

**UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA**  
**AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS**  
**POR CÉLULAS B-1 INFECTADAS PELO *Encephalitozoon***  
***cuniculi*: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL**  
**E MODULAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

**ALICIA HERRERA GUTIÉRREZ**

**SÃO PAULO**  
**2023**

**UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA**  
**AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS**  
**POR CÉLULAS B-1 INFECTADAS PELO *Encephalitozoon***  
***cuniculi*: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL**  
**E MODULAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo.

**ALICIA HERRERA GUTIÉRREZ**

**SÃO PAULO**

**2023**

Herrera-Gutiérrez, Alicia.

Vesículas extracelulares produzidas por células B-1 infectadas pelo *Encephalitozoon cuniculi*: análise ultraestrutural e modulação do perfil de macrófagos. / Alicia Herrera Gutiérrez. - 2023.

55 f. : il. color.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo.

1. Microsporidia. 2. Macrófagos. 3. Exossomos. 4. Ectossomos.  
5. Carga multivesicular. 6. Migrassomos. I. Lallo, Maria Anete (orientadora).  
II. Título.

**ALICIA HERRERA GUTIÉRREZ**

**VESÍCULAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS  
POR CÉLULAS B-1 INFECTADAS PELO *Encephalitozoon*  
*cuniculi*: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL  
E MODULAÇÃO DO PERFIL DE MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Anete Lallo

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Diva Denelle Spadacci-Morena

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Anuska Marcelino Alvares Saraiva

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Xander Batista

---

Prof. Dr. Uziel Castillo Velázquez

## Agradecimentos

À minha orientadora por ser um suporte fundamental para o desenvolvimento deste projeto, muito obrigada por tirar todas as minhas dúvidas e realizar cada experimento de mãos dadas comigo.

À minha banca examinadora pelo apoio e pelas observações para a realização desta pesquisa:

Da Universidade Paulista (UNIP) à Dra. Bety por todo o apoio e conselhos que forneceu e por suas preocupações e carinho, à Dra. Anuska por orientar muitos dos experimentos realizados; muito obrigada pelo seu tempo. Realmente aprecio sua ajuda.

À Dra. Patrícia Xander, por sempre explicar com gentileza e paciência como funciona o equipamento da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) principalmente à Dra. Ronalda pelo carinho e paciência na utilização dos equipamentos, assim como à Dra. Mikaela, Su e Gina.

E da *Universisad Autónoma de Nuevo León* (UANL) ao Dr. Uziel por tudo seu apoio e conselhos do “quem não trabalha, não erra”, obrigada.

Às minhas parceiras de laboratório: principalmente Rayane e Eluane; obrigada pela companhia, riso e desespero e toda a ajuda durante os experimentos.

Ao corpo técnico do laboratório da UNIP: Bruno, Su e Cleide; muito obrigada pela sua disponibilidade e por ter a melhor disposição para ajudar e preparar todas as coisas necessárias para poder realizar esta investigação.

Agradeço à CAPES/PROSUP pelo apoio financeiro concedido durante a realização desta pesquisa, e graças a isso, obter o título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

E à Universidade Paulista (UNIP) por me permitir fazer parte de seu programa de pós-graduação.

Essa tese é constituída por 2 capítulos correspondendo a 2 *papers* envolvendo o estudo as vesículas extracelulares na encefalitozoonose:

1. Artigo intitulado “**Aspectos ultraestruturais das vesículas extracelulares produzidas por células B-1 infectadas com *Encephalitozoon cuniculi***” que será enviado para o periódico *Journal of Extracellular Vesicle*.
2. Artigo intitulado “**Vesículas extracelulares de células B-1 modularam o perfil de macrófagos desafiados com *Encephalitozoon cuniculi***” que será enviado para o periódico *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*

# Capítulo 1

## Aspectos ultraestruturais das vesículas extracelulares produzidas por células B-1 infectadas com *Encephalitozoon cuniculi*

Alicia Herrera Gutiérrez<sup>1</sup>, Rayane Cristina Bego<sup>1</sup>, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva<sup>1</sup>, Diva Denelle Spadacci-Morena<sup>2</sup>, Patrícia Batista Xander<sup>3</sup>, Elizabeth Cristina Pérez<sup>1</sup>, Bruno de Lima Araújo<sup>1</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), Rua Dr. Bacelar 902, CEP 04057-000, São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>Professora da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Campus Diadema

<sup>4</sup>Pesquisadora associada, Pós-Doutoranda da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB

**Esse *paper* será enviado para o periódico Journal of Extracellular Vesicle**

## Resumo

As vesículas extracelulares (EVs) compreendem um grupo heterogêneo de vesículas limitadas por membrana carregadas com conteúdo proteico, lipídico e por ácidos nucleicos, sendo responsáveis por parte da comunicação celular. As células B-1 constituem um subtipo de linfócitos que produzem anticorpos naturais e grandes quantidades de IL-10. Contra o microsporídeo *Encephalitozoon cuniculi*, a presença de células B-1 ou de fagócitos derivados de B-1 modulou o perfil de macrófagos para M1, com maior atividade microbicida e as células B-1 apresentavam muitas EVs, indicativo de que a comunicação entre as células poderia ser mediada pelas mesmas. Assim, o objetivo da presente investigação foi caracterizar ultraestruturalmente as EVs liberadas por células B-1 infectadas pelo *E. cuniculi*. Para tal, células B-1 foram obtidas de lavados peritoneais de camundongos Balb/c, enriquecidas em coluna magnéticas e infectadas (EVs *Infected*) ou não (EVs *Uninfected*) com *E. cuniculi*. As EVs e as células foram analisadas em relação ao tamanho, concentração, morfologia em microscopia eletrônica de transmissão e varredura. *E. cuniculi* determinou maior quantidade e diversidade de EVs produzidas por células B-1. As culturas mostraram células B-1, assim como B-1 cell-derivate phagocytes (B-1 CDP). Clusters de exossomos, também nomeados de vesículas intraluminais (ILVs), estavam envolvidos por uma membrana em continuidade à membrana plasmática das células B-1 caracterizavam as EVs conhecidas como carga multivesicular (MVC). O diâmetro médio das ILVs contidos pelos MVC foi de  $68,5 \pm 17,42$  nm. Os migrassomos corresponderam aos clusters de exossomos localizados em projeção da membrana citoplasmática. Os ectossomos tinham origem por brotamentos da membrana plasmática. Os resultados permitiram demonstrar que as células B-1 produzem EVs de natureza diversificada incluindo exossomos, cargas multivesiculares e migrassomos, com expressivo aumento de produção causado pela infecção com *E. cuniculi*.

**Palavras-Chave:** Células B-1, Exossomos, Ectossomos, carga multivesicular, migrassomos.



Title: **Ultrastructural aspects of extracellular vesicles produced by B-1 cells infected with *E. cuniculi***

**Abstract**

Extracellular vesicles (EVs) comprise a heterogeneous group of membrane-bound vesicles loaded with protein, lipid, and nucleic acid content, and are responsible for part of cell communication. B-1 cells are a subtype of lymphocytes that produce natural antibodies and large amounts of IL-10. Against the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, the presence of B-1 cells or B-1-derived phagocytes modulated the macrophage profile for M1, with greater microbicidal activity and B-1 cells had many EVs, indicating that communication between cells could be mediated by them. Thus, the objective of the present investigation was to ultrastructurally characterize the EVs released by B-1 cells infected by *E. cuniculi*. For this purpose, B-1 cells were obtained from peritoneal washings of Balb/c mice, enriched in a magnetic column and infected (EVs Infected) or not (EVs Uninfected) with *E. cuniculi*. EVs and cells were analyzed for size, concentration, morphology in transmission and scanning electron microscopy. *E. cuniculi* determined greater quantity and diversity of EVs produced by B-1 cells. Cultures showed B-1 cells as well as B-1 cell-derived phagocytes (B-1 CDP). Clusters of exosomes, also called intraluminal vesicles (ILVs), were surrounded by a membrane in continuity with the plasmatic membrane of B-1 cells, characterizing the EVs known as multivesicular cargo (MVC). The average diameter of the ILVs contained by the MVC was  $68.5 \pm 17.42$  nm. Migrasomes corresponded to clusters of exosomes located in projection of the cytoplasmic membrane. Ectosomes originated by buds from the plasma membrane. The results allowed demonstrating that B-1 cells produce EVs of diverse nature including exosomes, multivesicular cargo and migrasomes, with a significant increase in production caused by infection with *E. cuniculi*.

