

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

DISSERTAÇÃO

**Influência de Linfócitos B-1 na Dinâmica de Leucócitos de
Animais Deficientes da Tirosina Quinase de Bruton (XID)**

Carolina de Albuquerque Correia

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**INFLUÊNCIA DE LINFÓCITOS B-1 NA DINÂMICA DE LEUCÓCITOS
DE ANIMAIS DEFICIENTES DA TIROSINA QUINASE DE BRUTON
(XID)**

CAROLINA DE ALBUQUERQUE CORREIA

Sob a orientação da Professora:
Débora Decoté Ricardo de Lima

e co-orientação do Professor:
Célio Geraldo Freire de Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C824i Correia, Carolina de Albuquerque, 1992-
 Influência de Linfócitos B-1 na Dinâmica de
Leucócitos de Animais Deficientes da Tirosina Quinase
de Bruton (XID) / Carolina de Albuquerque Correia. -
Seropédica, 2020.
 48 f.

 Orientadora: Débora Decoté Ricardo de Lima.
 Coorientador: Célio Geraldo Freire de Lima.
 Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Ciências Veterinárias, 2020.

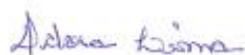
 1. Inflamação. 2. Imunomodulação. 3. Linfócitos B-1.
I. de Lima, Débora Decoté Ricardo, 1965-, orient. II.
de Lima, Célio Geraldo Freire, 1968-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Ciências Veterinárias. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

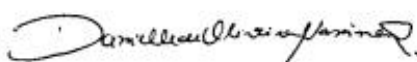
CAROLINA DE ALBUQUERQUE CORREIA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

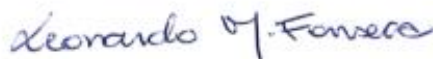
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/02/2020



Débora Decoté Ricardo de Lima. Dra. UFRRJ.
(Orientadora)



Danielle de Oliveira Nascimento. Dra. UFRRJ.



Leonardo Marques da Fonseca. Dr. UFRJ.

Lucia Helena Pinto da Silva. Dra. UFRRJ.

Herbert Leonel de Matos Guedes . Dr. UFRJ.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Débora Decoté Ricardo de Lima, pela oportunidade e orientação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Célio Geraldo Freire de Lima, pelo fornecimento dos equipamentos e materiais usados nos experimentos.

Às doutoras Isabel LaRocque, Luciana Conde e Jorgete Logullo, ao Dr. Raphael Francisco da Rocha, às mestrandas Joyce de Oliveira e Amanda Couto e à graduanda Julia Talarico Matos, pelo suporte nos experimentos.

Às técnicas do Laboratório de Imunologia e Virologia da UFRRJ, Renata Sant'Anna e Camila Campos, que, além de grandes amigas, contribuíram de maneira substancial para o nascimento desta dissertação.

Agradeço aos meus pais, Maria e Carlos Eduardo, pela minha vida, por me ensinarem a batalhar pelos meus sonhos e pelo incentivo na busca da realização desses, por mais loucos que sejam.

Aos meus irmãos, Daniel e Bruno, pelo amor mais puro que eu já senti e recebi, e pelos melhores abraços do mundo; e as minhas avós e avô, pelo amor e cuidado que sempre tiveram comigo.

Ao Leonardo, pela companhia de todos os dias.

À Profa. Dra. Themis Moura Cardinot, pela ajuda com o texto desta dissertação e pelo exemplo de superação, força e vontade de viver.

Aos meus amigos, Melissa, Terená, Eveliny, Bruna, Viviane, Drielly, Danilo, Thaisa, Jesus, Jefferson e Bruno, que me acompanham desde a graduação. Obrigada pela rede de apoio e pelas risadas, mesmo que estejamos fisicamente distantes.

Aos meus companheiros de laboratório, Paulo, Douglas e Raíssa, obrigada pelos conhecimentos compartilhados e momentos de descontração.

Agradeço a UFRRJ, por ter me acolhido e proporcionado momentos de convivência com pessoas incríveis. Escrevo mais um capítulo da minha história, com mais algumas marcas que o sol de Seropédica deixou no meu corpo e orgulhosa de ter cumprido mais uma missão acadêmica, principalmente em tempos tão sombrios para a ciência brasileira.

A todos os camundongos que contribuíram com suas próprias vidas para a realização dessa dissertação, meus agradecimentos e sinceras desculpas.

Ao CNPq e FAPERJ, pela bolsa de pesquisa e pelo fomento na execução desse projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

CORREIA, C.A. **Influência de Linfócitos B-1 na Dinâmica de Leucócitos de Animais Deficientes da Tirosina Quinase de Bruton (XID)**. Orientador: Débora Decoté Ricardo de Lima 2020. 36 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

A inflamação é uma reação fisiológica do organismo a um agente agressor e pode ser desencadeada por uma infecção e/ou por uma injúria. A fase aguda desse processo é uma resposta rápida e ocorre nos primeiros minutos e horas após o reconhecimento do patógeno. Sua resolução geralmente resulta na eliminação dos agentes infecciosos e reparo da arquitetura e função normais dos tecidos. A fase crônica se instaura quando as tentativas de restabelecimento da homeostase não são bem-sucedidas. Muitas vezes, apenas a ação dos fagócitos é suficiente para conter a inflamação, entretanto, se o estímulo nocivo perdurar, outros agentes do sistema imunológico são acionados, configurando a inflamação dentro da resposta adaptativa. As células dendríticas fazem a ligação entre a resposta imune inata e a adaptativa, pois são especializadas em processar e expor fragmentos dos antígenos para os linfócitos T. Esses, por sua vez, auxiliam na ativação de linfócitos B, que são células capazes de produzir e secretar anticorpos e formar células de memória. Os linfócitos B-1 constituem uma subpopulação de linfócitos B e têm como características a produção de anticorpos naturais, apresentação de antígenos aos linfócitos T e a liberação de várias citocinas, dentre elas a citocina anti-inflamatória IL-10. Assim, eles têm o potencial de modular a resposta inflamatória. Neste trabalho, nós avaliamos a dinâmica populacional dos leucócitos no sangue e na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e XID durante a resposta inflamatória aguda desencadeada por LPS. Para isso, usamos camundongos XID, cujo peritônio é um ambiente com pouquíssimos linfócitos B-1. Nossos resultados revelaram que os animais XID, espontaneamente, tem um número elevado de neutrófilos no sangue periférico e essa população fica ainda maior após a estimulação com LPS. Concomitantemente, altos níveis de IL-6 foram detectados. Além disso, a cavidade peritoneal desses animais também tem quantidade maior de neutrófilos, em comparação com camundongos BALB/c. Esse dado não sofre alteração após estimulação em nossas condições experimentais. Nos ensaios com fagócitos, observamos que o número de macrófagos capazes de fagocitar é estatisticamente igual entre BALB/c e XID, mas o número de leveduras internalizadas é menor no grupo XID LPS+IFN- γ . Isso sugere uma maior atividade microbicida dos macrófagos desses camundongos. Esse resultado é corroborado pela dosagem de nitrito no sobrenadante das culturas, na qual os macrófagos XID estimulados produziram mais óxido nítrico que o grupo controle. Nossos resultados, em conjunto, sugerem uma habilidade em desenvolver resposta inflamatória mais intensa nos camundongos XID em comparação com camundongos BALB/c, provavelmente devido a baixa produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Logo, nossa análise reporta pela primeira vez que camundongos XID possuem número aumentado na população de neutrófilos no sangue e cavidade peritoneal, quando comparado com BALB/c, indicando a importância dos linfócitos B-1 na modulação da resposta inflamatória e sugerindo que esses possam ser futuros alvos de investigações em estratégias de imunoterapia.

Palavras-chave: Linfócitos B-1, inflamação, modulação.

ABSTRACT

CORREIA, C.A. **Influence of B-1 Lymphocytes on the Leucocyte Dynamics of Bruton's Tyrosine Kinase Deficient animals (XID)**. Professor: Débora Decoté Ricardo de Lima 2020. 36 p. Dissertation (master's degree in Veterinary Sciences) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2020.

Inflammation is a physiological reaction of the body to an offending agent and can be triggered by infection and/or injury. The acute phase of this process is a rapid response and occurs in the first minutes and hours after pathogen recognition. Its resolution usually results in the elimination of infectious agents and repair of the normal tissue architecture and function. The chronic phase begins when attempts to restore homeostasis are unsuccessful. Often, the action of phagocytes is sufficient to contain inflammation, however, if the harmful stimulus lasts, other agents of the immune system are activated, configuring the inflammation within the adaptive response. Dendritic cells make the connection between the innate and adaptive immune responses, as they are specialized in processing and exposing fragments of antigens to T lymphocytes. These, in turn, assist in the activation of B-lymphocytes, which are cells capable of producing and secrete antibodies and form memory cells. B-1 lymphocytes are a subpopulation of B-lymphocytes, characterized by the production of natural antibodies, presentation of antigens to T lymphocytes and the release of various cytokines, including the anti-inflammatory cytokine IL-10. Thus, they have the potential to modulate the inflammatory response. In this work, we evaluated the population dynamics of leukocytes in the blood and in the peritoneal cavity of BALB/c and XID mice during the acute inflammatory response, triggered by LPS. Thus, we used XID mice, whose peritoneum is an environment with very few B-1 lymphocytes. Our results revealed that XID animals spontaneously have a high number of neutrophils in peripheral blood and this population is even greater after stimulation with LPS. Concomitantly, high levels of IL-6 were detected. In addition, the peritoneal cavity of these animals also has a greater amount of neutrophils, compared to BALB/c mice. This data does not change after stimulation in our experimental conditions. In phagocyte assays, we found out that the number of macrophages capable of phagocytosing is statistically equal between BALB/c and XID, but the number of internalized yeasts is lower in the XID LPS+IFN- γ group. This suggests an increased microbicidal activity of the macrophages of these mice. This result is corroborated by the dosage of nitrite in the culture supernatant, in which the stimulated XID macrophages produced more nitric oxide than the control group. Our results together suggest an ability to develop a more intense inflammatory response in XID mice compared to BALB/c mice, probably due to the impairment in the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Therefore, our analysis reports for the first time that XID mice have an increased number of neutrophil populations in the blood and peritoneal cavity when compared to BALB/c, indicating the importance of B-1 lymphocytes in modulating the inflammatory response and suggesting that these may be future targets of investigations in immunotherapy strategies.

Keywords: B-1 lymphocytes, inflammation, modulation.

LISTA DE ABREVIACES

APC	Células apresentadoras de antígenos
B-1CDP	Fagócitos derivados de células B-1
BALB/c	Linhagem de camundongo albino isogênico
BCR	Receptor de células B
BLIMP-1	Proteína indutora da maturaco de linfócitos B
Breg	Linfócitos B regulatórios
BTK	Tirosina quinase de Bruton
C57BL/6	Linhagem de camundongo isogênico
CBA	Linhagem de camundongo isogênico utilizado em experimentos de leucognese
CD	Grupo de diferenciao
Célula NK	Célula assassina natural
CEUA	Comissão de tica no uso de animais
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	cido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FACS	Classificador de células ativadas por fluorescência
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
Ly-1	Marcador de superfície (CD5)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NETs	Armadilhas extracelulares dos neutrófilos
NF- κ B	Fator de transcrio nuclear kappa B
NO	xido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos

PBS	Phosphate Buffered Saline
PtC	Fosfatidilcolina
RPM	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
sIgD	Imunoglobulina D de superfície
sIgM	Imunoglobulina M de superfície
TCD4	Linfócitos T CD4
Th1	Linfócito T auxiliador 1
Th17	Linfócito T auxiliador 17
TLR	Receptor semelhante ao Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alpha
VCAM-1	Proteína de adesão vascular 1
XID	Linhagem de camundongo isogênico deficiente em linfócitos B-1
XLA	Agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Linfócitos B-1	3
1.2 Desenvolvimento dos linfócitos B-1	5
1.3 Ativação dos Linfócitos B-1	6
1.4 Papel Imunomodulador dos Linfócitos B-1	6
1.4.1 Imunomodulação em doenças infecciosas	7
1.4.2 Imunomodulação em doenças inflamatórias	8
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Comitê de Ética	11
3.2 Caracterização Fenotípica dos Camundongos XID	11
3.3 Indução da Resposta Inflamatória	11
3.4 Coleta de Material para Análise	11
3.5 Leucometria	12
3.6 Ensaio de Fagocitose	12
3.7 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)	12
3.8 Dosagem de Citocinas	13
3.9 Citometria de Fluxo	13
3.10 Análise Estatística	13
4 RESULTADOS	14
4.1 Caracterização Fenotípica dos Camundongos XID	14
4.2 Dinâmica dos Leucócitos no Sangue Periférico de Camundongos BALB/C e XID Estimulados com LPS	15
4.3 Produção de Citocinas após Estimulação com LPS	17
4.4 Número Total de Células na Cavidade Peritoneal de Camundongos BALB/c e XID..	18
4.5 Contagem Diferencial das Células da Cavidade Peritoneal	18
4.6 Quantificação de Neutrófilos em Camundongos XID por Fenotipagem	20
4.7 Atividade Fagocítica de Macrófagos de Camundongos BALB/c e XID	21
4.8 Produção de Óxido Nítrico	23
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES	27

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS	34

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma reação fisiológica do organismo a uma injúria. Pode ser desencadeada por uma infecção ou por um dano nos tecidos e, na região afetada, apresentam-se os sinais de dor, calor, rubor e edema, com possibilidade de evoluir para a perda da função dos tecidos. Sua resolução geralmente é rápida, resultando na eliminação de agentes infecciosos, reparo tecidual e plena recuperação da função normal dos órgãos e de seus componentes (IQBAL *et al.*, 2016).

O reconhecimento de microrganismos potencialmente nocivos ao organismo é de fundamental importância para a manutenção da vida. Tal processo é realizado pelos macrófagos e mastócitos residentes nos tecidos ou por células epiteliais do hospedeiro, que detectam os componentes extracelulares comuns a diversos microrganismos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Sinais endógenos, como morte celular por necrose, tecidos danificados ou isquêmicos e eventos traumáticos também disparam sinais de alerta. Esses são os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que também ativam o processo de inflamação (TANG *et al.*, 2012).

A inflamação pode ser classificada como aguda ou crônica, dependendo do tempo de duração, dos mediadores e das células envolvidas. A fase aguda é uma resposta rápida e ocorre nos primeiros minutos e horas após o reconhecimento do patógeno. A fase crônica se estabelece quando o estímulo danoso não cessa após as tentativas de restabelecimento da homeostase (MEDZHITOV, 2008; RAJAEI *et al.*, 2018).

Nos momentos iniciais da resposta inflamatória aguda, o diâmetro dos vasos sanguíneos adjacentes a região lesionada aumenta e as células endoteliais dos capilares se afastam, favorecendo a infiltração de monócitos e neutrófilos nos tecidos afetados. Essas células são ativadas e recrutadas mediante a ação de fatores solúveis produzidos e liberados no local da inflamação (GIL, 2002; HAWIGER; ZIENKIEWICZ, 2019).

Os neutrófilos fazem parte do sistema imunológico inato e são um dos primeiros tipos celulares a chegarem no local da inflamação (NEMETH *et al.*, 2020). Quando maduros, possuem de 7 a 10µm de diâmetro, citoplasma repleto de grânulos e constituem a maior população de leucócitos circulantes em humanos (entre 50 e 70%). Em camundongos, compreendem de 12 a 25% dos leucócitos presentes no sangue (LIEW; KUBES, 2019).

