

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

ANDREY SLADKEVICIUS VIDAL

**COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS B-1 EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO**

SÃO PAULO

2019

ANDREY SLADKEVICIUS VIDAL

**COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS B-1 EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina do
Centro Universitário São Camilo,
orientado pelo Prof. Dr. Ronni Rômulo
Novaes e Brito, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

SÃO PAULO

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Vidal, Andrey Sladkevicius

Comportamento das células B-1 em camundongos submetidos ao estresse crônico /
Andrey Sladkevicius Vidal. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.

45 p.

Orientação de Ronni Rômulo Novaes e Brito.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação),
Centro Universitário São Camilo, 2019.

1. Camundongos 2. Estresse psicológico 3. Fagocitose 4.
Linfócitos 5. Privação do sono 6. Subpopulações de linfócitos B I.
Brito, Ronni Rômulo Novaes e II. Centro Universitário São Camilo
III. Título

CDD: 616.079

ANDREY SLADKEVICIUS VIDAL

**COMPORTAMENTO DAS CÉLULAS B-1 EM CAMUNDONGOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE CRÔNICO**

São Paulo, 18 de novembro de 2019

Prof. Orientador Ronni Rômulo Novaes e Brito

Prof^a Examinadora Marjorie Mendes Marini e Souza

Lista de Figuras

Figura 1 - Figura 1: Avaliação da porcentagem de células B-1 na cavidade peritoneal de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias24

Figura 2 - Células da cavidade peritoneal de animais restritos de sono por 21 dias produzem mais óxido nítrico, mais espécies reativas de oxigênio e menos arginase em relação aos animais controles..... 25

Figura 3 - Camundongos restritos de sono por 21 dias têm expressão genética relativa alterada da citocina IL-10 quando comparados ao grupo controle 26

Figura 4 - A restrição de sono por 21 dias não altera a expressão de moléculas de superfície marcadoras de ativação celular27

Figura 5 - Camundongos restritos de sono por 21 dias têm expressão genética relativa do gene G-CSFR alterada quando comparados ao grupo controle 28

Figura 6 - Camundongos restritos de sono por 21 dias têm expressão genética relativa de receptores semelhantes a *Toll* alterada quando comparados ao grupo controle.....29

Figura 7 - Avaliação das porcentagens de células B-1, na cavidade peritoneal de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.....30

Figura 8 - Células B-1 de animais restritos de sono por 21 dias produzem mais óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em relação aos animais controles.
.....31

Figura 9 - A restrição de sono por 21 dias altera a expressão de CD80 e CD86 na superfície de células B-1 de animais restritos de sono e injetados com promastigotas de *L. amazonensis*..... 32

Figura 10 - Fagocitose in vivo de promastigotas de *L. amazonensis* por células B-1 de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias 33

Lista de Abreviaturas

RS21 – Grupo que sofreu protocolo de restrição por 21 dias

NO – Óxido Nítrico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

TLR – Receptores semelhantes a *Toll* (*Toll Like Receptors*)

CD – Grupamento de diferenciação (*Clusters of Differentiations*)

a.C – Antes de Cristo

IL – Interleucina

IFN - *Interferons*

NK – *Natural Killer*

TNF- Fatores de Necrose Tumoral (*tumoral necrosis fator*)

TBE – Solução Tris/Borato/EDTA

PBS - Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*)

CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

FCS - soro fetal de bezerro

MHC - complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

RPMI – Nome da solução tampão desenvolvida pelo *Roswell Park Memorial Institute* com bicarbonato e concentrações modificadas de aminoácidos essenciais e vitaminas para estimular o crescimento celular.

PCR Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

q-PCR – PCR em tempo real

Rpm – Rotações por minuto

cDNA – DNA complementar

CT - *cycle threshold*

HE – Coloração utilizando os corantes Hematoxilina e Eosina

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

LPS – Lipopolissacarídeo

APC's - Células apresentadoras de antígenos (antigen-presenting cell)

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ronni Rômulo Novaes e Brito pela disposição em tempo integral na elaboração deste trabalho bem como no decorrer dos experimentos, por suas valiosas dicas e por sua orientação atenciosa e completa mesmo frente a tantos desafios.

Agradeço aos meus pais Iara e Márcio e ao meu irmão Yan que sempre me incentivaram a seguir meu sonho na carreira acadêmica e me ajudaram de todas as formas possíveis, inclusive com todos os custos extras necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo e sua aluna de graduação Claudia Midori Ariê Claudia pelo enorme auxílio no decorrer deste trabalho, por estarem sempre presente nos experimentos nos acompanhando de maneira muito atenciosa.

E agradeço a todos os docentes do Centro Universitário São Camilo pelos ensinamentos no decorrer de todos esses anos e por serem o pilar da minha educação e desenvolvimento acadêmico

Um agradecimento especial para a Profa. Dra. Patrícia Xander Batista e sua aluna de mestrado Natasha Ferraz de Campos Reis do laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) que tiveram um papel essencial no desenvolvimento deste trabalho, nos ajudando imensamente desde o desenvolvimento do trabalho escrito como em inúmeros procedimentos que necessitavam de equipamentos, experiência e habilidade, nos entregando resultados de altíssima qualidade. Muito obrigado, meninas. Sem vocês este trabalho não seria possível.

“A frase mais empolgante de ouvir na ciência, a que prenuncia novas descobertas, não é "Eureka!", mas sim "Isto é estranho..." ”.

Isaac Asimov

RESUMO

Células B-1 são um subtipo de linfócito B cujos mecanismos de ação no sistema imunológico bem como sua patogênese não são completamente compreendidos. Sabe-se que os linfócitos B-1 têm capacidade fagocitária quando expostos ao desafio bacteriano. Porém, não há estudos suficientes que abordam tais mecanismos em modelo animal submetido ao estresse crônico, como ocorre na privação e/ou restrição do sono. Sendo assim, o objetivo deste trabalho, foi averiguar as alterações fisiológicas das células B-1 bem como a capacidade fagocítica destas células em animais que sofreram restrição de sono. Para tanto, camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de restrição de sono durante 21 dias (RS21) e tiveram seus dados coletados para primeira etapa do trabalho. Na segunda etapa, após replicarmos o mesmo protocolo, no vigésimo dia de restrição de sono, todos os animais, incluindo os animais do grupo controle, foram injetados intraperitonealmente com 1.10^7 de promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A eutanásia ocorreu 24 horas depois da administração do parasita. Após eutanásia, foi realizado lavado peritoneal para análise das populações celulares por citometria de fluxo bem como análise da expressão relativa de alguns genes envolvidos no comprometimento linfoide ou mieloide das células B-1. Os resultados demonstraram que os fatores de transcrição relacionados à linhagem linfoide estão diminuídos, com uma persistência concomitante da expressão dos genes de comprometimento mieloide, revelando assim que essas células tendem a um comprometimento de perfil mieloide após o protocolo de restrição de sono. Além disso, as células B-1 apresentaram aumento estatisticamente significativo de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) nos animais que sofreram a restrição de sono. Porém, foi observado menor índice fagocitário nas células B-1 no grupo RS21 quando comparados ao grupo controle. Nossos resultados indicam que apesar das células B-1, após protocolo de restrição de sono, mesmo apresentando maior produção de NO e ROS, e, adquirindo uma tendência para perfil mieloide em detrimento ao comprometimento linfoide, também leva a diminuição da expressão de receptores envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, visto que, a expressão relativa dos genes dos receptores semelhantes a *Toll* (TLR-2, TLR-6, TLR-9) também estão diminuídos nos animais do grupo RS21. Acreditamos que a diminuição da fagocitose no grupo RS21, ocorra pela redução da expressão desses receptores nas células B-1.

Abstract

B-1 cells are a subtype of B lymphocyte whose mechanisms of action in the immune system as well as their pathogenesis are not fully understood. B-1 lymphocytes are known to have phagocytic capacity when exposed to bacterial defect. However, there are not enough studies that address such mechanisms in an animal model subjected to chronic stress, such as sleep deprivation and / or restriction. Thus, the objective of this project was to investigate the physiological changes of B-1 cells as well as the phagocytic capacity of these cells in animals that suffered sleep restriction. To this end, male C57BL / 6 mice underwent the sleep restriction protocol for 21 days (RS21). On the twentieth day of sleep restriction, all animals, including control animals, were injected intraperitoneally with $1,10^7$ *Leishmania amazonensis* promastigotes. Euthanasia occurred 24 hours after parasite administration. After euthanasia, peritoneal lavage was performed to analyze cell populations by flow cytometry as well as to analyze the relative expression of some genes involved in B-1 lymphoid or myeloid involvement. The results showed that the transcription factors related to the lymphoid lineage are decreased, with a concomitant persistence of myeloid impairment gene expression, thus revealing that these cells tend to a myeloid profile impairment after the sleep restriction protocol. In addition, B-1 cells showed a statistically significant increase in nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) in sleep-restricted animals. However, a lower phagocytic index was observed in B-1 cells in the RS21 group when compared to the control group. Our results indicate that despite B-1 cells, after sleep restriction protocol, even presenting higher NO and ROS production, and, acquiring a tendency towards myeloid profile to the detriment of lymphoid impairment, also leads to decreased expression of receptors involved in the recognition of pathogen-associated molecular patterns, as the relative expression of Toll-like receptor genes (TLR-2, TLR-6, TLR-9) is also decreased in RS21 group animals. We believe that the reduction of phagocytosis in the RS21 group occurs by reducing the expression of these receptors in B-1 cells

SUMÁRIO

RESUMO	10
Abstract	11
SUMÁRIO.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Soluções.....	19
3.2 Animais	19
3.3 Rotina de Restrição	19
3.4 Rotina do Experimento	20
3.5 Parasitas.....	20
3.6 Citometria de Fluxo	21
3.7 Avaliação da produção de óxido nítrico pela técnica DAF-FM.....	21
3.8 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio.....	21
3.9 Purificação de células B-1	22
3.10 Extração de RNA.....	22
3.11 Eletroforese em gel de Agarose	23
3.12 Tratamento com DNase	23
3.13 Produção de cDNA.....	23
3.14 Análise quantitativa por PCR em tempo real	23
3.15 Avaliação da capacidade fagocítica	25

3.13 Análise Estatística	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1 Imunofenotipagem de células B-1 da cavidade peritoneal de animais controle e submetidos à restrição de sono por 21 dias (RS21).	26
4.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por células B-1 peritoneais de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.....	26
4.4 Avaliação da expressão de moléculas de membrana marcadoras de ativação em células B-1 peritoneais de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.	28
4.5 Expressão relativa de genes de fatores de transcrição linfóide e mieloide em células B-1 peritoneais de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.	29
4.10 <i>Fagocitose in vivo de promastigotas de L. amazonensis por células B-1 de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.....</i>	34
5 DISCUSSÃO.....	36
6 Conclusões	41
Referências Bibliográficas	42

1 INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é um sistema altamente homeostático, responsável pela manutenção da vida frente ao desafio de patógenos e células cancerosas. É um sistema complexo conhecidamente adaptativo que garante a homeostasia, e passou a ser estudado desde o final do século XVIII, quando o Edward Jenner observou que a varíola bovina passava a conferir proteção contra a varíola humana (MURPHY, 2014). Atualmente com o advento de tecnologia e ao histórico de pesquisas, sabe-se que as respostas do sistema imune podem ser divididas em duas linhas: inata e adaptativa, um mecanismo que ajuda a garantir a efetividade de respostas frente a micro-organismos infecciosos e impedindo a multiplicação de células tumorais (MURPHY, 2014).