**Key words:** B-1 cell, Exosomes, Ectosomes, Multivesicular Cargo, Migrasomes.

## 1. INTRODUÇÃO

As vesículas extracelulares (EVs) representam uma família heterogênea de estruturas vesiculares revestidas por membrana, geralmente com tamanhos nanométricos e derivadas de praticamente todos os tipos de células (Riazifar et al., 2017). São classificadas pelo tamanho e pela biogênese em três classes: (a) exossomos; (b) ectossomas ou microvesículas descamadas, e (c) corpos apoptóticos. Os exossomos têm origem endocítica e diâmetros variáveis entre 30 e 100 nm. Os ectossomas (também conhecidos como microvesículas) têm diâmetros entre 100 e 1000 nm e se formam por brotamento direto da membrana plasmática. Os corpos apoptóticos (50 nm–2 µm) são liberados por células que sofrem morte celular programada por formação de bolhas na membrana celular apoptótica.

Em uma variedade de condições fisiológicas ou patológicas, as EVs podem ser sintetizadas e secretadas por diferentes tipos de células e são amplamente distribuídas em quase todos os fluidos corporais. Especialmente em doenças inflamatórias, as células secretoras liberam mais EVs para regular a imunidade e o metabolismo do corpo, contudo tais mecanismos de produção, liberação e atuação tem sido melhor reportados nos últimos anos. Uma vez que as EVs fazem parte da forma de comunicação entre as células, o conteúdo das mesmas tem sido explorado. Dentre as substâncias que transmitem informações em EVs, os microRNAs (miRNAs) são os mais amplamente estudados já que podem afetar o microambiente imunológico do corpo, afetando o fenótipo dos macrófagos. Entretanto, também podem carrear receptores, lipídios bioativos e proteínas. Por outro lado, as células receptoras podem absorver EVs de várias maneiras: a) pela fusão direta da membrana; b) endocitose; c) fagocitose e micropinocitose (Zhou et al., 2021). Em particular, a fusão e endocitose possuem importante papel na transmissão de informações, e a fagocitose está envolvida principalmente no metabolismo de substâncias (Wang et al., 2019).

Em doenças infecciosas, estudos demonstraram que patógenos como vírus e príons podem explorar exossomos para transferir algumas moléculas derivadas de patógenos para células hospedeiras e causar evasão imune e disseminação de vírus (Pegtel et al, 2011; Schorey et al., 2015; Martin-Jaular et al., 2011). Além disso, as células infectadas por patógenos, ou os próprios patógenos, liberam

microvesículas ou exossomos que podem fornecer antígenos às APCs e modular as respostas imunes inata e adaptativa (Wu et al., 2019). As células dendríticas produzem exossomos constitutivamente e com papel na ativação da resposta imune inata, particularmente de células NK, para aumentar sua atividade citotóxica (Munichet al., 2012). Nas doenças parasitárias, as EVs surgiram como um mecanismo onipresente para mediar a comunicação durante as interações hospedeiro-parasita, através da transferência de fatores de virulência e de moléculas efetoras de parasitas para hospedeiros, regulação da expressão gênica do hospedeiro e das suas respostas imunes e, conseqüentemente, mediação no processo patogênico, portanto, trata-se de assunto relevante para a compreensão da relação parasita-hospedeiro (Wu et al., 2019).

*Encephalitozoon cuniculi* pertence ao filo Microsporidia, um grupo diverso de fungos parasitas intracelulares obrigatórios, desprovidos de mitocôndrias e que são responsáveis por infecções oportunistas, embora também estejam associados a infecções em hospedeiros imunocompetentes (Han, Weiss, 2017; Han et al., 2021; Seatamanoch et al., 2022). Esses patógenos formam esporos, os quais possuem tamanho variando entre 1 a 12 µm, parede espessa e com um túbulo polar espiralado, responsável pela infecção celular, uma característica única desse filo (Wadi, Reinke, 2020). Cerca de 16 espécies de microsporídios foram descritas em mamíferos associadas a infecções intestinais e/ou sistêmicas, sendo os aspectos patogênicos variáveis de acordo com a espécie envolvida e a qualidade da resposta imune do hospedeiro (Han, Weiss, 2017; Han et al., 2020; Han et al., 2021).

As respostas inata e adaptativa são responsáveis pela imunidade contra esses patógenos, particularmente envolvendo as células T citotóxicas, que destroem as células infectadas por *E. cuniculi* (Moretto, Khan, 2022). Entretanto, as respostas associadas às células imunes inatas ainda precisam ser melhor exploradas, nesse contexto se encaixa o papel das células B-1. Encontradas especialmente nas cavidades mesoteliais (peritoneal e pleural), as células B-1 representam a maioria (até 80%) das células B (Hiéronimus et al., 2023; Baungarth, 2017). As diversas funções atribuídas a esse grupo de células incluem: a) secreção espontânea de anticorpos naturais, como IgM e IgA; b) produção de moléculas imunomoduladoras, em especial IL-10, e outras como adenosina, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), IL-13 e IL-35; c) fagocitose e apresentação antigênica, como

fagócitos profissionais ou B-1 cell-derived phagocytes (B-1CDP) (Hiéronimus et al., 2023; Baungarth, 2017; Popi et al., 2012; Popi et al., 2016). Foi anteriormente demonstrada menor resistência à encefalitozoonose em camundongos Xid deficientes em células B-1, enquanto que na presença de células B-1, nos camundongos Balb/c, foi observada menor carga parasitária, aumento da população de macrófagos e da citocina IFN- $\gamma$  associado à encefalitozoonose mais branda (da Costa et al., 2017). *In vitro*, nosso grupo identificou predomínio de macrófagos com perfil M1 e de citocinas pró-inflamatórias na presença de células B-1 houve e, na ausência das mesmas, os macrófagos peritoneais mostraram perfil M2, com atraso na atividade microbicida e menor morte celular (Pereira et al., 2019). Pela análise ultraestrutural, que as células B-1 potencialmente exibiam vesículas extracelulares (EVs), fato que motivou a presente investigação com objetivo de caracterizar ultraestruturalmente as EVs liberadas por células B-1 peritoneais infectadas pelo *E. cuniculi*.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1 Cultura de *Encephalitozoon cuniculi***

Os esporos de *E. cuniculi* foram cultivados em células RK-13 (*Rabbit Kidney*) mantidas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% e neomicina (20 mg/mL) (R10), incubadas à 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Os esporos obtidos dos sobrenadantes foram armazenados a 4°C, purificados em gradiente de Percoll e mantidos em R10.

### **2.2 Comitê de Ética**

Os procedimentos foram realizados com a anuência do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista, de acordo com a diretiva do CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, sob protocolo número 3502290719.

### **2.3 Camundongos**

Os camundongos isogênicos *specific pathogen free (SPF)* das linhagens Balb/c com 8 a 12 semanas de idade, de ambos gêneros, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (Cedeme/UNIFESP), foram mantidos durante o período experimental no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista, em microisoladores com capacidade para cinco animais, em cada gaiola, com controle de luminosidade em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 21°C, umidade relativa do ar de 45 a 55% e ventilação. Os animais receberam *ad libitum* ração peletizada irradiada e água esterilizada por autoclavagem.