Ao alcançarem o tecido afetado, os neutrófilos detectam e fagocitam patógenos e os destroem no interior dos fagolisossomos, através de oxidantes, proteases e da queda brusca do pH dentro dessas vesículas (KUBES, 2018). Outra estratégia é o lançamento das redes extracelulares dos neutrófilos (NETs), formadas pelo DNA, histonas e proteases dos neutrófilos que, ao serem lançados no meio extracelular, contribuem para a defesa do hospedeiro ao conter a propagação dos patógenos (MANFREDI *et al.*, 2018).

Os neutrófilos também podem modular a inflamação através da secreção de mediadores solúveis, como as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ e quimiocinas (IL-8), que recrutam outros neutrófilos e macrófagos para o sítio da inflamação (ZHANG *et al.*, 2018). O fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) desempenha papel central na regulação de expressão dos genes que codificam essas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de moléculas de adesão (VCAM-1 e ICAM-1), fatores de crescimento e enzimas como a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase (iNOS) (MAKAROV, 2000; VARELA *et al.*, 2018).

Muitas vezes, apenas a ação dos fagócitos é suficiente para a resolução do problema. O reparo tecidual é iniciado, restaurando a forma normal do tecido ou formando cicatrizes de tecido conjuntivo (FEEHAN; GILROY, 2019). Entretanto, se o estímulo nocivo não for eliminado, outros agentes do sistema imunológico entram em cena, configurando a

inflamação dentro da resposta adaptativa. Nesse contexto, os neutrófilos dão lugar a células que iniciam um combate específico e eficaz contra os microrganismos invasores. As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos profissionais (APC), portanto especializadas em processar e expor fragmentos dos antígenos para os linfócitos T. Dessa forma, estabelecem uma ponte entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (SAID; WEINDL, 2015). Os linfócitos T, por sua vez, auxiliam na ativação de linfócitos B, que são capazes de produzir e secretar anticorpos e formar células de memória. Se ainda assim a infecção ou o corpo estranho persistirem no organismo, um estado crônico de inflamação se instaura, muitas vezes levando a formação de granulomas e de tecidos linfoides terciários (MEDZHITOV, 2008). Portanto, novas estratégias visando ao controle da inflamação e de seus desdobramentos tem sido alvo de interesse de muitos trabalhos científicos, visto que o uso de fármacos convencionais, por vezes, não atende à demanda dos pacientes, devidos aos múltiplos efeitos colaterais.

Dessa forma, a modulação do processo inflamatório através de componentes do sistema imunológico desponta como uma alternativa promissora. Os linfócitos B-1, uma subpopulação de linfócitos B que reside nas cavidades serosas de camundongos, são capazes de secretar moléculas com ação moduladora, tanto da resposta inflamatória aguda, quanto crônica e representam uma estratégia alvo de imunomodulação (AZIZ *et al.*, 2015).

Os linfócitos B-1 apresentam muitas particularidades quando comparadas aos linfócitos B convencionais, como características fenotípicas, ontogênicas e funcionais únicas (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2006). O fenótipo dos linfócitos B-2 é CD19^{alto}, CD27^{baixo} e IgD de superfície (sIgD)^{alto} (TANAKA *et al.*, 2018). Por sua vez, os linfócitos B-1 são caracterizados pela expressão de CD45R (B220)^{baixo}, IgM de superfície (sIgM)^{alto}, sIgD^{baixo} e CD19^{alto}. Os linfócitos B-1 ainda podem ser subdivididos em B-1a e B-1b, de acordo com a expressão de CD5. Linfócitos B-1a expressam a molécula CD5, enquanto os B-1b, não a expressam (TUNG *et al.*, 2004).

Os leucócitos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos selvagens são linfócitos T (5-10%), macrófagos (30%) e linfócitos B (50-60%). As subpopulações de linfócitos B se dividem em B convencionais (26,3%) e B-1 (66,1%). Dentro da subpopulação B-1, 50,9% são B-1b e 26,4% B-1a (RAY; DITTEL, 2010). Mastócitos, neutrófilos e células NK também podem ser encontrados nesse microambiente (MEURER *et al.*, 2016; ARNARDOTTIR *et al.*, 2013; GONZAGA, 2011).

A deficiência de linfócitos B tem sido frequentemente associada a um comprometimento da imunidade no combate a infecções. Indivíduos portadores de agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X (XLA) apresentam uma mutação no gene responsável por codificar a tirosina quinase de Bruton (BTK), proteína essencial para o desenvolvimento e sobrevivência de linfócitos B (SINGH *et al.*, 2018). Logo, no contexto dessa doença herdada geneticamente, os anticorpos estão praticamente ausentes no soro, o que deixa o organismo suscetível a infecções bacterianas (SIMÃO-GURGE *et al.*, 2017).

Existe um modelo murino que apresenta um estado de vulnerabilidade semelhante à XLA que se manifesta em humanos. Os camundongos da linhagem BALB/c XID também apresentam mutação no gene responsável pela BTK e são quase completamente desprovidos de linfócitos B-1. Esses animais têm sido utilizados em muitos estudos que buscam elucidar a função dessas células em diversos modelos de infecção (MUKHOPADHYAY *et al.*, 1999; POPI *et al.*, 2008; ARCANJO *et al.*, 2017).

Em doenças inflamatórias e infecciosas, nas quais normalmente se observam padrões inflamatórios exacerbados, a presença de linfócitos B-1 parece exercer papel protetor, porém muitos aspectos necessitam ser esclarecidos. Pouco se sabe sobre a influência dessas células na dinâmica populacional em seus sítios de prevalência, nomeadamente o peritônio e a cavidade pleural, na ocorrência de um estímulo inflamatório. Conhecer esse aspecto pode

abrir novas frentes para o desenvolvimento de estratégias de imunoterapia para doenças inflamatórias de grande comprometimento, que prejudicam a qualidade de vida de muitas espécies animais.

1.1 Linfócitos B-1

Reconhecidos pela sua capacidade de secretar anticorpos e de apresentar antígenos aos linfócitos T, os linfócitos B podem ser classificados em duas subpopulações: linfócitos B-1 e linfócitos B-2 (ou convencionais). Entre essas, os linfócitos B-2 são os mais abundantes no organismo e estão presentes em órgãos linfoides secundários, como linfonodo e baço, para onde migram após sua gênese nas células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea (VALE *et al.*, 2015). Em contrapartida, os linfócitos B-1 compõem uma parte muito pequena do compartimento de células B (cerca de 2%) e residem preferencialmente na cavidade peritoneal e na pleura de camundongos adultos, onde sua população é mantida por autorrenovação (LALOR *et al.*, 1989; BAUMGARTH, 2017).

Entre a população de linfócitos B peritoneais, os linfócitos B-1 compreendem tipicamente 60 a 80% do seu número total. Todavia, a porcentagem de linfócitos B-1 pode apresentar uma diferença entre as linhagens de camundongos. Por exemplo, nos camundongos BALB/c, linfócitos B-1 constituem mais de 80% dos linfócitos B peritoneais, enquanto em CBA e C57BL/6 compõem 60 a 70%. Também existem diferenças nas proporções relativas entre B-1a e B-1b. Em camundongos BALB/c, a proporção de B-1a:B-1b é 2:1; enquanto, no CBA e na linhagem C57BL/6 a proporção é mais próximo de 1:1 (STALL *et al.*, 1996).

Desde a sua descoberta no início dos anos 80, os linfócitos B-1 tem intrigado cientistas em todo o mundo, devido a suas características peculiares. Hayakawa *et al.* (1983) descreveram-os como linfócitos “parte T e parte B”; pois, apesar de as células apresentarem todas as proteínas de superfície comuns aos linfócitos B-2, também expressavam CD5 (Ly-1, na época), marcador, até então, restrito a linfócitos T. Dentre suas outras particularidades, ao contrário dos linfócitos B convencionais, essa população não depende da ativação promovida por linfócitos T para iniciar a produção de anticorpos (HOFFMAN *et al.*, 2015) e mantem seu número estável por autorrenovação (HARDY; HAYAKAWA, 2015).

Com o passar dos anos e o aprimoramento das tecnologias de investigação científica, foi possível averiguar uma divisão entre os linfócitos B-1, delimitada pela expressão de CD5. Os dois tipos, B-1a (CD5⁺) e B-1b (CD5⁻) compartilham as mesmas características fenotípicas, exceto a expressão desse marcador de superfície (BAUMGARTH, 2011). Além da diferença fenotípica, os dois subtipos são distintos em relação à produção de anticorpos. O linfócito B-1a é responsável pela secreção de anticorpos naturais sem necessidade de exposição prévia ao antígeno, já o linfócito B-1b depende de um primeiro contato para complementar a defesa contra patógenos. (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2006).

Desse modo, através da produção espontânea de IgM, as subpopulações de linfócitos B-1 se mostram como uma importante fonte de anticorpos naturais e promovem uma primeira barreira de defesa contra microrganismos (Figura 1), antes mesmo desses serem capturados pelos fagócitos e apresentados aos linfócitos T (SAVAGE; BAUMGARTH, 2015). Os linfócitos B-1 também contribuem para o controle da microbiota intestinal e da proteção de mucosas, pois produzem IgA independentemente de estimulação prévia (MEYER-BAHLBURG, 2015).

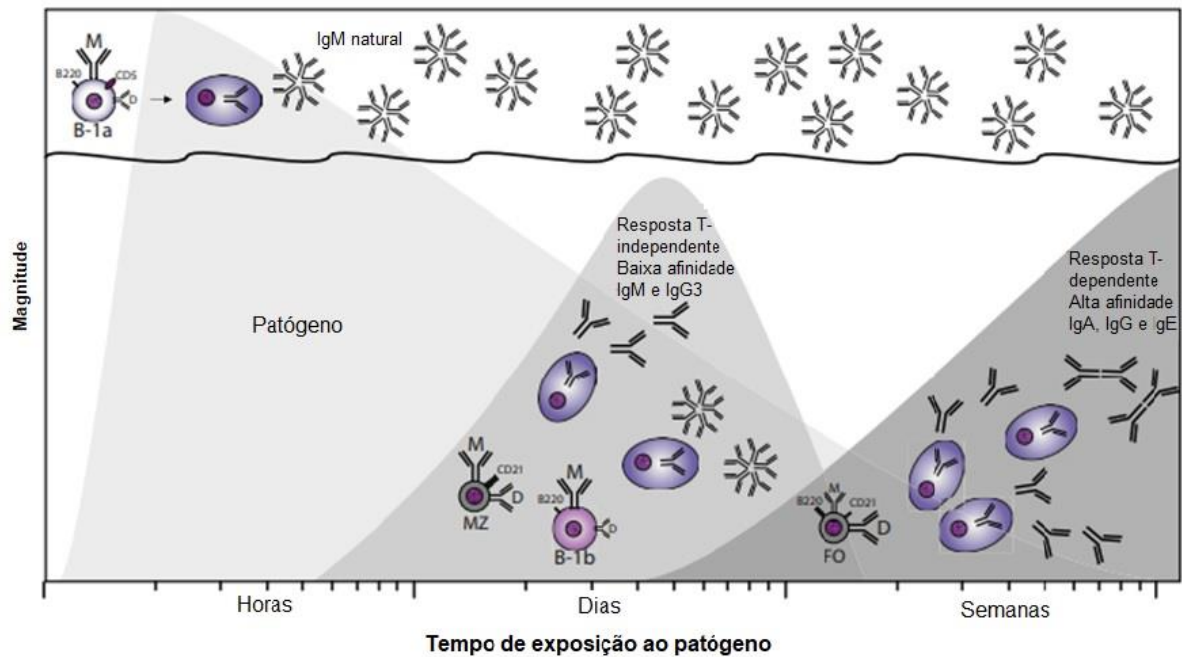


Figura 1. Produção contínua de anticorpos naturais por linfócitos B-1a. IgM natural é secretada espontaneamente pelos linfócitos B-1 independente de contato prévio com o patógeno ou de ativação por linfócitos T. Adaptado de VALE *et al.*, 2015.

Outra característica fascinante dos linfócitos B-1 é a sua plasticidade, uma vez que podem se diferenciar em células semelhantes a fagócitos (Figura 2), apesar de não serem descendentes de uma linhagem mielóide. Os fagócitos derivados de células B-1 (B-1CDP) são capazes de fagocitar antígenos opsonizados, produzem óxido nítrico (NO) e também atuam como bons apresentadores de antígenos para os linfócitos T. Além disso, os B-1CDP retém marcadores tanto da linhagem linfoide quanto da mielóide, que podem ser utilizados na sua identificação (LOPES; MARIANO, 2009). Sendo assim, os B-1CDP podem participar ativamente do processo inflamatório, migrando da cavidade peritoneal onde residem em direção aos focos da inflamação (POPI, 2015).

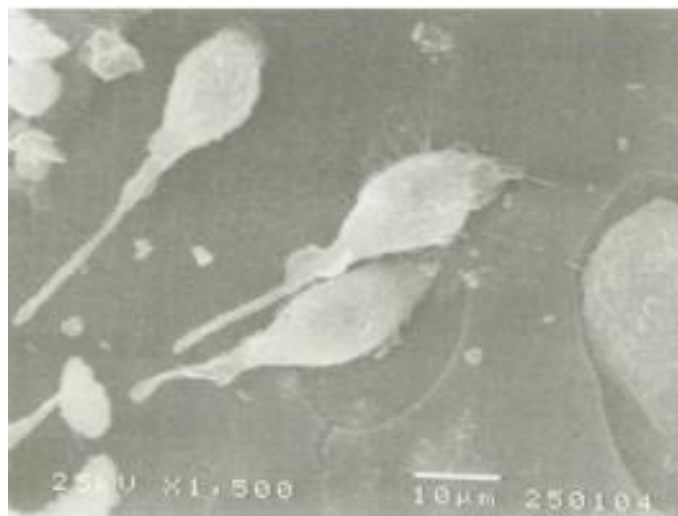


Figura 2. Fagócitos derivados de células B-1 (B-1CDP). Microscopia eletrônica evidenciando a morfologia dos B-1CDP (POPI *et al.*, 2015).

1.2 Desenvolvimento dos Linfócitos B-1

Depois da descoberta e caracterização fenotípica das células B-1, dois modelos foram propostos para explicar sua origem: modelo de linhagem e modelo de seleção (Figura 3).

