. Estes linfócitos provavelmente estavam participando do processo inflamatório e contribuindo para a cura da infecção. Embora outras investigações sejam necessárias para melhor compreendermos a participação de linfócitos B-1 na criptococose, podemos considerar que estas células interagem com leveduras de *Cryptococcus neoformans* e podem ser decisivas para uma resposta protetora na criptococose experimental.

meningoencéfalo pode, em parte, ser explicada pela utilização de catecolaminas presentes no Sistema Nervoso Central (SNC) para formação de melanina, um importante antioxidante que protege a levedura da ação oxidativa dos leucócitos⁴², e também devido à baixa concentração de proteínas do sistema complemento encontradas no SNC. *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* ocorre, mais freqüentemente, entre os pacientes vítimas da AIDS, com formas clínicas generalizadas apresentando lesões tegumentares e viscerais, atingindo principalmente o meningoencéfalo. Essas lesões, geralmente, possuem decurso fatal, pois, esta micose não apresenta resposta satisfatória ao tratamento. Já o *Cryptococcus neoformans* variedade *gattii* acomete, preferencialmente, pacientes imunocompetentes, com manifestações pulmonares exuberantes, entretanto apresenta bom prognóstico, respondendo bem ao tratamento clássico^{65,70} com Anfotericina B ou associada a 5-Fluorocitocina. Caso não tratada, a micose está associada a uma significativa mortalidade, ou levando a cegueira os pacientes que sobrevivem a sua evolução⁶⁹.

No Brasil, a maioria (64%) dos isolados, biológicos ou ambientais, pertence à variedade *neoformans* do sorotipo A, seguido pelo sorotipo B e D^{37,43}. A variedade *gattii* é endêmica no nordeste brasileiro, responsável por 71% dos casos, embora nos pacientes com AIDS este número diminuía consideravelmente¹³.

O diagnóstico mais prático e eficiente na identificação desta micose é o exame direto, onde a investigação clínica do fungo é feita em escarro, líquido, gânglios, lesões tegumentares, mucosas, entre outras espécimes clínicas, seguida de cultura do material. Segundo Benham (1935)⁸, no exame direto recomenda-se o emprego da Tinta da China, que não cora a cápsula do fungo, permitindo avaliar o tamanho da cápsula e a identificação da levedura pela sua imagem negativa. Em meio de cultura de rotina micológica, como agar Sabouraud dextrose à temperatura ambiente ou 37°C, o fungo apresenta-se em forma de leveduras, com algumas cepas apresentando aspecto mucóide, de acordo com o tamanho da cápsula. Algumas pesquisas bioquímicas ajudam no diagnóstico, como a Hidrólise da Uréia (positiva para o gênero

Cryptococcus) que se trata de uma prova simples e eficaz na identificação do patógeno, e a Fenol oxidase que diferencia a espécie *Cryptococcus neoformans* das outras espécies mais raras do gênero *Cryptococcus*. Métodos imunológicos como a reação de aglutinação com partículas de látex, são úteis no diagnóstico ou acompanhamento da doença, através da pesquisa do antígeno solúvel polissacarídico (GXM) circulante no soro, líquido e urina. Esta reação permite um diagnóstico rápido e de alta sensibilidade, entretanto, o alto custo inviabiliza sua utilização em rotina de laboratório. Outros métodos também podem ser utilizados como reações imunoenzimáticas (ELISA) e biópsia dos tecidos infectados²¹.

1.2. Imunopatogenia da criptococose

Um grande universo de fungos compartilha de nosso ecossistema, porém não expressam caráter patogênico em indivíduos imunologicamente saudáveis, o que nos permite uma tolerância no convívio com os fungos. Entretanto, com o surgimento da AIDS, diversos microrganismos antes saprófitas naturais ou pertencentes a microbiota normal passaram a apresentar características patogênicas para o homem, como ocorre na criptococose.

Geralmente, entramos em contato com o *Cryptococcus neoformans* através da inalação de leveduras acapsuladas, presentes na natureza (eucaliptos) e guano de aves. A posterior formação de cápsula está associada com a virulência do agente e conseqüente evolução da doença. Em alguns casos, a resposta imune natural amplificada pela imunidade adaptativa, nos indivíduos imunocompetentes, é satisfatória e elimina o patógeno nos alvéolos pulmonares, principalmente, na criptococose causada pela variedade *neoformans* do fungo⁴². Raramente, este patógeno pode evoluir para uma inflamação crônica granulomatosa, acometendo o pulmão de indivíduos imunologicamente competentes. Essa evolução geralmente ocorre na infecção pela variedade *gattii*. A variedade *neoformans* pode manter-se saprofiticamente no organismo humano, entretanto, pacientes imunocomprometidos são passíveis de infecções por ambas as variedades. Nos pacientes com a AIDS prevalece o *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans*⁴⁴. A evolução da

micose, nestes pacientes, pode ocorrer por uma infecção já existente (latente) que mantém viáveis as leveduras do fungo nos granulomas (criptococose-infecção) ou por exposição ao fungo no período da síndrome.

A fagocitose e conseqüente destruição do patógeno são fundamentais para o controle da infecção, porém, a cápsula polissacarídica de *Cryptococcus neoformans* é anti-fagocítica impedindo fagócitos como neutrófilos, macrófagos e dendríticas de reconhecer, internalizar e digerir o patógeno. Entretanto, certas opsoninas, como complemento ou anticorpos depositados na parede do fungo, facilitam a ingestão das leveduras que passam a ser reconhecidas através dos receptores presentes nos fagócitos. Este processo representa um papel fundamental na resistência ou susceptibilidade ao agente, já que a deficiência nas frações do complemento torna o camundongo susceptível à infecção experimental com um grande número de patógenos extracelulares na lesão⁴⁵.

Embora leveduras possam ser fagocitadas e destruídas, outras conseguem sobreviver e multiplicar-se dentro dos macrófagos caracterizando a levedura como um patógeno intracelular facultativo¹⁹. Essa capacidade de sobrevivência demonstra um mecanismo de escape eficiente do fungo que envolve fatores antioxidantes como a produção de melanina²⁴ e a expressão da enzima superóxido dismutase que converte radicais superóxido produzidos por macrófagos, em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Estes fatores contribuem para a virulência do fungo, embora, não sejam os fatores necessários para a patogenicidade da criptococose¹⁵. O fungo utiliza-se também de outros fatores de virulência que são utilizados como mecanismos de escape que o permite adaptar-se ao organismo. Um dos mecanismos de escape envolve a liberação intracelular do antígeno capsular GXM (antígeno solúvel). A presença intracelular deste polissacarídeo nas células fagocíticas pode estar associado com a causa ou efeito da sobrevivência intracelular da levedura²⁰. Outro fator de virulência é a produção das enzimas fenol oxidase, urease, proteinases e fosfolipases. A secreção de fosfolipase B também contribui para a sobrevivência e replicação do *Cryptococcus neoformans* no

interior de macrófagos *in vitro* e facilita a disseminação da levedura do pulmão para a circulação linfática e sangüínea⁶⁷.

Os macrófagos são, sabiamente, decisivos na evolução da criptococose, principalmente: na produção de citocinas e quimiocinas que estimulam as imunidades natural e adaptativa; no reconhecimento, processamento e apresentação do antígeno para o linfócito T; e como células efetoras na destruição do patógeno com produções importantes de óxido nítrico (NO), embora, leveduras de *Cryptococcus neoformans* são capazes de reduzir a produção de NO por macrófagos *in vitro*³⁹. Nos fagócitos, o receptor Toll-like 4 (TLR 4) é o responsável por reconhecer os polissacarídeos capsulares da levedura e iniciar o processo de resposta imune através da secreção de citocinas induzidas pela ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B – nuclear factor kappa B^{65,71}. Todos estes processos iniciais são fundamentais na proteção contra a criptococose e representam a imunidade natural. Entretanto, esta imunidade natural é insuficiente na resolução da doença, necessitando de uma amplificação pela imunidade adaptativa. Na imunidade adaptativa, o patógeno induz uma inflamação crônica granulomatosa com a participação da imunidade celular. A imunidade celular realizada por linfócitos T “helper” 1 (Th1) é protetora na criptococose, ou seja, linfócitos T auxiliares produtores de Interferon-gamma (IFN- γ) são solicitados para estimular macrófagos (modelo murino) e favorecer um granuloma compacto e uma conseqüente destruição do patógeno³⁰.

As células dendríticas também participam da resposta protetora na criptococose⁶. Entretanto, o antígeno solúvel polissacarídico (GXM) regula negativamente as funções biológicas das células dendríticas incluindo sua maturação e o aumento de moléculas co-estimulatórias e do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II). A inibição destas funções impede uma apresentação eficiente do antígeno aos linfócitos T nos linfonodos, dificultando a criação de uma resposta imune adaptativa necessária na proteção para criptococose⁸⁰.

Estudos com camundongos nocautes, depletados ou estimulados com citocinas revelaram que Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α), IFN- γ ,

Interleucina (IL)-12 e mais recentemente IL-18 estão envolvidas na proteção *in vivo* da criptococose experimental. Todas estas citocinas favorecem o desenvolvimento de uma resposta celular do tipo Th1 com destruição do patógeno, ou a formação de um granuloma compacto e organizado que controla a infecção²⁶.

A maioria das infecções fúngicas requer uma resposta celular eficiente para o controle da doença, entretanto, a resposta imune humoral participa decisivamente em alguns casos, como na criptococose, onde favorece a proteção em infecções experimentais. Camundongos nocautes de IL-6, IL-4 e IL-10 possuem maior índice de mortalidade comparado com camundongos selvagens, mesmo quando tratados com anticorpos protetores da criptococose. Isto demonstra a necessidade de citocinas secretadas por células T “helper” 2 (Th2) que são consideradas citocinas de resposta humoral⁷. O papel dos anticorpos na criptococose foi definido quando determinaram que anticorpos específicos anti-GXM de *Cryptococcus neoformans* podem ser protetores na criptococose. Entretanto, para induzir um efeito protetor nas infecções experimentais diversos fatores são envolvidos como o isótipo, local de inoculação e quantidade de anticorpos administrados no camundongo. Para determinarem-se estes fatores verifica-se primeiro a carga fúngica nestes animais, o que permite adquirir um melhor efeito protetor dos anticorpos. Qualquer alteração em algum destes fatores pode levar um efeito protetor a tornar-se não protetor, gerando susceptibilidade ao camundongo. Nesse mesmo trabalho foi observado um efeito pró-zona, descrito pela primeira vez *in vivo*. Uma concentração alta de anticorpos inoculados conduz a forte opsonização das leveduras gerando resistência ao fungo e conseqüentemente susceptibilidade ao camundongo⁷⁵.

Ainda sobre a importância dos anticorpos, TABORDA et al. (2002)⁷⁴ propuseram que anticorpos específicos, principalmente, Imunoglobulina (Ig)M e IgA poderiam alterar a conformação capsular da levedura, favorecendo assim, o reconhecimento da levedura pelo receptor de complemento dos fagócitos. Estes experimentos foram realizados na ausência de complemento, revelando um mecanismo de fagocitose via Receptor de Complemento (CR)3 e CR4

dependente de IgM ou IgA, mas, independente do complemento, mostrando uma interação entre a imunidade natural e adaptativa.

1.3. Sistema fagocitário mononuclear

O sistema fagocitário mononuclear representa a segunda maior população celular do sistema imune. Este sistema pertence a uma linhagem cuja principal função é a fagocitose. Atualmente são aceitos como membros deste sistema os monócitos, macrófagos e células dendríticas. De acordo com sua fase de ativação estas células desempenham diversos papéis na modulação do sistema imune com produção de citocinas e expressão de moléculas importantes para uma interação entre a imunidade inata e adaptativa. Ou seja, estas células têm a capacidade de fagocitar, processar o antígeno, produzir citocinas pró ou antiinflamatórias e apresentar os antígenos às células T, iniciando uma imunidade adaptativa. Em algumas patologias, a imunidade inata composta principalmente pelo sistema fagocitário é suficiente para conter uma infecção, entretanto a maioria das infecções fúngicas requer uma imunidade adaptativa direcionada através deste sistema fagocitário.

A fagocitose desempenha papel fundamental nas infecções fúngicas, já que a conseqüente destruição do fungo contribui para o controle da doença e proteção do hospedeiro. Essa destruição do fungo envolve a ativação de fatores microbicidas gerado pelas células durante ou após a fagocitose. Alguns eventos como: “burst” oxidativo, atividade peroxidásica e produção de NO são fundamentais para o efeito fungicida destas células.

“Burst” oxidativo: Além do espraiamento e fagocitose, a geração de radicais livres por fagócitos é um parâmetro que pode ser utilizado como indicador do estado de ativação destas células. A produção de radicais livres pode ser iniciada através de vários estímulos pro-inflamatórios e de microorganismos que aumentam o consumo de oxigênio. Esta reação é conhecida como “burst” oxidativo ou respiratório^{5,52} e tem como resultado a secreção de ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção destas espécies reativas de oxigênio (ERO) é um importante componente da ativação de macrófagos e é responsável pela atividade microbicida e tumoricida destas

células. O acetato de forbol miristato (PMA) é conhecido como ativador do processo de “burst” oxidativo e atua diretamente sobre a proteína C quinase que fosforila a proteína 47 kDa^{phox} e leva à organização do sistema NADPH oxidase²⁹. O sistema NADPH oxidase produz ânion superóxido, e este por sua vez pode dismutar o peróxido de hidrogênio.

Produção de NO: As espécies reativas de nitrogênio (ERN) são formadas por reações catalisadas pela óxido nítrico sintase através da oxidação da L-arginina formando L-citrulina e NO. Existem três isoformas de óxido nítrico sintase que podem ser expressas de forma constitutiva ou induzida. Esta última é encontrada em fagócitos e pode ser induzida por uma variedade de endotoxinas e citocinas (39). Foi demonstrado que ânion superóxido pode reagir com NO para formar peróxinitrito (ONOO⁻) que se decompõe em [•]OH e radical dióxido de nitrogênio³⁸. NO é uma das principais moléculas fungicidas.