Há cerca de cem anos, Metchnikoff descreveu as células fagocitárias que constituem o alicerce da resposta imune inata. Foram identificadas originalmente em equinodermas, embora presentes em quase todos os seres vivos do reino animal (revisado em Gordon, 2016). Filogeneticamente, a resposta imune inata antecede a resposta adaptativa e, isoladamente, confere proteção para a maioria das espécies animais existentes (Beutler & Poltorak, 2001). A resposta inata constitui a primeira linha de defesa contra as doenças infecciosas e é amplamente mediada por neutrófilos e macrófagos (Aderem, 2001; Aderem & Underhill, 1999). No entanto, há relatos na literatura mostrando que a capacidade de fagocitose não se restringe aos fagócitos profissionais, como neutrófilos e macrófagos, mas que existem linfócitos também capazes de realizar tal atividade, como as células B-1 (Novaes e Brito et al., 2010; Geraldo et al., 2016).

Duas linhagens de célula B, designadas B-1 e B-2, foram identificadas com base nas suas origens, distribuição anatômica, marcadores de superfície celular, subtipos de anticorpos produzidos e capacidade de autorreposição (Bao et al., 1998). Quanto à localização anatômica, as células B-1 concentram-se nas cavidades peritoneal e pleural em camundongos (Hayakawa et al., 1985; Herzenberg et al., 1986). Fenotipicamente, as células B-1 diferem das células B-2 por apresentarem expressão não usual de marcadores de superfície ($\text{IgM}^{\text{hi}} \text{IgD}^{\text{lo}}$ CD11b^+) e ausência do marcador CD23 (Berland & Wortis, 2002; Hardy &

Hayakawa, 2001). As células B-1 ainda são subdivididas em B-1a e B-1b pela presença ou ausência da molécula CD5, respectivamente (Herzenberg, 2000; Herzenberg et al., 1986; Kantor & Herzenberg, 1993)

Almeida et al. (2001) demonstraram que células B-1 estão presentes no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes do camundongo e que o recultivo dessas células induziu a expressão de características fenotípicas e fisiológicas de fagócitos mononucleares. Popi et al. (2009) demonstraram que células B-1 expressam tanto fatores de transcrição linfoides quanto mieloides; porém, quando essas células adquirem capacidade fagocítica *in vitro*, há manutenção dos fatores mieloides e diminuição de expressão de fatores linfoides. Embora esses dados sejam muito importantes para a compreensão da fisiologia das células B-1 na resposta imunológica, seu papel nas respostas inflamatórias ainda não está bem esclarecido.

Leishmania spp. são parasitas capazes de causar um grupo de doenças denominadas leishmanioses. Intracelulares obrigatórios de macrófagos, esses protozoários podem se diferenciar em duas formas: promastigotas, alongadas, flageladas e móveis; e amastigotas, arredondadas, sem flagelo aparente, que vivem no interior de células do sistema fagocítico do hospedeiro (Carvalho et al., 1994 apud Machado, 2014). Sua infecção ocorre pela inoculação da formas promastigota metacíclica durante o repasto do inseto vetor, as fêmeas de flebotomíneos (Bates e Rogers, 2004 apud Machado, 2014). Após sua inoculação, a forma promastigota metacíclica se adere ao macrófago sofrendo a fagocitose e localizando-se em uma vesícula denominada fagossomolisossomo (Russell, 1995 apud Machado, 2014). No interior dessas vesículas, a forma promastigota se diferencia em amastigota e passa a se reproduzir por divisão binária até que ocorra o rompimento da membrana e a infecção de novos macrófagos (Murray et al., 2005 apud Machado, 2014). Após o inseto vetor se alimentar com o sangue contaminado do hospedeiro, ocorre também a ingestão de macrófagos e monócito contendo formas amastigotas, que serão liberadas em seu intestino médio e completarão o ciclo parasitário.

Em 2010 nosso grupo demonstrou pela primeira vez que as células B-1 são capazes de fagocitar *Escherichia coli* *in vivo* e *in vitro* (Novaes e Brito et al., 2010), posteriormente outros grupos obtiveram resultados semelhantes, avaliando *Escherichia coli* e *Trypanosoma cruzi* (PARRA et al., 2011; ROCHA et al., 2019). Recentemente publicamos outro trabalho mostrando a versatilidade

desta célula, onde fagócitos derivados de células B-1 foram capazes de internalizar promastigotas de *L. amazonensis in vitro* (Geraldo et al., 2016). Nossos resultados mostraram que o índice fagocitário foi maior em B-1 em comparação com macrófagos peritoneais e macrófagos derivados de medula óssea. Esses resultados ressaltam a importância do estudo das células B-1 como fagócitos que podem participar e contribuir para a imunidade aos micro-organismos. No entanto, o papel dessas células em situação de estresse, como a privação e/ou restrição de sono, ainda não foi esclarecido.

A privação de sono é considerada um estressor, já que incita aumento nas concentrações de glicocorticóides em roedores (corticosterona) e em humanos (cortisol) (Palma et al., 2000; Meerlo et al., 2008; Suchecki et al., 2002) e a ativação crônica do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), responsável pela liberação deste hormônio, pode levar a uma série de distúrbios tais como, distúrbios de ansiedade, transtornos afetivos, hipertensão, hiperglicemia, além de prejuízos em respostas imunológicas (Pacak, 2000; Charmandare et al., 2005).

A influência mútua entre sistema imunológico e sono tem sido alvo de averiguação há muitos anos. O primeiro a propor que o sono se alterava na vigência de uma enfermidade foi Aristóteles (334 a.C). Ele descreveu que havia aumento de sonolência e este era coincidente com os períodos de febre. A partir desse estudo, outras importantes observações foram feitas.

Apesar de tais estudos terem sido iniciados há muitos anos, apenas na última década a interação do sistema imunológico com o sono passou a ser pesquisada de forma metódica. Dois importantes princípios guiam a investigação de tal interação. O primeiro deles é a letargia e o desejo intenso de dormir que acompanham certas infecções e alguns estados inflamatórios. E o segundo é o apontamento de que, em circunstâncias de privação de sono, existe perda da integridade imunológica, sugerindo que o sono é fator fundamental para o bom funcionamento do sistema imunológico (Krueger & Fang, 2000; Rogers et al., 2001; Bryant et al., 2004). Assim, há uma conexão bidirecional, ou seja, o sistema imunológico e o cérebro estabelecem comunicação, que é demonstrada pelas modificações no ciclo sono-vigília diante do acionamento imunológico e vice-versa. Dessa forma, os mecanismos que regulam o sono e o sistema imunológico compartilham mediadores envolvidos na resposta imunológica que participam tanto na alteração do sono em resposta a inflamação sistêmica como

na regulação do sono fisiológico (Bryant et al., 2004).

Um grande número de estressores é utilizado em pesquisas a respeito das implicações ambientais sobre a função imunológica. Estudos com modelos experimentais apontam que situações estressantes podem suprimir a resposta de linfócitos do baço e do sangue, como a produção de IL-2 e IFN- γ , a proliferação de células T e a atividade de células *natural killer* (NK) (Moyninhan, 2003). Evidências corroboram a hipótese de que alterações imunológicas estão associadas a determinados distúrbios de sono. Pacientes com insônia crônica apresentam redução no número de células TCD4+ e TCD8+ (Savard et al., 2003). Outrossim, na apneia obstrutiva do sono nota-se concentrações altas das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 (Alberti et al., 2003) e da proteína C reativa, importante marcador de processo inflamatório (Shamsuzzaman et al., 2002). Além disso, distúrbios na distribuição de monócitos, neutrófilos, linfócitos e aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias foram observados em animais privados de sono (Everson, 2005). Toth et al. (1993) mostraram que animais que dormiam mais após inoculação com algumas cepas de bactérias e de fungos, exibiam melhor prognóstico e poucos sinais clínicos adversos. No entanto, aqueles que morreram mostraram pouco aumento no tempo de sono quando comparados aos que sobreviveram à infecção (Toth et al., 1993). Dessa maneira, parece que o sono tem o atributo de assegurar a qualidade do sistema imunológico em condições adversas.

Os estudos realizados até o momento deixam claro que há uma bidirecionalidade entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central e que ainda são necessários mais estudos para que essa relação possa ser melhor compreendida.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi analisar a população de células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 que seguiram o protocolo de restrição de sono durante 21 dias e identificar possíveis diferenças quando comparado ao grupo controle. Além disso, avaliar parâmetros como, alterações na produção de NO e ROS, expressão de marcadores de superfície celular, bem como, analisar padrão de fagocitose das células B-1 após a administração de *Leishmania amazonensis* nos grupos controle e restrito de sono.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções

3.1.1 TBE 10x (1L): Tris Base 108g, Ácido Bórico 55g, EDTA 80 mL 0,5M, acertar o pH em 8,0 e completar para 1L com água destilada.

3.1.2 PBS 1x (1L): NaCl 8g, KCl 0,2g, Na₂HPO₄ 1,44g e KH₂PO₄ 0,24g. Dissolver os sais em 800mL de água destilada, ajustar o pH em 7,4 e completar para 1L com água destilada.

3.1.3 MACS: SFB 5%, EDTA 2mM completar para 500ml com PBS 1x e ajustar o pH entre 7,2 e 7,4

3.2 Animais

Para a realização do trabalho, foram utilizados animais da linhagem C57BL/6 machos com idade de 6 a 8 semanas fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O estudo foi conduzido seguindo as condições de luz similares à natural, com 12h de iluminação artificial e 12h sem iluminação, mantendo as condições de temperatura ideal para a espécie (23± 2°C). Os animais foram mantidos no biotério do Centro Universitário São Camilo, e foram disponibilizados em gaiolas adequadas para a quantidade de animais com comida e água *ad libitum*.