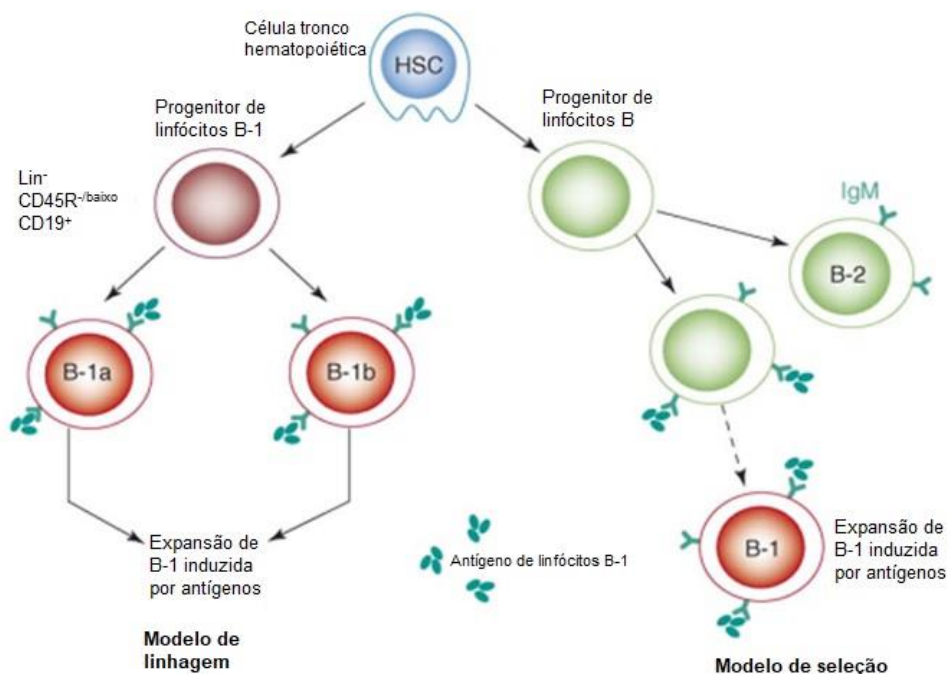


Figura 3. Modelos propostos para a origem e desenvolvimento dos linfócitos B-1. No modelo de linhagem, um progenitor específico de linfócitos B-1 dá origem a toda a população, antes mesmo da interação do seu BCR com os antígenos específicos. Em contrapartida, no modelo de seleção existe um progenitor comum a linfócitos B-1 e B-2 e o comprometimento com a linhagem B-1 ocorre somente após a expressão do BCR e sua interação com antígenos específicos de linfócitos B-1. Adaptado de MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2006.

O modelo de linhagem afirma que os linfócitos B pertencem a progenitores distintos, com o comprometimento para se tornarem B-1 ou B-2 já estabelecido antes da expressão do BCR. Em seu trabalho de revisão sobre o modelo de linhagem, Kantor e Herzenberg (1993) propuseram a teoria do sistema imunológico em camadas, no qual as linhagens separadas de progenitores de B-1 e B-2 surgem em tempos diferentes durante o desenvolvimento do camundongo. Segundo esse modelo, com algumas adições, os linfócitos B-1 aparecem durante as primeiras semanas da embriogênese dos camundongos, a partir de células progenitoras presentes no saco vitelínico e na esplancnopleura, que têm a habilidade de diferenciação em B-1, mas não em B-2. Logo, pode-se inferir que a linfopoiese, a partir desses tecidos embrionários, configura uma primeira onda de desenvolvimento de linfócitos B-1, que ocorre antes do surgimento dos progenitores de B-2. A atividade dos progenitores linfoides comuns, que se diferenciam tanto no compartimento B-1, quanto em linfócitos B-2, é característica da segunda onda de formação dos linfócitos B. Essa parte do desenvolvimento é realizada no fígado e na medula óssea fetal. Portanto, ao nascer, o camundongo já tem praticamente toda a sua população de linfócitos B-1 formada. Apesar disso, a produção de B-1 não é completamente interrompida após o nascimento, pois ainda há atividade linfopoética na medula óssea dos neonatos. Todavia, seu número é reduzido proporcionalmente a cada semana pós-nascimento, conforme outras populações de linfócitos vão se estabelecendo. Na fase adulta, a população de linfócitos B-1 se mantém majoritariamente por autorrenovação (MONTECINO-RODRIGUEZ; DORSHKIND, 2012).

O segundo modelo proposto para explicar a origem dos linfócitos B-1, o modelo de seleção, estabelece que os progenitores comuns de ambas linhagens de linfócitos B são

instruídos pelo BCR, já formado, a se diferenciarem em B-1 ou B-2, dependendo do reconhecimento de antígenos próprios e de antígenos de microrganismos e da interação com linfócitos T (HAUGHTON *et al.* 1993). Apesar de ser, notadamente, uma visão alternativa ao modelo de linhagem, o modelo de seleção não exclui a possibilidade do comprometimento das células progenitoras antes da constituição do BCR.

1.3 Ativação dos Linfócitos B-1

Os linfócitos B são capazes de reconhecer os antígenos capturados pelas APC através de seu BCR. Quando isso ocorre, uma sequência de reações bioquímicas promove rearranjos estruturais no citoesqueleto dessas células, permitindo que o antígeno seja internalizado e processado, visando a apresentação para as células T auxiliares (TOLAR, 2017). Em uma resposta T-dependente, os linfócitos B-2 começam a proliferar após sua ativação e ocasionalmente trocam o isotipo de sua imunoglobulina. Podem se diferenciar em células secretoras de anticorpos (plasmócitos), que migram para a medula óssea, onde oferecem proteção ao hospedeiro através da secreção contínua de anticorpos ou de células de memória. Esses linfócitos B de memória circulam pelos vasos sanguíneos por semanas, ou até mesmo por anos, até encontrar o antígeno para o qual seu BCR é específico. Quando isso acontece, promovem uma resposta muito mais rápida e eficaz contra esse mesmo antígeno conferindo, assim, uma proteção de longo prazo ao organismo (TREANOR, 2012).

Os linfócitos B-1 não se multiplicam através da estimulação específica do BCR, portanto, estímulos independentes do BCR podem ocorrer via citocinas, contato com bactérias ou agonistas de TLR. Esses sinais promovem a emigração instantânea de linfócitos B-1 da cavidade peritoneal para o omento, linfonodos adjacentes ao peritônio, lâmina própria do intestino ou para o baço. A ativação induz a secreção de IgM e IgA que protegem o hospedeiro de patógenos presentes na corrente sanguínea ou nas mucosas (BAUMGARTH, 2011).

A proteína indutora da maturação de linfócitos B (BLIMP-1) é considerada chave na regulação da diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Os linfócitos B-2 expressam BLIMP-1 durante sua ativação e diferenciação em células produtoras de anticorpos, característica compartilhada com linfócitos B-1 ativados, que produzem altas concentrações de IgM natural a partir da medula óssea e baço dos camundongos (BAUMGARTH, 2011).

1.4 Papel Imunomodulador dos Linfócitos B-1

Por muito tempo a contribuição dos linfócitos B-1 foi relacionada apenas à produção de anticorpos naturais, mas, com o avanço das pesquisas, ficou claro que eles participam da modulação de diversos fenômenos imunológicos. O papel dos anticorpos naturais não se limita a contenção de organismos potencialmente patogênicos. Eles também são responsáveis pelo reconhecimento e remoção de células apoptóticas pelas células dendríticas, devido a sua afinidade com compostos resultantes da degradação celular, por exemplo, fosfatidilcolina (PtC), fosforilcolina e malondialdeído. Portanto, ao auxiliar na “limpeza” de debris celulares, os anticorpos secretados pelos linfócitos B-1 evitam o desencadeamento de resposta inflamatória nos tecidos (BAUMGARTH, 2013).

Uma maneira alternativa de controle do processo inflamatório é a regulação da atividade dos macrófagos, haja vista que os linfócitos B-1 são fonte da citocina anti-inflamatória IL-10. Nesse contexto, os fagócitos de camundongos normais têm a produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (fundamentais no combate a microrganismos) reduzida em comparação com os animais XID, que são deficientes em linfócitos B-1. Em contrapartida ao seu papel regulatório, quando a intenção é impedir uma resposta inflamatória exacerbada, a

liberação de IL-10 pode ter papel permissivo nas infecções, devido a supressão da resposta dependente de linfócitos T e da ação dos macrófagos (POPI *et al.*, 2004).

Além da produção de anticorpos naturais e de citocinas que modulam a inflamação, os linfócitos B-1 também são bons apresentadores de antígenos para os linfócitos T. A capacidade de promover a proliferação de linfócitos T é corroborada pela expressão de MHC classe II, CD80 e CD86 na membrana de linfócitos B-1. A interação entre essas células induz, na maioria dos casos, um perfil pró-inflamatório (Th1 ou Th17) nos linfócitos T ativados (POPI *et al.*, 2016).

Apesar de bem estabelecida em camundongos, a existência da subpopulação B-1 em humanos permanece sob intenso debate. Griffin *et al.* (2011a) identificaram uma população de linfócitos B, presentes no cordão umbilical e no sangue periférico humano, caracterizadas pelo fenótipo CD20⁺ CD27⁺ CD43⁺ CD70⁻. Essas células produzem anticorpos naturais e são boas apresentadoras de antígenos para os linfócitos T, portanto, foram apontadas como prováveis homólogas dos linfócitos B-1 encontrados nas cavidades serosas dos camundongos.

Griffin *et al.* (2011b), dividiram os supostos linfócitos B-1 humanos em duas subpopulações, usando a expressão do marcador CD11b como fator diferencial. Morfologicamente idênticas, a principal distinção é em relação a função, uma vez que as células CD11b⁻ são especializadas na secreção de IgM natural e as CD11b⁺ são melhores apresentadoras de antígenos para os linfócitos T, visto que também expressam a molécula co-estimulatória CD86. Apesar de sua influência na proliferação dos linfócitos T, os linfócitos B-1 CD11b⁺ também produzem de maneira espontânea a citocina IL-10, conhecida por sua função anti-inflamatória e supressora da ativação de linfócitos T (GRIFFIN; ROTHSTEIN, 2012). A relação entre esses dois tipos celulares também se reflete na defesa primária contra microrganismos na cavidade peritoneal humana, uma vez que linfócitos T CD4⁺ CD49^{alto} presentes nesse sítio auxiliam os linfócitos B-1 na produção de anticorpos. Porém, os autores desse estudo consideram que marcadores mais confiáveis para esse tipo de linfócitos T devam ser estudados (LEE *et al.*, 2018).

Embora os supostos linfócitos B-1 humanos não sejam idênticos fenotipicamente aos murinos, eles desempenham funções muito semelhantes nos quesitos defesa inata contra patógenos invasores e na “limpeza” de debris celulares. Também foi estabelecido que os linfócitos B-1 encontrados em humanos também declinam sua produção de anticorpos conforme a idade avança, aumentando a suscetibilidade a infecções em indivíduos idosos (ROTHSTEIN *et al.*, 2013).

1.4.1 Imunomodulação em doenças infecciosas

As características imunomodulatórias dos linfócitos B-1 despertaram o interesse dos pesquisadores sobre como elas podem ajudar na proteção contra diversos patógenos. Pesquisas sobre o papel das citocinas e dos anticorpos naturais liberados pelos linfócitos B-1 mostraram que a presença desses pode ser tanto benéfica, quanto promover uma evolução indesejada da infecção.

O gênero *Influenza* é o principal responsável pela gripe em mamíferos e, durante o curso da infecção, os anticorpos naturais secretados pelos linfócitos B-1 auxiliam na eliminação desses vírus em camundongos. A partir dos linfonodos adjacentes ao sistema respiratório dos animais, a produção de IgM confere uma proteção local de maneira não específica, independente de ativação pelos linfócitos T (CHOI; BAUMGARTH, 2008). Entretanto, para o grupo dos Gamaherpesvírus, os linfócitos B-1b se mostraram mais propensos a infecção do que os linfócitos B-1a e macrófagos peritoneais (REKOW *et al.*, 2016).

Em casos de pneumonia causada pela bactéria *Streptococcus pneumoniae*, a presença de B-1 é benéfica. Essas células migram da cavidade peritoneal para o parênquima pulmonar e nesse ambiente os anticorpos naturais, mantidos em sua estrutura original, protegem o organismo (HAAS *et al.*, 2005). Em contrapartida, em relação a bactéria *Franciscella tularensis*, o linfócito B-1 permite o desenvolvimento da infecção. Isso ocorre devido a produção de IL-10, citocina que favorece uma condição anti-inflamatória na qual as cepas virulentas podem se multiplicar (CRANE *et al.*, 2013).

Nas infecções por protozoários do gênero *Leishmania*, a ação dos linfócitos B-1 atrapalha a resolução clínica. Em modelos experimentais com *Leishmania major* foi constatado o aumento no número da forma amastigota dentro dos macrófagos infectados e esse fato foi atribuído a produção de IL-10 pelos linfócitos B-1 (ARCANJO *et al.*, 2017a). Tendo em vista que os fagócitos são os principais tipos celulares infectados por *Leishmania*, demonstrou-se que B-1CDP é mais suscetível ao parasito do que macrófagos peritoneais (ARCANJO *et al.*, 2015). Em concordância com os relatos anteriores, os macrófagos peritoneais dos camundongos XID (deficientes em linfócitos B-1) são mais resistentes a infecção por *Leishmania infantum chagasi* (ARCANJO *et al.*, 2017b). Portanto, pode-se inferir que os fagócitos dos camundongos de fenótipo selvagem são mais suscetíveis a leishmaniose.

A permissibilidade dos macrófagos peritoneais e dos B-1CDP também pode ser observada na doença de Chagas. Os animais XID se mostram mais resistentes à invasão de seus macrófagos pelo *Trypanosoma cruzi*, controlando a parasitemia e os sintomas clínicos da fase crônica da doença (MINOPRIO *et al.*, 1993; ROCHA *et al.*, 2019).

No combate ao fungo *Encephalitozoon cuniculi*, os animais BALB/c se mostraram mais resistentes que os XID, sendo constatada a ausência de sintomas no primeiro grupo; porém, no segundo foram observadas graves lesões teciduais e alta concentração de fungos nas amostras. Todavia, animais XID repopulados com linfócitos B-1 conseguiram controlar a infecção (COSTA *et al.*, 2016). Em estudos com *Paracoccidioides brasiliensis*, outra espécie fúngica, a atividade fagocítica dos macrófagos foi diminuída pela ação dos linfócitos B-1 através da ativação de linfócitos T regulatórios e da produção de IL-10 e TGF- β (POPI, 2008; NOAL *et al.*, 2016).

Tendo em vista seu potencial envolvimento na defesa contra patógenos de diversos reinos, os linfócitos B-1 merecem uma atenção especial. Por isso, mais pesquisas devem ser encaminhadas para elucidar seu papel imunomodulador, uma vez que esse pode ter ação protetora ou favorecer a extensão dos danos causados pelas doenças infecciosas.

1.4.2 Imunomodulação em doenças inflamatórias

A ambiguidade das funções dos linfócitos B-1, principalmente no que tange a produção de IgM natural autorreativa e de citocinas anti-inflamatórias, levantou suspeitas sobre o papel dessas células no desenvolvimento de doenças autoimunes.

A falha nos mecanismos de produção de IL-10 leva a um perfil pró-inflamatório no organismo. Nos casos de lúpus eritematoso sistêmico é evidente a redução da população de linfócitos B regulatórios (Breg), levando a ação de respostas Th1 e comprometendo o equilíbrio da resposta inflamatória nos animais (MORRIS *et al.*, 2019). A inflamação exacerbada nos tecidos das articulações leva ao desenvolvimento da artrite reumatóide. Nesse contexto, os linfócitos B-1 proliferam, migram para os sítios inflamados e pioram o quadro através da ativação de osteoclastos (DENG *et al.*, 2016).