Atividade peroxidásica: A principal peroxidase encontrada nos fagócitos é a mieloperoxidase (MPO). Os monócitos contêm cerca de um terço do conteúdo de MPO quando comparado aos neutrófilos. Quando monócitos se diferenciam em macrófagos *in vivo* ou *in vitro* este conteúdo é perdido, entretanto trabalhos recentes sugerem que em algumas situações também podem estar presentes em macrófagos teciduais. (51,52). MPO é uma heme peroxidásica clássica que na presença de íons cloreto e H₂O₂ forma um potente sistema microbicida, o ácido hipocloroso (HOCl).

A quantificação do “burst” oxidativo e atividade peroxidásica podem ser obtidas através de quimiluminescência na presença de luminol. A introdução de um substrato quimiluminescente, como o luminol, a um ensaio com fagócitos aumenta em várias ordens de grandeza o rendimento de luminescência, facilitando a monitoração da atividade de oxigenação destas células. A luminescência dessa reação, apesar de não discriminar o tipo de ERO envolvido, é freqüentemente usada para detecção do “pool” de ERO em sistemas biológicos, assim como a atividade peroxidásica em homogenatos celulares. A leitura da intensidade de luz neste sistema utilizando luminol é dependente de uma peroxidase (endógena) que se torna ativa caso os fagócitos produzam H₂O₂. Esta peroxidase ativa excitará o luminol e este

processo resulta na emissão de luz. Caso a peroxidase endógena seja pouca ou não totalmente utilizada neste sistema, pode-se adicionar à reação uma peroxidase exógena como a Horse Radish Peroxidase (HRP) que otimiza a reação e facilita a visualização do “burst” oxidativo.

Atualmente, um novo fagócito foi descrito e parece fazer parte deste sistema fagocitário mononuclear. Entretanto estes fagócitos não são derivados de monócitos, mas de linfócitos B-1. Estes fagócitos realizam diversas funções como a fagocitose, apresentação de antígenos, produção de anticorpos e citocinas. Este dado permite-nos concluir que se trata de uma importante célula capaz de atuar na modulação do sistema imune.

1.4. Fagócitos mononucleares derivados de linfócitos B-1

Embora, a principal função de todas as células B e sua progênie seja produzir e secretar anticorpos há diferenças significativas entre as células B maduras com respeito à ontogenia, fisiologia, fenótipo, localização anatômica e origem das linhagens³¹.

Hayakawa e Hardy^{27,31} identificaram novas células linfocíticas do tipo B e propuseram um novo grupo de linfócitos, dividindo assim, os linfócitos B em dois sub-grupos: 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, desde sua identificação, a célula B-1 tem gerado grandes controvérsias.

Dois grandes grupos discutem a origem destas células. Enquanto um grupo acredita na existência de uma única célula progenitora para os linfócitos B, que se diferenciam em células B-1 na fase fetal e B-2 na fase adulta^{11,25}, outro grupo especula a possibilidade da existência de progenitores distintos para cada subtipo de Linfócito B^{31, 33}.

Os linfócitos B-1 são produzidos na fase fetal e mantém-se por auto-renovação e não são reconstituídos na fase adulta. Desta forma, a destruição destas células após o período neonatal comprometeria a progênie dos linfócitos B-1, pois, poucas células B-1 seriam produzidas pela medula e apenas uma

pequena parcela delas teriam origem pela conversão de células B convencionais em células com fenótipo B-1³¹.

Após sua formação na fase fetal, os linfócitos B-1 povoam a cavidade pleural e peritoneal e representam uma pequena fração no baço e são indetectáveis em linfonodos. Nesses locais, as células B-1 também povoam as mucosas participando de forma eficaz na liberação de IgA na lâmina própria do intestino e no pulmão^{4,31}.

Embora, as características genéticas e moleculares expressas pelas células B-1 e B-2 sejam semelhantes, elas se diferenciam pelas suas características fenotípicas³¹. Os linfócitos B-1 apresentam fenótipos de linfócitos B convencionais (B-220, IgM e IgD de superfície de membrana), de células T (Cluster of Differentiation-CD 5) e também de células macrófágicas (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 convencionais³². As células B-1 (B-1a e B-1b) podem, ainda, serem distinguidas das células B-2 por possuírem altos níveis de IgM e pouco IgD de superfície²⁸.

As células B-1 produzem anticorpos que são raramente produzidos por células B-2. As células B-1 são responsáveis pela produção de anticorpos inatos (naturais) do soro, sintetizados na fase neonatal. Algumas moléculas inatas mimetizam determinantes antigênicos e induzem linfócitos B-1 a secretar anticorpos promovendo uma imunidade a antígenos externos, como ocorre no sistema ABO. Neste caso, os linfócitos B-1 são capazes de produzir anticorpos anti-A ou anti-B dependendo do fenótipo A, B ou O do indivíduo. O mesmo ocorre para os anticorpos produzidos por linfócitos B-1 contra o vírus Influenza, já que os indivíduos nascem com uma imunidade humoral contra este vírus³¹. Já as células B-2 aparecem tardiamente onde encontram antígenos externos, tornando-se responsáveis pela produção de anticorpos contra estes antígenos que são em sua maioria expressos através da célula T. Conseqüentemente, as células B-2 respondem melhor aos antígenos T dependentes, enquanto, as

células B-1 têm a capacidade de desenvolverem anticorpos diretamente sem a mediação por linfócitos T, mas, dependentes de complemento⁴⁸.

Os linfócitos B-1 têm a capacidade de produzir auto-anticorpos, o que representa papel fundamental nas doenças auto-imune. Estudos mostraram que a expressão da molécula CD5 pelas células B-1a pode estar relacionada à interação de auto-antígenos com os receptores de células B-1a (BCR), que induziriam a expressão desta molécula CD5. A descoberta de que, provavelmente, todos os indivíduos produzam auto-anticorpos independentemente da capacidade destes de causar uma patologia auto-imune, justificaria a presença de aproximadamente 90% de células B-1 expressando a molécula CD5 (B-1a). Os linfócitos B-1 aumentam seu número progressivamente com o passar do tempo, tornando as doenças auto-imunes mais recorrentes em indivíduos adultos e senis⁴⁸.

As células B-1 também participam de processos oncogênicos, através de uma auto-reação produzindo células malignas. No estudo da Leucemia Linfóide Crônica (LLC) verificou-se que os clones destes linfócitos malignos eram originados de linfócitos B-1⁴⁸.

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)². 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 infecção³¹. Esta capacidade de migração nos desperta ao conhecimento do papel que estas células desenvolveriam na inflamação.

Experiências com camundongos deficientes de células B-1, demonstraram que estes animais apresentam uma melhor resposta imune e geram uma inflamação e conseqüente granuloma mais compacto e efetivo após uma infecção por patógenos. Dados sugerem que estes linfócitos B-1 poderiam regular negativamente as células efetoras, como macrófagos, na eliminação de patógenos. O fato de estas células migrarem até o foco inflamado e produzirem quantidades significativas de IL-10^{55,56,57} sustentaria

esta hipótese². 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-2 por células TCD4⁺, conseqüentemente impediria o desenvolvimento da imunidade celular, necessário para o granuloma e promoveria a imunidade humoral.

O sistema fagocitário mononuclear defende a origem dos macrófagos a partir de monócitos do sangue circulante, inclusive os presentes em reações inflamatórias. Entretanto, ALMEIDA et al. (2001)² mostraram a capacidade de linfócitos B-1 em transformar-se em novos fagócitos mononucleares. Esta característica atribuída a estas células deve-se ao aumento da expressão de Mac-1 (marcador de superfície para macrófagos) concomitante à diminuição da expressão da molécula B-220 (marcador de superfície para linfócitos B). Conseqüentemente, as células B-1 mostraram-se capazes de migrarem do peritônio e se diferenciarem em células semelhantes a macrófagos (B/M com capacidade de aderência e fagocitose. Experimentos foram realizados para assegurar a não relação desta nova célula fagocítica com monócitos da circulação. Até o momento, não existe informação suficiente para assegurar que os fagócitos mononucleares derivados de células B-1 e os macrófagos dividem as mesmas características fisiológicas. Porém, alguns trabalhos mostram uma relação entre as linhagens linfóide e mielomonocítica, tradicionalmente consideradas independentes.

CUMANO et al. (1992)¹⁶ detectaram progenitores bipotenciais de células B e macrófagos no fígado fetal, purificados por marcadores de superfície de células indiferenciadas (AA4.1 e Ly6A), de células pré-B (B-220) e de macrófagos (Mac-1), além de ambas as linhagens compartilharem a molécula CD9. Em continuação aos estudos de células progenitoras, BORRELLO et al. (1996)⁹ demonstraram uma correlação entre estas duas linhagens, propondo uma nova cinética da linfopoese no fígado fetal dando origem aos linfócitos B-1. Estes achados proporcionam vários questionamentos na cinética de desenvolvimento das linhagens celulares. Dessa forma, o aparecimento de células fagocíticas a partir de células B-1 contradiz o paradigma vigente da não relação entre as linhagens linfóides e mielomonocíticas.

Diversos experimentos utilizando camundongos imunodeficientes Xid (X-linked immunodeficiency), que são especialmente desprovidos de linfócitos B-1, mostram que estes camundongos têm células efetoras com uma alta atividade, e conseqüentemente apresentam uma resistência às infecções por patógenos dependentes de resposta celular. Entretanto, os camundongos Xid possuem susceptibilidade inata à infecção por *Salmonella typhimurium*, que poderia ser explicada pela ausência de uma resposta imune humoral de IgA, mediada por linfócitos B-1 na lâmina própria do intestino⁵³.

Camundongos Xid são deficientes no cromossomo X no gene que regula a expressão de uma tirosina quinase (tirosina quinase de Bruton) responsável pela maturação de linfócitos B, causando em especial a ausência de linfócitos B-1⁶³. Os camundongos, quando infectados com microrganismos que desenvolvem um processo inflamatório crônico seguido 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 avaliar a importância de linfócitos B-1 na evolução da doença. Vários agentes infecciosos já foram testados: *Trypanossoma cruzi*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Leishmania major*. Em todos os experimentos, os animais Xid foram mais resistentes, apresentaram granuloma mais compacto, organizado que propiciou uma menor carga microbiológica nos órgãos e uma menor disseminação destes patógenos^{36, 41, 51}.

Dados comprovam a importância e a colaboração de células e moléculas da imunidade natural e adaptativa na criptococose, no entanto, nenhum trabalho mostrou a participação de linfócitos B-1 ou fagócitos mononucleares derivados de linfócitos B-1 nesta micose, já que, estas células estão envolvidas nos processos inflamatórios e granulomatosos, através da migração do peritônio até o foco inflamatório. Linfócitos B-1 possuem características peculiares, como a capacidade concomitante de fagocitar, apresentar antígenos, secretar anticorpos e produzir citocinas, principalmente IL-10. Portanto, torna-se necessário o estudo do comportamento e participação

frente a criptococose. Para isso, realizamos ensaios *in vivo* infectando experimentalmente com *Cryptococcus neoformans* os camundongos deficientes de linfócitos B-1, denominados BALB/xid e os comparamos com camundongos imunologicamente competentes BALB/c. Realizamos também outras investigações *in vitro* para melhor compreendermos a participação dos linfócitos B-1 na criptococose. Indiscutivelmente, a demonstração de que os linfócitos B-1 podem deixar a cavidade celomática e migrarem para o sítio de uma reação inflamatória e se transformarem em um novo tipo de fagócito mononuclear traz novas compreensões para a investigação do papel que estas células poderiam exercer na criptococose.

2. OBJETIVOS

Investigar a participação de linfócitos B-1 na infecção fúngica causada por *Cryptococcus neoformans*. Para isso, avaliamos *in vitro*:

- A capacidade de linfócitos B-1 de fagocitar e destruir as leveduras de *Cryptococcus neoformans*;
- Os mecanismos microbicidas utilizados pelos linfócitos B-1 como: produção de NO, “burst” oxidativo e atividade peroxidásica;
- O padrão de citocinas secretado pelos linfócitos B-1 após contato com o fungo.

E avaliamos *in vivo*:

- A infecção experimental com duas cepas diferentes de *Cryptococcus neoformans* em camundongos desprovidos de linfócitos B-1 (BALB/xid) e em camundongos selvagens (BALB/c);
- A carga fúngica nos órgãos baço, fígado e pulmão destes animais;
- O padrão de citocinas encontrado no sobrenadante do macerado dos órgãos;
- A presença de linfócitos B-1 nos órgãos dos animais BALB/c infectados;
- Índice de mortalidade entre os animais infectados BALB/xid e BALB/c.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Cryptococcus neoformans*

Duas cepas leveduriformes do fungo *Cryptococcus neoformans* foram fornecidas pelo Professor Doutor Carlos Pelleshi Taborda do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo (ICB II – USP). As cepas foram denominadas cepa **01** e cepa **02** que se diferem pelo volume capsular. A cepa **01** pertence à micoteca Holandesa Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) 132, apresentando pequena cápsula polissacarídica. A cepa **02** é um isolado obtido de fezes de pombos do estado do Rio de Janeiro-B58A, apresentando uma cápsula polissacarídica maior. Ambas as cepas são *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* sorotipo A. As leveduras foram utilizadas após 48 a 72 horas de crescimento em meio agar Sabouraud dextrose à 37°C. As leveduras foram suspensas em meio de cultura celular Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma, St. Louis, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (sem complemento) ou 5% de soro de camundongo (com complemento) para ensaios de fagocitose, ou suspensas em tampão salino estéril (PBS) para infecções experimentais em camundongos. As leveduras foram contadas em câmara de Neubauer (Optik Labor, Eberstadt, Alemanha).