3.3 Rotina de Restrição

Os animais foram divididos em dois grupos (controle e restritos de sono) com a devida identificação na base das gaiolas moradia. Para a restrição do sono foi utilizado o método de plataforma múltipla, sendo cada plataforma de cimento com 3,5 cm de diâmetro por 4 cm de altura e em número suficiente para a livre movimentação dos camundongos (aproximadamente 4 animais por gaiola) e foi inserido aproximadamente 2 cm de água limpa para que os animais permanecessem em cima das plataformas em constante estado de vigília. Este

é um método eficiente, pois os animais ao entrarem em sono paradoxal sofrem hipotonia muscular e acabam caindo das plataformas, ocasionando o despertar, mantendo-o em constante estado de vigília, não sendo necessária a constante observação dos animais. Os camundongos do grupo experimental foram trocados exatamente às 16:00 h e transferidos para a gaiola de restrição para serem retirados às 10:00 h do dia seguinte. Este processo perdurou por durante 21 dias ininterruptos.

3.4 Rotina do Experimento

Após os 21 dias de restrição de sono os animais foram eutanasiados por meio do método de decapitação conforme informado no trabalho de pesquisa entregue ao CNPq e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 01/018, seguindo todas as normas pela CEUA estipuladas para diminuir o estresse causado pelo procedimento. Após eutanásia dos animais, foi realizada a exsanguinação dos mesmos para um tubo contendo EDTA que foi posteriormente processado e armazenado.

Em seguida foi realizada lavagem peritoneal para avaliação de algumas características de células residentes desta região. Por citometria de fluxo foram avaliadas as porcentagens das células B-1, bem como as concentrações de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio intracelulares dessas células, e, a avaliação da expressão de moléculas de membrana marcadoras de ativação celular. Este procedimento foi realizado em todos os animais. Após o término as carcaças foram descartadas seguindo as leis de descartes de materiais biológicos, identificadas com sacolas brancas com o símbolo adequado.

3.5 Parasitas

A cepa de *L. amazonensis* (MHOM / BR / 1973 / M2269), caracterizada pelo Dr. JJ Shaw (Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil) foi gentilmente cedida por Patrícia Xander (Universidade Federal de São Paulo, *campus* Diadema, Brasil). As promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio 199 (Gibco, Life Technologies Brand, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 4 mM bicarbonato de sódio, 4 mM HEPES, 1 mM

adenina, 5 lg / mL hemina (bovino tipo I) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 10% de soro fetal de bezerro (FCS) (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e mantidos a 26 ° C até à fase estacionária de crescimento. Os parasitas foram então recuperados por centrifugação e ressuspensos em solução salina tamponada com fosfato, isenta de endoxina (solução estéril).

3.6 Citometria de Fluxo

Após eutanásia, células provenientes da cavidade peritoneal dos camundongos foram usadas para avaliação das populações celulares. Para tanto, primeiramente, as células foram incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 (BD Pharmingen), para bloqueio de receptor Fc. Em seguida, as células foram lavadas e marcadas usando os anticorpos específicos para os marcadores desejados. Após 40 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas novamente e caracterizadas fenotipicamente por aquisição de dados em citômetro de fluxo *Accuri C6* (BD - Becton, Dickinson and Company. Para análise dos dados, foi utilizado o *software* FlowJo (Tree Star, Inc.). Foram utilizados os seguintes parâmetros: B-1, marcação com CD19+/CD23-/CD11b+/IgM+; Macrófagos, marcação com: F4/80+/CD19-/CD11b+. Para verificação dos marcadores de ativação das células B-1: MHC-II, CD80, CD86 e CD40.

3.7 Avaliação da produção de óxido nítrico pela técnica DAF-FM

As células B-1 foram submetidas ao protocolo de detecção de NO conforme instruções do fabricante. Resumidamente, as células em suspensão foram incubadas com o DAF-FM diluído a 10 µM por 40 minutos a 4°C. Após lavagem das células, para remover o excesso de sonda, as células foram incubadas em meio RPMI fresco por 30 minutos para permitir a desesterificação completa do sistema diacetato intracelular. Após período de incubação a leitura das células foi feita por citômetro de fluxo.

3.8 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

As células B-1 foram submetidas ao protocolo de detecção de ROS conforme instruções do fabricante. Resumidamente, as células em suspensão foram incubadas com o marcador H2DCFHDA (Sigma) diluído de a 10 µM por 30 minutos a 37°C. Após lavagem das células, para remover o excesso de

sonda, as células foram incubadas em meio RPMI fresco por 30 minutos. Após período de incubação a leitura das células foi feita por citômetro de fluxo.

3.9 Purificação de células B-1

Linfócitos B-1 foram obtidos por lavado peritoneal de camundongos. Após coleta das células da cavidade peritoneal dos camundongos, as mesmas foram submetidas à centrifugação por 1200 rpm por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foi feita a ressuspensão do *pellet* em tampão MACS. As células totais foram purificadas por colunas magnéticas (MACS, Miltenyi Biotec). Para purificação das células B-1 primeiro houve a seleção negativa das células peritoneais marcadas com anticorpo anti-CD23 conjugado a *microbeads* e posteriormente positivamente selecionadas com anticorpo anti-CD19 conjugado a *microbeads*. As células purificadas foram submetidas a citometria de fluxo para avaliação do grau de pureza das amostras. Adicionalmente as células purificadas foram coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina (*kit* panótico rápido, Laborclin) para análise em microscópio óptico, bem como, para extração de RNA para realização da q-PCR.

3.10 Extração de RNA

O RNA total das células B-1 purificadas foi extraído utilizando PureLink™ RNA Mini Kit (Life technologies), seguindo as especificações do fabricante. Foi utilizado o tampão de lise do *kit* acrescido com β -mercaptoetanol. O conteúdo total foi centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos. Após o processo, o sobrenadante foi retirado e colocado em outro tubo para adição de etanol 70%. O conteúdo foi colocado sobre as membranas que são fornecidas no *kit*. O produto da filtração foi descartado e os filtros contendo RNA retido no processo foi lavado com os tampões de lavagens I e II, também fornecidos pelo *kit*. Depois, o RNA foi obtido a partir dos filtros por centrifugação com 20mL de água ultrapura de alta qualidade (água Milli-Q). O material foi dosado em um aparelho NanoDrop (Thermo Scientific) e as razões 260/280 e 260/230 foram avaliadas. Somente o material com as razões próximas a 2,0 foram utilizados para análises de PCR em tempo real.

3.11 Eletroforese em gel de Agarose

Todas as amostras de RNA foram analisadas avaliando sua integridade em eletroforese em gel de agarose. Foi feito gel de agarose 1,5% (GE Healthcare) diluído em tampão TBE 1x acrescido de gel *red* (Biotium) na proporção 1:100.000. A corrida foi realizada a voltagem constante de 100 V por aproximadamente 45 minutos. Após a corrida, o gel foi avaliado em luz UV para visualização das bandas de RNA. O gel foi fotografado em equipamento fotodocumentador (UVITEC, Cambridge). Somente amostras íntegras foram utilizadas para as análises de PCR em tempo real.

3.12 Tratamento com DNase

Obtido o RNA, quantidades idênticas das amostras íntegras que tiveram boa qualidade foram submetidas ao tratamento com DNase (*Kit* Thermo Scientific) para remoção de possível contaminação com DNA genômico. O tratamento foi realizado seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com DNase *buffer* e DNase livre de RNase disponibilizadas pelo *kit* e depois incubadas a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, foi feita a incubação das amostras a 65°C por 10 minutos para inativação da DNase usando *Stop Solution* do *Kit*.

3.13 Produção de cDNA

Os procedimentos utilizados para obtenção do cDNA foram realizados com o *kit* ProtoScript® *First Stand* (New England BioLabs) seguindo as recomendações do fabricante. Após o tratamento do RNA com DNase, foi preparado um *mix* de reação utilizando 6µl de RNA tratado com DNase, 1µl de oligo(dt) este foi incubado a 70° C por cinco minutos. Em seguida foram adicionados 10µl de *Reaction Mix* e 1µl de *Enzyme Mix* do *kit* e toda a solução foi incubada a 42°C por uma hora em equipamento termociclador (eppendorf). O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até seu uso.

3.14 Análise quantitativa por PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi realizada com o reagente *Sybr Green* (Applied Biosystems). A partir da reação de transcrição reversa, utilizou-se 1 µl de cDNA, 5,0 µl de *master mix Sybr Green*, 2,0 µl de cada oligonucleotídeo (1,0

μ l): *Foward* e *Reverse* (tabela 1). Os genes alvos utilizados para amplificação do cDNA das células B-1 foram ARG, Blnk, E2A (tcf3), EBF(ebf1), G-csfr, IL-10, IL-12, IL-6, M-CSFR, Spi 1 (PU.1), TLR-6, TLR-9 e TNF.

As reações para PCR em tempo real foram realizadas usando equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems), nas seguintes condições: 10 minutos a 50°C para ativação da enzima, desnaturação por 5 minutos a 95°C, e 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minutos. Após avaliar a qualidade da reação com base nas curvas de dissociação, os resultados foram analisados utilizando o programa *StepOne software* (applied Biosystems). Para a quantificação relativa, foi realizado o seguinte cálculo: inicialmente determinou-se o *cycle threshold* (CT), dado pelo número do ciclo em que o sinal de fluorescência atingiu a linha limiar (*threshold line*), ou seja, a linha em que a emissão de fluorescência está acima do ruído de fundo (*background*). O CT encontrou-se invariavelmente na região correspondente à fase exponencial da amplificação, o que torna mais acurada a estimativa de quantificação dos transcritos na amostra original. Os valores de CT dos genes de interesse foram normalizados em relação ao CT do gene constitutivo (ARBP), resultando o Δ CT, representado pelo $CT_{\text{gene}} - CT_{\text{constitutivo}}$. Por fim, calculou-se o $2^{-\Delta D^{ct}}$, sendo este valor a ser trabalhado como representante a expressão relativa para cada gene. Os primers utilizados para amplificação os genes de interesse estão transcritos na tabela a seguir.