Devido a sua propensão a autoimunidade e ao seu local de residência nos camundongos, a suspeita de que os linfócitos B-1 possam ter papel no desenvolvimento da diabetes do tipo 1 foi levantada (RYAN *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que existe uma

correlação entre a apresentação de antígenos das ilhotas pancreáticas pelos linfócitos B-1 e a infiltração de linfócitos TCD4⁺ autorreativos, aumentando a inflamação no pâncreas (CHAMBERLAIN *et al.*, 2014).

Diante dos relatos apresentados na literatura que sugerem a conexão dos linfócitos B-1 a afecções inflamatórias, o presente trabalho visa a contribuir com informações sobre o papel imunomodulador dos linfócitos B-1 sobre a dinâmica populacional dos leucócitos de camundongos BALB/c e XID, frente a um estímulo inflamatório agudo, desencadeado pela inoculação de lipopolissacarídeo (LPS).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel imunomodulador de linfócitos B-1 através do estudo da dinâmica das populações de leucócitos de camundongos BALB/c e XID frente a um estímulo inflamatório agudo.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Determinar o percentual das populações de células da cavidade peritoneal e sangue periférico de camundongos BALB/c e XID;
- ii. Quantificar a produção de citocinas no soro de camundongos BALB/c e XID;
- iii. Avaliar a capacidade fagocítica de macrófagos isolados de camundongos BALB/c e XID;
- iv. Verificar a produção de óxido nítrico (NO) de macrófagos isolados de camundongos BALB/c e XID.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro sob o número 9230100418 e na CEUA da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) sob o número IBCF 062/14.

Foram utilizados camundongos BALB/c provenientes do Biotério da UFRRJ e BALB/c XID provenientes do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ), com idades entre 8 e 10 semanas, de ambos os sexos. Alimento e água foram oferecidos livremente. Importante ressaltar que os camundongos foram mantidos em ambientes adequados, com enriquecimento ambiental e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Caracterização Fenotípica dos Camundongos XID

A caracterização fenotípica dos camundongos XID foi feita regularmente para nos certificarmos do padrão do percentual de células B-1 no peritônio desses animais, como garantia de qualidade. Para isso, utilizamos células totais do lavado peritoneal. Os camundongos XID foram submetidos à eutanásia com utilização de Isoflurano. Logo após foi injetado 5 mL de PBS gelado na cavidade peritoneal e em seguida o PBS foi recolhido, centrifugado e as células obtidas foram ressuspensas em meio DMEM com 2 mmol/L de glutamina, 50 µmol/L de 2-ME, 10 µg/mL de gentamicina, 1 mmol/L de piruvato de sódio, 100 µmol/L de MEM aminoácidos não essenciais e 10% de soro bovino fetal (SBF) da Gibco. A concentração de células foi ajustada (10^6) e, em seguida, incubadas em tampão de bloqueio (FC Block-BD Pharmigen) por 30 minutos. Logo após, as células foram marcadas com os anticorpos: rato anti-camundongo IgM-FITC e rato anti-camundongo CD11bAPC por 30 minutos no gelo e protegido da luz e, finalmente, analisadas em citômetro de fluxo FACSscan.

3.3 Indução da Resposta Inflamatória

Os camundongos BALB/c e XID receberam um inóculo intraperitoneal de 10 µg de lipopolissacarídeo (LPS - *Escherichia coli* serotype O26:B6, 90–99% pure; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Animais não inoculados foram utilizados como grupo controle.

Após 16 horas, os animais foram eutanasiados por inalação com Isoflurano e deslocamento cervical, como descrito no protocolo aprovado pela CEUA/IV/UFRRJ e CEUA/ IBCCF/UFRJ.

3.4 Coleta de Material para Análise

Após a eutanásia, o sangue de cada animal foi coletado por punção intracardíaca e centrifugado. O soro resultante foi congelado no freezer a -80°C para posterior análise.

A obtenção de células da cavidade peritoneal foi realizada através do lavado. A exposição do peritônio foi seguida de injeção de 5 mL de meio RPMI suplementado e gelado. Seringa e agulha foram utilizadas para a retirada do meio contendo as células. Após a extração, o lavado foi centrifugado.

3.5 Leucometria

Parte do sangue recolhido por punção intracardíaca foi utilizada para o preparado de distensões em lâmina e corado por panótico rápido (Laborclin). Posteriormente, a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em microscópio óptico (Olympus) em aumento final de 1000x.

A suspensão celular obtida do lavado peritoneal foi centrifugada, como previamente estabelecido (item 3.4), e o sobrenadante foi dispensado. O *pellet* de células formado no fundo do tubo foi ressuspensionado em 2 mL de meio RPMI com 10% de SBF (Gibco) e a contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Tripán para diferenciação de células viáveis. Após a contabilização, 150 μ L de células foram à citocentrífuga (CT-2000-Cientec). As lâminas contendo os citocentrifugados foram coradas por panótico rápido (Laborclin) e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em microscópio óptico (Olympus), com lente objetiva de 100x.

3.6 Ensaio de Fagocitose

Os macrófagos utilizados nesse ensaio foram isolados a partir do lavado peritoneal de 3 camundongos BALB/c e 4 camundongos XID. A decisão de juntar as amostras de cada animal e de usar um camundongo XID a mais foi tomada devido à baixa recuperação de células do lavado peritoneal desses animais. A viabilidade celular foi averiguada através da coloração por Azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, 2×10^5 células foram adicionadas em placa de 24 poços (Costar), alocada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 4 horas.

Após esse ínterim, o meio contendo as células não aderidas foi removido e os poços foram lavados três vezes com PBS 1x. O meio foi repostado na quantidade inicial (500 μ L) nos poços controle e 460 μ L de meio, mais 20 μ L de LPS (400ng/mL) e 20 μ L interferon gama (INF- γ) (2ng/mL) foram adicionados nos demais poços. A placa retornou para a estufa e ficou incubada por aproximadamente 16 horas.

No dia seguinte, leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* foram homogeneizadas e as células viáveis foram contadas na câmara de Neubauer, após a coloração com Azul de Tripán. Então, 2×10^6 leveduras foram adicionadas à placa e o tempo de incubação foi de 4 horas em estufa. Em seguida, os poços foram novamente lavados por três vezes e as lamínulas de vidro foram retiradas dos poços e coradas com panótico rápido (Laborclin). A contagem das leveduras internalizadas pelos macrófagos foi realizada em microscópio óptico (Olympus), com lente objetiva com aumento de 100x.

3.7 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico foi avaliada indiretamente através da medida de nitrito no sobrenadante das culturas celulares. Para isso, macrófagos isolados como descrito acima (item 3.4) foram cultivados e incubados em intervalos de 4, 6, 8, 12 e 24 horas na presença de 400 ng/mL de LPS e 2ng/mL de IFN- γ . Ao término de cada tempo de incubação, 50 μ L do sobrenadante foram recolhidos e adicionados a uma placa de 96 poços, onde duas curvas de diluição seriada de nitrito de sódio (12 μ M e 8,33 μ M) também foram acrescentadas. Antes da realização da leitura, 50 μ L de cada uma das soluções de Griess (solução A: sulfanilamida 1% e ácido ortofosfórico 5%; solução B: N-(1-naphthyl)-ethylendiamin 0,1% - Sigma) foram adicionadas ao sobrenadante previamente recolhido e também às curvas de nitrito de sódio. O leitor de microplacas Spectramax M3 foi utilizado para a leitura da placa, com filtro de 570 nm.

3.8 Dosagem de Citocinas

O soro obtido a partir da punção intracardíaca dos animais foi empregado na dosagem das citocinas IL-6 e TNF- α . A técnica de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA - Kit Peptotech) foi executada em protocolo de três dias.

No primeiro dia, foram adicionados 50 μ L de cada anticorpo de captura, diluído em PBS 1x, nos poços de uma placa de 96 poços com fundo reto, própria para ELISA (Costar). A placa foi vedada e alocada em geladeira da noite para o dia.

No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes com PBS 1x + Tween 0,02% (Merck) e o bloqueio realizado com 50 μ L de PBS 1x + BSA 1% por poço, em temperatura ambiente, por uma hora e meia. O preparo da curva foi feito com os anticorpos padrão diluídos em 5mL de diluente (PBS 1x + BSA 0,1%) e 100 μ L desse preparo foram adicionados no primeiro poço das curvas. Os demais poços foram preenchidos com 50 μ L de PBS 1x e fizemos diluição seriada. As amostras de soro foram alocadas nos poços, no volume de 50 μ L, e a incubação foi de um dia para o outro.

No terceiro dia, a placa foi lavada três vezes e 50 μ L dos anticorpos de detecção diluídos foram adicionados, aguardamos duas horas. Após esse intervalo, 50 μ L de avidina (concentração 1:2000) foram dispostos nos poços, permanecendo durante trinta minutos. A placa foi novamente lavada e 50 μ L de substrato (Life Technologies) foram adicionados e observamos os poços até que eles adquirissem cor azulada. Antes que o tom azulado ficasse muito forte, adicionamos 25 μ L de solução de parada (H₃PO₄). A leitura da placa foi realizada em leitor de microplacas Spectramax M3, com filtro de 405 nm.

3.9 Citometria de Fluxo

Essa técnica foi utilizada para a determinação da fenotipagem de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos.

O lavado peritoneal foi realizado conforme descrito no item 3.4. Em uma placa de 96 poços de fundo reto (Costar), 150 μ L de tampão FACS (PBS 1x + 3% SFB + 0.02% azida) foram adicionados nos poços utilizados para a incubação da amostra com os anticorpos. As amostras foram adicionadas (20 μ L) e a placa foi centrifugada. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 100 μ L da solução de bloqueio (PBS 1x + 1% soro de camundongo + 2% SFB) e a placa permaneceu durante 15 minutos em gelo.

Durante esse intervalo, as soluções contendo os anticorpos foram preparadas, utilizando 390 μ L de tampão FACS e 1,95 μ L de anticorpo anti-Ly6G (Cy5 PE) e anti-F480 (APC).

Decorrido o período de incubação com o bloqueio, a solução contendo os anticorpos foi adicionada, seguida de 45 minutos de incubação. A leitura das amostras foi realizada no equipamento FACS Calibur e a análise dos resultados foi efetuada através do programa Flowing Software 2.

3.10 Análise Estatística

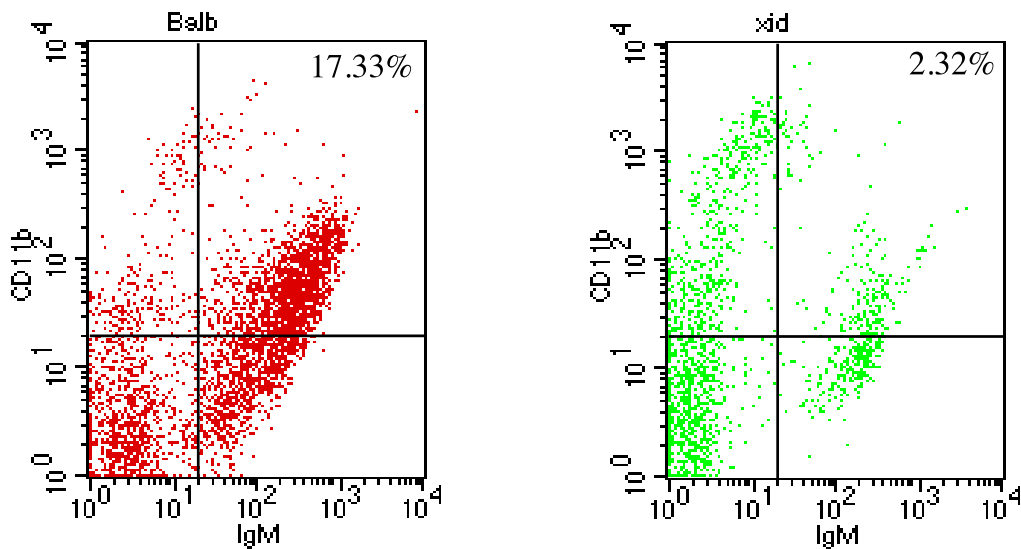
Os dados dos experimentos passaram pelo teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) para amostras não pareadas e pelo pós-teste de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Análises mostrando $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização Fenotípica dos Camundongos XID

Dentro do fenótipo BALB/c, uma mutação da tirosina quinase de Bruton (BTK) deu origem ao camundongo XID. A mutação na BTK interfere na habilidade desses animais produzirem de forma eficiente a subpopulação de linfócitos B-1, além de apresentarem uma leve diminuição de linfócitos B-2. Independente do fato da mutação ser estável, é recomendado como boa prática de laboratório a checagem periódica da porcentagem de linfócitos B-1 na cavidade peritoneal desses animais. Animais considerados bons padrões de XID não devem apresentar mais que 5% de linfócitos B-1, que normalmente constituem uma das populações majoritárias no peritônio. Para a checagem de rotina, usamos anticorpos anti-IgM e anti-CD11b e, através da análise por citometria de fluxo (Figura 4), pudemos quantificar os linfócitos B-1. Nossos animais apresentam 2.3% de linfócitos B-1 na cavidade peritoneal, o que consideramos um excelente padrão.

A)



B)

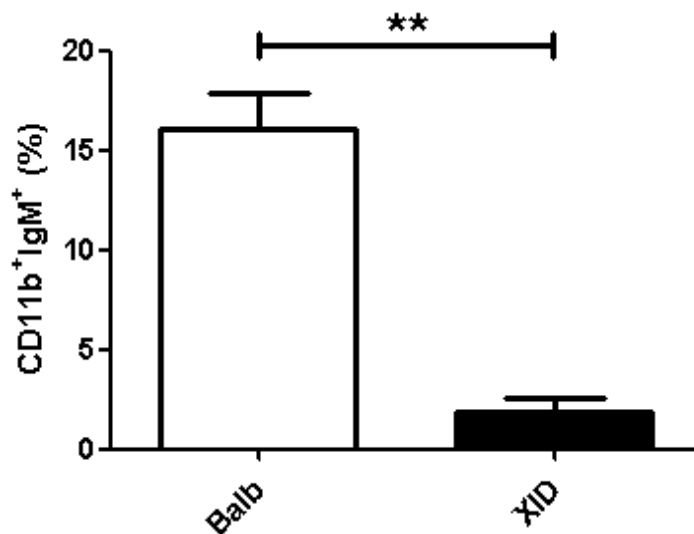


Figura 4. Análise fenotípica padrão dos camundongos XID. (A) Gráficos de dispersão gerados a partir da análise por citometria de fluxo das células totais obtidas por lavado peritoneal de camundongos BALB/c e camundongos XID. Previamente à análise, a concentração foi ajustada para 10^6 /mL e as células foram incubadas com tampão de bloqueio e marcadas com anticorpos anti-IgM e anti- CD11b. O quadrante superior direito mostra a porcentagem de células duplamente marcadas que representam a população de linfócitos B-1. (B) Quantificação gráfica da porcentagem de células duplamente marcadas que representam a população de linfócitos B-1. Resultados representativos de três análises independentes.

4.2 Dinâmica dos Leucócitos no Sangue Periférico de Camundongos BALB/C e XID Estimulados com LPS

Para identificar possíveis diferenças nas populações de leucócitos entre camundongos BALB/c e camundongos deficientes em linfócitos B-1 (XID), realizamos uma contagem diferencial em lâminas de distensão do sangue periférico, coradas pelo método panótico rápido.