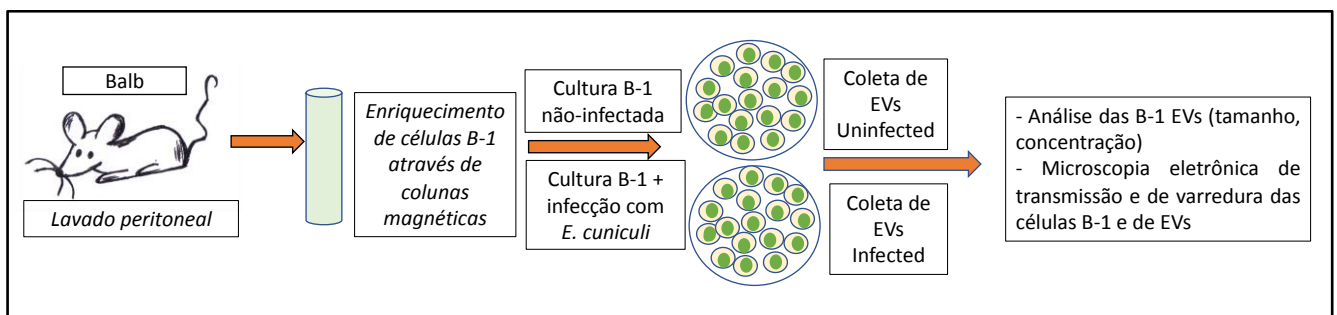
#### **2.4 Obtenção e enriquecimento de células B-1**

Camundongos foram submetidos ao aprofundamento anestésico com sevofluorano até a completa parada cardiorrespiratória. A seguir, foram imersos em álcool e colocados no fluxo laminar para a realização do lavado peritoneal. Após dissecação da pele, cerca de 10 a 14 mL de tampão Macs foram introduzidos no abdome e aspirados com seringa e agulha hipodérmica. O lavado foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento foi analisado em câmara de Neubauer para contagem das células. Para a purificação, as células foram incubadas por 30 minutos com anticorpos anti-CD16/CD32 e depois incubados 1 hora com anticorpos anti-CD23 ligados à microbeads e lentamente passadas em colunas magnéticas (e Brito et al., 2007). Nessa primeira passagem, células com marcadores CD23 (linfócitos B-2 convencionais) ficaram aderidas ao magneto e descartadas, o fluido resultante foi utilizado para a próxima etapa. A seguir, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpos anti-CD19 ligados à microbeads e lentamente passadas em colunas magnéticas. O fluido foi descartado e a coluna foi lavada para a liberação das células CD19<sup>+</sup> ou células B-1 aderidas à coluna magnética. As células B-1 (CD19<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup>) enriquecidas foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD11b e anti-IgM-A, para análise do grau de pureza pela citometria de fluxo no citômetro Acuri A6. A concentração de células B-1 obtida pela purificação em colunas magnéticas foi de 88,2%.

#### **2.5 Infecção *in vitro* de células B-1 para obtenção das vesículas**

As células B-1 obtidas foram cultivadas em placas com 24 poços na concentração de 1x10<sup>6</sup> células por poço, com a adição de esporos de *E. cuniculi* na proporção de 2:1 (2x10<sup>6</sup> esporos por poço) e

mantidos por 24h (Fig. 1). Após da coleta dos sobrenadantes das células infectadas e não infectadas (controle) as amostras foram submetidas a diferentes etapas de centrifugação, (1) centrifugação de 500 g por 10 minutos para retiradas de células e parasitas; (2) depois o sobrenadante de foi centrifugado a 1.500 g por 10 minutos; (3) o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos para a remoção de células e debris celulares; (4) e então foi centrifugado a 100.000 g por 1 hora e 30 minutos e o *pellet* contendo as vesículas foi ressuspendido em PBS e novamente centrifugado a 100.000 g por 1 hora e 30 minutos (Ultracentrífuga Sorvall® RC 90 – rotor T-1250). Ao final o *pellet* contendo as vesículas extracelulares foi ressuspendido em PBS 1x filtrado e armazenado a 4°C até sua utilização.



**Figura 1.** Delineamento experimental para análise morfológica de EVs produzidas por células B-1 enriquecidas e infectadas com *E. cuniculi* ou não. A coleta de células B-1 foi feita a partir de lavados peritoneais de camundongos Balb/c e o enriquecimento foi realizado em colunas magnéticas. Então, as células B-1 enriquecidas foram infectadas (EVs *Infected*) ou não (EVs *Uninfected*) com *E. cuniculi* (MOI 2:1) por 3 horas. As EVs isoladas foram analisadas (tamanho, concentração) e as culturas de B-1 enriquecidas e desafiadas foram analisadas morfológicamente pela microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

## 2.6 Determinação da concentração e tamanho das vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares purificadas a partir de células B-1 foram diluídas 50 vezes em PBS (1x) filtrado e analisadas no equipamento Nanosight (NS300 Malvern™) para determinar a concentração e o tamanho das partículas. Foram realizadas cinco capturas com um minuto de duração (20 frames por segundo), sob uma temperatura de 25°C, com equipamento do Laboratório de Nefrologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. Foi utilizado o período

de infecção das células B-1 de 3h. Também foram coletadas EVs de células B-1 sem infecção (*Uninfected* – controle).

## **2.7 Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV) das células B-1 e de suas EVs**

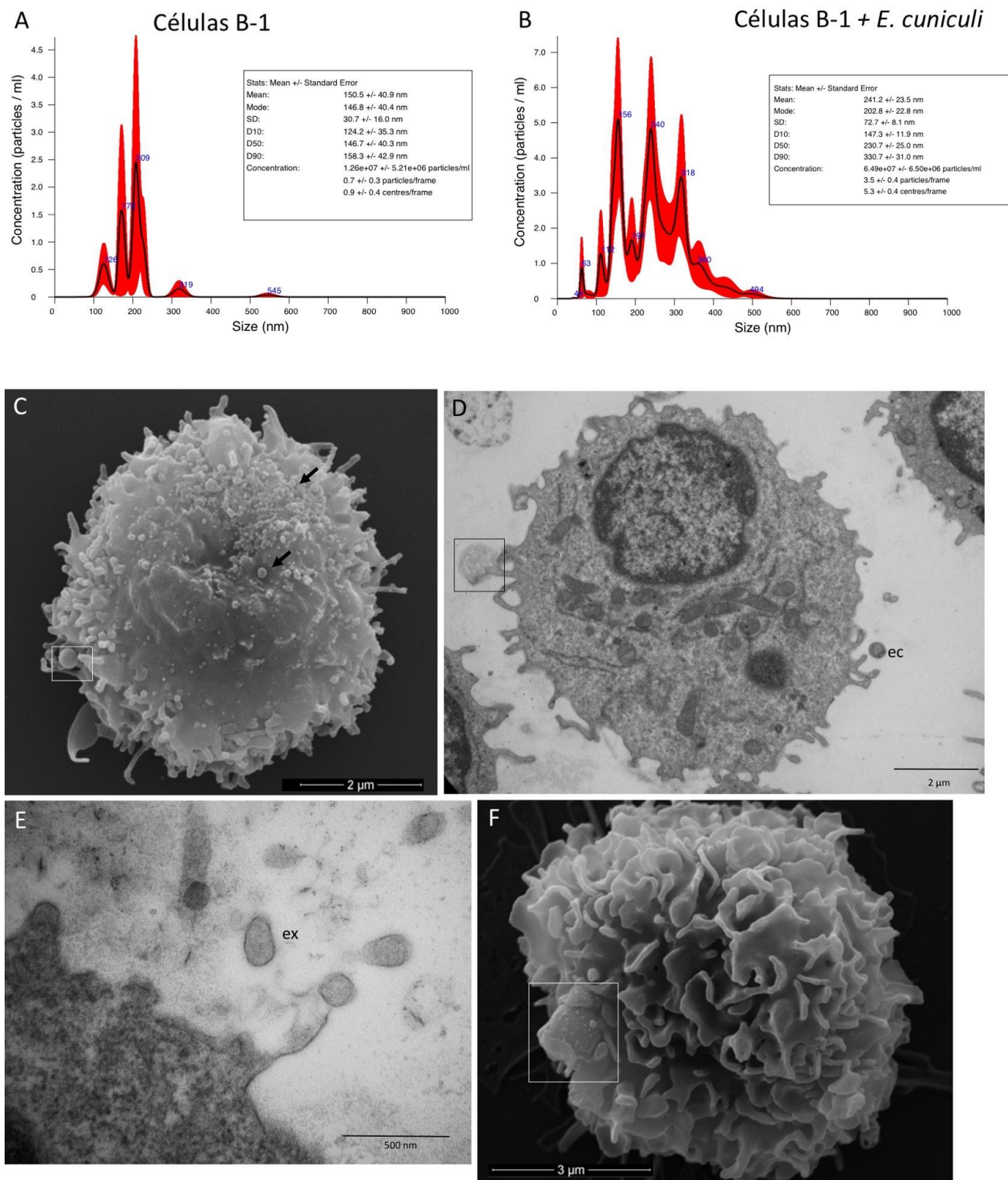
As células B-1 enriquecidas foram cultivadas em placas com 6 poços em RPMI com 10% de foro fetal bovino livres de EVs por uma hora. Após esse período, metade foi infectada com *E. cuniculi* (MOI 2:1) e outra metade não foi desafiada. Após 3 horas de incubação, as células foram liberadas dos poços e fixadas em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2) a 4°C durante 10 h, pós-fixados em OsO<sub>4</sub> a 1% tamponado durante 2 h e, em seguida, ficaram durante a noite em acetato de uranila 5% a 4°C. Após desidratação em etanol com óxido de propileno, foram embebidas em resina Epon. Os cortes ultrafinos serão duplamente corados com acetato de uranila aquoso e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109 operado a 80 kV (projeto FAPESP 18070806074 - pelo Instituto Butantan). A MEV foi realizada a partir das células B-1 cultivadas em lamínulas, seguindo o mesmo protocolo de infecção indicado para MET. Após a incubação, as células aderidas às lamínulas foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído a 5%, paraformolaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 2 horas), lavada 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, com posterior adição de Poli-l-lisina a 0,1% sobre lamínulas para evitar o descolamento das células. Após desidratação em série crescente de etanol, os materiais desidratados foram secos utilizando o método de ponto crítico e, posteriormente, recobertos com uma fina camada de ouro. Os fragmentos foram analisados em alto vácuo no microscópio eletrônico de varredura - MEV (marca FEI, modelo Quanta 250).