3.2. Tamanho da cápsula das cepas de *Cryptococcus neoformans*

As duas cepas de *Cryptococcus neoformans* foram cultivadas por 72h em agar Sabouraud em 37°C. Após este período as células leveduriformes foram analisadas com tinta nanquim entre lâmina e lamínula em aumento de 400X. O tamanho da cápsula foi obtido considerando a distância entre a parede da levedura até a margem externa da cápsula. As cápsulas foram medidas com auxílio do software Image – Pro Plus (Media Cybernetics) utilizando micrômetro (µm) como escala de medida. O tamanho da cápsula foi calculado através da média de aproximadamente 30 leveduras de cada cepa.

3.3. Camundongos

Camundongos machos das linhagens BALB/xid e BALB/c com 8 a 12 semanas de vida foram obtidos do Biotério de camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo (ICB II-USP). Os camundongos foram mantidos em padrão sanitário livre de patógenos específicos (SPF) e alimentados com ração comercial irradiada. A linhagem BALB/c foi utilizada para a obtenção de linfócitos B-1, macrófagos e sangue por punção intracardíaca. As linhagens BALB/xid e BALB/c foram utilizadas para a infecção experimental. Os camundongos foram sacrificados de acordo com critérios aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – CEEA/FCF.

3.4. Obtenção de linfócitos B-1

O peritônio dos camundongos sacrificados (BALB/c) foram lavados com meio RPMI, com auxílio de pipeta de bulbo. A solução de lavagem foi transferida para uma placa de petri e incubada por uma hora em estufa de 37°C com 5% CO₂. O sobrenadante foi desprezado e as células aderentes foram ressuspensas em meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado e, novamente, mantidas em estufa 37°C com 5% de CO₂ por sete dias. Após este período o sobrenadante contendo células B-1 foi recultivado em placa de 24 poços com lamínula e, em aproximadamente quatro dias os linfócitos B-1 aderem e espraiaem sobre as lamínulas². Após este período as células estão prontas para o ensaio de Fagocitose.

3.4.1. Obtenção de macrófagos

Para obtermos uma população de macrófagos livre de linfócitos B-1, foi utilizada medula óssea de fêmur de camundongos BALB/c. A medula femural foi lavada três a quatro vezes com meio RPMI e esta solução de lavagem foi centrifugada para troca do meio de cultura. As células foram transferidas para uma placa de petri e adicionados 10mL de meio de diferenciação de macrófagos composto por 50% de meio RPMI, 30% de sobrenadante de

cultura de células L-929 (clones neoplásicos de fibroblasto) contendo fator estimulante de colônia de monócitos (M-CSF) e 20% soro fetal bovino inativado. As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% CO₂. No quarto dia de cultura foram adicionados mais 10mL de meio de diferenciação, e no sétimo dia as células estavam diferenciadas em macrófagos⁸². Os macrófagos aderidos foram mantidos em baixa temperatura antes de serem retirados com auxílio de uma "cell scraper". As células foram contadas em câmara de Neubauer.

3.4.2. Obtenção de complemento

Para os ensaios de fagocitose que necessitam de complemento para opsonizar a cápsula das leveduras utilizamos soro autólogo de camundongos BALB/c. Para obtermos o soro, os camundongos foram sacrificados e imediatamente, o coração foi exposto para punção do sangue com seringa de aplicação de insulina. Aproximadamente, 1mL de sangue é obtido de cada animal e imediatamente transferido para um tubo seco. Os tubos foram mantidos por uma hora em banho-maria de 37°C. Logo em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos em 1500 rpm. O soro (sobrenadante) foi retirado e utilizado logo em seguida para não perder a atividade do complemento. O soro foi utilizado na concentração de 5% diluído em meio RPMI.

3.5. Ensaio de fagocitose

As células B-1 ou macrófagos foram distribuídas em placa de 24 poços contendo lamínulas redondas. Linfócitos B-1 aderem na lamínula em aproximadamente quatro dias, enquanto que macrófagos foram mantidos apenas 24 horas para aderirem antes da realização do ensaio. Logo em seguida as leveduras da cepa **01** ou cepa **02** foram colocadas em contato com as células na presença ou ausência de complemento por quatro horas. Após este período de fagocitose, as lamínulas foram retiradas, coradas por Giemsa (Newprov – Brasil) e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400X.

As células B-1, macrófagos e leveduras foram contadas em Câmara de Neubauer e ajustadas na proporção de uma célula para cinco leveduras (1:5) por apresentar melhor relação para análise quantitativa e qualitativa. Para melhor representar os resultados obtidos com o ensaio de Fagocitose, realizamos o Índice Fagocítico (IF) que expressa a porcentagem de células fagocíticas multiplicadas pela média de leveduras fagocitadas por cada célula⁵⁴.

3.5.1. Ensaio de viabilidade

As leveduras foram mantidas em contato com as células B-1 (como descrito no ensaio de fagocitose) por 24h e 72h. Logo em seguida, as células aderidas na lamínula foram lavadas com PBS estéril para retirar as leveduras do sobrenadante que não foram fagocitadas. Após a lavagem, as células foram lisadas com água estéril para a liberação das leveduras fagocitadas. Trezentos microlitros (300µL) desta solução foram plaqueados em agar Sabouraud dextrose por três dias para avaliarmos a viabilidade do fungo após fagocitose pelos linfócitos B-1^{22,46}.

3.5.2. Análise do “burst” oxidativo

A capacidade dos linfócitos B-1 em gerar ERO foi avaliada através de ensaio por quimiluminescência. Os linfócitos B-1 foram obtidos conforme descrito e ajustadas em câmara de Neubauer para 4×10^5 células por ensaio. As células foram colocadas em placa branca de 96 orifícios e a reação foi iniciada com ativador PMA (16ng/ensaio) ou com o fungo (proporção 1:5 com 4h de contato antes da leitura do ensaio) e substrato luminol (1mM). A peroxidase Horse Radish Peroxidase (HRP-1µM) foi utilizada junto com PMA para melhor avaliar a produção de ERO. O mesmo experimento foi realizado deixando os linfócitos B-1 aderirem e espriarem na placa por três dias antes do ensaio. A intensidade de quimiluminescência foi acompanhada em luminômetro EG&G Berthold LB 96V de microplacas. As reações foram realizadas em PBS, volume

final de 300 μ L, e acompanhadas por 60 minutos⁶⁴. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.5.3. Análise da atividade peroxidásica

A presença de atividade peroxidásica nos linfócitos B-1 foi analisada através de ensaio por quimiluminescência com homogenato celular. Os linfócitos B-1 foram obtidos conforme descrito e contados em câmara de Neubauer e ajustadas em um total de 4x10⁵ células por ensaio. As células foram homogeneizadas com o auxílio de um Homogeneizador tipo Potter-Elvehjem por 1,5 minuto em velocidade máxima em banho de gelo. Após a homogeneização a viabilidade celular foi conferida para avaliar a eficiência do processo. Este processo rompe cerca de 100% das células. O homogenato foi colocado em placa branca de 96 orifícios e a reação foi iniciada com H₂O₂ (0,5mM) e substrato luminol (1mM). O mesmo experimento foi realizado deixando os linfócitos B-1 aderirem e espriarem na placa por três dias antes do preparo do homogenato. A intensidade de quimiluminescência foi acompanhada em luminômetro EG&G Berthold LB 96V de microplacas. As reações foram realizadas em PBS, volume final de 300 μ L, e acompanhadas por 60 minutos⁶⁴. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.5.4. Produção de Óxido Nítrico

Os linfócitos B-1 foram obtidos e desafiados com as cepas **01** ou **02** conforme descrito no ensaio de fagocitose. Os sobrenadantes da cultura de 4h, 24h e 72h foram retirados e a concentração de NO foi avaliada através da dosagem de nitritos utilizando reagente de Griess. Volumes iguais da amostra (ou padrão da curva) e de reagente de Griess foram colocadas em placas de 96 orifícios e logo em seguida as densidades ópticas (DO) foram obtidas através de leitor automático, em comprimento de onda de 550 nanômetros (550nm). As concentrações de NO foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear da curva padrão obtida com concentrações de NaNO₂³⁴. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.6. Infecção experimental

Vinte camundongos de cada linhagem BALB/c e BALB/xid foram infectados via intraperitoneal (i.p.) com 10^7 leveduras da cepa **01** ou cepa **02** suspensas em 200 μ L de PBS estéril. Após a infecção os camundongos foram sacrificados nos dias 7, 15, 40, 60 e 100 dias. Os órgãos baço, fígado e pulmão foram macerados para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e dosagem de citocinas.

3.6.1. Índice de mortalidade dos camundongos infectados

Onze camundongos de ambas as linhagens BALB/c e BALB./xid, infectados via i.p. com 10^7 leveduras da cepa **01** ou cepa **02**, foram observados diariamente. Os dias de morte foram comparados entre as duas linhagens de camundongos (BALB/xid e BALB/c) infectados com a cepa **02**, já que todos os camundongos infectados com a cepa **01** sobreviveram à infecção.

3.6.2. Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

Os órgãos baço, fígado e pulmão das duas linhagens de camundongos foram retirados nos dias 7, 15, 40, 60 e 100 após a infecção. Os órgãos, previamente pesados, foram macerados em 2mL de PBS estéril. Trezentos microlitros do macerado foram distribuídos em placas de petri contendo meio agar Sabouraud dextrose⁷. Diluição 1/20 foi realizada para cada macerado de órgão. As placas foram incubadas em 30°C. Os números de UFC foram determinados sete dias após o plaqueamento, e os resultados quantificados em unidades formadoras de colônia por grama de órgão (UFC/g). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7. Dosagem de citocinas

As citocinas IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 foram dosadas a partir do sobrenadante das culturas de linfócitos B-1 após fagocitose e do sobrenadante do macerado dos órgãos. Estas amostras foram recolhidas e estocadas a

-70°C até o momento da dosagem. A técnica utilizada nos ensaios foi ELISA de captura, utilizando anticorpos monoclonais, para detecção das citocinas, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (R&D System, Minneapolis, USA). Para realizar o procedimento, placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo primário diluído em PBS e mantidas em temperatura ambiente de um dia para o outro. Foram adicionados às placas, PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) para promover o bloqueio de sítios livres do plástico e mantidos por uma hora a temperatura ambiente. As citocinas recombinantes, utilizadas para realizar a curva padrão, foram diluídas em PBS contendo 1% de BSA e incubados por duas horas a temperatura ambiente. As amostras também foram incubadas em poços por este mesmo período. Todos os poços foram lavados com PBS acrescido de tween 20 a 0,05%. Foram adicionados os anticorpos secundários conjugados a biotina, diluídos em PBS e incubados por duas horas a temperatura ambiente. Os poços foram lavados. As placas foram incubadas com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos em temperatura ambiente e os poços lavados. A revelação foi realizada com o-fenilenodiamina 1mg/mL, diluída em tampão citrato de sódio 0,1M pH 4,5 por 15 a 30 minutos. Para o bloqueio da reação foi utilizado ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4N e a leitura das densidades ópticas (DO) foi realizada em leitor automático, em comprimento de onda de 450 nanômetros (450nm). As concentrações de cada citocina foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear, da curva padrão obtida com citocinas recombinantes murinas.

3.8. Quantificação de linfócitos B-1 nos órgãos dos camundongos BALB/c

Os camundongos BALB/c foram infectados conforme descrito. Após 7 e 14 dias de infecção os camundongos foram sacrificados e os órgãos baço, fígado, pulmão e lavado peritoneal foram retirados e macerados em 10mL de PBS estéril. Esta solução foi utilizada para quantificação de linfócitos B-1 em cada órgão por citometria de fluxo. O macerado dos órgãos dos camundongos não infectados foi utilizado como controle. Para detecção de linfócitos B-1 foi

realizada dupla marcação com anticorpos anti-camundongo: anti-B-220 marcados com ficoeritrina (PE) e anti-Mac-1 marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Pharmingen, San Diego, CA). Até o momento da análise estas células marcadas com anticorpos foram mantidas em solução fixadora (2% de glicose e 1% de formaldeído diluídos em PBS). As células foram lavadas com PBS para leitura da porcentagem de células duplamente marcadas com B-220 e Mac-1^{2,68,73}. A leitura foi realizada no equipamento FacScalibur (Becton & Dickison, CA) do Instituto Butantã calibrado para leitura de 10000 eventos e os dados foram analisados no programa Cell Quest. Os experimentos foram realizados em triplicata⁶⁸.

3.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo método One-Way ANOVA, e múltiplas comparações pelo teste de Tukey⁸³, com auxílio do software Graphpad Instat TM. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$ para todas as comparações.

4. RESULTADOS

4.1. *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans pode ser encontrado na natureza com volume capsular variado. Sabendo da importância desta cápsula polissacarídica como fator de virulência na evolução da criptococose, realizamos os experimentos com duas cepas diferentes: cepa **01** com pouco volume capsular, e a cepa **02** com volume capsular maior. Ambas são amostras de *Cryptococcus neoformans* variedade *neoformans* sorotipo A (Figura 01).

Figura 01. Cepas de *Cryptococcus neoformans*.

A cultura da cepa **01** apresenta um aspecto macroscópico cremoso e seco (**A**). A cultura da cepa **02**, devido ao grande volume capsular polissacarídico, apresenta cultura mucóide com aspecto de “leite condensado” que escorre pelo tubo (**B**). Cultura em agar Sabouraud por sete dias a 30°C (**A** e **B**).

4.2. Tamanho da cápsula das cepas de *Cryptococcus neoformans*

As cápsulas das duas cepas do fungo foram analisadas e medidas para comparação e compreensão do efeito da cápsula na infecção (Figura 02). Aproximadamente 30 leveduras de cada cepa foram analisadas e a média foi obtida mostrando uma diferença significativa entre as cepas. A cápsula da cepa **02** apresentou um tamanho aproximado de 18,4 μ m enquanto a cepa **01** 3,8 μ m.

Figura 02. Análise da cápsula das duas cepas de *Cryptococcus neoformans*. A cepa **01 (A)** e cepa **02 (B)** foram cultivadas por 72h em agar Sabouraud em 37°C. Após este período as cápsulas foram avaliadas com a técnica da tinta nanquim em microscópio óptico com aumento de 400X. A distância entre a parede celular da levedura e a margem externa da cápsula foi considerada como tamanho capsular.