Nossos resultados mostraram que, nos animais BALB/c, a população mais numerosa é de linfócitos, seguida pela de monócitos e, em menor número, neutrófilos e eosinófilos (Figuras 5A e 5B, respectivamente para animais sem e com estimulação com LPS). Nos XID sem LPS, depois da população de linfócitos, observamos maior porcentagem de neutrófilos (Figura 5C). Já para os XID estimulados com LPS, a população de neutrófilos foi ainda maior que a observada para linfócitos (Figura 5D). Ao comparar a população de neutrófilos nos dois grupos de animais, confirmamos que os camundongos XID possuem maior população dessas células que os camundongos BALB/c (Figura 5E).

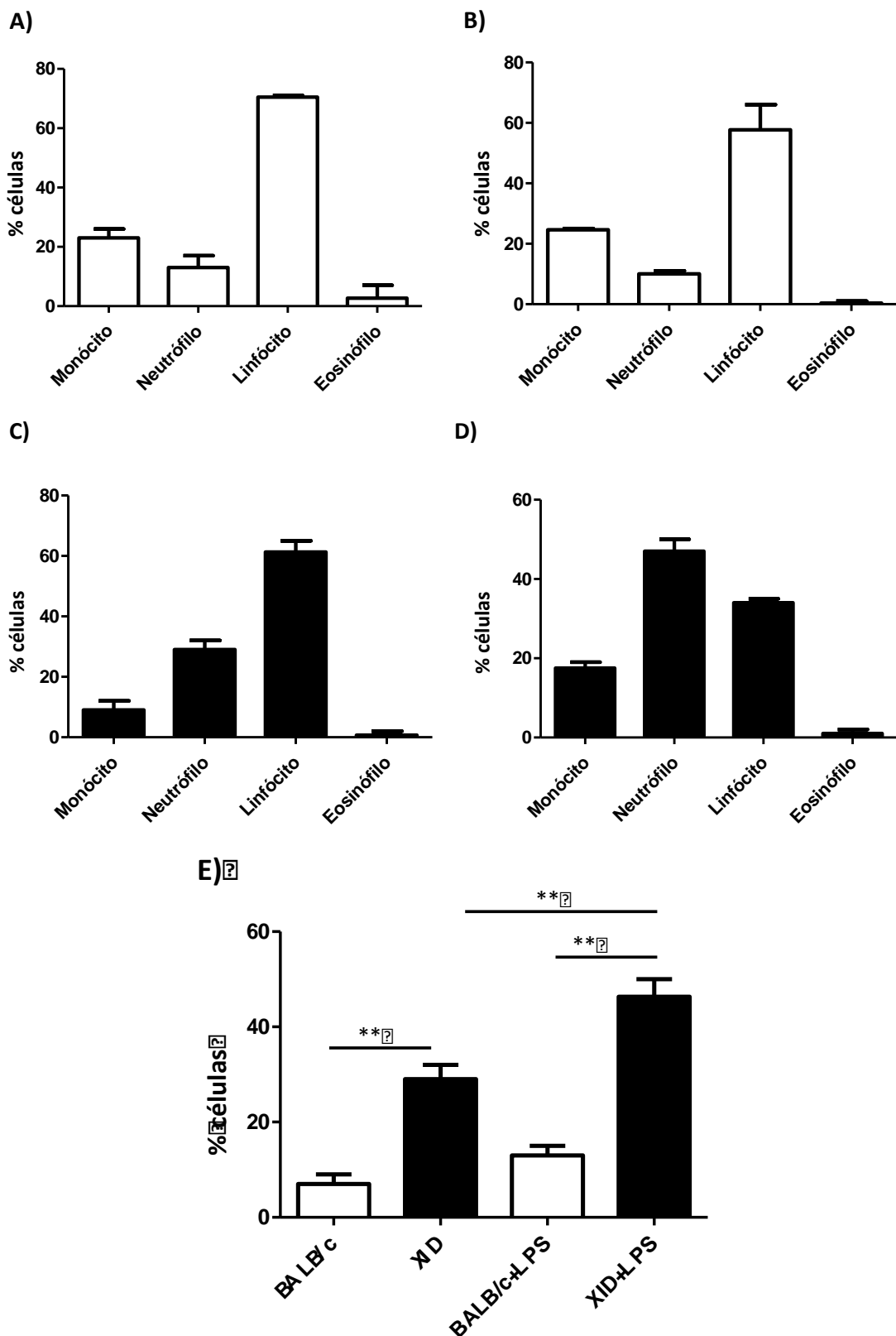


Figura 5. Leucometria específica dos camundongos BALB/c e XID. Células obtidas do sangue periférico dos animais através da punção intracardíaca. Sangue recolhido foi utilizado para o preparo de distensões em lâminas, coradas pelo método panótico rápido e observadas ao microscópio óptico, no aumento final de 1000x (n=12). Distribuição percentual das populações de leucócitos em BALB/c (A), BALB/c+LPS (B), XID (C), XID+LPS (D) e comparação das populações de neutrófilos (E) para os mesmos grupos. Resultados representativos de três análises independentes.

4.3 Produção de Citocinas após Estimulação com LPS

Devido à baixa densidade de linfócitos B-1 nos camundongos XID, supomos que esses animais possuem, de maneira geral, um perfil pró-inflamatório. Esse questionamento se apoia no fato de que os linfócitos B-1 são fonte da citocina anti-inflamatória IL-10. Ademais, com os dados da contagem diferencial apontando para uma neutrofilia nos camundongos XID, suspeitamos que ocorra aumento nas citocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos após o estímulo inflamatório. Portanto, investigamos a ocorrência de uma maior produção e circulação de citocinas pró-inflamatórias no soro de camundongos XID em comparação com animais de genótipo selvagem.

Averiguamos que, após estimulação com LPS, a produção de TNF- α aumentou nos dois grupos em relação aos seus controles. Na dosagem da citocina IL-6 foi observado que, além de um aumento em sua concentração nos animais tratados com LPS, relativamente a seus respectivos controles, também houve diferença significativa entre os grupos XID e BALB/c estimulados (Figura 6).

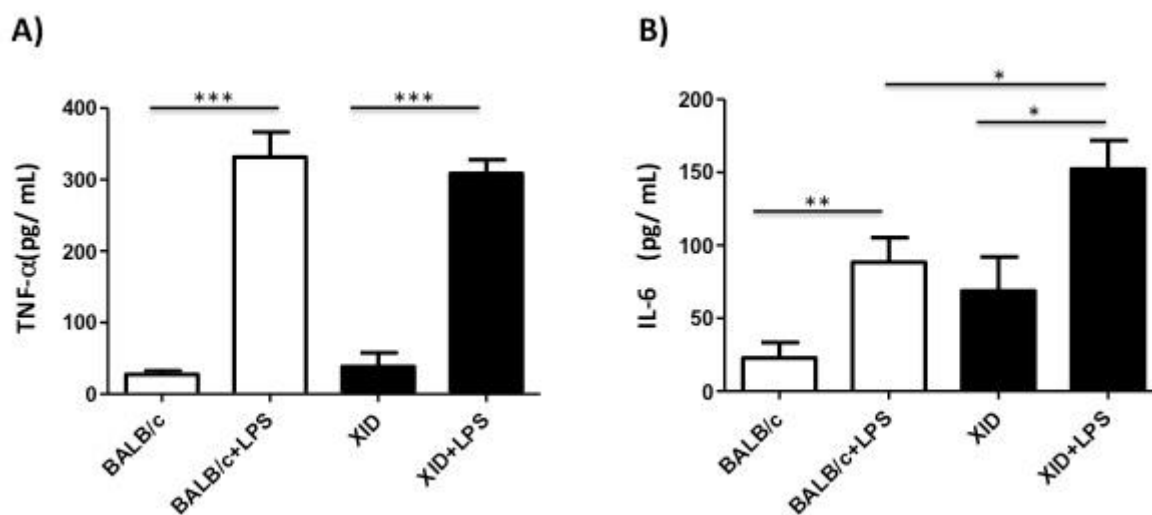


Figura 6. Dosagem de citocinas pró-inflamatórias no plasma de camundongos BALB/c e XID. Amostras de sangue obtidas por punção intracardíaca foram centrifugadas e o soro resultante foi analisado utilizando a técnica de ELISA. As citocinas TNF- α e IL-6 foram dosadas no soro dos camundongos dos grupos BALB/c (barras brancas) e XID (barras pretas), estimulados ou não com LPS (n=12). Os gráficos mostram a quantificação das citocinas TNF- α (A) e IL-6 (B).

4.4 Número Total de Células na Cavidade Peritoneal de Camundongos BALB/c e XID

Visto que a cavidade peritoneal é o local de residência de muitos tipos de leucócitos, inclusive dos linfócitos B-1, verificamos o número total dessas células nos dois grupos de animais. Nota-se incremento no número células do sistema imunológico após a inoculação intraperitoneal de LPS (Figura 7).

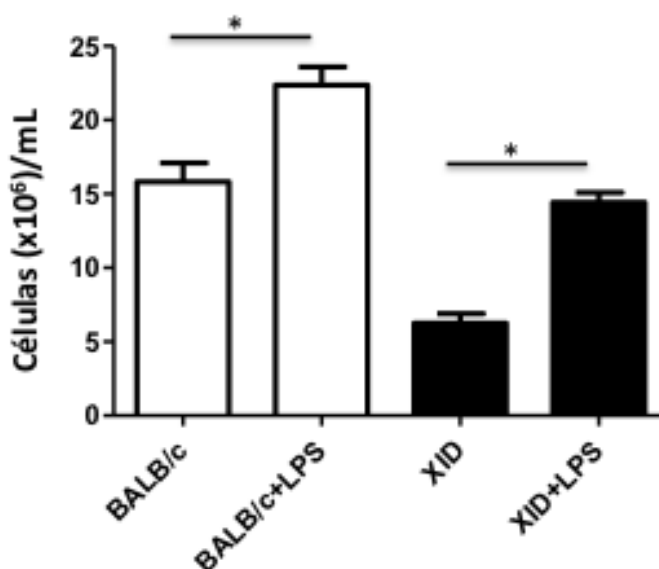


Figura 7. Leucometria total da cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c e XID. Células obtidas do lavado peritoneal dos animais BALB/c e XID estimulados ou não com LPS. Após o lavado, as amostras foram coradas com Azul de Tripán e as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico no aumento final de 400x. Resultados representativos de três análises independentes (n=36). Animais BALB/c (barras brancas) e XID (barras pretas).

4.5 Contagem Diferencial das Células da Cavidade Peritoneal

A investigação sobre diferenças entre as populações de células residentes na cavidade peritoneal dos animais BALB/c e XID foi realizada através da leucometria diferencial. Analisamos lâminas contendo citocentrifugado de células oriundas do lavado peritoneal dos camundongos.

O resultado das contagens dos animais não estimulados mostrou que, nos camundongos BALB/c, as populações predominantes são de macrófagos e linfócitos, seguidos de neutrófilos e mastócitos. Esse panorama se manteve após o estímulo inflamatório com LPS (Figura 8A). Em contrapartida, na análise das lâminas correspondentes aos animais XID, observamos que os macrófagos e neutrófilos constituem as maiores populações, seguidas de mastócitos e linfócitos (Figura 8B). Ao verificarmos o material obtido dos animais XID estimulados com LPS, notamos que a sequência das populações nesses camundongos não sofreu alteração (Figura 8B).

Tendo em vista que observamos um perfil neutrofílico nos camundongos XID nas lâminas de citocentrifugado do lavado peritoneal, decidimos comparar a porcentagem de neutrófilos peritoneais dos animais BALB/c e XID. Sendo assim, constatamos que essas células estão presentes em maior número no peritônio de animais XID, tanto antes quanto depois do estímulo com LPS, reforçando o achado na análise do sangue periférico desses animais (Figura 8C).

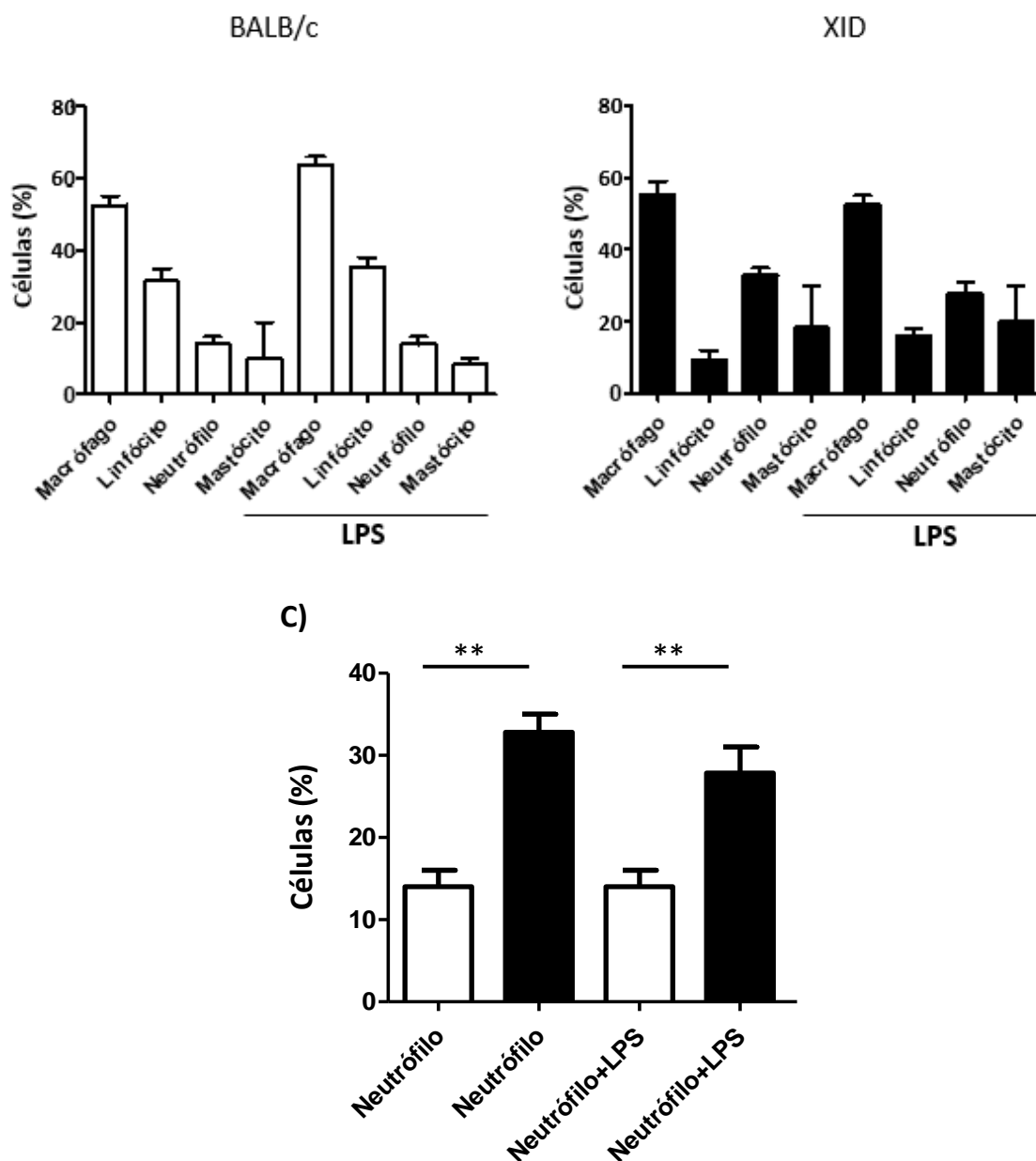
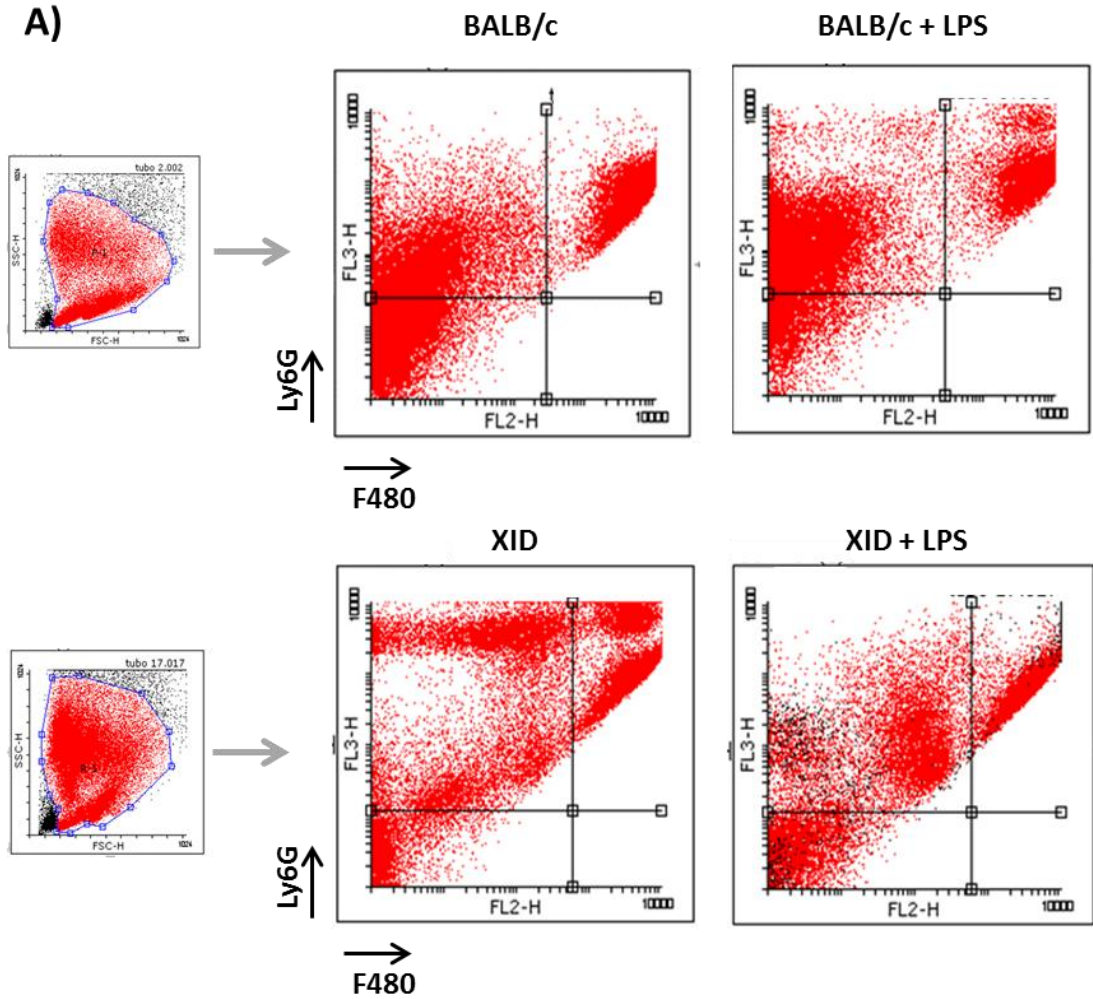