## **3. RESULTADOS**

A produção de EVs por células B-1 infectadas (EVs *Infected*) ou não (EVs *Uninfected*) por esporos de *E. cuniculi* foi mensurada por rastreamento de nanopartículas (Fig. 2A, B), sendo

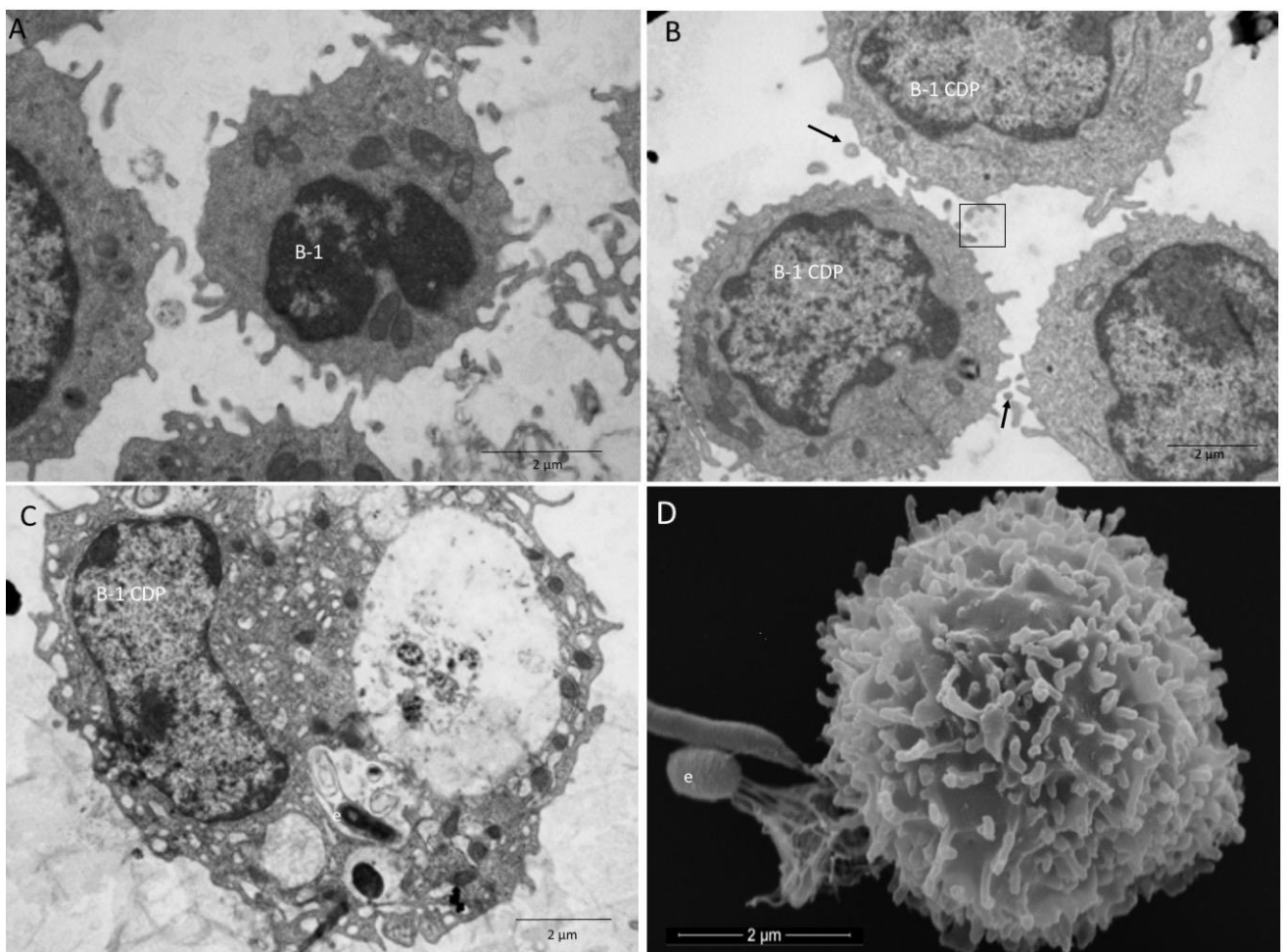
identificadas maiores quantidades de EVs produzidas e maior diversidade de tamanho após a infecção (Fig. 2B). A concentração obtida de EVs *Infected* foi de  $367 \times 10^7$  partículas por mL, enquanto que para EVs *Uninfected*, a concentração obtida foi de  $152 \times 10^7$  partículas por mL. Houve grande variação nos tamanhos das EVs produzidas pelas células B-1 infectadas, entre 48 e 494 nm, porém com tamanho médio foi de  $241,2 \pm 23,5$  nm. Para as EVs produzidas pelas células B-1 os tamanhos foram de 100 a 319 nm com média de  $150,5 \pm 40,9$  nm, demonstrando variação muito menor (Fig. 2A, B). A análise ultraestrutural demonstrou a presença de EVs de morfologia distintas (Fig. 2C-F).





**Figura 2. Quantificação e identificação de EVs liberadas por células B-1.** A) Discriminação do tamanho e da quantidade de EVs produzidas por células B-1 não infectada pelo rastreamento de nanopartículas (NTA) por NanoSight; B) Discriminação do tamanho e da quantidade de EVs produzidas por células B-1 infectada pelo rastreamento de nanopartículas (NTA) por NanoSigh; C) Ultramicrografias eletrônica de varredura de células B-1 infectada pelo *E. cuniculi*. Notar projeções da membrana citoplasmática e a EVs de tamanhos variados na membrana celular (em destaque e nas setas). D) Ultramicrografia eletrônica de transmissão de células B-1 infectada pelo *E. cuniculi* demonstrando presença de corpo multivesicular like ou migrassomo (em destaque) e presença de EVs livres na forma de ectossomos (ec). E) Ultramicrografias eletrônica de transmissão de exossomas (ex) livres liberados a partir de um cargo multivesicular de células B-1 infectada pelo *E. cuniculi*. F) Ultramicrografias eletrônica de varredura de B-1 desafiada pelo *E. cuniculi* apresentando muitas projeções da membrana citoplasmática e uma EV na membrana celular (em destaque).