4.3. Ensaio de fagocitose

Para avaliarmos a capacidade de linfócitos B-1 em fagocitar *in vitro* leveduras de *Cryptococcus neoformans*, realizamos o ensaio de fagocitose com as duas cepas do fungo na presença ou ausência de complemento (Figura 03). As leveduras capsuladas de *Cryptococcus neoformans* são anti-fagocíticas, entretanto, a opsonização desta cápsula com fator do sistema complemento obtido de soro autólogo de camundongos BALB/c favoreceu a fagocitose.

Embora linfócitos B-1 foram capazes de fagocitar leveduras de *Cryptococcus neoformans* na ausência de opsoninas, observamos que a presença do complemento aumentou significativamente a fagocitose. Este dado indica a importância de receptores de complemento em linfócitos B-1 fundamentais na internalização de leveduras (Figura 04).

Figura 03. Ensaio de Fagocitose. Os linfócitos B-1 foram desafiados com leveduras de *Cryptococcus neoformans* por quatro horas na proporção de 1:5 e as lamínulas foram coradas por Giemsa. As leveduras da cepa 01 (A e B) e cepa 02 (C e D) foram fagocitadas na presença (B e D) ou ausência (A e C) de complemento. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Comparamos a capacidade fagocítica de linfócitos B-1 com macrófagos, que representam fagócitos fundamentais no controle da criptococose (Figura 04). Para isso, realizamos o mesmo ensaio de fagocitose com macrófagos isolados e diferenciados a partir de células mielomonocíticas da medula óssea. Os ensaios foram realizados com as diferentes cepas do fungo, na presença ou ausência de complemento. Os macrófagos fagocitaram leveduras de *Cryptococcus neoformans* na ausência de opsoninas, entretanto na presença de complemento mostraram-se mais eficientes na fagocitose. Quando comparados com os macrófagos, os linfócitos B-1, na presença de complemento, apresentaram maior capacidade de fagocitar leveduras de *Cryptococcus neoformans*.

Figura 04. Índice Fagocítico. Índice Fagocítico com a cepa **01** (A) e cepa **02** (B) obtido através da porcentagem de células B-1 ou macrófagos fagocíticos multiplicado pela média de leveduras fagocitadas por cada célula. Os experimentos foram realizados em triplicata. * Os valores são significativos para os resultados com e sem complemento para $p < 0,05$.

4.4. Secreção de citocinas *in vitro*

Para avaliarmos o padrão de citocinas secretado pelos linfócitos B-1 após contato e fagocitose de *Cryptococcus neoformans* dosamos as Interleucinas 2, 12, 4, 10 e IFN- γ no sobrenadante de cultura dos ensaios de fagocitose (Figura 05). Após quatro horas de fagocitose, os linfócitos B-1 desafiados com a cepa **01** secretaram principalmente IL-12 e IFN- γ que são fundamentais na resolução da doença, enquanto a IL-10 diminuiu significativamente. Quando a cepa **01** foi opsonizada com complemento, favorecendo a fagocitose, a secreção de IL-12 aumentou. Quando estimulados com a cepa **02**, os linfócitos B-1 também secretaram IL-12 e IFN- γ , inibindo completamente a secreção de IL-10. Ainda com a cepa **02**, a secreção de IFN- γ

foi alta, porém diminuiu significativamente quando as leveduras foram opsonizadas com complemento. A produção de IL-4 foi discretamente maior quando os linfócitos B-1 foram desafiados com a cepa **01** e a IL-2 não foi encontrada no sobrenadante das culturas.

Figura 05. Citocinas liberadas no sobrenadante de cultura quatro horas após contato de linfócitos B-1 com as duas cepas de *Cryptococcus neoformans*. A legenda mostra a proporção de um linfócito B-1 desafiado com cinco leveduras (1:5) de ambas as cepas por 4 horas na presença ou ausência de complemento. Os experimentos foram realizados em triplicata. * Valores significativos comparados com controle para $p < 0,05$, ** Valores significativos comparados entre leveduras (cepa **01** ou cepa **02**) na presença ou ausência de complemento para $p < 0,05$.

4.5. Análise da viabilidade de leveduras de *Cryptococcus neoformans* após fagocitose.

Para avaliarmos a viabilidade das leveduras de *Cryptococcus neoformans* após serem fagocitadas pelos linfócitos B-1, desafiemos os linfócitos B-1 com as diferentes cepas do fungo por 24 e 72 horas na presença ou ausência de complemento (Figura 06). Após 24 horas, quando os linfócitos foram lisados e a solução foi semeada em meio de cultura, observamos um grande número de leveduras ainda viáveis. Entretanto, após 72 horas de contato com os linfócitos B-1 pouca levedura estava viável. Embora muitas leveduras (de ambas as cepas) perderam a viabilidade após 72 horas, os

linfócitos B-1 apresentaram maior dificuldade em destruir as leveduras da cepa 02 (Figura 07).

Figura 06. Ensaio de Viabilidade das leveduras de *Cryptococcus neoformans* após fagocitose por linfócitos B-1. As leveduras da cepa 01 (A e B) e cepa 02 (C e D) foram colocadas em contato com os linfócitos B-1, na proporção de 5 leveduras para cada linfócito (1:5), por 24 e 72 horas na ausência (A e C) ou presença (B e D) de complemento. Após este período, os linfócitos foram lisados com água. Esta solução foi plaqueada em meio de cultura agar Sabouraud e as UFCs foram contadas.

Figura 07. Gráfico de Viabilidade. As UFC viáveis da cepa 01 (A) e cepa 02 (B), na presença ou ausência de complemento, foram contadas após 24 e 72 horas de contato com linfócitos B-1. Os valores representam a média de UFC obtidas de três experimentos. * Valores significativos comparados com 24 horas para $p < 0,05$.

4.6. Produção de Óxido Nítrico

Avaliamos a capacidade fungicida de linfócitos B-1 através da produção de NO na presença ou ausência de leveduras de *Cryptococcus neoformans* (Figura 08). Para detectarmos a produção de NO por linfócitos B-1 após contato com as duas cepas do fungo realizamos o ensaio de fagocitose por 4h, 24h e 72h e após estes períodos os sobrenadantes da cultura foram coletados. Nestes sobrenadantes realizamos a dosagem de nitritos através de microensaio com reagente de Griess. Os linfócitos B-1 mostraram-se produtores de NO independentemente de qualquer estímulo e apresentaram uma cinética de produção tempo-dependente. Quando desafiados com as cepas do fungo estes linfócitos mantiveram uma alta produção de NO, entretanto as leveduras apresentaram uma capacidade de inibição desta produção.

Figura 08. Determinação da produção de NO. Linfócitos B-1 foram desafiados com a cepa 01 ou cepa 02 do fungo na relação de um linfócito para 5 leveduras (1:5) durante 4h, 24h e 72h. Após estes períodos realizamos a dosagem de nitritos no sobrenadante destas culturas através de microensaio por reagente de Griess. Os linfócitos B-1 foram mantidos em meio RPMI acrescido de 10% soro fetal bovino (SFB) ou 5% de "pool" de soro autólogo de camundongos saudáveis para controle. Soro de camundongos saudáveis foi utilizado para opsonização das leveduras. Os experimentos foram realizados em duplicata. * $p < 0,05$ comparados com controle.

4.7. Análise do "burst" oxidativo

Avaliamos a capacidade de linfócitos B-1 de produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) mediante estímulos (Figura 09). Os ensaios foram realizados com linfócitos aderidos e espreiados (72h de cultura) ou linfócitos recém obtidos de cultura. Estes linfócitos não são previamente ativados, ou seja, são utilizados logo após a cultura de sete dias obtida de células peritoneais residentes. Em todos os ensaios utilizou-se luminol como substrato e observamos que, embora com pouca eficiência, linfócitos B-1 são capazes de gerar ERO quando estimulados com PMA. Para otimizar o experimento acrescentamos ao ensaio a peroxidase HRP, um substrato para a ERO H_2O_2 . Na presença de H_2O_2 produzida pelos linfócitos B-1 a HRP torna-se ativa e excita o luminol gerando maior emissão de luz, indicando uma atividade do "burst" oxidativo. Portanto, na presença de HRP o "burst" oxidativo da célula torna-se mais evidente. Quando estes linfócitos são desafiados com leveduras de *Cryptococcus neoformans* em ensaio de fagocitose por quatro horas e logo em seguida analisado pelo luminômetro observamos uma produção de ERO na presença de HRP (Figura 10). Embora houve uma pequena produção de ERO, os valores se aproximaram daqueles obtidos com os mesmos linfócitos estimulados com PMA, indicando a capacidade de *Cryptococcus neoformans* em estimular a produção de ERO através de linfócitos B-1.

Figura 09. Análise do "burst" oxidativo de linfócitos B-1. Os linfócitos B-1 foram obtidos conforme descrito e uma população de 4×10^5 foram utilizadas para cada ensaio. A reação foi iniciada com PMA (16ng) e acompanhada por 60 minutos. Para otimizar o experimento foi utilizada a peroxidase HRP (1 μ M) permitindo uma melhor avaliação da produção de ERO. Em todos os ensaios foi utilizado luminol (1mM) como substrato para formação de luz. A leitura foi realizada em luminômetro. O mesmo experimento foi realizado utilizando linfócitos B-1 aderidos e espalhados num período de 72h (células aderidas-barras pontilhadas). Os experimentos foram realizados em duplicata. * valores significativos para $p < 0,05$.

Figura 10. Análise do "burst" oxidativo induzido por *Cryptococcus neoformans*. Os linfócitos B-1 (4×10^5) foram obtidos e cultivados por 72h para aderirem e espalharem. A reação foi iniciada com 2×10^6 leveduras da cepa 02 (relação 1:5) e mantida por 4h em estufa 37°C + 5%CO₂. Após este período a produção de "burst" oxidativo foi avaliado na presença ou não de HRP (1 μ M) utilizando luminol (1mM) como substrato para formação de luz. A leitura foi acompanhada em luminômetro por 60 minutos. Os experimentos foram realizados em duplicata. * valores significativos para $p < 0,05$.

4.8. Análise da atividade peroxidásica

Para avaliarmos outra molécula com capacidade microbicida dosamos a atividade peroxidásica de linfócitos B-1 (figura 11). Os linfócitos B-1 foram lisados e a enzima liberada para o sobrenadante. Após a adição do substrato H_2O_2 observamos uma alta atividade peroxidásica nestas células. A alta atividade peroxidásica foi observada tanto nos linfócitos recém obtidos de cultura como de linfócitos recultivados por 72h para aderir e espraiair.

Figura 11. Atividade peroxidásica de linfócitos B-1. Os linfócitos B-1 foram obtidos conforme descrito. Uma população de 4×10^5 células foram rompidas em homogeneizador velocidade máxima em solução de PBS. A reação foi iniciada na presença ou ausência de H_2O_2 (0,5mM). Luminol (1mM) foi utilizado como substrato para formação de luz. A leitura foi acompanhada em luminômetro por 60 minutos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Ensaio *in vivo*

4.9. Análise da mortalidade dos camundongos BALB/c e BALB/xid

Os animais BALB/c e BALB/xid foram infectados com 10^7 leveduras por via i.p. com duas diferentes cepas. Os animais (BALB/c e BALB/xid) infectados com a cepa **02** foram mais susceptíveis à infecção. Neste grupo os animais BALB/xid, desprovidos de linfócitos B-1, apresentaram maior índice de mortalidade (todos morreram até 13º dia) quando comparados aos camundongos BALB/c que sobreviveram até o 28º dia após a infecção (Figura 12). Os animais (BALB/c e BALB/xid) infectados com a cepa **01** sobreviveram à infecção e resolveram a doença. Todavia, os animais BALB/xid infectados com a cepa **01** apresentaram maior carga fúngica e resolveram a doença mais tardiamente quando comparados aos camundongos BALB/c do mesmo grupo (Figura 13).

Figura 12. Índice de Mortalidade. Onze animais, de cada linhagem de camundongo, foram infectados com 10^7 leveduras da cepa **02** de *Cryptococcus neoformans*. Todos os animais BALB/xid morreram 13 dias após a infecção. Os animais BALB/c começaram a morrer no 15º dia. Vinte e oito dias após a infecção todos os animais BALB/c morreram. Os resultados são significativos para $p < 0,0001$.

4.9.1. Análise das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos órgãos baço, fígado e pulmão após a infecção com as duas cepas de *Cryptococcus neoformans*

Avaliamos a evolução da infecção fúngica nos camundongos BALB/c e BALB/xid através da carga fúngica medida pelas UFC nos órgãos baço, fígado e pulmão. Os animais foram infectados com 10^7 leveduras por via intraperitoneal com as cepas **01** e **02**. Nos dias 7 e 13 após a infecção com a cepa **02** os animais (BALB/c e BALB/xid) foram sacrificados e os órgãos foram retirados, macerados e uma pequena alíquota plaqueada em agar Sabouraud para observarmos a carga fúngica de cada órgão (Figura 14). Os animais BALB/xid apresentaram maior carga fúngica, principalmente no 13º dia após a infecção, quando todos os animais morreram. Os animais BALB/c conseguiram conter a infecção por mais tempo, apresentando uma carga fúngica menor na primeira e segunda semanas (dias 7 e 13 após a infecção). Entretanto, os animais inoculados com a cepa **01** sobreviveram à infecção. Portanto, os órgãos destes animais foram analisados nos dias 7, 15, 40, 60 e 100 após a inoculação do fungo (Figura 13). Da mesma forma que ocorreu com o grupo infectado com a cepa **02**, os animais BALB/xid apresentaram maior susceptibilidade com uma carga fúngica persistente até o 60º dia após a infecção. A colonização atingiu o pulmão dos camundongos BALB/xid logo na quinta semana, enquanto, nos camundongos BALB/c as leveduras atingiram o pulmão apenas na oitava semana após a infecção. Todos os animais, BALB/c e BALB/xid, resolveram a doença após 100 dias de infecção e não apresentaram crescimento de leveduras no macerado dos órgãos.