Figura 8. Leucometria específica dos camundongos BALB/c e XID. Células obtidas do lavado peritoneal dos animais BALB/c (barras brancas) e XID (barras pretas), estimulados ou não com LPS. Após a coleta das células, o material foi submetido a citocentrifugação e as lâminas resultantes desse processo foram coradas pelo método panótico rápido. A contagem das células foi realizada ao microscópio óptico, no aumento final de 1000x. Resultados representativos de três análises independentes (n=36). Em (A) camundongos BALB/c, (B) camundongos XID, (C) comparativo entre as populações de neutrófilos dos animais BALB/c (barras brancas) e XID (barras pretas).

4.6 Quantificação de Neutrófilos em Camundongos XID por Fenotipagem

Devido a grande proporção de neutrófilos encontrados nas contagens em lâminas de sangue periférico e no citocentrifugado do lavado peritoneal dos animais XID, decidimos corroborar esses resultados utilizando uma técnica mais refinada. Portanto, elegemos a citometria de fluxo para analisar essa população dentro do peritônio dos animais estudados.

A citometria confirmou a tendência de neutrofilia nos animais XID, tanto em seu estado normal, quanto perante a um estímulo inflamatório (Figura 9A e 9B).



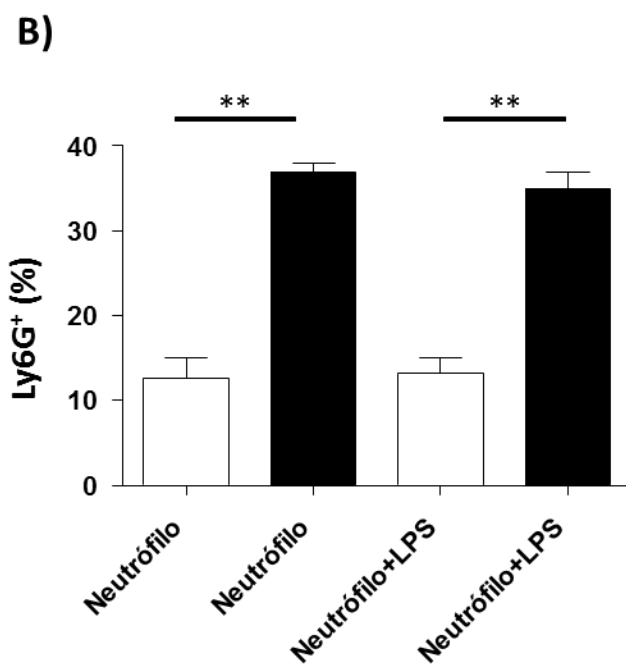


Figura 9. Fenotipagem dos neutrófilos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c e XID. Células obtidas através do lavado peritoneal, marcadas com anticorpo anti-Ly6G e anti-F480 murino, que identifica molécula de superfície para a caracterização fenotípica de neutrófilos. A análise foi feita pela técnica de citometria de fluxo. (A) Gráficos de dispersão e (B) gráfico percentual comparativo entre a população de neutrófilos de animais BALB/c (barras brancas) e XID (barras pretas).

4.7 Atividade Fagocítica de Macrófagos de Camundongos BALB/c e XID

Tendo em vista que os macrófagos podem ser influenciados pela presença dos linfócitos B-1 e seus mediadores solúveis, prosseguimos nossa investigação com um ensaio de avaliação da atividade fagocítica. Esse teste visou a estabelecer possíveis diferenças na capacidade de fagocitose entre os macrófagos primários, que conviveram na abundância ou quase ausência de linfócitos B-1 no microambiente da cavidade peritoneal dos camundongos BALB/c e XID, respectivamente.

Nesse experimento, leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* foram adicionadas a poços contendo culturas de macrófagos obtidos do lavado peritoneal dos animais. Em metade dos poços, foram adicionados LPS e IFN- γ , como estímulo inflamatório.

Em relação à porcentagem de macrófagos que foram capazes de fagocitar as leveduras, não houve diferença significativa entre o comportamento dos macrófagos oriundos de ambos os grupos de animais (Figura 10A). Quanto ao número de leveduras internalizadas, não houve diferença estatística entre os macrófagos controle e estimulados dos camundongos BALB/c. Entretanto, o grupo controle dos macrófagos dos animais XID foi mais eficiente na

fagocitose, quando comparado aos macrófagos XID estimulados. Na comparação entre os animais BALB/c e XID, não houve diferença significativa entre os grupos controle desses camundongos, no entanto, os macrófagos BALB/c estimulados com LPS e IFN- γ fagocitaram mais leveduras que os XID também estimulados (Figura 10A e 10B).

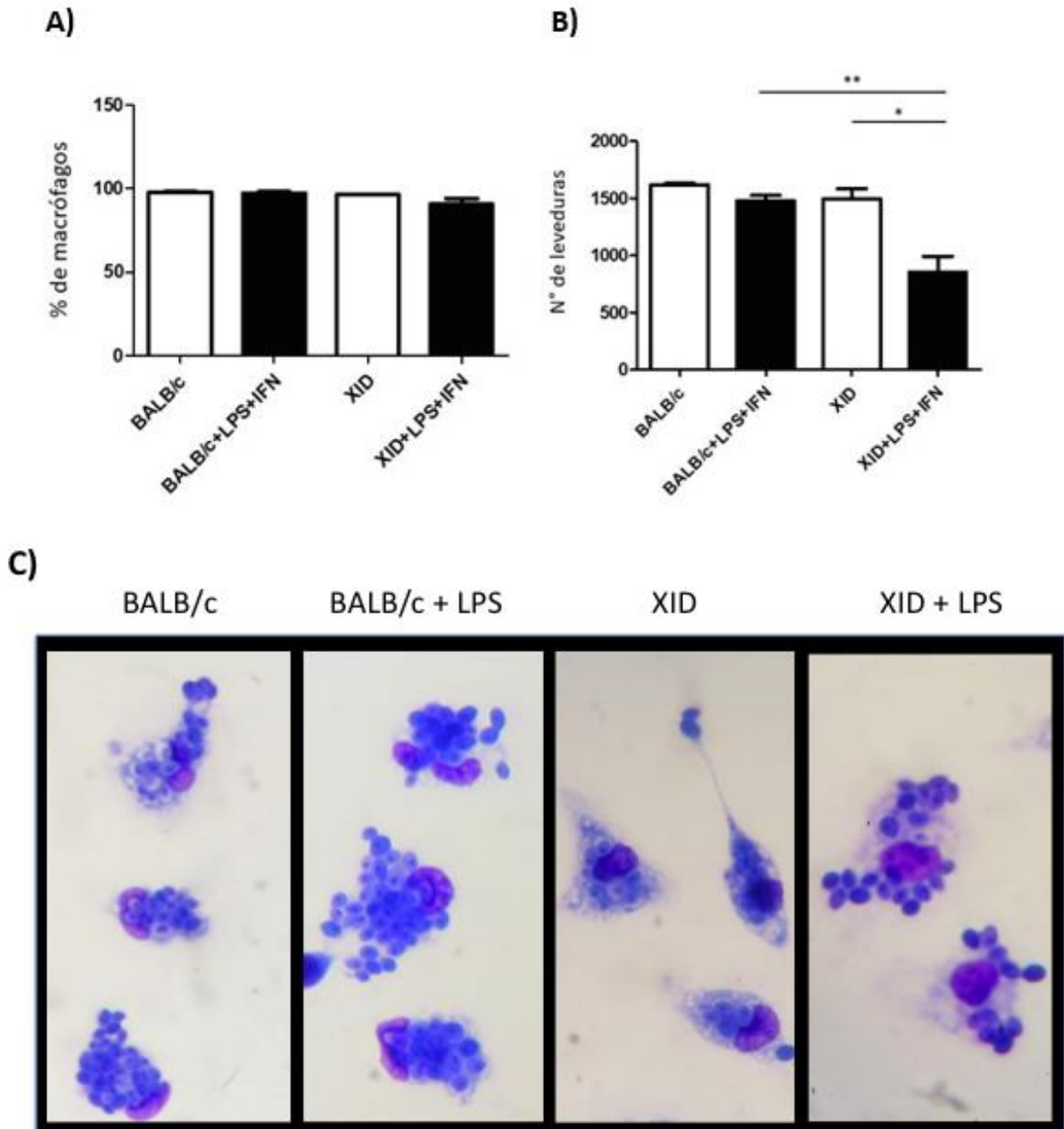


Figura 10. Ensaio de fagocitose com leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*. Macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos BALB/c e XID, estimulados ou não com LPS (n=7). As lamínulas utilizadas para aderência dos macrófagos foram retiradas do fundo da placa de 24 poços, coradas pelo método panótico rápido e coladas em lâminas limpas. As contagens foram realizadas ao microscópio óptico, no aumento final de 1000x. Em (A) Proporção de macrófagos, controle e estimulados, que foram capazes de fagocitar as leveduras, (B) Número de leveduras internalizadas pelos macrófagos e (C) imagens representativas do ensaio de fagocitose.

4.8 Produção de Óxido Nítrico (NO)

Devido ao menor número de leveduras internalizadas pelos macrófagos XID estimulados, realizamos a dosagem indireta do óxido nítrico (NO) produzido por essas células para determinar seu potencial microbicida. Essa mensuração foi feita através da detecção de nitrito, por ensaio de Griess, no sobrenadante das culturas de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal dos animais, estimulados ou não com LPS e IFN- γ .

A cinética do experimento mostrou um aumento significativo de nitrito no sobrenadante dos poços contendo células estimuladas com LPS e IFN- γ em BALB/c e XID. Destacamos que, oito horas após o estímulo, os macrófagos XID produziram mais NO do que os macrófagos BALB/c, também estimulados. Portanto, inferimos que a baixa contagem de leveduras internalizadas pelos macrófagos XID+LPS no ensaio de fagocitose pode ser creditada a alta produção de NO por essas células (Figura 11).