A análise ultraestrutural das culturas não infectadas revelou padrão morfológico de células B-1 predominante, as quais exibiam núcleo lobado, com cromatina densa e pontes da membrana nuclear unindo os lóbulos, retículo endoplasmático bem desenvolvido e com poucas mitocôndrias no citoplasma mais escasso (Fig. 3A). Entretanto, nas culturas de células B-1 infectadas, foi mais frequente a presença de células B-1 com padrão de fagócito ou B-1 CDP (Fig. 3B), apresentando muitas projeções citoplasmáticas e cromatina nuclear menos densa. Também pode ser observada a atividade fagocítica dessas células, nas quais o núcleo ficava posicionado lateralmente e, no citoplasma, grandes vacúolos fagocíticos podem ser observados com esporos de *E. cuniculi* (e) ou com resíduos líticos no seu interior (Fig. 3C, D).



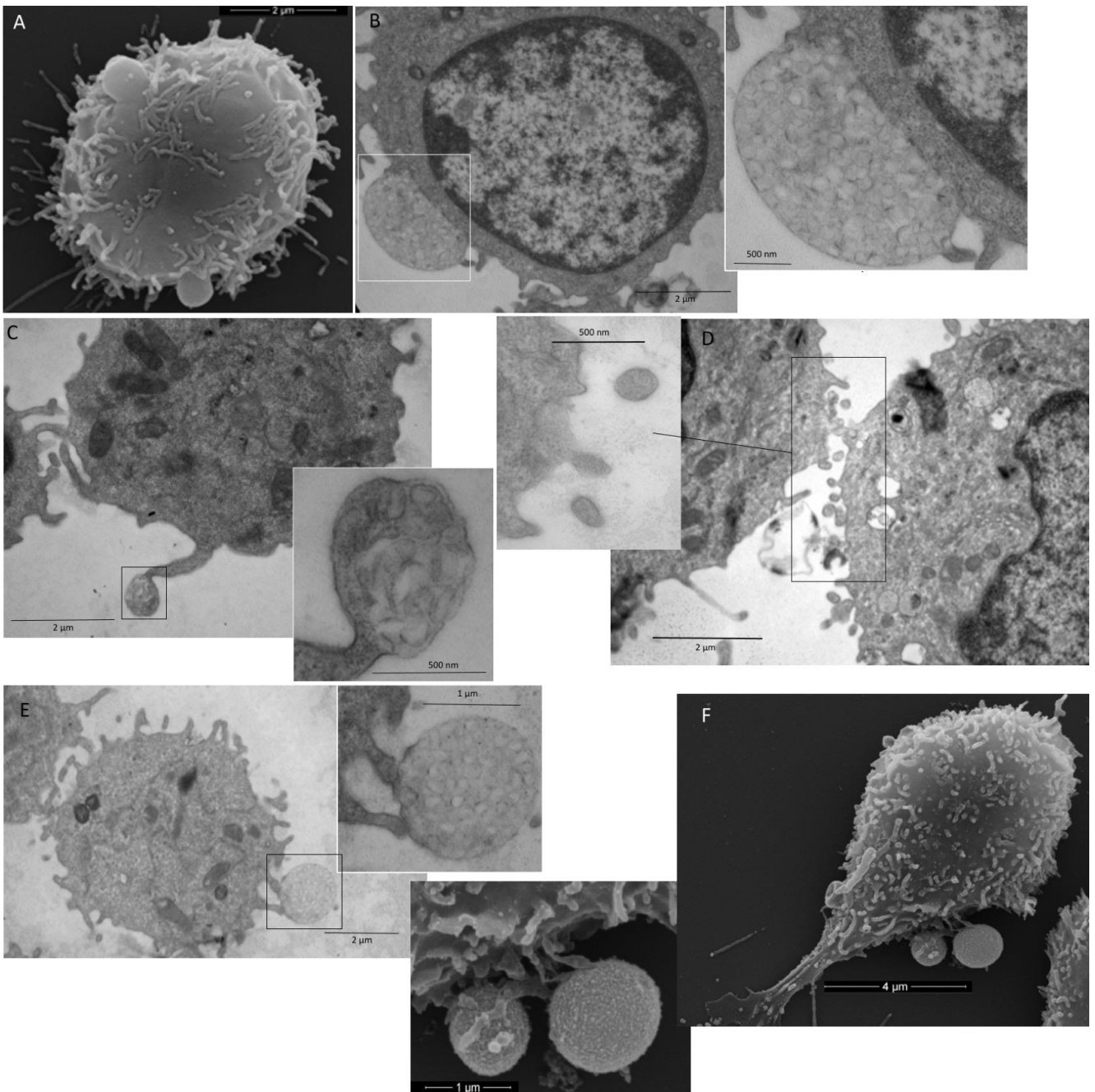
**Figura 3. Ultramicrografias eletrônica de transmissão (A, B, C) e de varredura (D) de células B-1 e fagócitos derivados de B-1 (B-1 CDP) provenientes de células aderentes peritoneais de camundongos Balb/c. A) Células B-1 não infectada pelo *E. cuniculi*, apresentando núcleo lobulado, cromatina densa e poucas mitocôndrias; B) B-1 CDP, núcleo mais arredondado e cromatina menos**

densa. Notar a liberação de ectossomos (seta) e no detalhe exossomos; C) B-1 CDP com núcleo lateralizado e citoplasma expandido, com vacúolos fagocíticos e esporos em degeneração; D) Célula B-1 com muitas projeções citoplasmáticas dispersas pela membrana e em direção ao esporo de *E. cuniculi* (e) localizado na lateral esquerda da célula.

As EVs produzidas pelas células B-1 e pela B-1 CDP mostraram grande diversidade estrutural, tanto na condição infectada como na não infectada, achados que corroboram a capacidade inata de produção de EVs pelas células B-1 (Fig. 4A). Pela microscopia eletrônica de transmissão, exossomos foram observados em clusters e envolvidos por uma membrana em continuidade à membrana plasmática das células B-1, com características semelhantes a carga multivesicular (MVC – *multivesicular cargo*) (Fig. 4B). À semelhança do que é descrito em corpos multivesiculares (MVB- *multivesicular bodies*), o interior dos MVC é repleto de vesículas intraluminais (ILVs) e, somente ao serem liberadas no meio extracelular, recebem a denominação de exossomos (Fig. 4B). Os exossomos possuem baixa electrondensidade e, por essa razão, não foram facilmente identificados pela MET no meio extracelular. O diâmetro médio das ILVs (exossomos) contidos pelos MVC foi de  $68,5 \pm 17,42$  nm (média  $\pm$  DP, n = 20), com diâmetro mínimo de 44 nm e máximo de 92 nm. Foi frequente a observação de clusters de exossomos, com características semelhantes MVC, porém com localização característica de migrassomos, no final de uma projeção da membrana citoplasmática, os quais também podem ser chamados de MVB-like ou migrassomos, como mencionado (Fig. 4C).

Outro tipo particular de EVs muito observado nesse estudo foram os ectossomos, os quais se formavam a partir de brotamentos da membrana plasmática das células B-1 ou B-1 CDPs, com aspecto ultraestrutural mais electrondenso e com tamanhos bem variados (Fig. 4D). Especialmente foram identificados quando duas células estavam bem próximas, hipoteticamente indicando uma forma de comunicação entre elas.

De forma intrigante, EVs foram identificados junto a projeções da membrana celular, nesse as membranas do EVs e do pseudópode estavam preservadas e individualizadas, portanto, distintamente dos migrassomos (Fig. 4E, F). As análises ultraestruturais sugerem que as projeções celulares se direcionam para estabelecer contato com os EVs de forma a permitir a transferência de conteúdo (Fig. 4E, F).