Figura 13. Carga fúngica dos órgãos dos animais infectados com a cepa 01. Os animais foram infectados com 10^7 leveduras da cepa 01 de *Cryptococcus neoformans* e nos dias 7 (A), 15 (B), 40 (C) e 60 (D) após a infecção. Os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados, macerados e a carga fúngica foi analisada através da contagem das UFC. No dia 100 após a infecção nenhuma levedura viável foi encontrada no macerado dos órgãos. Os valores foram expressos em UFC por grama de órgão (UFC/g). Os experimentos foram realizados feitos em triplicata. * Os valores são significativos comparando os órgãos dos camundongos BALB/xid e BALB/c para $p < 0,05$.

Figura 14. Carga fúngica dos animais infectados com a cepa 02. Os animais BALB/xid e BALB/c foram infectados com 10^7 leveduras da cepa 02 de *Cryptococcus neoformans*. Nos dias 7 (A) e 13 (B) após a infecção, os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados, macerados e a carga fúngica foi analisada através da contagem das UFC. No dia 13 após a infecção todos os camundongos estavam mortos. Os valores foram expressos em UFC por grama de órgão (UFC/g). Os experimentos foram realizados feitos em triplicata. * Os valores são significativos comparando os órgãos dos camundongos BALB/xid e BALB/c para $p < 0,05$.

4.9.2. Análise do padrão de citocinas presentes no macerado dos órgãos após infecção

Avaliamos o padrão de citocinas (IL-2, IL-12, IFN- γ , IL-4 e IL-10) encontrado no sobrenadante do macerado dos órgãos baço, fígado e pulmão dos camundongos BALB/c e BALB/xid infectados ou não com 10^7 leveduras de *Cryptococcus neoformans*. A dosagem foi realizada com o mesmo sobrenadante utilizado para o experimento de quantificação de carga fúngica. Na primeira semana (7 dias) de infecção com a cepa **02** (Figura 15), todas as citocinas dos órgãos de ambas as linhagens de camundongos (BALB/xid e BALB/c) aumentaram significativamente comparadas ao controle, com exceção da IL-4 que diminuiu no baço dos camundongos susceptíveis BALB/xid. A concentração de IL-4 nos camundongos BALB/c foi maior na primeira semana quando comparada à concentração nos órgãos dos camundongos BALB/xid (Figura 15 e Figura 16). Ainda na primeira semana de infecção, a secreção de IL-10 é mais induzida nos camundongos BALB/c (Figura 16), principalmente no baço, onde a colonização (carga fúngica/UFC) foi menor (Figura 14). Todas as citocinas baixaram na segunda semana de infecção, entretanto, encontramos concentração maior de IL-10 nos camundongos susceptíveis BALB/xid (Figura 17). Neste tempo (13 dias de infecção), todos os camundongos BALB/xid morreram, enquanto os camundongos BALB/c resistiram à infecção por mais tempo. Na primeira semana de infecção com a cepa **01**, a concentração das citocinas IL-12, IFN- γ e IL-10 dos órgãos dos camundongos BALB/xid e BALB/c não alteraram significativamente quando comparadas ao controle (Figura 18 e Figura 19). Entretanto, a concentração de IL-4 no baço dos camundongos BALB/xid foi reduzida (Figura 18), e nos camundongos BALB/c a concentração de IL-4 no baço aumentou consideravelmente (Figura 19). No dia 40 após a infecção com a cepa **01**, a concentração das citocinas IL-12, IFN- γ , IL-2 e IL-4 dos órgãos dos camundongos BALB/c foi maior ou igual à concentração dos órgãos dos camundongos susceptíveis BALB/xid. Entretanto, a concentração de IL-10 aumentou nos camundongos BALB/xid. Neste período, os camundongos BALB/c já tinham controlado a infecção. Finalmente, 60 dias após a infecção quando quase todos os camundongos estavam curados, a

concentração das citocinas de ambas as linhagens de camundongos foi semelhante (Figura 21). Ao longo da infecção a IL-10 persistiu no baço dos camundongos susceptíveis BALB/xid (Figura 18, Figura 20 e Figura 21). No final da infecção, a concentração de IL-4 diminuiu no baço de ambas as linhagens de camundongos.

cepa 01	7 dias de infecção
BALB/xid	= IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-2 ↓ IL-4 BAÇO
BALB/c	= IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-2 ↑ IL-4 BAÇO

Tabela 01. Esquema geral da produção de citocinas sete dias após infecção com a cepa 01. Os valores das citocinas obtidos dos órgãos dos camundongos infectados com a cepa **01** foram analisados e resumidos no esquema acima. As setas indicam aumento ou diminuição das citocinas comparadas com o controle inoculado apenas com PBS estéril. O sinal = (igual) representa uma não alteração na produção de citocinas comparadas ao controle.

cepa 01	40 dias de infecção	60 dias de infecção
BALB/xid	↑ IL-10	=
BALB/c	↑ ou = IFN- γ , IL-12, IL-4 e IL-2	=

Tabela 02. Esquema geral da produção de citocinas 40 e 60 dias após infecção com a cepa 01. Os valores das citocinas obtidos dos órgãos dos camundongos infectados com a cepa 01 foram analisados e resumidos no esquema acima. As setas indicam aumento ou diminuição das citocinas quando comparados os camundongos BALB/c e BALB/xid. O sinal = (igual) representa uma não alteração na produção de citocinas quando comparados os camundongos BALB/c e BALB/xid, ou seja, no dia 60 após a infecção não houve diferença na produção de citocinas entre as duas linhagens de camundongos.

cepa 02	7 dias	13 dias
BALB/xid	<p>↑ IFN-γ, IL-12, IL-10, IL-4 e IL-2</p> <p>↓ IL-4 BAÇO</p>	<p>↓ IFN-γ, IL-12, IL-4 e IL-2</p> <p>↑↑ IL-10 BAÇO</p>
BALB/c	<p>↑ IFN-γ, IL-12, IL-10, IL-4 e IL-2</p> <p>↑↑ IL-10 BAÇO</p>	<p>↓ IFN-γ, IL-12, IL-10, IL-4 e IL-2</p>

Tabela 03. Esquema geral da produção de citocinas após infecção com a cepa 02. Os valores das citocinas obtidos dos órgãos dos camundongos infectados com a cepa 02 foram analisados e resumidos no esquema acima. As setas em sete dias de infecção indicam aumento ou diminuição das citocinas comparadas com o controle inoculado apenas com PBS estéril. As setas em treze dias de infecção indicam aumento ou diminuição das citocinas comparadas com as citocinas produzidas em sete dias de infecção. Quando as linhagens de camundongos são comparadas, observamos uma maior produção de IL-4 nos camundongos BALB/c.

Figura 15. Padrão de citocinas nos órgãos dos animais BALB/xid 07 dias após a infecção com a cepa 02. Após 07 dias de infecção com a cepa 02, os animais BALB/xid foram sacrificados e os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados e macerados com 2mL de PBS estéril. Uma pequena alíquota (100μL) desta solução foi utilizada para a dosagem das citocinas IL-12 (A), IFN-γ (B), IL-2 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) através de ELISA. Outro grupo de animais foi inoculado apenas com PBS estéril. A secreção de citocinas também foi analisada nos órgãos destes animais controle. Os gráficos comparam o padrão de citocinas dos animais infectados e controle 07 dias após a inoculação. A concentração das citocinas é expressa em picogramas por mililitros (pg/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata. * Os valores são significativos entre os órgãos dos camundongos infectados e controle para $p < 0,05$.

Figura 16. Padrão de citocinas nos órgãos dos animais BALB/c 07 dias após a infecção com a cepa 02. Após 07 dias de infecção com a cepa 02, os animais BALB/c foram sacrificados e os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados e macerados com 2mL de PBS estéril. Uma pequena alíquota (100μL) desta solução foi utilizada para a dosagem das citocinas IL-12 (A), IFN-γ (B), IL-2 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) através de ELISA. Outro grupo de animais foi inoculado apenas com PBS estéril. A secreção de citocinas também foi analisada nos órgãos destes animais controle. Os gráficos comparam o padrão de citocinas dos animais infectados e controle 07 dias após a inoculação. A concentração das citocinas é expressa em picogramas por mililitros (pg/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata. * Os valores são significativos entre os órgãos dos camundongos infectados e controle para $p < 0,05$.

Figura 17. Padrão de citocinas nos órgãos dos animais BALB/xid e BALB/c 13 dias após a infecção com a cepa 02. Após 13 dias de infecção com a cepa 02, os animais BALB/xid e BALB/c foram sacrificados e os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados e macerados com 2mL de PBS estéril. Uma pequena alíquota (100μL) desta solução foi utilizada para a dosagem das citocinas IL-12 (A), IFN-γ (B), IL-2 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) através de ELISA. Os gráficos comparam o padrão de citocinas dos animais infectados BALB/xid e BALB/c 13 dias após a infecção com 10^7 leveduras de *Cryptococcus neoformans*. A concentração das citocinas é expressa em picogramas por mililitros (pg/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata. * Os valores são significativos para $p < 0,05$.

Figura 18. Padrão de citocinas nos órgãos dos animais BALB/xid 07 dias após a infecção com a cepa 01. Após 07 dias de infecção com a cepa 01, os animais BALB/xid foram sacrificados e os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados e macerados com 2mL de PBS estéril. Uma pequena alíquota (100 μ L) desta solução foi utilizada para a dosagem das citocinas IL-12 (A), IFN- γ (B), IL-2 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) através de ELISA. Outro grupo de animais foi inoculado apenas com PBS estéril. A secreção de citocinas também foi analisada nos órgãos destes animais controle. Os gráficos comparam o padrão de citocinas dos animais infectados e controle 07 dias após a inoculação. A concentração das citocinas é expressa em picogramas por mililitros (pg/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata. * Os valores são significativos entre os órgãos dos camundongos infectados e controle para $p < 0,05$.

Figura 19. Padrão de citocinas nos órgãos dos animais BALB/c 07 dias após a infecção com a cepa 01. Após 07 dias de infecção com a cepa 01, os animais BALB/c foram sacrificados e os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados e macerados com 2mL de PBS estéril. Uma pequena alíquota (100 μ L) desta solução foi utilizada para a dosagem das citocinas IL-12 (A), IFN- γ (B), IL-2 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) através de ELISA. Outro grupo de animais foi inoculado apenas com PBS estéril. A secreção de citocinas também foi analisada nos órgãos destes animais controle. Os gráficos comparam o padrão de citocinas dos animais infectados e controle 07 dias após a inoculação. A concentração das citocinas é expressa em picogramas por mililitros (pg/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata. * Os valores são significativos entre os órgãos dos camundongos infectados e controle para $p < 0,05$.

Figura 20. Padrão de citocinas nos órgãos dos animais BALB/xid e BALB/c 40 dias após a infecção com a cepa 01. Após 40 dias de infecção com a cepa 01, os animais **BALB/xid** e **BALB/c** foram sacrificados e os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados e macerados com 2mL de PBS estéril. Uma pequena alíquota (100μL) desta solução foi utilizada para a dosagem das citocinas IL-12 (A), IFN-γ (B), IL-2 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) através de ELISA. Os gráficos comparam o padrão de citocinas dos animais infectados BALB/xid e BALB/c 40 dias após a infecção com 10^7 leveduras de *Cryptococcus neoformans*. A concentração das citocinas é expressa em picogramas por mililitro (pg/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata. * Os valores são significativos para $p < 0,05$.

Figura 21. Padrão de citocinas nos órgãos dos animais BALB/xid e BALB/c 60 dias após a infecção com a cepa 01. Após 60 de infecção com a cepa 01, os animais BALB/xid e BALB/c foram sacrificados e os órgãos baço, fígado e pulmão foram retirados e macerados com 2mL de PBS estéril. Uma pequena alíquota (100μL) desta solução foi utilizada para a dosagem das citocinas IL-12 (A), IFN-γ (B), IL-2 (C), IL-4 (D) e IL-10 (E) através de ELISA. Os gráficos comparam o padrão de citocinas dos animais infectados BALB/xid e BALB/c 13 dias após a infecção com 10^7 leveduras de *Cryptococcus neoformans*. A concentração das citocinas é expressa em picogramas por mililitros (pg/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata. * Os valores são significativos para $p < 0,05$.

4.10. Quantificação de linfócitos B-1 nos órgãos dos camundongos BALB/c

Para avaliarmos a presença de linfócitos B-1 durante a criptococose experimental realizamos a quantificação destas células nos órgãos dos animais BALB/c após infecção com a cepa **01** ou cepa **02** de *Cryptococcus neoformans*. Os camundongos BALB/c foram infectados com 10^7 leveduras via i.p. e nos dias 7 e 14 após a infecção os animais foram sacrificados e os órgãos: baço, fígado, pulmão e cavidade peritoneal foram analisados. Os órgãos dos camundongos BALB/c não infectados foram utilizados como controle. A presença de linfócitos B-1 foi caracterizada pela presença de células duplamente marcadas com anticorpos anti-B-220 (PE) e anti-Mac-1 (FITC) como já descrito anteriormente em alguns artigos^{2,68}(Figura 22). Observa-se um aumento de linfócitos B-1 em todos os órgãos dos animais infectados apenas com a cepa **01** considerada menos virulenta. Ainda com a cepa **01**, os linfócitos B-1 aumentam logo na primeira semana de infecção, no baço e pulmão, enquanto no fígado e peritônio estas células aumentam mais tardiamente no 14º dia após a infecção. Quando os animais são infectados com a cepa **02** há apenas um aumento significativo de linfócitos B-1 no baço 14 dias após a infecção, enquanto nos outros órgãos o número de linfócitos B-1 permaneceu próximo ao encontrado nos animais controle. Quando as células totais são analisadas através da citometria de fluxo (Figura 23, 24, 25 e 26) observa-se que nos órgãos dos animais infectados com a cepa **02** há um aumento significativo de populações Mac-1⁺ e B-220⁻ e Mac-1⁺ e B-220^{low}, além de uma população menor de células B-220⁺ e Mac-1⁻ principalmente no baço.