Tabela 1 Sequência de nucleotídeos dos *primers* utilizados nas reações de RT-PCR

Gene alvo	Sequencia <i>foward</i>	Sequencia <i>Reverse</i>
ARG	5' CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG 3'	5' GATGTCCCTAATGACAGCTCCT 3'
Blnk	5' GCCCTCCAAGTGTTCTCG 3'	5' GGCAGGCATCACATACATCTC 3'
E2A (tcf3)	5' CCATGCTAGGTGACGGCTCTTC 3'	5' GCGAGCCATTAACCTCAGATCC 3'
EBF (ebf1)	5' GGTGGAAGTCACACTGTCGTAC 3'	5' GTAACCTCTGGAAGCCGTAGTC 3'
G-csfr	5' CTCAAACCTATCCTGCCTCATG 3'	5' TCCAGGCAGAGATGAGCGAATG 3'
IL-10	5' GTCCTTACTGACTGGCATGAG 3'	5' CGCAGCTCTAGGAGCATGTG 3'
IL12	5' GGAAGCACGGCAGCAGAATA 3'	5' AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG 3'
IL-6	5' TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC 3'	5' TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC 3'
M-CSFR	5' TGTCATCGAGCCTAGTGCC 3'	5' CGGGAGATTGAGGGTCCAAG 3'

Spi 1 (PU.1)	5' AGTTCAGGACTTCAGGGAA 3'	5' TTGCTGCTGTAAGCAGAGGT 3'
TLR-2	5' CTCTCAGCAAACGCTGTTCT 3'	5' GGCGTCTCCCTCTATTGTATTG 3'
TLR-6	5' AGCCAAGACAGAAAACCCATC 3'	5' GGGGTCATGCTTCCGACTAT 3'
TLR-9	5' ATGGTTCTCCGTCGAAGGACT 3'	5' GAGGCTTCAGCTCACAGGG 3'
TNF	5' GAAAAGCAAGCAGCCAACCA 3'	5' CGGATCATGCTTTCTGTGCTC 3'

3.15 Avaliação da capacidade fagocítica

A capacidade fagocítica das células B-1 foi avaliada tanto nos animais restritos de sono quanto nos controles. Após o período de restrição de sono foi realizada injeção intraperitoneal de 1.10^7 de *L. amazonensis* por animal, restritos e controles. Após 24 h os animais foram eutanasiados e procedeu-se a purificação das células B-1 por coluna magnética. Subsequentemente, as células B-1 purificadas foram coradas com hematoxilina e eosina (*kit* Panótico Rápido, Laborclin). As células B-1 purificadas e coradas foram então dispostas em lamínulas contendo triarilmetano para sua adesão à lamínula. Posteriormente as lamínulas foram fixadas e seladas em lâmina com entelan (Merck). As lamínulas foram avaliadas sob microscópio óptico para determinação do índice fagocítico (IF). O cálculo do IF foi realizado multiplicando a média do número de parasitas e o número de células infectadas por 100. Foram analisados 300 fagócitos por experimento, sendo 100 fagócitos a cada lamínula. Macrófagos peritoneais foram usados como controle da fagocitose. A identificação foi feita com base na observação direta de formas amastigostas na região intracelular de linfócitos B-1 e macrófagos.

3.13 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA). Os resultados obtidos foram analisados por teste *t* de *Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Imunofenotipagem de células B-1 da cavidade peritoneal de animais controle e submetidos à restrição de sono por 21 dias (RS21).

A avaliação da porcentagem de células B-1 presentes na cavidade peritoneal dos animais mostrou que não houve alteração na população das células B-1 nos animais RS21 em relação aos animais do grupo controle (Fig.1).

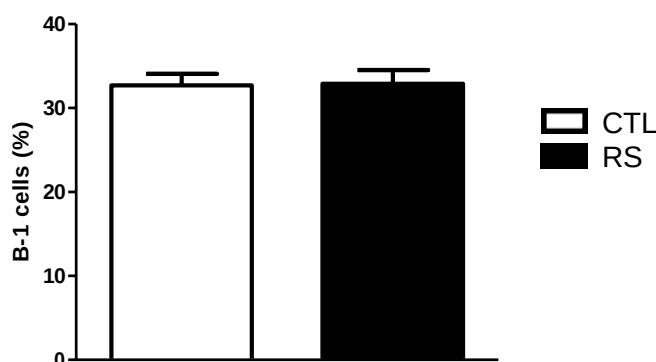
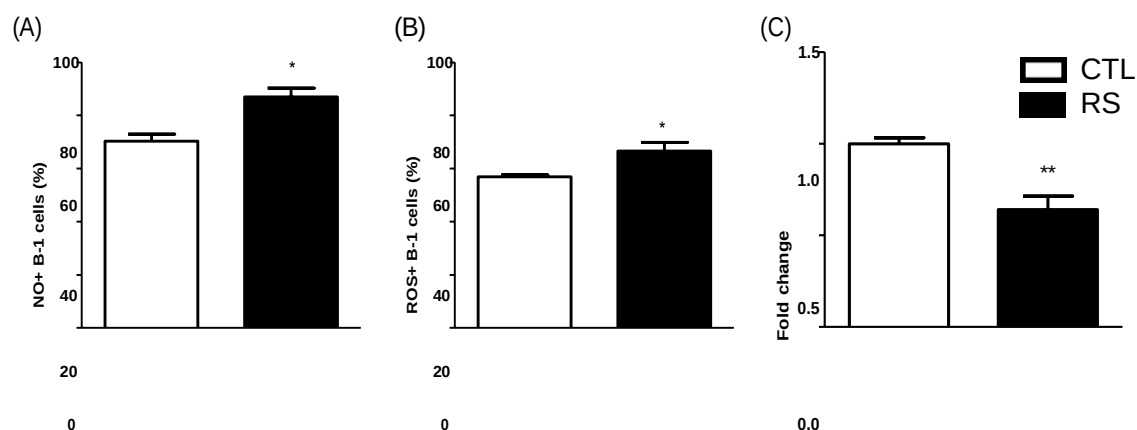


Figura 1: Avaliação da porcentagem de células B-1 na cavidade peritoneal de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias. Foi realizada lavagem peritoneal de animais controles (barras brancas) e submetidos à restrição de sono por 21 dias (RS21; barras pretas). As células foram marcadas com anticorpos fluorescentes adequados e as porcentagens de células B-1 foram avaliadas por citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n = 5 por grupo.

4.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por células B-1 peritoneais de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.

Foi avaliada a produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células B-1 peritoneais de animais controles e RS21. Os resultados mostraram que a produção de NO (Fig. 2A) e de ROS (Fig. 2B) estavam significativamente aumentadas nos animais RS21 em relação aos controles. Esses dados sugerem maior capacidade microbicida das células de animais restritos de sono. Além disso, a expressão relativa do gene da arginase (Fig. 2C) foi investigada após 21 dias de restrição de sono. O RNA purificado a partir de células B-1 dos camundongos foi analisado por PCR tempo real e comparado com RNA de células B-1 de animais controles. As células B-1 totais

do lavado peritoneal dos animais foram purificadas em colunas magnéticas com base na expressão de CD19 e ausência de CD23, como detalhado em material e métodos. Dessa maneira, foi observado que a expressão de arginase foi diminuída nos animais que passaram pelo protocolo de restrição de sono.

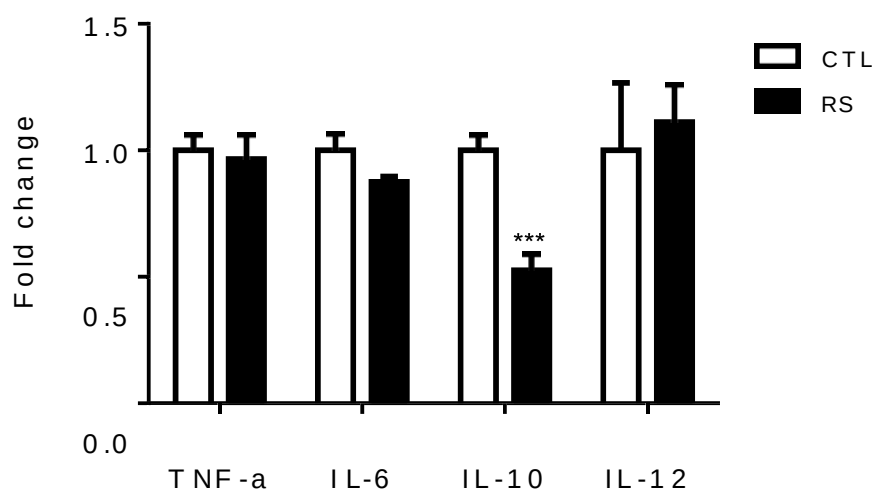


*Figura 2: Células da cavidade peritoneal de animais restritos de sono por 21 dias produzem mais óxido nítrico, mais espécies reativas de oxigênio e menos arginase em relação aos animais controles. Células do lavado peritoneal de animais controle (barras brancas) e RS21 (barras pretas) foram avaliadas quanto à produção de NO (A), ROS (B) e arginase (C). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. n = 5 por grupo.*

4.3 Avaliação da expressão relativa de genes das citocinas IL-10, IL-6, IL-12 e TNF- α em células B-1 peritoneais de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.

Células B-1 são conhecidas por induzir resposta anti-inflamatória, que é mediada em parte pela indução ativa de IL-10 (Barbeiro et al., 2011; Chousterman e Swirski, 2015). A IL-10 é uma citocina que é capaz de modular a atividade microbicida de macrófagos e induzir perfil mais permissivo às infecções intracelulares (Arcanjo et al., 2017; Aziz et al., 2017; Smith e Baumgarth, 2019). Assim, após confirmar que houve aumento na produção intracelular de NO nas células B-1 dos camundongos do grupo RS21, essas células foram avaliadas quanto à expressão relativa do gene da citocina IL-10, bem como de outras citocinas (IL-6, IL-12 e TNF- α) para verificar se a restrição de sono poderia modular a produção das mesmas. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa para as citocinas IL-6, IL-12 e TNF- α entre os grupos controle e experimental (RS21). Porém, a expressão

relativa do gene da IL-10 estava surpreendentemente inferior no grupo RS21 quando comparado ao grupo controle (Fig. 3).



*Figura 3: Camundongos restritos de sono por 21 dias têm expressão gênica relativa alterada da citocina IL-10 quando comparados ao grupo controle. Análise da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (q-PCR) dos transcritos indicados em linfócitos B-1 purificados, utilizando primers que detectaram os genes TNF-α, IL-6, IL-10 e IL-12.. A quantidade de entrada de cDNA foi normalizada analisando os transcritos controle de GAPDH. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$. n=5 por grupo.*

4.4 Avaliação da expressão de moléculas de membrana marcadoras de ativação em células B-1 peritoneais de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.

Células B-1 da cavidade peritoneal de animais controle e RS21 foram avaliadas quanto ao estado de ativação, por meio da avaliação da expressão de moléculas de superfície celular. Foram avaliadas as moléculas CD80, CD86, CD40 e MHC-II, por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, para todas as moléculas avaliadas (Fig. 4).