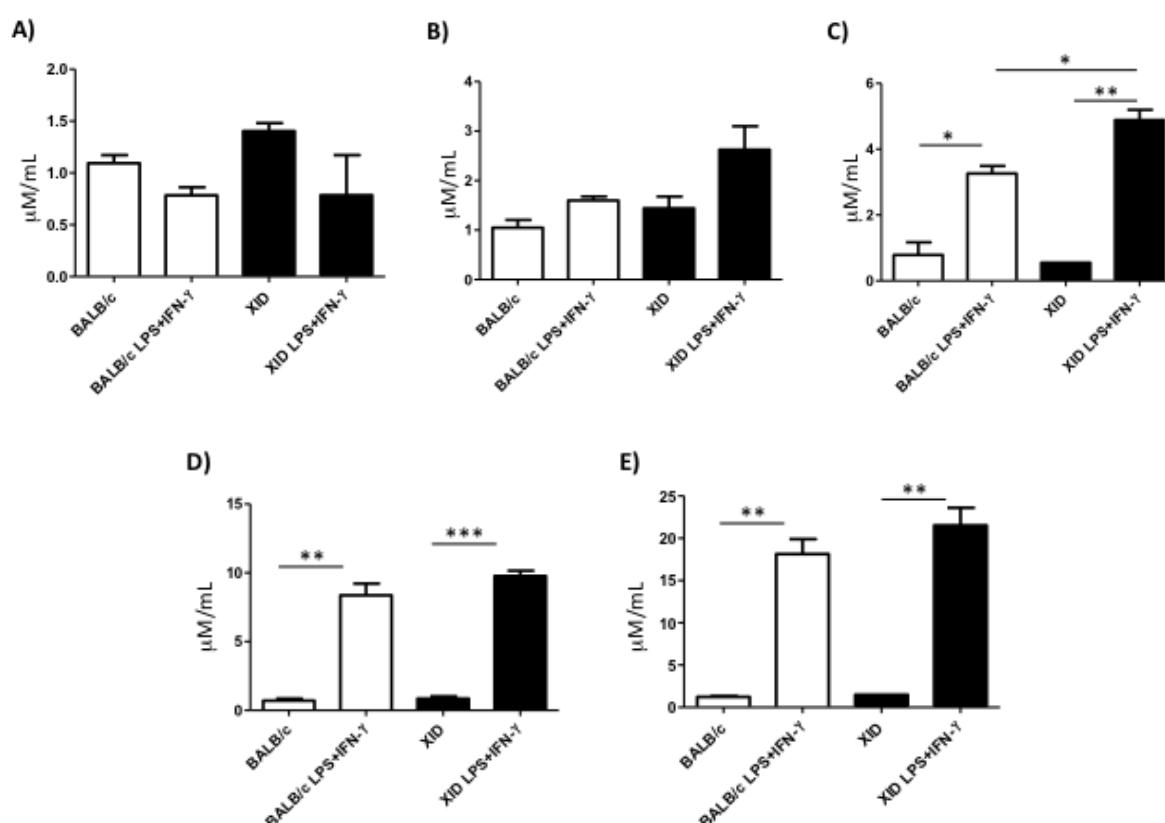


Figura 11. Produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos BALB/c e XID estimulados com LPS e IFN- γ . Macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos BALB/c e XID, estimulados ou não com LPS e IFN- γ (n=7), foram cultivados em placas de 24 poços. Decorrido o tempo de incubação previamente estabelecido (4, 6, 8, 12 e 24 horas) a mensuração dos níveis de óxido nítrico foi realizada de maneira indireta, por ensaio de Griess. Dados representativos da concentração de nitrito ($\mu\text{M/mL}$) presente no sobrenadante das culturas de macrófagos. Os gráficos mostram a cinética do experimento, com a quantificação de nitrito ($\mu\text{M/mL}$) em (A) 4 horas, (B) 6 horas, (C) 8 horas, (D) 12 horas e (E) 24 horas.

5 DISCUSSÃO

A resposta inflamatória é a reação do organismo a uma injúria, seja ela um trauma, uma infecção ou até mesmo os dois fenômenos simultaneamente. Quando controlada, age de forma rápida no restabelecimento da homeostase, restaurando a forma e função dos tecidos afetados. No entanto, se o estímulo nocivo não for removido, se estabelece a fase crônica, que pode durar semanas ou meses. Os fármacos convencionais muitas vezes são caros, inacessíveis a grande parte da população e carregam consigo múltiplos efeitos colaterais. Portanto, pesquisas que visam ao avanço tecnológico em novas terapias, através da modulação da inflamação por componentes do sistema imunológico, estão cada vez mais em voga. Os linfócitos B-1 são fortes candidatos a alvo terapêutico, visto que são capazes de fazer a ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa, interagir com outras células e através de sua produção de imunoglobulinas e citocinas (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Desse modo, a finalidade do presente trabalho foi apontar o papel dos linfócitos B-1 no contexto inflamatório, enfatizando sua influência sobre as outras células do sistema imunológico. Para isso, utilizando camundongos como modelo, inoculamos uma dose não letal de 10µg de LPS por animal (MOON *et al.*, 2012), objetivando desenvolver uma resposta inflamatória aguda e acompanhar a dinâmica das populações de leucócitos.

Nas lâminas de distensão do sangue periférico, neutrófilos, monócitos e eosinófilos puderam ser facilmente caracterizados. Mas, apesar de identificar a morfologia dos linfócitos, não foi possível discernir entre linfócitos T e B durante a observação no microscópio óptico utilizado. Por isso, o número relativamente alto de linfócitos nas contagens das lâminas dos animais XID pode ser justificado devido aos poucos linfócitos B presentes, junto aos linfócitos T, que não têm sua maturação tão afetada pelo defeito genético desses camundongos.

Observamos que a alta proporção de neutrófilos nos animais XID é espontânea e se eleva durante a fase aguda da inflamação, sugerindo maior mobilização dessas células na ausência de linfócitos B-1. O tráfego de neutrófilos na corrente sanguínea também pode estar relacionado ao aumento de TNF- α , uma vez que uma das funções dessa citocina é promover o recrutamento dessas células (ZHANG *et al.*, 2018).

Durante nossas pesquisas bibliográficas, não encontramos relatos sobre essa peculiaridade dos XID. Logo, supomos que esse é um achado inédito, que merece atenção e o desenvolvimento de mais pesquisas sobre a função desses neutrófilos na resposta inflamatória.

O potencial pró-inflamatório dos animais XID foi reforçado pela detecção de níveis elevados das citocinas IL-6 e TNF- α . No soro de ambos os animais utilizados nessa pesquisa, pudemos notar aumento considerável de TNF- α , em proporções semelhantes. Entretanto, os camundongos XID produziram mais IL-6 quando estimulados com LPS do que os animais de genótipo selvagem na mesma condição. Barbeiro *et al.* (2011) encontraram perfil semelhante na produção de IL-6. Porém, houve discordância entre nossos dados em relação à produção de TNF- α , uma vez que a autora detectou maior concentração dessa citocina nos animais XID em relação aos BALB/c. No entanto, essa diferença pode ser explicada pela concentração de LPS empregada pelo grupo, muito superior a utilizada no nosso trabalho, que promoveu a simulação de um estado de septicemia nos animais.

Os neutrófilos, presentes em abundância no sangue dos camundongos XID, são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias. No contexto das doenças inflamatórias do intestino, Zhang *et al.* (2018) detectaram níveis elevados de IL-6 no sobrenadante da cultura de neutrófilos humanos estimulados com LPS (200ng/mL), obtidos do sangue periférico de pacientes com doença de Crohn. Apesar de o nosso trabalho ter detectado essa citocina em

quantidade significativa nos animais XID, não podemos atribuir esse dado unicamente aos neutrófilos, pois realizamos o teste de ELISA diretamente do soro dos animais. Entretanto, experimentos que envolvam apenas os neutrófilos podem ser realizados futuramente, a fim de se investigar se eles podem ser os principais responsáveis pela alta taxa de IL-6 no soro murino.

Logo, as informações obtidas nos nossos experimentos de detecção de citocinas indicam que os XID têm uma propensão natural a desenvolver uma resposta inflamatória mais robusta do que os animais BALB/c.

Tendo em vista que os neutrófilos presentes no sangue periférico dos XID respondem positivamente a estimulação com LPS, avaliamos se na cavidade peritoneal essa dinâmica é mantida. Primeiramente, a contagem total de leucócitos denotou que, apesar da deficiência de linfócitos B-1 nesse microambiente, o número total de células aumentou após a indução da inflamação. Essa quase ausência de linfócitos B-1 provoca uma queda nos níveis da citocina IL-10 (OLIVEIRA *et al.*, 2010), que modula negativamente a resposta inflamatória. A leucometria diferencial das células peritoneais revelou que os camundongos XID possuem mais neutrófilos do que os camundongos BALB/c, confirmando os dados da leitura de lâminas de distensão sanguínea. Portanto, deduzimos que a baixa concentração de linfócitos B-1 e, conseqüentemente, da IL-10, promove um ambiente favorável para a permanência de neutrófilos. Esse achado está em concordância com os dados de Kondratieva *et al.* (2010), que revelaram um atraso no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal, influenciado pelos linfócitos B, em um modelo de tuberculose murina.

Ainda em relação aos neutrófilos presentes na cavidade peritoneal dos camundongos XID, observamos que, apesar da presença em grande número, sua proporção não se altera mediante estímulo com LPS. Uma explicação plausível pode ser encontrada na concentração de LPS que usamos e na dinâmica do experimento. Optamos por inocular os animais dezesseis horas antes da eutanásia e não acompanhamos o experimento em intervalos menores. Essa decisão se ancorou na dificuldade de deslocamento entre a cidade de Seropédica e a cidade do Rio de Janeiro, e por questões de segurança dos pesquisadores.

As alterações na dinâmica populacional dos leucócitos, tanto no sangue quanto no peritônio dos animais XID, podem ser justificadas pela redução na produção de IL-10. Sendo assim, a circulação de neutrófilos no sangue periférico na presença de um estímulo inflamatório é favorecida. Ademais, a permanência dessas células na cavidade peritoneal também é facilitada, mesmo sem estimulação.

Nos ensaios de fagocitose e dosagem indireta de NO, a adição de LPS e IFN- γ diretamente nas culturas foi realizada porque essas moléculas são usadas de forma rotineira para promover a ativação de macrófagos (OGAWA *et al.*, 2017). Na literatura, está estabelecido que o NO produzido por macrófagos ativados é um potente microbicida (LAMB DEN, 2019) e que as células B-1 são fonte importante de IL-10 (GEHERIN *et al.*, 2016). Essa citocina parece regular negativamente a produção de NO pelos macrófagos, comprometendo a destruição dos patógenos.

Os resultados desses ensaios estão correlacionados, pois, perante o desafio promovido pelas leveduras, os macrófagos ativados dos camundongos BALB/c tiveram melhor desempenho na internalização dos fungos em comparação aos animais XID na mesma situação. Entretanto, os dados se invertem na mensuração indireta do NO, mostrando maior liberação de nitrito no sobrenadante das culturas dos macrófagos XID estimulados após 8, 12 e 24 horas de experimento.

A cinética da produção de NO mostrou que os animais XID estimulados liberaram mais nitrito no sobrenadante das culturas nas primeiras horas. Após oito horas, o nível de NO gerado pelos XID superou o dos camundongos BALB/c também estimulados. Esse resultado

sugere que o menor número de leveduras encontradas dentro dos macrófagos obtidos dos XID pode ser associado ao alto poder microbicida dessas células.

Tendo esses fatos em perspectiva, infere-se que a convivência dos macrófagos BALB/c com linfócitos B-1 na cavidade peritoneal pode ter influência sobre sua capacidade fagocítica e na produção de óxido nítrico. Isso se deve a constante exposição desses fagócitos a IL-10 sendo, portanto, mais permissivos a entrada de agentes patogênicos via fagocitose e menos efetivos no combate a microrganismos, via produção de NO. Os macrófagos XID, por outro lado, praticamente não tem contato com os fatores solúveis produzidos pelos linfócitos B-1, então podem reagir de maneira mais efetiva na eliminação dos patógenos através do NO.

A influência dos linfócitos B-1 e seus fatores solúveis sobre os macrófagos ficou evidente em modelo experimental de infecção por *Trypanosoma cruzi* (ROCHA *et al.*, 2019). Os autores demonstraram que os macrófagos XID são mais susceptíveis ao parasito e produzem menos NO quando co-cultivados com linfócitos B-1, oriundos de camundongos BALB/c. A produção de NO também fica comprometida nos macrófagos dos camundongos BALB/c, quando cultivados na presença de linfócitos B-1 (BARBEIRO *et al.*, 2011). Sendo assim, concluímos que os linfócitos B-1 podem modular a capacidade de eliminação dos patógenos pelos macrófagos, ao comprometer sua produção de óxido nítrico. Sugerimos, ainda, que essa interferência ocorra através da regulação negativa imposta pela IL-10 produzida pelos linfócitos B-1.

6 CONCLUSÕES

Diante da análise de todos os resultados obtidos nessa pesquisa, podemos inferir que a baixa proporção de linfócitos B-1 nos camundongos XID pode favorecer a circulação de neutrófilos no sangue e seu estabelecimento na cavidade peritoneal desses animais durante a resposta inflamatória aguda. Esse fato pode estar relacionado ao aumento dos níveis de TNF- α pós estímulo, uma vez que uma das funções dessa citocina é o recrutamento de neutrófilos para os locais inflamados. Uma vez que, no decorrer do nosso levantamento bibliográfico, não encontramos relatos semelhantes, supomos que esse seja um achado inédito, que abre portas para o desenvolvimento de mais pesquisas sobre a modulação da resposta inflamatória por esses neutrófilos.

A dosagem de citocinas, principalmente a IL-6, sugere que os camundongos XID possuem um potencial inflamatório elevado, quando comparados aos camundongos selvagens. Os macrófagos dos XID parecem ter mais facilidade para destruir os patógenos fagocitados, quando estimulados. Isso provavelmente se deve a alta concentração de NO produzida por esses macrófagos, evidenciada pela cinética da dosagem de nitrito no sobrenadante das culturas.

Sendo assim, esse trabalho pode ajudar a pavimentar o caminho para novas descobertas em imunoterapia, sendo a primeira pista para futuros estudos sobre a influência dos linfócitos B-1 na atividade e função dos neutrófilos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNARDOTTIR, H.H.; FREYSDOTTIR, J.; HARDARDOTTIR, I. Dietary fish oil increases the proportion of a specific neutrophil subpopulation in blood and total neutrophils in peritoneum of mice following endotoxin-induced inflammation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 248-255, 2013.

ARCANJO, A.F.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I.F.; ROCHA, J.D.B.; ZAMITH, D.; COSTA-DA-SILVA, A.C.; NUNES, M.P.; MESQUITA-SANTOS, F.P.; MORROT, A.; FILARDY, A.A.; MARIANO, M.; BANDEIRA-MELO, C.; DOSREIS, G.A.; DECOTE-RICARDO, D.; FREIRE-DE-LIMA, C.G. The PGE2/IL-10 axis determines susceptibility of B-1 cell-derived phagocytes (B-1CDP) to *Leishmania major* infection. **PLoS One**, v. 10, n. 5, 2015.

ARCANJO, A.F. ; NICO, D. ; CASTRO, G.M.M.; FONTES, Y.S.; SALTARELLI, P.; DECOTE-RICARDO, D.; NUNES, M.P.; FERREIRA-PEREIRA, A.; PALATINIK-DE-SOUSA, C.B.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; MORROT, A. Dependency of B-1 cells in the maintenance of splenic interleukin-10 producing cells and impairment of macrophage resistance in visceral leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 978, p. 1-7, 2017a.

ARCANJO, A.F.; NUNES, M.P.; SILVA-JUNIOR, E.B.; LEANDRO, M.; ROCHA, J.D.B.; MORROT, A.; DECOTE-RICARDO, D.; FREIRE-DE-LIMA, C.G. B-1 cells modulate the murine macrophage response to *Leishmania major* infection. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 151-162, 2017b.

AZIZ, M.; HOLODICK, N.E.; ROTHSTEIN, T.L.; WANG, P. The role of B-1 cells in inflammation. **Immunologic Research**, v. 63, n. 1-3, p. 153-166, 2015.

BARBEIRO, D.F.; BARBEIRO, H.V.; FAINTUCH, J.; ARIGA, S.K.K.; MARIANO, M.; POPI, A.F.; SOUZA, H.P.; VELASCO, I.T.; SORIANO, F.G. B-1 cells temper endotoxemic inflammatory responses. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 02-308, 2011.

BAUMGARTH, N. Innate-like B cells and their rules of engagement. *In*: KATSIKIS, P.; SCHOENBERGER, S.; PULENDRAN, B. (eds.). **Crossroads between innate and adaptive immunity IV**. 1. ed. Nova Iorque: Springer, 2013. cap. 7, p. 57-66.

BAUMGARTH, N. A Hard(y) look at B-1 cell development and function. **Journal of Immunology**, v. 199, n. 10, p. 3387-3394, 2017.

BAUMGARTH, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 1, p. 34-46, 2011.