Figura 22. Porcentagem de linfócitos B-1 nos órgãos dos camundongos BALB/c infectados. Os animais foram infectados com 10^7 leveduras da cepa 01 ou cepa 02. Nos dias 7 e 14 após a infecção os órgãos foram retirados e as células totais foram contadas e duplamente marcadas com anticorpos anti-Mac-1 e anti-B-220 e analisadas por citometria de fluxo. As células que apresentaram estas duas marcações foram consideradas linfócitos B-1. Camundongos não infectados foram utilizados como controle. Os experimentos foram realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparados com o controle.

Figura 23. Padrão de população celular no baço de camundongos BALB/c infectados com a cepa 01 ou cepa 02 de *Cryptococcus neoformans*. Os animais BALB/c foram infectados com 10^7 leveduras da cepa 01 (B e C) ou cepa 02 (D e E) e nos dias 7 (B e D) e 14 (C e E) após a infecção o baço foi retirado e macerado em 10mL de PBS estéril. Esta solução contendo células totais do baço foi duplamente marcada com anticorpos anti-Mac-1 (FITC-linha horizontal do gráfico) e anti-B-220 (PE-linha vertical do gráfico) e analisadas através de citometria de fluxo. As células duplamente marcadas com Mac-1 e B-220 foram consideradas linfócitos B-1 e estão no quadrante acima e à direita (sigla UR). As siglas UL=upper-left, UR=upper-right, LL=lower-left e LR=lower-right e representam os quadrantes onde estão populações celulares distintas (A): representa o baço do animal controle não infectado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 24. Padrão de população celular no peritônio de camundongos BALB/c infectados com a cepa 01 ou cepa 02 de *Cryptococcus neoformans*. Os animais BALB/c foram infectados com 10^7 leveduras da cepa 01 (B e C) ou cepa 02 (D e E) e nos dias 7 (B e D) e 14 (C e E) após a infecção o peritônio foi lavado com 10mL de PBS estéril. Esta solução contendo células totais do peritônio foi duplamente marcada com anticorpos anti-Mac-1 (FITC-linha horizontal do gráfico) e anti-B-220 (PE-linha vertical do gráfico) e analisadas através de citometria de fluxo. As células duplamente marcadas com Mac-1 e B-220 foram consideradas linfócitos B-1 e estão no quadrante acima e à direita (sigla UR). As siglas UL=upper-left, UR=upper-right, LL=lower-left e LR=lower-right e representam os quadrantes onde estão populações celulares distintas (A): representa o peritônio do animal controle não infectado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 25. Padrão de população celular no fígado de camundongos BALB/c infectados com a cepa 01 ou cepa 02 de *Cryptococcus neoformans*. Os animais BALB/c foram infectados com 10^7 leveduras da cepa 01 (B e C) ou cepa 02 (D e E) e nos dias 7 (B e D) e 14 (C e E) após a infecção o fígado foi retirado e macerado em 10mL de PBS estéril. Esta solução contendo células totais do fígado foi duplamente marcada com anticorpos anti-Mac-1 (FITC-linha horizontal do gráfico) e anti-B-220 (PE-linha vertical do gráfico) e analisadas através de citometria de fluxo. As células duplamente marcadas com Mac-1 e B-220 foram consideradas linfócitos B-1 e estão no quadrante acima e à direita (sigla UR). As siglas UL=upper-left, UR=upper-right, LL=lower-left e LR=lower-right e representam os quadrantes onde estão populações celulares distintas (A): representa o fígado do animal controle não infectado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 26. Padrão de população celular no pulmão de camundongos BALB/c infectados com a cepa 01 ou cepa 02 de *Cryptococcus neoformans*. Os animais BALB/c foram infectados com 10^7 leveduras da cepa 01 (B e C) ou cepa 02 (D e E) e nos dias 7 (B e D) e 14 (C e E) após a infecção o pulmão foi retirado e macerado em 10mL de PBS estéril. Esta solução contendo células totais do pulmão foi duplamente marcada com anticorpos anti-Mac-1 (FITC-linha horizontal do gráfico) e anti-B-220 (PE-linha vertical do gráfico) e analisadas através de citometria de fluxo. As células duplamente marcadas com Mac-1 e B-220 foram consideradas linfócitos B-1 e estão no quadrante acima e à direita (sigla UR). As siglas UL=upper-left, UR=upper-right, LL=lower-left e LR=lower-right e representam os quadrantes onde estão populações celulares distintas (A): representa o pulmão do animal controle não infectado. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5. DISCUSSÃO

Nossos estudos demonstraram pela primeira vez a participação de um novo fagócito mononuclear na criptococose capaz de fagocitar e destruir leveduras de *Cryptococcus neoformans* sorotipo A. Este novo fagócito é derivado de linfócito B-1 e fagocitou as leveduras de *Cryptococcus neoformans* principalmente na presença de complemento, indicando a presença de um receptor de complemento fundamental na otimização da fagocitose mediada por estas células. Estes ensaios de fagocitose foram realizados sem nenhum tipo de estímulo celular mostrando a capacidade destes linfócitos em realizar suas funções independente de ativação exógena.

Não é a primeira vez que se observa uma forte relação entre linfócitos B e células macrofágicas. Em 1996 foi sugerida uma nova cinética leucopoética, onde uma mesma célula progenitora seria capaz de originar linfócitos B e macrófagos, esta última chamada de célula B/macrofágica⁹. Recentemente, outro trabalho mostrou essa íntima relação entre estas duas células, mostrando que linfócitos B-1 quando recultivados aderem e espraíam sobre lamínula e são excelentes fagócitos via receptor Fc de imunoglobulina e receptor de manose².

Quando comparados com macrófagos, os linfócitos B-1 apresentaram capacidade fagocítica semelhante, entretanto, em um dos ensaios de fagocitose realizado neste trabalho, os linfócitos B-1 apresentaram um Índice de Fagocitose surpreendente (IF=800 / dados não mostrados) mesmo na ausência de complemento. Embora não fosse possível reproduzir este resultado, isto indica que em alguma condição ainda não conhecida, estas células adquirem a capacidade de fagocitar leveduras de *Cryptococcus neoformans* com maior eficiência que qualquer outro fagócito envolvido nesta patologia. A observação de que estes linfócitos produzem anticorpos antipolissacarídeos no sobrenadante de cultura^{2,31} poderia parcialmente explicar este alto IF encontrado, uma vez que estes linfócitos em condição favorável poderia ter produzido altas quantidades de anticorpos opsonizantes, revestindo a cápsula das leveduras e otimizando o processo de fagocitose.

Sabe-se que macrófagos são considerados decisivos na criptococose devido à fagocitose e eventual destruição do patógeno. Entretanto, estas células não são eficientes em fagocitar estas leveduras principalmente na ausência de opsoninas, graças à cápsula mucopolissacarídica e anti-fagocítica do fungo, e ainda, estas leveduras possuem mecanismos de escape eficientes contra macrófagos podendo desenvolver-se dentro destas células^{15,19,20,24}. Estes relatos atribuem aos linfócitos B-1 o papel de uma das principais células do sistema imune do hospedeiro em defesa à criptococose, já que estas células além de fagocitar também destruíram com eficiência as leveduras internalizadas.

Essa eficiente capacidade de “killing” observada nos linfócitos B-1 nos fez investigar os possíveis mecanismos utilizados por esta célula para inviabilizar estas leveduras fagocitadas. Quando dosamos a produção de NO de linfócitos B-1 observamos que, surpreendentemente, estas células são produtoras inatas de NO produzindo e liberando constantemente esta molécula no sobrenadante da cultura sem a necessidade de qualquer ativador celular. Essa produção de NO apresentou-se contínua e a presença de soro de camundongo autólogo parece induzir uma maior produção desta molécula fungicida. Embora, sabe-se que leveduras de *Cryptococcus neoformans* podem inibir a produção de NO por macrófagos *in vitro*⁴⁰, verificamos que os linfócitos B-1 mantiveram uma alta produção desta molécula, possivelmente considerada responsável pela atividade fungicida destes linfócitos. Diversos trabalhos atribuem a capacidade fungicida de macrófagos à produção de NO^{76,77,78}, entretanto esta produção é baixa quando comparada aos nossos resultados com linfócitos B-1. Todavia, a produção de NO e conseqüente “killing” por macrófagos é induzida por fatores de ativação celular como IFN-gamma ou LPS, enquanto que a produção de NO observada em linfócitos B-1 foi obtida sem estímulo exógeno e em valores significativamente superiores.

Outras moléculas fungicidas importantes como as EROs produzidas a partir do “burst” oxidativo foram avaliadas. Os experimentos avaliados por quimiluminescência mostraram que os linfócitos B-1 são capazes de gerar EROs na presença de PMA, e o “burst” oxidativo foi melhor evidenciado

quando adicionamos a peroxidase HRP. Entretanto, a capacidade de “burst” oxidativo pelos linfócitos B-1 foram inferiores comparados aos macrófagos peritoneais residentes, observado por Rodrigues, M.R. em sua dissertação de Mestrado⁶⁴. Quando desafiados com as leveduras de *Cryptococcus neoformans*, os linfócitos B-1 também geram EROs observados na presença de HRP, embora em quantidade inferior ao estímulo por PMA. Estes dados apenas nos permitem concluir que linfócitos B-1 são capazes de gerar EROs, mas a baixa produção sugere que a capacidade fungicida destas células dificilmente deve-se ao “burst” oxidativo. A utilização de HRP foi devida a necessidade de uma peroxidase para reagir com a ERO H_2O_2 (caso produzida pelo “burst” oxidativo) gerando uma peroxidase ativa que excita o luminol emitindo luz e permitindo a visualização da reação do “burst” oxidativo. Como não sabíamos se a peroxidase endógena dos linfócitos B-1 seria suficiente para reagir ao H_2O_2 utilizamos HRP como uma peroxidase exógena. A HRP permitiu-nos uma melhor visualização do “burst” oxidativo, entretanto o aumento da emissão de luz observado ainda é pequeno comparado a capacidade de macrófagos em gerar EROs⁶⁴.

A literatura descreve uma regulação entre as espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, ou seja, a produção de EROs inibiria a produção de ERNs. Portanto, este fenômeno poderia estar ocorrendo com os linfócitos B-1, onde a alta produção de NO direcionaria toda a produção microbicida e imunoreguladora para ERNs inibindo a produção de EROs. Entretanto, alguns trabalhos mostraram que EROs podem reagir com NO formando moléculas de grande capacidade microbicida³⁸, mas este fenômeno parece não ocorrer com a formação fungicida de linfócitos B-1, já que a produção de EROs deveria ser abundante para reagir com as altas doses de NO.

Os linfócitos B-1 também possuem atividade peroxidásica, um importante agente microbicida. Ao contrário do que ocorreu com a produção de EROs, os linfócitos B-1 apresentaram muita atividade peroxidásica comparada aos macrófagos peritoneais residentes observado por Rodrigues, M.R. em sua dissertação de Mestrado⁶⁴. Em sua dissertação pode-se observar que

macrófagos peritoneais residentes praticamente não possuem atividade peroxidásica, já que esta enzima perde sua ação biológica gradativamente. Cerca de 24h à 48h de cultura de macrófagos é suficiente para não mais encontrarmos atividade peroxidásica, e a sua produção não é mais induzida pela célula diferenciada, dessa forma, macrófagos recém originados de monócitos possuem alta atividade peroxidásica e esta atividade é superior a dos linfócitos B-1⁶⁴. Entretanto, seguindo o protocolo de obtenção de linfócitos B-1, estas células permanecem cerca de sete dias em cultura e ainda observamos uma alta atividade peroxidásica sem a necessidade de ativador celular. Estes dados indicam uma possível participação da peroxidase na ação fungicida de linfócitos B-1. Embora peroxidase reaja com H_2O_2 para formar compostos fungicidas¹ existem outros mecanismos pelos quais a peroxidase pode atuar. Já que a alta produção de NO acompanha a alta atividade peroxidásica podemos sugerir que estas moléculas estejam interagindo em um mecanismo de regulação e também formando novos compostos fungicidas¹. A presença de NO favorece o aumento da atividade catalítica da peroxidase em um sistema com baixas concentrações de H_2O_2 ¹. Este modelo parece ocorrer com os linfócitos B-1, já que estes possuem alta atividade peroxidásica, alta produção de NO e pouca geração de EROs.

Linfócito B-1 é uma das principais células produtoras de IL-10⁵⁵. Quando cultivamos estas células sem nenhum estímulo observamos a produção espontânea de IL-10, entretanto a presença de soro autólogo de camundongos diminuiu drasticamente esta citocina induzindo uma produção de IFN-gamma. Na presença de *Cryptococcus neoformans* estas células foram capazes de diminuir a produção de IL-10 e passar a produzir preferencialmente IL-12 e IFN-gamma. Esta alteração no padrão de citocinas é extremamente importante para o controle da criptococose já que são citocinas descritas como protetoras nesta patologia⁴⁰. Embora observamos uma alta produção de IFN-gamma induzida pela cepa 02, quando adicionamos a mesma cepa mais soro esta produção diminui. A maior ingestão de leveduras opsonizadas pelo soro poderia explicar tal fenômeno, onde leveduras não fagocitadas e também exoantígeno do fungo liberado no meio de cultura poderiam induzir altas taxas

de IFN-gamma, e quando as leveduras são fagocitadas esta indução é consideravelmente diminuída. Estes dados nos permitiram concluir que embora linfócitos B-1 produzam preferencialmente IL-10 mesmo após estímulo ⁵⁹, este padrão pode ser completamente alterado mediante algumas condições como, por exemplo, o contato com leveduras de *Cryptococcus neoformans* e/ou soro não inativado. Estes dados trazem novas compressões para o papel destas células nas infecções, já que, inevitavelmente, para alcançar o sítio inflamatório estas células precisam percorrer vasos sanguíneos mantendo contato direto com plasma e em seguida com o agente infeccioso.