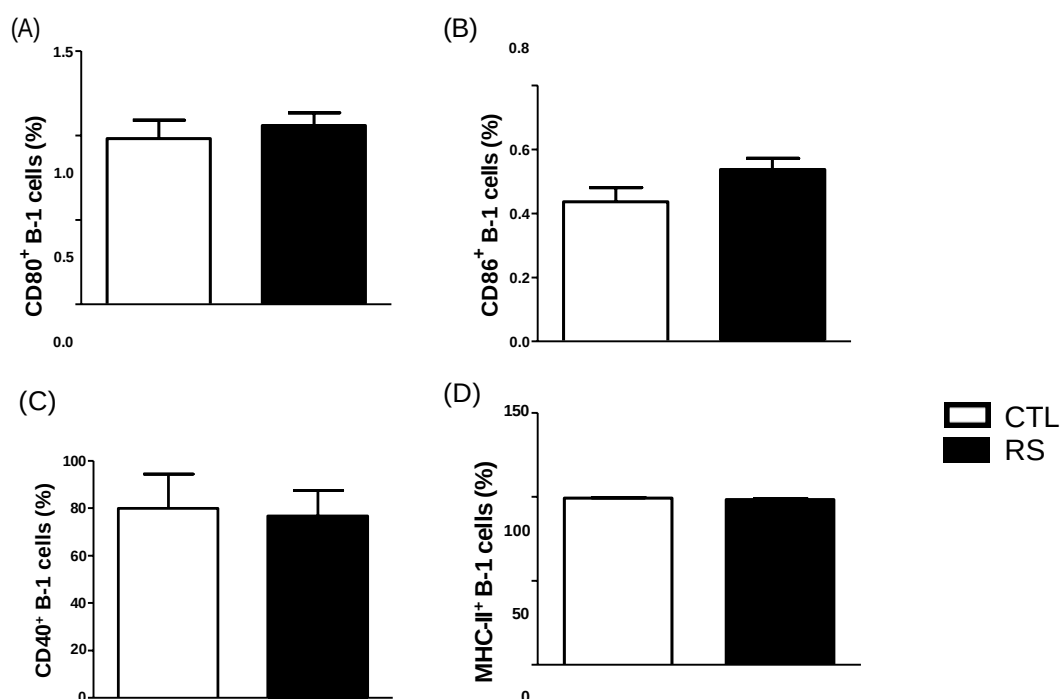


Figura 4: A restrição de sono por 21 dias não altera a expressão de moléculas de superfície marcadoras de ativação celular. Células do lavado peritoneal de animais controle (barras brancas) e RS21 (barras pretas) foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de membrana marcadoras de ativação. Como CD40, CD80, CD86 e MHC II, por citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. $n = 5$ por grupo.

4.5 Expressão relativa de genes de fatores de transcrição linfóide e mieloide em células B-1 peritoneais de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.

A expressão relativa de genes de alguns fatores de transcrição linfóide e mieloide foi investigada após 21 dias de restrição de sono. O RNA purificado a partir de células B-1 de camundongos restritos de sono foi analisado por PCR tempo real e comparado com RNA de células B-1 de animais controles. As células B-1 totais do lavado peritoneal dos animais foram purificadas em colunas magnéticas com base na expressão de CD19 e ausência de CD23, como detalhado em material e métodos. Surpreendentemente, a expressão de fatores de transcrição restritos ao comprometimento linfóides foi diminuída nos animais que passaram pelo protocolo de restrição de sono.

Como visto na Fig. 5, os genes dos fatores de transcrição “fator de células B precoces” (EBF - *early B-cell factor*), “proteína E box” (E2A - *E box protein*) e “proteína ligante de células B” (BLNK - *B cell linker*) são expressos pelas células

B-1. Porém, foram modulados negativamente após 21 dias de restrição de sono. Por conseguinte, no entanto, as células B-1 também expressam fatores de transcrição restritos ao comprometimento mieloide. Foram mensuradas as expressões relativas dos genes “fator estimulador de colônias de macrófagos” (M-CSFR - *macrophage colony-stimulating factor*), “receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos” (G-CSFR - *granulocyte colony-stimulating factor receptor*) e “oncogene de integração proviral do vírus que forma o foco do baço” (SPI1 - *spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene*). A expressão relativa dos genes M-CSFR e SPI1 das células B-1 dos animais restritos de sono não apresentou alteração nos grupos estudados. Curiosamente, a expressão relativa do gene G-CSFR pelas células B-1 do grupo restrito de sono foi maior do que nas células B-1 dos animais controle.

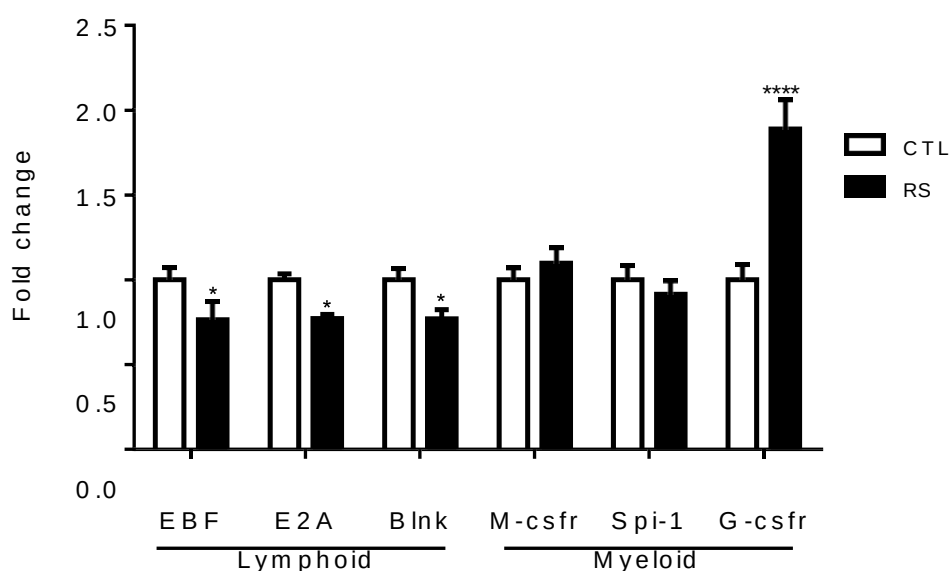
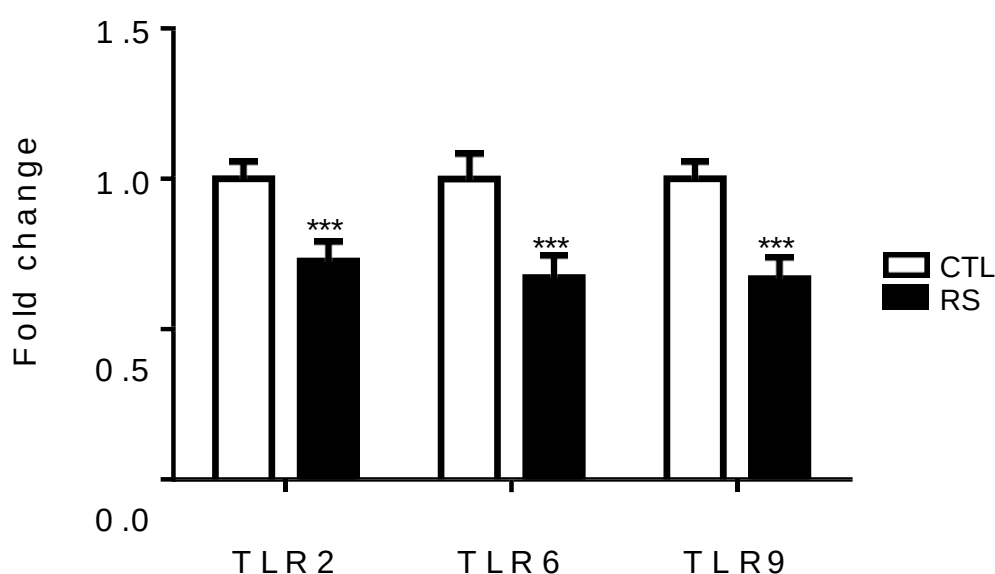


Figura 5: Camundongos restritos de sono por 21 dias têm expressão genética relativa do gene G-CSFR alterada quando comparados ao grupo controle. Análise da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (q-PCR) dos transcritos indicados em linfócitos B-1 purificados, utilizando *primers* que detectaram os genes linfoides ou mieloides indicados. A quantidade de entrada de cDNA foi normalizada analisando os transcritos controle de GADPH. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. EBF, fator de células B precoces; E2A, proteína E box; BLNK, proteína ligante de células B; M-CSFR, receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos; G-CSFR; receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos; SPI1, oncogene de integração proviral do vírus que forma o foco do baço. * $p < 0,05$ **** $p < 0,0001$. n=5 por grupo.

4.6 Avaliação da expressão relativa de genes dos receptores semelhantes a Toll 2, 6 e 9 (TLR-2, TLR-6 e TLR-9) em células B-1 peritoneais de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias.

A expressão relativa dos genes *TLR-2*, *TLR-6* e *TLR-9* foi investigada após 21 dias de restrição de sono. Foi observado que a expressão desses genes estava diminuída nos animais que passaram pelo protocolo de restrição de sono (Fig. 6)



*Figura 6: Camundongos restritos de sono por 21 dias têm expressão genética relativa de receptores semelhantes a Toll alterada quando comparados ao grupo controle. Análise da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (q-PCR) dos transcritos indicados em linfócitos B-1 purificados, utilizando primers que detectaram os genes *TLR-2*, *TLR-6* e *TLR-9*. A quantidade de entrada de cDNA foi normalizada analisando os transcritos controle de *GADPH*. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. *TLR-2*, receptor semelhante a *Toll 2*; *TLR-6*, receptor semelhante a *Toll 6* e *TLR-9*, receptor semelhante a *Toll 9*. *** $p < 0,001$. n=5 por grupo.*

4.7 Imunofenotipagem das células da cavidade peritoneal de animais controle, submetidos à restrição de sono por 21 dias (RS21) e injetados com promastigotas de *L. amazonensis*.

Cada camundongo, controle ou restrito, foi infectado intraperitonealmente com 1×10^7 promastigotas de *L. amazonensis*. A avaliação das porcentagens de células presentes na cavidade peritoneal dos animais mostrou que não houve alteração na porcentagem de células B-1 entre camundongos RS21 em relação aos animais controles (Fig.7).