**Figura 4.** Ultramicrografias eletrônica de transmissão e de varredura dos tipos de EVs observados em células B-1 e fagócitos derivados de B-1 (B-1 CDP) infectados com *E. cuniculi*. A) Ultramicrografias eletrônica de varredura de células B-1 com EVs projetadas a partir da membrana celular. B) Ultramicrografias eletrônica de transmissão de MVC junto a membrana celular contendo muitas vesículas intraluminais (detalhe). C) Ultramicrografias eletrônica de transmissão migrassomo, contendo vesículas intraluminais (detalhe). D) Ultramicrografias eletrônica de transmissão de ectossomos liberados entre duas células B-1 CDP, notar no inserto que apresentam maior electrondensidade e tamanhos diversos. E-F) Ultramicrografias eletrônica de transmissão (E) de varredura (F) de células B-1 conectada à EVs por meio de projeção citoplasmática.

#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo nós demonstramos que a infecção por *E. cuniculi* determinou aumento da produção de EVs por células B-1, com marcada diversidade no tamanho das mesmas, corroborando as observações feitas quanto a produção de EVs por células B-1 desafiadas com *Leishmania amazonensis* (Toledo et al., 2020). Os autores descreveram a produção de EVs por células B-1 na ausência ou na presença do patógeno, assim como as observações aqui destacadas. Todos os tipos de células imunes que participam da inflamação podem secretar EVs (van Niel et al., 2022), que por sua vez têm múltiplos papéis nos processos inflamatórios, portanto, esses achados reforçam a participação de células B-1 através de EVs como via de comunicação com outras células do sistema imunológico.

Desde que foram reconhecidas, as EVs demonstram grande heterogeneidade biofísica, bioquímica e funcional (Buzas, 2023). Dentro do espectro dimensional estão as microvesículas e MVB (Tkach, Théry, 2016), as micropartículas, os ectossomos (Meldolesi, 2018), a MVB-like ou migrossomos (Ma et al., 2015), a MVC (Fertig et al., 2014) e aglomerados EV semelhantes a MVB (MVB EVs) (Valcz et al., 2019) e, possivelmente, outros tipos poderão ser incluídos nessa lista a medida que novos estudos sejam realizados. Nossos resultados descrevem pela primeira vez a diversidade ultraestrutural entre as EVs produzidas pelas células B-1 e corroboram o amplo espectro de estruturas morfológicas contidas no escopo das EVs.

No presente estudo, pela análise de MET e MEV, nossos achados indicam que exossomos ou ILVs são liberadas a partir de MVB-like ou de MVC. Exossomos são pequenas EVs de origem endossomal, aglomeradas em MVBs e liberadas por exocitose (Buzas, 2023). Embora com características morfológicas lembrem os MVBs, os clusters de exossomos observados em células B-1 não foram vistos no citoplasma celular e, tampouco eram liberados por exocitose. Nós identificamos MVB-like como clusters de exossomos observados em projeções ou pseudópodes da membrana celular, com formato arredondado e circundados por membrana, característicos de migrassomos. Esse tipo de EVs geralmente é vinculado ao processo de divisão celular, pelos quais são secretados produtos remanescentes (van Niel et al., 2022). Dada a conhecida capacidade das EVs de se ligarem a moléculas da matriz extracelular, também é concebível que as EVs secretadas por células inflamatórias em migração, criem potencialmente gradientes quimiotáticos secundários estáveis ('trilhas') na matriz para

outras células realizarem a migração (Sung et al., 2021). Talvez essa seja hipoteticamente uma explicação para a presença de migrassomos associados às células B-1, uma vez a capacidade migratória de células B-1 para sítios inflamados foi descrita em várias situações (Noal et al., 2016).

Por sua vez, os MVCs mostravam-se como clusters de exossomos, que aparentemente se aglomeravam em pontos da membrana celular, empurravam a membrana produzindo uma projeção vesicular arredondada ou elíptica. Também foram vistos MVCs livres no meio extracelular. As características ultraestruturais aqui referidas também já foram identificadas em telócitos (Fertig et al., 2014) e em células de carcinoma coloretal (Valcz et al., 2019). Adicionalmente, o mecanismo de biogênese de MVC proposto por Fertig et al., (2014) em telócitos, os aglomerados de exossomos incham a membrana plasmática e são gradualmente envelopados por ela e se separam da célula-mãe após a ruptura da membrana externa, permitindo a liberação de numerosas EVs no espaço extracelular. Em contraste com os ectossomas individuais, no entanto, os MVCs podem representar um método mais eficiente de dispersão de sinais biológicos para várias células-alvo, pois um único MVC pode fornecer até 500 EVs (Fertig et al., 2014). Assim, poderia ser um mecanismo muito eficaz de dispersão de sinais envolvendo as células B-1 em relação às demais células do sistema imune.

Os ectossomos, gerados por brotamento da membrana plasmática, incluem EVs de tamanho pequeno, microvesículas de tamanho médio e corpos apoptóticos de tamanho maior (Buzas, 2023). No presente estudo, a análise ultraestrutural corroborou a biogênese dessas EVs, sendo observados ectossomos formando-se a partir da membrana celular, com tamanhos variados. Recentemente foi descrito que EVs de células B clássica podem transferir BCR funcional para outras células B receptoras e os sinais extracelulares recebidos pela célula receptora podem alterar sua sensibilidade ao mesmo ou a diferentes estímulos, o que pode afetar o desenvolvimento ou a ativação das células B (Phan et al., 2021). Como sugerem nossos resultados, a liberação de ectossomos entre células próximas pode ser uma forma de comunicação e sinalização importante nas culturas de células B-1, porém esses fenômenos deverão ser melhor explorados.

Todos os tipos de células imunes que participam da inflamação podem secretar EVs, que por sua vez têm múltiplos papéis nos processos inflamatórios. As EVs carregam mediadores lipídicos bioativos

derivados do ácido araquidônico, como os eicosanóides e as enzimas envolvidas em sua produção, que podem ter efeitos quimiotáticos (Buzas, 2023). Da mesma forma que as citocinas, as EVs são transportadoras onipresentes de mensagens intercelulares e podem funcionar como mediadores imunológicos intercelulares, com funções pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas ou antagônicas. Podemos então concluir que as células B-1 produzem EVs de natureza diversificada incluindo exossomos, cargas multivesiculares e migrassomos, com expressivo aumento de produção causado pela infecção com *E. cuniculi*. Esses resultados abrem caminhos para pesquisas que busquem a identificação dos conteúdos dos diferentes tipos de EVs e suas funções no direcionamento da resposta imune.

## 5. Referências

- Baumgarth N. A hard(y) look at B-1 cell development and function. *J Immunol.* 2017; 199(10):3387-3394.
- Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2023; 23(4):236-250. doi: 10.1038/s41577-022-00763-8.
- da Costa LFV, Alvares-Saraiva AM, Dell'Armeline Rocha PR, Spadacci-Morena DD, Perez EC, Mariano M, Lallo MA. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *Immunobiol.* 2017; 222(2):218-227. doi: 10.1016/j.imbio.2016.09.018.
- Fertig ET, Gherghiceanu M, Popescu LM. Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: electron microscopy and electron tomography. *J Cell Mol Med.* 2014;18(10):1938-43. doi: 10.1111/jcmm.12436.
- Han B, Takvorian PM, Weiss LM. Invasion of Host Cells by Microsporidia. *Front Microbiol.* 2020; 11:172. doi: 10.3389/fmicb.2020.00172.
- Han B, Takvorian PM, Weiss LM. Invasion of Host Cells by Microsporidia. *Front Microbiol.* 2020; 11:172. doi: 10.3389/fmicb.2020.00172. PMID: 32132983; PMCID: PMC7040029.
- Han B, Pan G, Weiss LM. Microsporidiosis in humans. *Clin Microbiol Rev.* 2021; 34, e0001020. doi: 10.1128/CMR.00010-20.
- Han B, Weiss L.M. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol Spectr.* 2017; 5. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016.
- Hiéronimus L, Huaux F. B-1 cells in immunotoxicology: Mechanisms underlying their response to chemicals and particles. *Front Toxicol.* 2023; 5:960861. doi: 10.3389/ftox.2023.960861.
- Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, Chen L, Yan X, Du Y, Yu L. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell Res.* 2015; 25(1):24-38. doi: 10.1038/cr.2014.135.