Alguns ensaios *in vivo* sugeriram que linfócitos B-1 estariam participando na proteção à criptococose. A análise da mortalidade dos animais infectados mostrou uma alta susceptibilidade dos camundongos BALB/xid. Embora estes animais possuem algumas alterações devido à falta da tirosina quinase de Bruton, uma das principais aberrações é a ausência de linfócitos B-1 principalmente na cavidade peritoneal, o que torna necessário avaliar o papel *in vivo* destes linfócitos na criptococose. A susceptibilidade à criptococose encontrada nos animais BALB/xid já foi observada em outra linhagem de camundongo xid, o CBA/N⁴⁷. Este camundongo mostrou-se mais susceptível que linhagens como: BALB/cN, C57BL/KsJ, C57BR/cdJ, CBA/CaJ, BRVR, DW/+ e C57BL/6J. Neste estudo sugeriu-se que a susceptibilidade à criptococose nos animais CBA/N fosse devido à deficiência genética encontrada no cromossomo X destes animais. A ausência de linfócitos B-1 não foi discutida ou avaliada. Portanto ainda carecemos de um estudo direcionado aos mecanismos envolvidos nesta alta susceptibilidade observada nos animais xid, nos permitindo uma melhor compreensão do processo patológico na criptococose. Este estudo encontra-se em andamento em nosso laboratório.

Os ensaios de quantificação das UFC nos órgãos dos animais infectados demonstraram resultados coerentes com a mortalidade observada nos animais xid. O número de leveduras colonizando os órgãos dos animais BALB/xid foi significativamente maior do que nos animais BALB/c e, como esperado, com a cepa **02** o número de CFU é maior e atinge o pulmão logo na primeira semana de infecção, enquanto a cepa **01** encontra maiores dificuldades em proliferar e

disseminar-se. Embora os animais BALB/xid sejam susceptíveis a criptococose, todos os animais BALB/xid e BALB/c infectados com a cepa **01** sobreviveram a infecção, demonstrando pouca virulência do sorotipo A quando apresenta pouca ou nenhuma cápsula.

Ambas as cepas foram inoculadas em camundongos BALB/c e reisoladas após 15 dias para reativar eventuais moléculas, fatores de virulência ou formação de cápsula. Portanto, ambas as cepas sofreram os mesmos processos e estavam em mesmas condições antes de sua utilização para os ensaios *in vitro* e *in vivo*. Após este processo, a cápsula das leveduras foi reavaliada e observamos que estas mantiveram suas características já descritas: pouca cápsula para cepa **01** e muita cápsula para cepa **02**.

Para avaliarmos se os linfócitos B-1 estão realmente em contato com o fungo e participando da inflamação nos órgãos infectados, quantificamos células Mac-1⁺ e B-220⁺ nestes órgãos. Células que apresentam estas duas moléculas de superfície foram consideradas linfócitos B-1, embora outras moléculas possam ser usadas como marcadores^{68,73}. Surpreendentemente, a indução de células B-1 foi maior nos órgãos dos animais infectados com a cepa **01**, menos virulenta. Já com a cepa **02**, não foi observada nenhuma alteração em relação ao controle (não infectado), sugerindo que estas células participariam do controle da doença causada pela cepa **01** principalmente através da fagocitose e destruição da levedura. Estes dados indicam que a própria cepa de *Cryptococcus neoformans* induziria uma população celular protetora ou não na doença, e essa população poderia ser de linfócitos B-1 que seriam decisivos para o controle da doença. Alguns trabalhos já mostraram que linfócitos B-1 podem participar de processos inflamatórios e estar presente em alguns órgãos^{2,68}. Essa participação de linfócitos B-1 poderia ocorrer por migração até o foco inflamatório ou eventualmente indução através de determinados agentes.

O aumento de linfócitos B-1 nos animais BALB/c infectados com a cepa **02** só ocorreu no baço, 14 dias após a infecção. Esse surgimento de linfócitos B-1 coincidiu com o baixo número de UFC encontrada no baço destes animais 13 dias após a infecção. Enquanto a UFC no baço dos camundongos BALB/xid

aumentou exponencialmente da primeira para segunda semana de infecção e as UFCs no baço dos camundongos BALB/c não aumentaram. A presença de linfócitos B-1 neste órgão durante a segunda semana de infecção poderia ter contribuído para o controle da carga fúngica.

O aumento do número de linfócitos B-1 encontrado logo na primeira semana no pulmão dos animais infectados com a cepa **01** teria contribuído para a maior proteção observada neste órgão, já que muito pouca colonização aconteceu no pulmão. Apenas alguns animais BALB/c apresentaram colonização no pulmão, e as leveduras só conseguiram atingir este órgão 60 dias após a infecção e logo em seguida eliminaram toda carga fúngica. As leveduras infectadas no camundongo BALB/xid atingiram o pulmão com mais rapidez, provavelmente a falta de linfócitos B-1 na cavidade peritoneal (local de infecção) destes animais favoreceria uma disseminação mais rápida das leveduras.

A participação de linfócitos B-1 em granuloma já foi avaliado e observou-se que a ausência de linfócitos B-1 impede a formação de granuloma *in vitro* (artigo submetido). Este resultado sugere que camundongos deficientes de linfócitos B-1 formaria granuloma menos eficiente. Isto nos permitiria compreender melhor a alta susceptibilidade dos camundongos xid, já que o granuloma é fundamental para o controle desta infecção fúngica.

Analisando os gráficos de citometria de fluxo observamos, independente da presença de linfócitos B-1 (quadrante UR), que populações celulares diferentes foram recrutadas para cada órgão dependendo da cepa inoculada. A infecção causada pela cepa **02** induziu uma grande população Mac-1⁺ e B-220⁻ no órgão colonizado e uma menor população B-220⁺ e Mac-1⁻. Essa grande população Mac-1⁺ e B-220⁻, encontrada em todos os órgãos, provavelmente representa um grande infiltrado de macrófagos e neutrófilos, recrutados talvez pelo alto estímulo provocado pela cepa virulenta, entretanto este infiltrado fagocítico não foi suficiente para conter a evolução da doença. Esta alta concentração de células Mac-1⁺ e B-220⁻ não foi visto em animais infectados com a cepa **01**. Esta diferente resposta inflamatória que se apresentou para as diferentes cepas já foi descrita, quando mostraram que colônias mucóides são

colônias mucóides são mais virulentas que colônias secas desenvolvendo respostas inflamatórias diferentes⁶². No peritônio observamos que após a infecção, com ambas as cepas, as células começaram a aumentar a expressão de Mac-1 e diminuir B-220, sugerindo que os linfócitos B-1 passassem a adquirir característica "macrofágica", como já descrito em experimentos *in vitro*² e reproduzidos nesta dissertação também *in vitro* (ensaio de fagocitose).

Observamos que os animais resistentes (BALB/c) apresentaram ao longo da infecção altas concentrações de citocinas consideradas protetoras na criptococose como IFN-gamma, IL-12 e IL-2. Entretanto também observamos aumentos significativos de IL-4 e ainda na primeira semana de infecção aumento de IL-10 (Tabela 01, 02 e 03). Estes dados demonstraram um equilíbrio entre a produção de citocinas mediada por células Th1 e Th2. Este equilíbrio Th1/Th2, ou melhor, a produção de citocinas de ambos os grupos de linfócitos T parece induzir uma melhor resposta e conseqüente proteção nos animais infectados com *Cryptococcus neoformans*^{7,49}. Entretanto, os animais susceptíveis (BALB/xid) apresentaram uma polarização na produção de citocinas, com altas concentrações de IL-10 que foram detectadas durante todo o processo infeccioso e curiosamente, uma baixa concentração de IL-4 acompanhou esta polarização.

A alta produção de IL-4 observada nos animais resistentes BALB/c acompanhada de baixas produções da mesma em animais susceptíveis BALB/xid poderia associar esta citocina a um fator de proteção neste modelo experimental. Sabe-se que IL-4, além de outras funções, favorece a estimulação de linfócitos B IgM^{high} além de aumentar sua expressão de MHC classe II³⁵. Linfócitos B-1 fazem parte desta população e além de uma contribuição humoral, esta citocina poderia estimular este linfócito B-1 a apresentar sua característica "macrofágica" vista nesta dissertação como efetora na criptococose.

A resposta humoral também participa na evolução da criptococose^{7,12,75}. Assim, os linfócitos B-1 podem novamente atuar na proteção desta doença, já que são capazes de produzir anticorpos inatos antipolissacarídeos, os quais podem participar no início da infecção, na imunidade inata, antes do fungo

instalar-se, adaptar-se e desenvolver a doença, pois estes anticorpos poderiam ligar-se a estrutura capsular GXM. A cápsula de GXM é uma molécula solúvel liberada no meio que pode ativar linfócitos B independentes de linfócito T (T-independente). Essa é mais uma evidência da participação de linfócitos B-1 nesta patologia, já que linfócitos B-1 são responsáveis pela resposta humoral T-independente. Certamente linfócitos B-1 são responsáveis por uma grande parte dos anticorpos formados na criptococose e junto com sua função macrofágica agora descrita poderíamos afirmar que: "linfócitos B-1 são células envolvidas na criptococose e merece ser alvo de estudos para melhor elucidarmos a resposta imune nesta patologia".

Alguns trabalhos já foram realizados para avaliar a participação de linfócitos B-1 em outras doenças infecciosas e observou-se que estes linfócitos exercem papel protetor na defesa do hospedeiro contra *Plasmodium chabaudi chabaudi*, *Leishmania major*^{36,58,81} e recentemente *Toxoplasma gondii*. Neste último os autores demonstraram que linfócitos B-1 inoculados via i.p. conferiram resistência para camundongos µMT. Estes animais que receberam os linfócitos B-1 expressaram citocinas de ambas populações Th1 e Th2 além de uma alta produção de NO nos órgãos infectados.

Embora outras investigações sejam necessárias para melhor compreender o papel destas células B-1 na criptococose, podemos concluir que linfócitos B-1 fagocitam e matam *Cryptococcus neoformans* podendo participar de forma decisiva na evolução da doença e estes dados trouxeram novas compreensões que nos obriga reavaliar a construção da resposta imune na proteção à criptococose.

6. CONCLUSÕES

- Nos ensaios *in vitro* linfócitos B-1 foram capazes de fagocitar e destruir leveduras de *Cryptococcus neoformans* sorotipo A, mesmo na ausência de ativação ou estímulo celular. A fagocitose e "killing" destas leveduras está associada à alta produção de NO e atividade peroxidásica e baixa produção de EROs. Linfócitos B-1 também foram capazes de alterar seu padrão de citocinas quando desafiadas com o fungo. A produção de IL-10 diminuiu significativamente enquanto observamos um aumento de IL-12 e IFN-gamma, que são citocinas protetoras na criptococose.
- Nos ensaios *in vivo* observamos que camundongos BALB/xid (desprovidos de linfócitos B-1) foram mais susceptíveis à infecção e morreram precocemente. O alto índice de mortalidade nestes animais foi associado a maior carga fúngica nos órgãos e rápida disseminação para os pulmões. A produção de citocinas também foi diferente nestes animais, os quais produziram principalmente IL-10 e pouca IL-4. Entretanto, os camundongos BALB/c, mais resistentes à infecção, apresentaram um padrão de citocinas misto com alta produção de IL-12, IFN-gamma e IL-4 e pouca concentração de IL-10, além de apresentarem uma maior população de linfócitos B-1 nos órgãos quando infectados com a cepa 01.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABU-SOUD, H.M. and HAZEN, S.L. Nitric Oxide Modulates the Catalytic Activity of Myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.** 275(8):5425-5430, 2000.
2. ALMEIDA, S. R.; AROEIRA, L. S.; FRYMULLER, E.; DIAS, M. A. A.; BOGSAN, C. S. B.; LOPES, J. D. and MARIANO, M. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **Int. Immunol.** 13:1193-1201, 2001.
3. ALSPAUGH, J.A.; DAVIDSON, R.C. and HEITMAN, J. Morphogenesis of *Cryptococcus neoformans*. **Contrib Microbiol.** 5:217-38, 2000.
4. ARAKAMI, M.; NAGASAWA, T.; KOSEKI, T. and ISHIKAWA, I. Presence of activated B-1 cells in chronic inflamed gingival tissue. **J. Clin. Immunol.** 18:421-429, 1998.
5. BABIOR, B.M.; KIPNESS, R.S. and CURNUHE, J.I. Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. **J. Clin. Invest.** 52:741-744, 1973
6. BAUMAN, S. K.; HUFFNAGLE, G. B. and MURPHY, J. W. Effects of Tumor Necrosis Factor Alpha on Dendritic Cell Accumulation in Lymph nodes Draining the Immunization Site and the Impact on the Anticryptococcal Cell-Mediated Immune Response. **Infect. and Immun.** 71: 68-74, 2003.
7. BEENHOUWER, D.O.; SHAPIRO, S.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. and SCHARFF, M.D. Both Th1 and Th2 cytokines affect the ability of monoclonal antibodies to protect mice against *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun.** 69(10):6445-55, 2001.

8. BENHAM, R.W. Criptococci: their identification by morphology and by serology. **J. Infect. Dis.** 57: 255-274, 1935. Apud: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C; HEINZ-VACCARI, E. M. and MELO, N. T. Criptococose. In: Tratado de Micologia Médica 9ª Edição. São Paulo: Savier, p. 416-440, 2002.

9. BORRELLO, M. A. and PHIPPS, R. P. The B/Macrophage cell: an elusive link between CD5⁺ B lymphocytes and macrophages. **Immunol. Today** 17:471-475, 1996.

10. BOSE, I.; REESE, A.J.; ORY J.J.; JANBON, G. and DOERING TL. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryot Cell.** 2(4):655-63, 2003.