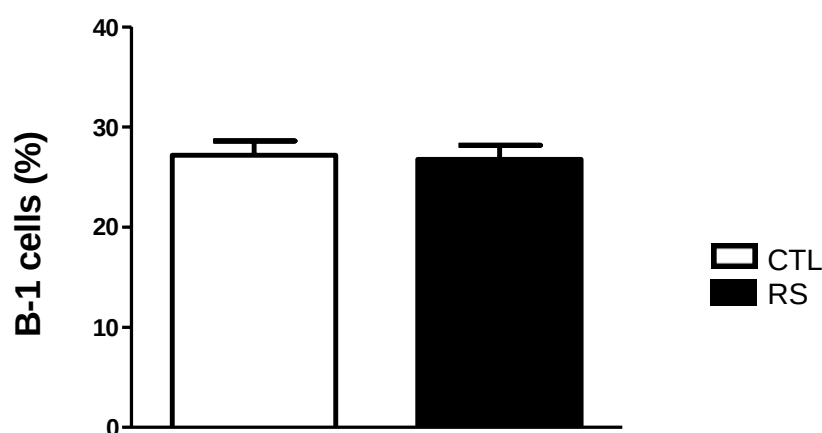
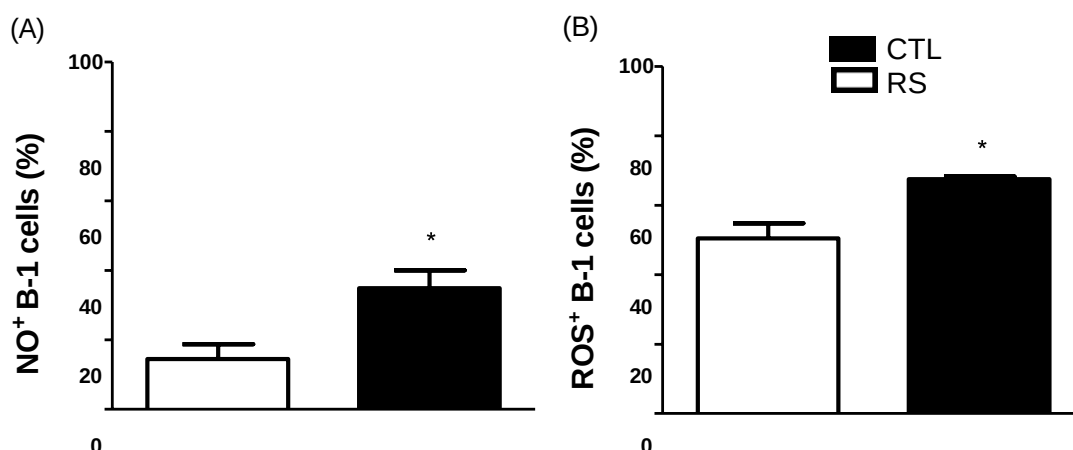


Figura 7: Avaliação das porcentagens de células B-1, na cavidade peritoneal de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias e injetados com promastigotas de Leishmania amazonensis. Foi realizada lavagem peritoneal de animais controles (barras brancas) e submetidos à restrição de sono por 21 dias (RS21; barras pretas). As células foram marcadas com anticorpos fluorescentes adequados e as porcentagens de células B-1 foram avaliadas por citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. n=5 por grupo.

4.8 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por células B-1 de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias e injetados com promastigotas de *L. amazonensis*.

Foi avaliada a produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) por células B-1 peritoneais de animais controles e RS21. Os resultados mostraram que a produção de NO (Fig. 8A) e ROS (Fig. 8B) estavam significativamente aumentada nos animais RS21 em relação aos controles. Esses dados sugerem maior capacidade microbicida das células B-1 de animais restritos de sono.



*Figura 8: Células B-1 de animais restritos de sono por 21 dias e injetados com promastigotas de Leishmania amazonensis produzem mais óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio em relação aos animais controles. Células do lavado peritoneal de animais controle (barras brancas) e RS21 (barras pretas) foram avaliadas quanto à produção de NO (A) e ROS (B) por citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$. n=5 por grupo.*

4.9 Avaliação da expressão de moléculas de membrana marcadoras de ativação em células B-1 de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias e injetados com promastigotas de *L. amazonensis*.

Células B-1 da cavidade peritoneal de animais controle e RS21 foram avaliadas quanto ao estado de ativação, por meio da avaliação da expressão de moléculas de superfície celular. Foram avaliadas as moléculas CD80, CD86, CD40 e MHC-II, por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa para as moléculas CD40 e MHC-II entre os grupos controle e restrito. Ao passo que, para as moléculas CD80 e CD86 foi observado discreto aumento na porcentagem destes marcadores nas células B-1 dos animais RS21 (Fig. 9).

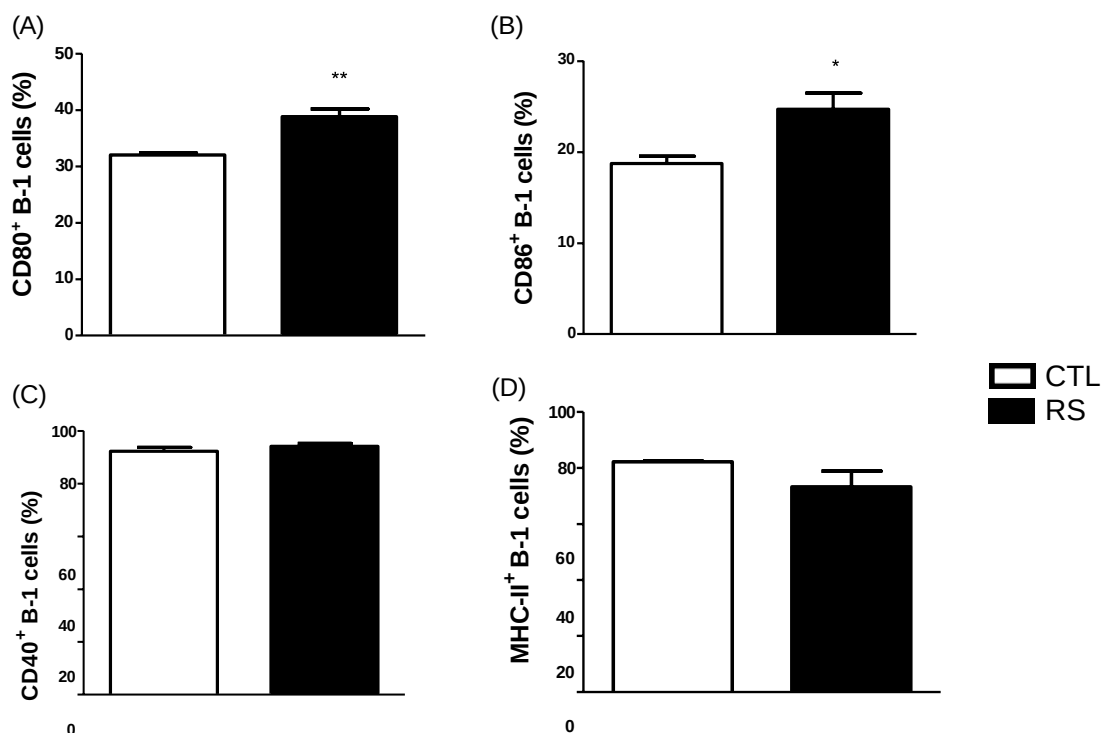


Figura 9: A restrição de sono por 21 dias altera a expressão de CD80 e CD86 na superfície de células B-1 de animais restritos de sono e injetados com promastigotas de *L. amazonensis*. Células B-1 da cavidade peritoneal de animais controle (barras brancas) e RS21 (barras pretas) foram avaliadas quanto à expressão de moléculas de membrana marcadoras de ativação. As moléculas avaliadas por citometria de fluxo foram: CD40, CD80, CD86 e MHC II. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os valores de *p* estão indicados na figura. *n* = 5 por grupo.

4.10 Fagocitose *in vivo* de promastigotas de *L. amazonensis* por células B-1 de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias

Os fagócitos derivados de células B-1 são capazes de internalizar certos patógenos, incluindo *L. major* (Arcanjo et al., 2015), *Escherichia coli* e corpos apoptóticos (Novaes e Brito et al., 2010). Aqui, avaliamos se esta população celular era capaz de fagocitar promastigotas de *L. amazonensis* após o protocolo de restrição de sono. Macrófagos foram utilizados como controle. Os resultados demonstraram que as células B-1 e macrófagos dos animais restritos de sono exibiram taxas significativamente menores de fagocitose quando comparado aos animais do grupo controle (Fig. 10).

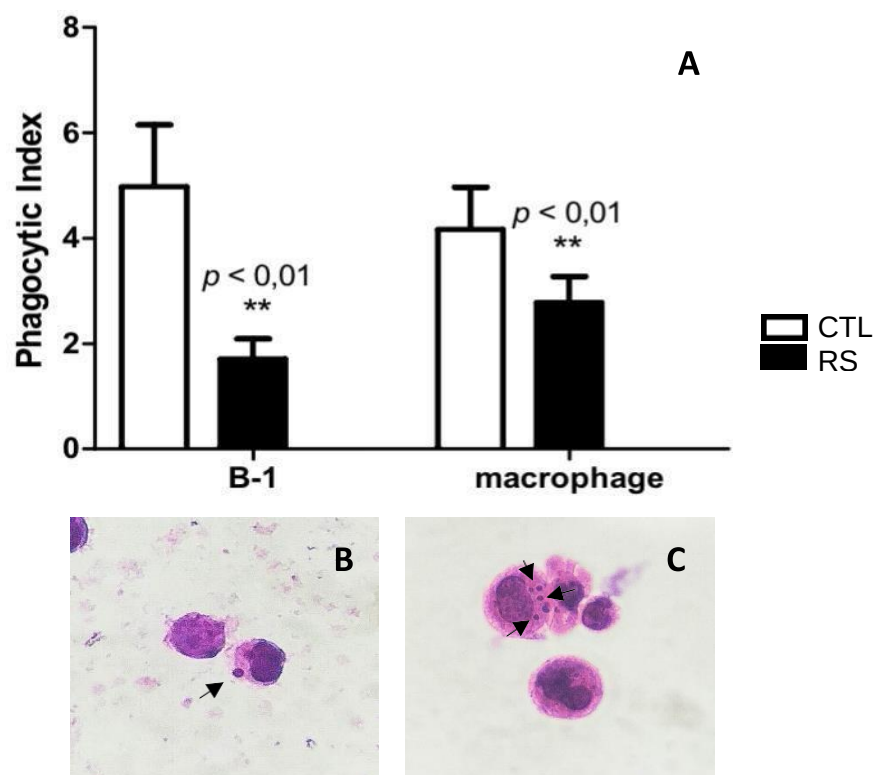


Figura 10: Fagocitose *in vivo* de promastigotas de *L. amazonensis* por células B-1 de animais submetidos à restrição de sono por 21 dias. Células B-1 e macrófagos peritoneais foram purificados em colunas magnéticas utilizando *beads* magnéticas conjugadas a anti-CD23 para seleção negativa e *beads* magnéticas conjugadas a anti-CD19 para seleção positiva das células B-1. Para os macrófagos foram utilizadas *beads* magnéticas conjugadas a F4/80. (A) Índice fagocitário após fagocitose *in vivo* de promastigotas de *L. amazonensis* por células B-1 e macrófagos peritoneais. Animais controle (barras brancas) e RS21 (barras pretas). Células B-1 (B) e macrófagos (C) purificados obtidos por coloração com HE. As setas mostram os parasitas dentro das células B-1 ou macrófagos. Ambas as imagens mostram a ampliação de 1000x. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Os valores de *p* estão indicados na figura. *n* = 5 por grupo.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliado o efeito da restrição de sono por 21 dias (RS21) em provocar alterações na quantidade, potencial fagocítico, produção intracelular de óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas nas células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6, na presença e ausência de infecção com *Leishmania amazonensis*.