Magalhães TR, Pinto FF, Queiroga FL. A multidisciplinary review about *Encephalitozoon cuniculi* in a One Health perspective. *Parasitol Res.* 2022; 121(9):2463-2479. doi: 10.1007/s00436-022-07562-z.

Martin-Jaular L, Nakayasu ES, Ferrer M, Almeida IC, Del Portillo HA. Exosomes from *Plasmodium yoelii*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS One.* 2011; 6(10):e26588. doi: 10.1371/journal.pone.0026588.

Meldolesi J. Exosomes and ectosomes in intercellular communication. *Curr Biol.* 2018; 28(8):R435-R444. doi: 10.1016/j.cub.2018.01.059.

Moretto MM, Khan IA. Immune Response to Microsporidia. *Exp Suppl.* 2022; 114:373-388. doi: 10.1007/978-3-030-93306-7\_13.

Munich S, Sobo-Vujanovic A, Buchser WJ, Beer-Stolz D, Vujanovic NL. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunol.* 2012; 1(7):1074-1083. doi: 10.4161/onci.20897.

Noal V, Santos S, Ferreira KS, Almeida SR. Infection with *Paracoccidioides brasiliensis* induces B-1 cell migration and activation of regulatory T cells. *Microbes Infect.* 2016; 18(12):798-803. doi: 10.1016/j.micinf.2016.08.001

Pegtel DM, van de Garde MD, Middeldorp JM. Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1809(11-12):715-21. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.08.002.

Peng, X., Yang, L., Ma, Y. *et al.* Focus on the morphogenesis, fate and the role in tumor progression of multivesicular bodies. *Cell Commun Signal* 2020; 18:122. doi.org/10.1186/s12964-020-00619-5

Pereira A, Alvares-Saraiva A M, De Camargo Konno FT, Spadacci-Morena DD, Perez EC, Mariano M, Lallo MA. B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile ameliorates microbicidal functions and disrupt the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2019; 13:1–22, 2019. doi.org/10.1371/journal.pntd.0007674

Phan HD, Longjohn MN, Gormley DJB, Smith RH, Dang-Lawson M, Matsuuchi L, Gold MR, Christian SL. CD24 and IgM stimulation of B cells triggers transfer of functional B cell receptor to B cell recipients via extracellular vesicles. *J Immunol.* 2021; 207(12):3004-3015. doi: 10.4049/jimmunol.2100025.

Popi AF, et al. Could a B-1 cell derived phagocyte “be one” of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? *PLoSOne.* 2012; 7:e34570.

Popi AF, Longo-Maugéri IM, Mariano M. An Overview of B-1 Cells as antigen-presenting cells. *Front Immunol.* 2016; 7:138.

Riazifar M, Pone EJ, Lötvall J, Zhao W. Stem cell extracellular vesicles: extended messages of regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2017; 57:125-154. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-061616-030146.



Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host-pathogen interactions. *EMBO Rep.* 2015 Jan;16(1):24-43. doi: 10.15252/embr.201439363.

Seatamanoch N, Kongdachalert S, Sunantaraporn S, Siriyasatien P, Brownell N. Microsporidia, a highly adaptive organism and its host expansion to humans. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12:924007. doi: 10.3389/fcimb.2022.924007.

Sung BH, Parent CA, Weaver AM. Extracellular vesicles: Critical players during cell migration. *Dev Cell.* 2021 Jul 12; 56(13):1861-1874. doi: 10.1016/j.devcel.2021.03.020.

Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell.* 2016; 164(6):1226-1232. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.043.

Toledo, Mdos S., Cronemberger-Andrade, A., Barbosa, F.M.C., Reis, N.F., de, C., Dupin, T. V., Soares, R.P., Torrecilhas, A.C., Xander, P. Effects of extracellular vesicles released by peritoneal B-1 cells on experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *J. Leukoc. Biol.* 2020; 1–12. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA0220-464RR>.

Valcz G, Buzás EI, Kittel Á, Krenács T, Visnovitz T, Spisák S, Török G, Homolya L, Zsigrai S, Kiszler G, Antalffy G, Pálóczi K, Szállási Z, Szabó V, Sebestyén A, Solymosi N, Kalmár A, Dede K, Lőrincz P, Tulassay Z, Igaz P, Molnár B. *En bloc* release of MVB-like small extracellular vesicle clusters by colorectal carcinoma cells. *J Extracell Vesicles.* 2019; 8(1):1596668. doi: 10.1080/20013078.2019.1596668.

van Niel, G., Carter, D.R.F., Clayton, A. *et al.* Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022; 23:369–382. doi.org/10.1038/s41580-022-00460-3.

Wadi, L., Reinke, A.W., 2020. Evolution of microsporidia: an extremely successful group of eukaryotic intracellular parasites. *PLoS Pathog.* 16, e1008276. doi: 10.1371/journal.ppat.1008276.

Wang T, Nasser MI, Shen J, Qu S, He Q, Zhao M. Functions of exosomes in the triangular relationship between the tumor, inflammation, and immunity in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2019; 4197829. doi: 10.1155/2019/4197829.

Wu Z, Wang L, Li J, Wang L, Wu Z, Sun X. Extracellular vesicle-mediated communication within host-parasite interactions. *Front Immunol.* 2019; 9:3066. doi: 10.3389/fimmu.2018.03066.

Zhou Z, Tao Y, Zhao H, Wang Q. Adipose extracellular vesicles: messengers from and to macrophages in regulating immunometabolic homeostasis or disorders. *Front Immunol.* 2021; 12:666344. doi: 10.3389/fimmu.2021.666344.

## Capítulo 2

# Vesículas extracelulares de células B-1 modularam o perfil de macrófagos desafiados com *Encephalitozoon cuniculi*

Alicia Herrera Gutiérrez<sup>1</sup>, Rayane Cristina Bego<sup>1</sup>, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva<sup>1</sup>, Diva Denelle Spadacci-Morena<sup>2</sup>, Patrícia Batista Xander<sup>3</sup>, Elizabeth Cristina Pérez<sup>1</sup>, Bruno de Lima Araújo<sup>1</sup>, Uziel Castillo Velázquez<sup>5</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), Rua Dr. Bacelar 902, CEP 04057-000, São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil

<sup>3</sup>Professora da Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, Campus Diadema

<sup>4</sup>Pesquisadora associada, Pós-Doutoranda da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB

<sup>5</sup>Corpo Acadêmico Consolidado de Zoonoses e Enfermidades Emergentes, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Monterrey, México.

## Resumo

As células B1 são células B inatas que possuem características dos sistemas imunológicos adaptativo e inato. Residem principalmente na cavidade peritoneal, são autorenováveis e fornecem a primeira linha de defesa contra patógenos. Foi demonstrada a associação entre a ausência de células B-1 e aumento de macrófagos com perfil M2 infectados com *E. cuniculi*, um microsporídio oportunista e intracelular obrigatório. A presença de células B-1 ou de fagócitos derivados de B-1 determinou perfil M1 e, aparentemente, as células B-1 apresentavam vesículas extracelulares (EVs), indicativo de que a comunicação entre as células poderia ser mediada pelas mesmas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as EVs produzidas por células B-1 sobre o perfil e a viabilidade de macrófagos desafiados com *E. cuniculi*. Para tal, células B-1 foram obtidas de lavados peritoneais de camundongos Balb/c, purificação em coluna magnéticas, as células foram infectadas (EVs *Infected*) ou não (EVs *Uninfected*) com *E. cuniculi*. As EVs e as células foram analisadas em relação ao tamanho e concentração em 3 tempos de infecção com *E. cuniculi*, 3, 12 e 24h, sendo adotado o intervalo de 3h. Macrófagos diferenciados da medula óssea ou de células peritoneais aderentes de camundongos foram tratados com EVs (*Uninfected* ou *Infected*) e depois desafiados com *E. cuniculi*. Procedeu-se um segundo protocolo com o desafio com *E. cuniculi* anterior ao tratamento com as EVs. Após os tratamentos, os macrófagos foram avaliados quanto aos fenótipos M1/M2, viabilidade e produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , MCP-1, IL-6, IL-12, IL-10). Macrófagos diferenciados de medula óssea tratado previamente com EVs de células B-1 não-infectadas tinham perfil M1, em destaque após o desafio com *E. cuniculi*, maior viabilidade e menor apoptose, sem a produção significativa de citocinas. Os macrófagos peritoneais aderentes tratados com EVs antes do desafio com o patógeno tinham perfil M1, com aumento de TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6, maior apoptose e menor viabilidade, porém, o tratamento com EVs após a infecção resultou em aumento do perfil M2, com presença de citocinas pró- e antiinflamatórias TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e IL-10 e menor viabilidade. Assim, conclui-se que as EVs, produzidas por células B-1 infectadas com *E. cuniculi* ou não, modulam o fenótipo de macrófagos naïve de medula óssea para o perfil M1 e macrófagos peritoneais aderentes para perfil misto, M1 e M2, mediante o desafio com *E. cuniculi*.