11. CARLSSON, L. and HOLMBERG, D. Genetic basis of the neonatal antibody repertoire: germline V-gene expression and limited N-region diversity. **Int Immunol.** (7):639-43, 1990.

12. CASSONE, A.; CONTI, S.; De BERNARDIS, F. and POLONELLI, L. Antibodies, killer toxins and antifungal immunoprotection: a lesson from nature? **Immunol. Today** 18(4):164-169, 1997.

13. CAVALCANTI, M.A.S. Criptococose sistêmica endêmica pela variedade *gattii* no meio norte do Brasil. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Piauí, 1997.

14. CLUMECK, N.; SONNET, J.; TAEIEMAN, H.; MASCART-LEMONE, F.; de BRUYERE, M.; VANDEPERRE, P.; DASNOY, J.; MARCELIS, L.; LAMY, M. and JONAS, C. Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. **N Engl J Med.** 310(8):492-7, 1984.

15. COX, G.M.; HARRISON, T.S.; McDADE, H.C.; TABORDA, C.P.; HEINRICH, G.; CASADEVALL, A. and PERFECT, J.R. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. ***Infect Immun.*** 71:173-80, 2003.
16. CUMANO, A.; PAIGE, C. J.; ISCOVE, N. N. and BRANDY, G. Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. ***Nature*** 356:612-615, 1992.
17. CURRIE, B.P. and CASADEVALL, A. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York City. ***Clin Infect Dis.*** 19(6):1029-33, 1994.
18. ELLIS, D. H. and PFEIFFER, T. J.. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. ***Lancet.*** 336; 923-925, 1990.
19. FELDMESSER, M.; TUCKER, S. and CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: intracellular or extracellular?. **TRENDS in Microbiology**. Vol.9 N°9:418-419, 2001.
20. FELDMESSER, M.; TUCKER, S. and CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: intracellular or extracellular?. **TRENDS in Microbiology**. Vol.9 N°6, 2001.
21. FERREIRA, A. W. and ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2° Edição. Guanabara Koogan, 2001. 443p.
22. FERREIRA, K. S. Modulação da ativação de células dendríticas por *Paracoccidioides brasiliensis*. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

23. FRANZOT, S.P.; SALKIN, I.F. and CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. **J Clin Microbiol.** 37(3):838-40, 1999.
24. GOMEZ, B.L. and NOSANCHUK, J.D. Melanin and fungi. **Curr Opin Infect Dis.** 16:91-6, 2003.
25. GU, H.; FORSTER, I. and RAJEWSKY, K. Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. **EMBO J.** 9(7):2133-40, 1990.
26. HARRISON, T. S. *Cryptococcus neoformans* and Cryptococcosis. **Journal of Infec.** 41; 12-17, 2000.
27. HAYAKAWA, K. and HARDY, R. R. Development and function of B-1 cells. **Current Opinion Immunol.** 12:346-353, 2000.
28. HAYAKAWA, K.; HARDY, R. R.; PARKS, D. R. and HERZENBERG, L. A. The Ly-1B cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. **J. Exp. Med.** 157:202-218, 1983.
29. HENDERSON, L.M.; MOULE, S.K. and CHAPPELL, J.B. The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. **FEBS Lett.** 211:157-162, 1993.
30. HERRING, A.C.; LEE, J.; MCDONALD, R.A.; TOEWS, G.B. and HUFFNAGLE, G.B. Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. **Infect Immun.** 70:2959-64, 2002.

31. HERZENBERG, L. A. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol. Rev.* 175:9-22, 2000.
32. HERZENBERG, L. A.; STALL, A. M.; LALOR, P. A.; SIDMAN, C.; MOORE, W. A. and PARKS, D. The Ly-1B cell lineage. *Immunol. Rev.* 93:81-102, 1986.
33. HERZENBERG, L. H. and KANTOR, A. B. B-cell lineages exist in the mouse. *Immunol. Today.* 14: 79-83, 1993.
34. HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:87-94, 1989.
35. HODGKIN, P.D.; GO, N.F.; CUPP, J.E. and HOWARD, M. Interleukin-4 enhances anti-IgM stimulation of B cells by improving cell viability and by increasing the sensitivity of B cells to the anti-IgM signal. *Cell Immunol.* 134(1):14-30, 1991.
36. HOERAUF, A.; SOLBACH, W.; LOHOFF, M. and ROLLINGHOFF, M. The Xid defect determines an improved clinical course of murine leishmaniasis in susceptible mice. *Int. Immunol.* 6:1117-1124, 1994.
37. HORTA, J.A.; STAATS, C.C.; CASALI, A.K.; RIBEIRO, A.M.; SCHRANK, I.S.; SCHRANK, A. and VAINSTEIN, M.H. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Med Mycol.* 40(6):565-71, 2002.
38. HUE, R.E. and PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.* 18:195-199, 1993.

39. KAWAKAMI, K; ZHANG, T.; QURESHI, M. H. and SAITO, A. *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide production by murine peritoneal macrophages stimulated with interferon-gamma and lipopolysaccharide. **Cell. Immunol.** 180: 47, 1997.
40. KAWAKAMI, K.; QURESHI, M.H.; ZHANG, T.; KOGUCHI, Y.; SHIBUYA, K.; NAOE, S. and SAITO, A. Interferon-gamma (IFN-g)-dependent protection and synthesis of chemoattractants for mononuclear leucocytes caused by IL-12 in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Clin. Exp. Immunol.** 117:113-122, 1999.
41. KIPNIS, A. P. J. Caracterização da infecção intraperitoneal de camundongos imunodeficientes, Balb.xid, com *Paracoccidioides brasiliensis*. (Tese de Doutorado) Universidade de São Paulo. São Paulo, 1998.
42. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C; HEINZ-VACCARI, E. M. and MELO, N. T. Tratado de Micologia Médica 9ª Edição. São Paulo: Savier, 2002. p. 1104.
43. LACAZ, C. da SILVA and RODRIGUES, M.C. Sorotipagem do *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Bras. Med.** 40:297-300, 1983.
44. LEVITZ, S.M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Rev Infect Dis.** 13(6):1163-9, 1991.
45. LEVITZ, S.M. *Cryptococcus neoformans*: intracellular or extracellular? **TRENDS in Microbiology**. Vol.9 N°6: 417-418, 2001.
46. LEVITZ, S.M. and FARRELL, T.P. Growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by cultured human monocytes: role of the capsule, opsonins, the culture surface, and cytokines. **Infect Immun.** 58(5):1201-9, 1990.

47. MARQUIS, G.; MONTPLAISIR, S.; PELLETIER, M.; MOUSSEAU, S. and AUGER, P. Genetic Resistance to Murine Cryptococcosis: Increased Susceptibility in the CBA/N XID Mutant Strain of Mice. *Infect Immun.* 47(1):282-287, 1985.
48. MARTIN, F. and KEARNEY, J.F. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Current Opinion Immunol.* 13:195-201, 2001.
49. MEDNICK, A.J.; FELDMESSER, M.; RIVERA, J. and CASADEVALL, A. Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis. *Eur. J. Immunol.* 33:1744-1753, 2003.
50. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Dados e pesquisa em DST e AIDS. Coordenação do programa nacional de DTS/AIDS. Brasília, 2002. (site: www.aids.gov.br).
51. MINOPRIO, P.; el CHEIKH, M.C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A. and O'GARRA A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J. Immunol.* 151: 4200-4208, 1993.
52. NATHAN, C.F. and ROOT, R.K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophage. Dependence on sequential activation and triggering. *J. Exp. Med.* 146:1648-1662, 1977.
53. 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.

54. ODA, L.M.; KUBELKA, C.F.; ALVIANI, C. S. and TRAVASSOS, L.R. Ingestion of yeast forms of *Sporothrix schenckii* by mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 39: 497-504, 1983.
55. O'GARRA, A.; CHANG, R.; GO, N.; HASTINGS, R.; HAUGHTON, G. and HOWARD, M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol.* 22(3):711-7, 1992.
56. O'GARRA, A. and HOWARD, M. Cytokines and Ly-1 (B1) B cells. *Int Rev Immunol.* 8(2-3):219-34, 1992.
57. O'GARRA, A. and HOWARD, M. IL-10 production by CD5 B cells. *Ann N Y Acad Sci.* 651:182-99, 1992.
58. PACIORKOWSKI, N.; PORTE, P.; SHULTZ, L.D. and RAJAN, T.V. B1 B lymphocytes play a critical role in host protection against lymphatic filarial parasites. *J. Exp. Med.* 191:731-736, 2000.
59. PALANIEL, V.; POSEY, C.; HORAUF, A.M.; SOLBACH, W.; PIESSENS, W.F. and HARN, D.A. B-cell outgrowth and ligand-specific production of IL-10 correlate with Th2 dominance in certain parasitic diseases. *Exp. Parasitol.* 84:168-177, 1996.
60. PAPPALARDO, M.C.S.M. Criptococose em Aids: estudo clínico e microbiológico em 35 pacientes acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, entre 1995 a 1997. (Dissertação de Mestrado) Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria da Saúde de São Paulo. São Paulo, 2002.
61. PAPPALARDO, M.C. and MELHEM, M.S. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 45(6):299-305, Epub 2004.

62. PIETRELLA, D.; FRIES, B.; LUPO, P.; BISTONI, F.; CASADEVALL, A. and VECCHIARELLI, A. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* can influence the outcome of the human immune response. **Cell. Microbiol.** 5(8):513-522, 2003.

63. 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.

64. RODRIGUES, M.R. Atividade peroxidásica em macrófagos ativados *in vivo* com concanavalina A (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

65. ROEDER, A.; KIRSCHNING, C.J.; RUPEC, R.A.; SCHALLER, M. and KORTING, H.C. Toll-like receptors and innate antifungal responses. **Trends Microbiol.** 12(1):44-9, 2004.

66. SANFELICE, F. Contributo alla morfologia I biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. Istituto d'Igiene della R. **Università di Cagliari**. 4: 463-498, 1894. Apud: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C; HEINZ-VACCARI, E. M. and MELO, N. T. Criptococose. In: Tratado de Micologia Médica 9º Edição. São Paulo: Savier, p. 416-440, 2002.

67. SANTANGELO, R.; ZOELLNER, H.; SORRELL, T.; WILSON, C.; DONALD, C.; DJORDJEVIC, J.; SHOUNAN, Y. and WRIGHT, L. Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model. **Infect Immun.** 72(4):2229-39, 2004.

68. SATO, T.; ISHIKAWA, S.; AKADEGAWA, K.; ITO, T.; YURINO, H.; KITABATAKE, M.; YONEYAMA, H. and MATSUSHIMA, K. Aberrant B1 cell migration into the thymus results in activation of CD4 T cells through its potent antigen-presenting activity in the development of murine lupus. *Eur. J. Immunol.* 34:1-13, 2004.
69. SEATON, R.A.; NARAQI, S.; WEMBRI, J.P. and WARRELL, D.A. Predictors of outcome in *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis. *QJM.* 89:423-428, 1996.
70. SEVERO, L.C. Criptococose: duas doenças? Porto Alegre (Tese de livre-docência apresentada à Fundação Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre) 1993.
71. SHOHAM, S.; HUANG, C.; CHEN, J.M.; GOLENBOCK, D.T. and LEVITZ, S.M. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- α release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol.* 166(7):4620-6, 2001.
72. SORREL, T.C. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Med. Mycol.* 39: 155-168, 2001.
73. STALL, A.M.; WELLS, S.M. and LAM, K.P. B-1 Cells: unique origins and functions. *Semin. Immunol.* 8: 45-59, 1996.
74. TABORDA, C.P. and CASADEVALL, A. CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity.* 16:791-802, 2002.

75. TABORDA, C.P.; RIVERA, J.; ZARAGOZA, O. and CASADEVALL A. More is not necessarily better: prozone-like effects in passive immunization with IgG. *J Immunol.* 170:3621-30, 2003.
76. TOHYAMA, M.; KAWAKAMI, K. and SAITO, A. Anticryptococcal Effect of Amphotericin B Is Mediated through Macrophage Production of Nitric Oxide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(8):1919-1923, 1996.
77. TOHYAMA, M.; KAWAKAMI, K.; FUTENMA, M. and SAITO, A. Enhancing effect of oxygen radical scavengers on murine macrophage anticryptococcal activity through production of nitric oxide. *Clin. Exp. Immunol.* 103(3):436-441, 1996.
78. TRAJKOVIC, V.; STEPANOVIC, S.; SAMARDZIC, T.; JANKOVIC, V.; BADOVINAC, V. and STOJKOVIC, M.M. *Cryptococcus neoformans* Neutralizes Macrophage and Astrocyte Derived Nitric Oxide without Interfering with Inducible Nitric Oxide Synthase Induction or Catalytic Activity – Possible Involvement of Nitric Oxide Consumption. *Scand. J. Immunol.* 51:384-391, 2000.
79. van der HORST, C.M.; SAAG, M.S.; CLOUD, G.A.; HAMILL, R.J.; GRAYBILL, J.R.; SOBEL, J.D.; JOHNSON, P.C.; TUAZON, C.U.; KERKERING, T.; MOSKOVITZ, B.L.; POWDERLY, W.G. and DISMUKES, W.E. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 337(1):15-21, 1997.
80. VECCHIARELLI, A.; PIETRELLA, D.; LUPO, P.; BISTONI, F.; McFADDEN, D.C. and CASADEVALL, A. The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation. *J Leukoc Biol.* 74(3): 370-8, 2003.

- 81.YODER, B.J. and GOODRUM, K.J. *Plasmodium chabaudi chabaudi*: B-1 cell expansion correlates with semiresistance in BALB/cJ mice. **Exp. Parasitol.** 98:71-82, 2001.
- 82.ZAMBONI, D.S. AND RABINOVITCH, M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. **Infect Immun.** 71(3):1225-33, 2003.
- 83.ZAR, J.H. Bioestatistical Analysis. 2^aed. New Jersey, Prentice Hall, p.718, 1984.