Os resultados demonstraram que não houve alteração na porcentagem de células B-1 da cavidade peritoneal nos camundongos restritos de sono, como mostrado na figura 1. Porém, pode-se notar que a produção intracelular de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio destas células foi superior nos animais do grupo RS21 quando comparados ao grupo controle (Fig. 2), fenômeno também observado no grupo RS21, quando injetado com promastigotas de *L. amazonensis* (Fig. 8).

O aumento de óxido nítrico em fagócitos mononucleares derivados de células B-1 que internalizaram *C. neoformans* já foi descrito (GHOSN et al., 2006). Acredita-se que o motivo do aumento desses marcadores seja devido à própria indução celular ao realizar o processo de fagocitose, visto que, tanto as espécies reativas de oxigênio quanto o óxido nítrico, têm, como importante característica, a capacidade microbicida. Interessantemente, como observado na figura 2C, a expressão relativa do gene da arginase estava reduzida no grupo RS21. Uma das enzimas que compete com a arginase pela *L*-arginina é a óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A expressão da iNOS nos fagócitos é fortemente induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicóico, onde a enzima catalisa a formação de NO a partir da *L*-arginina e, o óxido nítrico, por sua vez, participa de vários processos fisiológicos, como vasodilatação, neurotransmissão e eliminação de patógenos (Wu e Morris, 1998). A presença da iNOS está associada ao aumento da atividade microbicida e, um metabólito intermediário da metabolização da arginina, o N-G-hidroxi-*L*-arginina (NOHA), impede a ação da arginase, conseqüentemente aumenta a disponibilidade da *L*-arginina para a produção de NO (Hecker et al., 1995). Vale ressaltar que, tanto a arginase, quanto a iNOS utilizam a *L*-arginina como substrato. Em nossos resultados,

observamos o aumento dos níveis de NO nos animais que passaram pelo protocolo RS21 concomitante com a redução da expressão da arginase. Como a presença do NO em fagócitos está associado ao aumento da atividade microbicida, acreditamos que as células B-1 ficam mais potentes com relação à destruição microbiana após o protocolo de restrição de sono, fato este, ainda não compreendido.

As células B-1 foram inicialmente conhecidas por terem função importante como fonte de anticorpos naturais (Baumgarth, 2011). No entanto, sabemos agora por meio de vários trabalhos publicados que suas funções vão muito além da produção de anticorpos. As células B-1 são produtoras de uma variedade de moléculas, como IL-10, IL-3 e GM-CSF (Chousterman e Swirski, 2015), que são capazes de exercer influência sobre outras populações de células e, portanto, podem influenciar a suscetibilidade ou resistência em modelos de infecção (Minoprio et al., 1993; Popi et al., 2008; Arcanjo et al., 2017). No presente trabalho, mostramos que células B-1 de camundongos C57BL/6 e submetidos ao protocolo de RS21, a expressão relativa do gene da IL-10 estava inferior no grupo RS21 quando comparado ao grupo controle.

A ativação de fagócitos pode ser um fator determinante para a eliminação de patógenos internalizados. Tal ativação aumenta a atividade microbicida e a produção de NO pode ser crucial nesse processo. Por outro lado, a supressão dessa molécula pode contribuir para a suscetibilidade e sucesso de parasitas (Watanabe Costa et al., 2016; Sanmarco et al., 2017). Por esse motivo, avaliamos se a produção de NO e IL-10 pelas células B-1 estava sendo afetada pelo processo de restrição de sono.

Muitos estudos já relataram que as células B-1 desempenham papel na produção de IL-10 e são capazes de modular outros tipos de células (De-Gennaro et al., 2009; Geraldo et al., 2016; Liu et al., 2016). A IL-10 é uma citocina que pode atuar em diferentes tipos celulares e leva à inibição de várias moléculas que têm papel importante na ativação de fagócitos e na produção de NO (Ouyang et al., 2011; Liu et al., 2016).

Rocha et al. (2019) mostraram que a redução na produção de NO por macrófagos co-cultivados com células B-1 pode ser resultado da ação da IL-10

nos macrófagos. Seus resultados revelaram que a produção de óxido nítrico foi significativamente reduzida na presença de altas concentrações de IL-10 (Rocha et al., 2019). Além disso, Arcanjo et al. (2017) mostraram aumento do parasitismo intracelular de macrófagos por *L. major* na presença de IL-10 provenientes de células B-1. Estes dados corroboram nossos resultados que demonstraram que em células B-1 de camundongos RS21 observamos maior produção de NO intracelular concomitante com marcante redução da expressão relativa do gene da IL-10 nestas células. Sendo assim, parece plausível especular que a restrição de sono leva a uma diminuição de IL-10 que por sua vez, proporciona aumento da concentração de óxido nítrico intracelular nas células B-1 dos camundongos submetidos ao protocolo de restrição de sono por 21 dias.

Sabem-se que, durante a diferenciação mieloide das células B-1, há alteração na expressão de marcadores de superfície bem como de em alguns fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento mieloide destas células. (Popi AF, 2009). Dessa maneira, investigamos a expressão de alguns fatores de transcrição envolvidos na determinação de linhagens hematopoiéticas nas células B-1 de animais restritos de sono. Almeida et al. (2001) demonstraram que células B-1 podem sofrer diferenciação para adquirir um fenótipo de fagócitos mononucleares após a ligação ao substrato *in vitro* (Almeida SR, 2001). Mais tarde, Popi et al. (2009) seguiram a expressão de marcadores de superfície e fatores de transcrição durante essa diferenciação. Assim, foi demonstrado que células B-1 expressam espontaneamente tanto fatores de transcrição restritos ao comprometimento celular linfóide como mieloide (Popi AF, 2009). Dessa maneira, como ainda não se compreende muito bem a fisiologia das células B-1, tampouco em situação de estresse como na restrição/privação de sono, ocorreu-nos verificar como se comportariam alguns fatores de transcrição das células B-1 frente ao protocolo de RS21.

Após o período de restrição de sono, a expressão relativa de alguns genes das células B-1 foi significativamente alterada. Os genes linfóides EBF, E2A e BLNK foram modulados negativamente, enquanto a expressão de genes relacionados ao comprometimento mieloide (SPI-1 e M-CSFR) não apresentaram alterações significativas quando comparado aos animais controle.

Isso indica que essas células tendem a um comprometimento com o perfil mieloide após o protocolo de restrição de sono.

O esclarecimento de mecanismos que determinam o comprometimento de linhagem é considerável não apenas para a compreensão da diferenciação celular, assim como, para a elucidação de mecanismos envolvidos em possíveis transformações neoplásicas. Sendo assim, a promiscuidade de expressão gênica por células B-1 é modelo para estudo de possíveis fatores que induzem alterações nucleares relacionadas à permissividade da coexistência dos programas linfóide e mieloide nestas células após o protocolo de restrição de sono.

Sabe-se que as moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 são expressas principalmente nas células apresentadoras de antígenos (APC), incluindo células dendríticas, macrófagos e células B convencionais (B-2). Estão ausentes ou expressam em baixos níveis nas células apresentadoras de antígenos (APCs) em repouso e são induzidas por vários estímulos, incluindo produtos microbianos que acoplam receptores semelhantes a *Toll* e citocinas como interferon gama. Mussalem et al. (2012) verificaram que a aplicação *Propionibacterium acnes* aumentou as células B-1 no exsudato peritoneal obtidas de camundongos BALB/c e antecipou a diferenciação de células B-1 em fagócitos (B-1 CDP) *in vitro*. Adicionalmente, também foi observado aumento na expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 (Mussalem, et al., 2012). De maneira similar, nossos resultados mostraram claramente que após o protocolo RS21 e injeção intraperitoneal de promastigotas de *L. amazonensis*, células B-1 apresentaram aumento da expressão de CD80 e CD86 (Fig. 9), sugerindo que essas células após restrição de sono e contato com este micro-organismo influenciou a função de apresentação do antígeno das células B-1.

Apesar de serem classificadas como linfócitos, devido à expressão de BCR e produção de imunoglobulinas, as células B-1 também exibem características de macrófagos, na medida em que expressam CD11b e possuem funções fagocíticas e de apresentadoras de antígenos. Além disso, as células B-1 diferenciam-se em “fagócitos derivados de células B-1” (B-1 CDPs) tanto *in vitro* como *in vivo* (Almeida et al., 2001; Mussalem et al., 2012; Popi et al., 2008; Popi et al. al., 2012). Essas células diferenciadas perdem a expressão de CD19 e

começam a expressar F4/80 (CD11b⁺/F4/80⁺/CD19⁻), indicando plasticidade em seu fenótipo (Almeida et al., 2001; Popi et al., 2009; Popi et al., 2012). No entanto, a resposta de células B-1 a antígenos e adjuvantes é pouco conhecida. Alguns estudos demonstraram que a ativação dessas células é mediada por receptores semelhantes a *Toll* (TLR), como na presença de LPS (de *Escherichia coli*) ou sequências CpG (sequência de DNA não metilada). (Takahama et al., 1990; Thomas-Vaslin e Freitas, 1990; Bamba et al., 2005).

Como as células B-1 exibem características tanto dos macrófagos quanto de linfócitos, procuramos investigar o efeito da restrição de sono sobre o potencial fagocítico dessas células. Os resultados demonstraram que, apesar do aumento de NO e ROS intracelulares, houve redução das partículas fagocitadas, tanto pelas células B-1, quanto pelos macrófagos, nos animais que passaram pela RS21 (Fig. 10). Este dado corrobora a diminuição da expressão relativa dos genes dos receptores semelhantes a *Toll* (*TLR-2*, *TLR-6* e *TLR-9*) nas células B-1 dos camundongos restritos de sono (Fig. 6). Dessa maneira, parece plausível inferir que a restrição de sono pode modular o potencial fagocítico das células B-1, bem como a expressão de receptores semelhantes a *Toll*.