CHAMBERLAIN, J.L.; ATTRIDGE, K.; WANG, C.J.; RYAN, G.A.; WALKER, L.S.K. B cell depletion in autoimmune diabetes: insights from murine models. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 15, n. 6, p. 703-714, 2011.

CHOI, Y.S.; BAUMGARTH, N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 13, p. 3053-3064, 2008.

COSTA, L.F.V.; ALVARES-SARAIVA, A.M.; ROCHA, P.R.D.A.; SPADACCI-MORENA, D.D.; PEREZ, E.C.; MARIANO, M.; LALLO, M.A. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. **Immunobiology**, v. 222, n. 2, p. 218-227, 2017.

CRANE, D.D.; GRIFFIN, A.J.; WEHRLY, T.D.; BOSIO, C.M. B1a cells enhance susceptibility to infection with virulent *Francisella tularensis* via modulation of NK/NKT cell responses. **Journal of Immunology**, v. 190, p. 2756-2766, 2013.

DENG, J.; WANG, X.; CHEN, Q.; SUN, X.; XIAO, F.; KO, K.H.; ZHANG, M.; LU, L. B1a cells play a pathogenic role in the development of autoimmune arthritis. **Oncotarget**, v. 7, n. 15, p. 19299-19311, 2016.

FEEHAN, K.T.; GILROY, D.W. Is resolution the end of inflammation? **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 3, p. 198-214, 2019.

GEHERIN, S.A. ; GÓMEZ, D.; GLABMAN, R.A.; RUTHEL, G.; HAMANN, A.; DEBES, G.F. IL-10+ Innate-like B cells are part of the skin immune system and require $\alpha 4\beta 1$ integrin to migrate between the peritoneum and inflamed skin. **The Journal of Immunology**. v. 196, n. 6, p. 2514-2525, 2016.

GIL, Á. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 388-396, 2002.

GONZAGA, R.; MATZINGER, P.; PEREZ-DIEZ, A. Resident peritoneal NK cells. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 12, p. 6235-6242, 2011.

GRIFFIN, D.O.; HOLODICK, N.E.; ROTHSTEIN, T.L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 1, p. 67-80, 2011a.

GRIFFIN, D.O.; ROTHSTEIN, T.L. A small CD11b+ human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 13, p. 2591-2598, 2011b.

GRIFFIN, D.O.; ROTHSTEIN, T.L. Human “orchestrator” CD11b+ B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. **Molecular Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1003-1008, 2012.

HAAS, K.M.; POE, J.C.; STEEBER, D.A.; TEDDER, T.F. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. **Immunity**, v. 23, n. 1, p. 7-18, 2005.

HARDY, R.R.; HAYAKAWA, K. Perspectives on fetal derived CD5+ B1 B cells. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 11, p. 2978-2984, 2015.

HAUGHTON, G.; ARNOLD, L.W.; WHITMORE, A.C.; CLARKE, S.H. B-1 cells are made, not born. **Immunology Today**, v. 14, n. 2, p. 84-87, 1993.

HAWIGER, J.; ZIENKIEWICZ, J. Decoding inflammation, its causes, genomic responses and emerging countermeasures. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 90, n. 6, 2019.

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

HOFFMAN, W.; LAKKIS, F.G.; CHALASANI, G. B cells, antibodies, and more. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 1, p. 137-154, 2015.

IQBAL, A.J.; FISHER, E.A.; GREAVES, D.R. Inflammation – a critical appreciation of the role of myeloid cells. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, 2016.

KANTOR, A.B.; HERZENBERG, L.A. Origin of murine B cell lineages. **Annual Review of Immunology**, v. 11, n. 1, p. 501-538, 1993.

KONDRATIEVA, T.K.; RUBAKOVA, E.I.; EVSTIFEEV, V.V.; MAJOROV, K.B.; APT, A.S. B cells delay neutrophil migration toward the site of stimulus: tardiness critical for effective bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis infection in mice. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1227-1234, 2010.

KUBES, P. The enigmatic neutrophil: what we do not know. **Cell And Tissue Research**, v. 371, n. 3, p.399-406, 2018.

LALOR, P.A.; HERZENBERG, L.A.; ADAMS, S.; STALL, A.M. Feedback regulation of murine Ly-1 B cell development. **European Journal of Immunology**, v. 19, n. 3, p. 507-513, 1989.

LAMBDEN, S. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis—an update. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 7, n. 1, p.1-14, 2019.

LEE, J.G.; JANG, J.Y.; FANG, T.; XUAN, X.Y.; YAN, J.J.; RYU, J.H.; JEON, H.J.; KOO, T.Y.; KIM, D.K.; OH, K.H.; KIM, T.J.; YANG, J. Identification of human B-1 helper T cells with a Th1-like memory phenotype and high integrin CD49d expression. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1617, 2018.

LIEW, P.X.; KUBES, P. The neutrophil's role during health and disease. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p.1223-1248, 2019.

LOPES, J.D.; MARIANO, M. B-1 cell: the precursor of a novel mononuclear phagocyte with immuno-regulatory properties. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 489-496, 2009.

MAKAROV, S.S. NF- κ B as a therapeutic target in chronic inflammation: recent advances. **Molecular medicine today**, v. 6, n. 11, p. 441-448, 2000.

MANFREDI, A.A.; RAMIREZ, G.A.; QUERINI, P.R.; MAUGERI, N. The neutrophil's choice: phagocytosis vs make neutrophil extracellular traps. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p.1-13, 2018.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 545, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MEURER, S.K.; NEß, M.; WEISKIRCHEN, S.; KIM, P.; TAG, C.G.; KAUFFMANN, M.; HUBER, M.; WEISKIRCHEN, R. Isolation of mature (peritoneum-derived) mast cells and immature (bone marrow-derived) mast cell precursors from mice. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0158104, 2016.

MEYER-BAHLBURG, A. B-1 cells as a source of IgA. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1362, n. 1, p. 122-131, 2015.

MINOPRIO, P.; EL CHEIKH, M.C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O'GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 8, p. 4200-4208, 1993.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. B-1 B cell development in the fetus and adult. **Immunity**, v. 36, n. 1, p. 13-21, 2012.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. New perspectives in B-1 B cell development and function. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 9, p. 428-433, 2006.

MOON, H.; LEE, J.G.; SHIN, S.H.; KIM, T.J. LPS-induced migration of peritoneal B-1 cells is associated with upregulation of CXCR4 and increased migratory sensitivity to CXCL12. **Journal of Korean Medical Science**. v. 27, n. 1, p. 27-35, 2012.

MORRIS, G.; PURI, B.K.; OLIVE, L.; CARVALHO, A.F.; BERK, M.; MAES, M. Emerging role of innate B1 cells in the pathophysiology of autoimmune and neuroimmune diseases: Association with inflammation, oxidative and nitrosative stress and autoimmune responses. **Pharmacological Research**, v. 148, p. 1-14, 2019.

MUKHOPADHYAY, S.; SAHOO, P.K.; GEORGE, A.; BAL, V.; RATH, S.; RAVINDRAN, B. Delayed clearance of filarial infection and enhanced Th1 immunity due to modulation of macrophage APC functions in xid mice. **Journal of Immunology**. v. 163, n. 2, p. 875-883, 1999.

NÉMETH, T.; SPERANDIO, M.; MÓCSAI, A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**. p.1-23, 2020.

NOAL, V.; SANTOS, S.; FERREIRA, K.S.; ALMEIDA, S.R. Infection with *Paracoccidioides brasiliensis* induces B-1 cell migration and activation of regulatory T cells. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 12, p. 798-803, 2016.

OGAWA, M.; SATOH, M.; KATAOKA, M.; ANDO, S.; SAIJO, M. Nitric oxide enhanced the growth of an obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* in murine macrophages. **Microbial Pathogenesis**. v. 107, p.335-340, 2017.

OLIVEIRA, H.C.; POPI, A.F.; BACHI, A.L.; NONOGAKI, S.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. B-1 cells modulate the kinetics of wound-healing process in mice. **Immunobiology**. v. 215, n. 3, p. 215-222, 2010.

POPI, A.F. B-1 phagocytes: the myeloid face of B-1 cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1362, n. 1, p. 86-97, 2015.

- POPI, A.F.; GODOY, L.C.; XANDER, P.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 7, p. 817-824, 2008.
- POPI, A.F.; LONGO-MAUGÉRI, I.M.; MARIANO, M. An overview of B-1 cells as antigen-presenting cells. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 138-143, 2016.
- POPI, A.F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 348-354, 2004.
- RAJAEI, A.; BARNETT, R.; CHEADLE, W.G. Pathogen- and danger-associated molecular patterns and the cytokine response in sepsis. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 1-10, 2018.
- RAY, A.; DITTEL, B.N. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 35, p. e1488, 2010.
- REKOW, M.M.; DARRAH, E.J.; MBOKO, W.P.; LANGE, P.T.; TARAKANOVA, V.L. Gammaherpesvirus targets peritoneal B-1 B cells for long-term latency. **Virology**, v. 492, 140-144, 2016.
- ROCHA, R.F.D.B.; LAROCQUE-DE-FREITAS, I.F.; ARCANJO, A.F.; LOGULLO, J.; NUNES, M.P.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; DECOTE-RICARDO, D. B-1 cells may drive macrophages susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1598, 2019.
- ROTHSTEIN, T.L.; GRIFFIN, D.O.; HOLODICK, N.E.; QUACH, T.D.; KAKU, H. Human B-1 cells take the stage. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1285, p. 97-114, 2013.
- RYAN, G.A.; WANG, C.J.; CHAMBERLAIN, J.L.; ATTRIDGE, K.; SCHMIDT, E.M.; KENEFECK, R.; CLOUGH, L.E.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; TOELLNER, K.M.; WALKER, L.S.K. B1 cells promote pancreas infiltration by autoreactive T cells. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 2800-2807, 2010.
- SAID, A.; WEINDL, G. Regulation of dendritic cell cell function in inflammation. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1-15, 2015.
- SAVAGE, H.P.; BAUMGARTH, N. Characteristics of natural antibody-secreting cells. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1362, n. 1, p. 132-142, 2015.
- SIMÃO-GURGE, R.M.; COSTA-CARVALHO, B.T.; NOBRE, F.A.; GONZALEZ, I.G.; MORAES-PINTO, M.I. Prospective evaluation of Streptococcus pneumoniae serum antibodies in patients with primary immunodeficiency on regular intravenous immunoglobulin treatment. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 45, n. 1, p. 5562, 2017.
- SINGH, S.P.; DAMMEIJER F.; HENDRIKS, R.W. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 57, 2018.

STALL, A.M.; WELLS, S.M.; LAM, K.P. B-1 cells: unique origins and functions. **Seminars in Immunology**, v. 8, n. 1, p. 45-59, 1996.

TANAKA, Y.; KUBO, S.; IWATA, S.; YOSHIKAWA, M.; NAKAYAMADA, S. B cell phenotypes, signaling and their roles in secretion of antibodies in systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v. 186, p. 21-25, 2018.

TANG, D.; KANG, R.; COYNE, C.B.; ZEH, H.J.; LOTZE, M.T. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 158-175, 2012.

TOLAR, P. Cytoskeletal control of B cell responses to antigens. **Nature Reviews Immunology**. v. 17, n. 10, p. 621-634, 2017.

TREANOR, B. B-cell receptor: from resting state to activate. **Immunology**. v. 136, n. 1, p. 21-27, 2012.

TUNG, J.W.; PARKS, D.R.; MOORE, W.A.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A. Identification of B-cell subsets – An exposition of 11-color (Hi-D) FACS methods. *In*: GU, H.; RAJEWSKY, K. (eds). **B cell protocols**. Springer, 2004. v. 271, p. 37-58.

VALE, A.M.; KEARNEY, J.F.; NOBREGA, A.; SCHROEDER, H.W. Development and Function of B Cell Subsets. *In*: ALT, F.W.; HONJO, T.; RADBRUCH, A.; RETH, M. (eds.). **Molecular biology of B cells**. 2. ed. Elsevier, 2015. cap. 7, p. 99-119.

VARELA, M.L.; MOGILDEA, M.; MORENO, I.; LOPES, A. Acute inflammation and metabolism. **Inflammation**. v. 41, n. 4, p. 1115-1127, 2018.

ZHANG, C.; SHU, W. ; ZHOU, G. ; LIN, L. ; CHU, F. ; WU, H. ; LIU, Z. Anti-TNF- α therapy suppresses proinflammatory activities of mucosal neutrophils in inflammatory bowel disease. **Mediators of Inflammation**. v. 2018, p.1-12, 2018.

ANEXO 1: COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética no
Uso de Animais
Instituto de Veterinária



Seropédica, 10 de abril de 2018
CEUA N 9230100418

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE PROPOSTA À COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CPF: 875.362.007-06

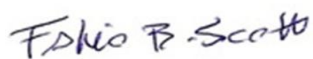
Título do projeto: Papel imunomodulador de linfócitos B-1 no potencial inflamatório de animais deficientes da tirosina quinase de Bruton

Responsável: Débora Decote Ricardo de Lima

Equipe: Carolina de Albuquerque Correia, Raphael Francisco Dutra Barbosa da Rocha, Amanada Couto Silva

Telefone: (21)999688980 e-mail: decotericado@ufrj.br

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, avaliará os documentos seguindo calendário de reuniões vigentes. Todo o processo poderá ser acompanhado no sistema (<http://r1.ufrj.br/ceua/>) por meio da sua senha de acesso.



Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro





Carlos Alexandre Rey Matias
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

ANEXO 2: SUBMISSÃO DO ARTIGO

2/7/2020

ExpressoLivre - ExpressoMail

Enviado por: "Immunobiology" <EvisSupport@elsevier.com>
De: EvisSupport@elsevier.com
Para: decotericardo@ufrj.br
Data: 15/01/2020 22:10
Assunto: Successfully received: XID mice leukocytes dynamics reveals increased number of neutrophils for Immunobiology  

This message was sent automatically.

Ref: IMBIO_2020_15

Title: XID mice leukocytes dynamics reveals increased number of neutrophils

Journal: Immunobiology

Dear Dr. Decote-Ricardo,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Immunobiology. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE[®] at:

http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=IMBIO and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Immunobiology

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE[®] via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.



Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

ANEXO 3: ARTIGO SOB REVISÃO

27/2020

ExpressoLivre - ExpressoMail

Enviado por: "Immunobiology" <EvisSupport@elsevier.com>
De: EvisSupport@elsevier.com
Para: decotericardo@ufrj.br
Data: 24/01/2020 16:33
Assunto: Your manuscript IMBIO_2020_15 has been sent for review  

This message was sent automatically.

Reference: IMBIO_2020_15
Title: XID mice leukocytes dynamics reveals increased number of neutrophils
Journal: Immunobiology

Dear Dr. Decote-Ricardo,

I am currently identifying and contacting reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer review is a voluntary service it can take time to find reviewers who are both qualified and available. While reviewers are being contacted, the status of your manuscript will appear in EVISE® as 'Reviewer Invited'.

Once a reviewer agrees to review your manuscript, the status will change to 'Under Review'. When I have received the required number of expert reviews, the status will change to 'Ready for Decision' while I evaluate the reviews before making a decision on your manuscript.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® and go to 'My Submissions' via:
http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=IMBIO

Kind regards,

Immunobiology

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.