6 Conclusões

Os resultados nos permitem concluir que a restrição de sono por 21 dias promove a diferenciação de células B-1 peritoneais em fagócitos, além de aumentar a capacidade microbicida, por aumentar a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, independentemente da infecção por *L. amazonensis*.

Apesar de a restrição de sono, por si só, não interferir com a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, na presença de promastigostas *L. amazonensis* juntamente com o protocolo de restrição de sono, houve aumento desses marcadores, sugerindo que elas potencializaram sua ação como células apresentadoras de antígeno.

Por outro lado, células B-1 de animais restritos de sono reduziram a expressão de receptores semelhantes a *Toll*, o que reduz a capacidade fagocítica destas células.

Conjuntamente, nossos resultados mostram, de maneira inédita, que a restrição de sono induz a diferenciação de células B-1 e aumenta sua capacidade microbicida, embora interfira negativamente com a capacidade fagocítica das mesmas, em parte, por reduzir a expressão de receptores semelhantes a *Toll* nas células B-1.

Referências Bibliográficas

Aderem A, Underhill Dm. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623.

ADEREM A. Role of Toll-like receptors in inflammatory response in macrophages. *Crit Care Med*. 2001 Jul; 29(7 Suppl):S16-8.

ALBERTI A et.al. Plasma cytokine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a preliminary study. *J Sleep Res*. 2003 Dec;12(4):305-11.

ALMEIDA SR, et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int Immunol*. 2001 Sep;13(9):1193-201.

Arcanjo AF, et al. The PGE2/IL-10 Axis Determines Susceptibility of B-1 Cell-Derived Phagocytes (B-1CDP) to *Leishmania major* Infection, *PLoS One*. 2015 May 1;10(5): e0124888.

ARCANJO, Angelica F et al. B-1 cells modulate the murine macrophage response to *Leishmania major* infection. **World Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.151-162, 2017. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.4331/wjbc.v8.i2.151>.

AZIZ, Monowar et al. B-1a Cells Protect Mice from Sepsis: Critical Role of CREB. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 199, n. 2, p.750-760, 19 jun. 2017. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1602056>.

Bamba, H., Ishigaki, H., Ishida, H., Kajino, K., Fujiyama, Y., Ogasawara, K. B1-B Cells Are the Main Antigen Presenting Cells in CpG-ODN Stimulated Peritoneal Exudate Cells. *Microbiol. Immunol*. 2005; v. 49, 89-95.

BAO S, et al. Intestinal IgA plasma cells of the B1 lineage are IL-5 dependent. *Immunology*, 1998. 94(2): p. 181-8.

BARBEIRO, Denise Frediani et al. B-1 cells temper endotoxemic inflammatory responses. **Immunobiology**, [s.l.], v. 216, n. 3, p.302-308, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2010.08.002>

BAUMGARTH, Nicole. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.34-46, 10 dez. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2901>.

Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20: p. 253-300.

Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Critical Care Medicine*, 2001 v. 22, n.7 (Suppl.), p.S2-S6.

Bryant P, Trinder J, Curtis N. Sick and tired: Does sleep have a vital role in the immune system? *Nature Rev Immunol* 2004;4:457–67.

CHOUSTERMAN, Benjamin G.; SWIRSKI, Filip K.. Innate response activator B cells: origins and functions. **International Immunology**, [s.l.], v. 27, n. 10, p.537-541, 8 maio 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxv028>.

COSTA, Renata Watanabe; SILVEIRA, Jose F. da; BAHIA, Diana. Interactions between Trypanosoma cruzi Secreted Proteins and Host Cell Signaling Pathways. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 7, p.388-390, 31 mar. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00388>.

DE-GENNARO, Luiz Antonio et al. B-1 cells modulate oral tolerance in mice. **Immunology Letters**, [s.l.], v. 124, n. 2, p.63-69, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2009.04.003>.

EVERSON, C. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 289.4 (2005): R1054-R1063.

Geraldo MM, Costa CR, Barbosa FM, Vivanco BC, Gonzaga WF, Novaes E Brito RR, Popi AF, Lopes JD, Xander P. In vivo and in vitro phagocytosis of Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigotes by B-1 cells. 2016; Jun;38(6):365-76. doi: 10.1111/pim.12324.

GHOSN, E. E. B.; RUSSO, M.; ALMEIDA, S. R.. Nitric oxide-dependent killing of Cryptococcus neoformans by B-1-derived mononuclear phagocyte. *Journal Of Leukocyte Biology*, [s.l.], v. 80, n. 1, p.36-44, 9 maio 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1005603>.

GORDON, Siamon. Phagocytosis: The Legacy of Metchnikoff. *Cell*, [s.l.], v. 166, n. 5, p.1065-1068, ago. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.017>.

Hardy, R.R. and K. Hayakawa. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 595-621.

Hayakawa K, Hardy RR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med*, 1985. 161(6): p. 1554-68.

HECKER, M. et al. Inhibition of arginase by N-G-hydroxy-L-arginine in alveolar macrophages: Implications for the utilization of L-arginine for nitric oxide synthesis. *FEBS Letters*, 1995 v. 359, p. 251-254.

HERZENBERG L. B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev*, 2000. 175: p. 9-22.

Herzenberg LA, Stall AM, Lalor PA, Sidman C, Moore WA, Parks DR. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev*. 1986 Oct;93:81-102.

Kantor, A.B. and L.A. Herzenberg. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 1993. 11: p. 501-38.

Krueger JM, Fang J. Host defense. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC editors. *Principles and practice of sleep medicine*. 3rd ed. Philadelphia: W.B.Saunders; 2000. p. 255–65.

LIU, Fangwei et al. Role of IL-10-producing regulatory B cells in modulating T-helper cell immune responses during silica-induced lung inflammation and fibrosis. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-2, jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep28911>.

LOPES, José Daniel; MARIANO, Mario. B-1 cell: the precursor of a novel mononuclear phagocyte with immuno-regulatory properties. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. São Paulo, p. 489-496. fev. 2009.

MACHADO, Michelle Menezes. Análise de diferentes cepas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos infectados. 2014. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Parasitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

Meerlo, P., A. Sgoifo, and D. Suchecki. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med.Rev.* 12.3 (2008): 197-210.

MINOPRIO, P et al. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **The Journal Of Immunology**. Paris, p. 4200-4208. 15 out. 1993.

Moynihan, J. A. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav.Immun.* 17 Suppl 1 (2003): S11-S16.

MURPHY, Kenneth. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Mussalem, J.S., Squaiella-Baptistão, C.C., Teixeira,D., Yendo, T.M., Thies, F.G., Popi, A.F., Mariano, M., Longo-Maugéri, I., Adjuvant effect of killed *Propionibacterium acnes* on mouse peritoneal B-1 lymphocytes and their early phagocyte differentiation. *PLoS One*. 2012: 297-310.

NOVAES E BRITO, RR. et al. In vitro and in vivo phagocytic ability of mouse B-1 cells. *Immunology and Immunogenetics Insights*. 2010; 2:31-39.

OUYANG, Wenjun et al. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.71-109, 23 abr. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>.

PACAK, K. Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res*. 49 Suppl 1 (2000): S11-S17.

Palma BD, Suchecki D, Tufik S. Differential effects of acute cold and footshock on the sleep of rats. *Brain Res*. 2000;861(1):97-104.

PARRA, D. et al. Pivotal Advance: Peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. **Journal Of Leukocyte Biology**, [s.l.], v. 91, n. 4, p.525-536, 4 nov. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0711372>

Popi A.F., Godoy L.C, Xander P, Lopes J.D, Mariano M., 2008. B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. *Microbes Infect.* 2008.04.012. v. 10, 817-824.

Popi AF, Motta FL, Mortara RA, Schenkman S, Lopes JD, Mariano M. Co-ordinated expression of lymphoid and myeloid specific transcription factors during B-1b cell differentiation into mononuclear phagocytes in vitro. *Immunology.* 2009 Jan;126(1):114-22.

Popi, A.F., Osugui, L., Perez, K.R., Longo-Maugéri, I.M., Mariano, M.,. Could a B-1 cell derived phagocyte “Be one” of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? *PLOS ONE.* 2012; 7:395-408.

ROCHA, Raphael Francisco Dutra Barbosa da et al. B-1 Cells May Drive Macrophages Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 10, 9 jul. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01598>.

Rogers NL, Szuba MP, Staab JP, Evans DL, Dinges DF. Neuroimmunologic aspects of sleep and sleep loss. *Semin Clin Neuropsychiatry* 2001;6:295–307.

SANMARCO, Liliana M. et al. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease**, [s.l.], v. 1863, n. 4, p.857-869, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.006>.

Savard J, Laroche L, Simard S, Ivers H, Morin CM. Chronic insomnia and immune functioning. *Psychosom Med* 2003;65:211–21.

SECRETARIA DE ESTADO A SAÚDE. 11 ago 2017 Insônia: distúrbio do sono atinge cada vez mais pessoas. Disponível em: <<https://www.saude.se.gov.br/?p=12583>>. Acesso em: 07 fev. 2019.*

Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Lanfranchi P, Wolk R, Kara T, Accurso V et al. Elevated C-reactive protein in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 2002;105:2462–4.

SILVEIRA, Fernanda Ariana Santos. O impacto da restrição crônica de sono na função cognitiva e humor em adolescentes. 2017. 48 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, 2017.

SMITH, Fauna L; BAUMGARTH, Nicole. B-1 cell responses to infections. **Current Opinion In Immunology**, [s.l.], v. 57, p.23-31, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2018.12.001>.

Suchecki, D., P. A. Tiba, and S. Tufik. Paradoxical sleep deprivation facilitates subsequent corticosterone response to a mild stressor in rats. *Neurosci.Lett.* 320.1-2 (2002): 45-48.

Takahama, Y., Ono, S., Ishihara, K., Muramatsu, M., Hamaoka, T.,. Involvement of I-A-restricted B-B cell interaction in the polyclonal B cell differentiation induced by lipopolysaccharide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990; v. 256, 427-443.

Thomas-Vaslin, V., Freitas, A.A. Population kinetics of peritoneal LPSreactive B lymphocytes. *Int.Immunol.* 1990; v. 2, 73-81.

Toth L, Tolley E, Krueger J. Sleep as a prognostic indicator during infectious disease in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 203:179–92.

WU, G.; MORRIS, S. M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal*, 1998 v. 336, p. 1-17.