**Palavras-Chave:** Células B-1, Exossomos, Macrófago, Microsporidia, Vesículas Extracelulares.

Title: **Extracellular vesicles B-1 cells modulated the profile of macrophages challenged with *Encephalitozoon cuniculi***

**Abstract**

B1 cells are innate B cells that have characteristics of both the adaptive and innate immune systems. They reside primarily in the peritoneal cavity, are self-renewing and provide the first line of defense against pathogens. The association between the absence of B-1 cells and the increase of macrophages with an M2 profile infected with *E. cuniculi*, an opportunistic and obligate intracellular microsporidian, has been demonstrated. The presence of B-1 cells or B-1-derived phagocytes determined the M1 profile and, apparently, B-1 cells had extracellular vesicles (EVs), indicating that communication between cells could be mediated by them. The present work aimed to evaluate the EVs produced by B-1 cells on the profile and viability of macrophages challenged with *E. cuniculi*. For this purpose, B-1 cells were obtained from peritoneal washings of Balb/c mice, purification on magnetic columns and infection (EVs Infected) or not (EVs Uninfected) with *E. cuniculi*. EVs were analyzed (size and concentration). Differentiated macrophages from bone marrow or adherent peritoneal cells of mice were treated with EVs (Uninfected or Infected) and then challenged with *E. cuniculi*. A second protocol was carried out with the challenge with *E. cuniculi* prior to the treatment with the EVs. After treatments, macrophages were evaluated for M1/M2 phenotypes, viability and cytokine production (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , MCP-1, IL-6, IL-12, IL-10). Differentiated macrophages from bone marrow previously treated with EVs from non-infected B-1 cells had an M1 profile, highlighted after challenge with *E. cuniculi*, higher viability and lower apoptosis, without significant cytokine production. Adherent peritoneal macrophages treated with EVs before challenge with the pathogen had an M1 profile, with an increase in TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6, greater apoptosis and lower viability; however, treatment with EVs after infection resulted in an increase of the M2 profile, with the presence of pro- and anti-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 and IL-10 and lower viability. Thus, it is concluded that B-1 cells infected with *E. cuniculi* produced EVs of diverse nature including exosomes and ectosomes, which modulate the phenotype of naïve bone marrow macrophages for the M1 profile and adherent peritoneal macrophages for the mixed profile, M1 and M2, through the challenge with *E. cuniculi*.

**Key words:** B-1 cell, Exosomes, Macrophage, Microsporidia, Extracellular vesicles.

## 1. INTRODUÇÃO

Os microsporídios são fungos atípicos, unicelulares, intracelulares obrigatórios e constituem o filo Microsporidia (Han, Weiss, 2017). Esses patógenos ubíquos na natureza, infectam vertebrados e invertebrados, sendo 16 espécies descritas em mamíferos, como animais domésticos de produção (bovinos, caprinos, ovinos, suínos, bubalinos, equinos e lagomorfos), animais de companhia (caninos e felinos), animais de laboratório (camundongos e ratos) e animais selvagens (Han, et al., 2020; Magalhães et al., 2022). Como patógenos oportunistas, acometem pacientes imunossuprimidos pelo HIV, por neoplasias ou por doenças autoimunes, assim como pelo uso de anticorpos imunomoduladores ou terapêutica contra a rejeição de transplantes, porém tem sido relatado em crianças, idosos e pessoas imunocompetentes (Seatamanoch et al., 2022). *Encephalitozoon cuniculi* foi o primeiro microsporídio cultivado *in vitro* e tem sido considerado padrão para os estudos de microsporidiose. Os microsporídios estão entre os agentes intracelulares mais eficientes e desenvolvidos para o parasitismo, e, para interagir com as células hospedeiras, esses patógenos utilizam proteínas efetoras que são capazes de manipular e sequestrar diretamente as vias metabólicas do hospedeiro (van Ooij et al., 2008). Por exemplo, as hexoquinases de microsporídios são secretadas para fosforilar a glicose do hospedeiro, que é então absorvida pelo parasita (Tamin et al., 2020).

A imunidade dos vertebrados contra os microsporídios envolve as respostas imunes inata e adaptativa (Han et al., 2020; Aseeja et al., 2021). Macrófagos infectados com microsporídios liberam citocinas e estimulam células dendríticas produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-12 (Sak et al., 2017). Essas, por sua vez, estimulam os linfócitos T citotóxicos, que destroem as células infectadas por *E. cuniculi* (Texier et al., 2010; Gosh, Weiss, 2012; Moretto, Khan, 2022). A dinâmica da implementação de respostas imunes inatas durante a infecção por microsporídios é um fator determinante para o destino do parasito e tem sido melhor explorada (Smith, Baumgarth, 2019). Nesse contexto, pode-se incluir as células B-1, como elemento da resposta imune inata. Essas células possuem efeitos imunomoduladores diferentes sobre as demais células do sistema imunológico em modelos de infecção e inflamação e, estudos indicam, que

constituem componente chave para a resposta imune inata contra patógenos, por meio da produção de várias moléculas imunomoduladoras, como IL-10, adenosina, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), IL-13 e IL-35, além de se diferenciar em fagócitos (B-1 CDP) que passam a expressar F4/80 em sua membrana e demonstram capacidade fagocítica (Aziz et al., 2015; Baumgarth, 2017; Popi et al., 2004; Popi et al., 2012; Popi et al., 2016; Martin, Kearney, 2001).

Anteriormente, nosso grupo demonstrou que a deficiência de células B-1 em camundongos Xid foi associada a menor resistência à encefalitozoonose (da Costa et al., 2017). Em contrapartida, a presença de células B-1 em camundongos Balb/c contribuiu com uma encefalitozoonose mais branda com menor carga parasitária e sintomas, aumento da população de macrófagos e de IFN- $\gamma$ . Ao realizar a infecção por via oral, foi observado que a transferência adotiva de células B-1 para camundongos Xid aumentou a população de linfócitos T CD8 e a produção de citocinas inflamatórias (Langanke dos Santos et al., 2018). *In vitro*, na presença de células B-1 houve predomínio de macrófagos com perfil M1 e de citocinas proinflamatórias e, na ausência de células B-1, os macrófagos peritoneais mostraram perfil M2, com atraso na atividade microbicida e menor morte celular (Pereira et al., 2019). Os autores demonstraram, pela análise ultraestrutural, que as células B-1 potencialmente liberam vesículas extracelulares (EVs), fato que motivou a presente investigação.

A comunicação célula-célula é fundamental para manter a homeostase corporal e a resposta rápida e adequada aos danos celulares e a invasão por patógenos. As EVs são produzidas por todas as células de mamíferos e podem ser amplamente divididas em três categorias principais: a) exossomos, de origem endossomal, variam seu diâmetro de ~40 a 160 nm; b) ectossomos, que inclui microvesículas, micropartículas e grandes vesículas de ~ 50 nm a 1  $\mu$ m de diâmetro, sendo vesículas se desprendem da superfície da membrana plasmática por meio de brotamento externo; c) corpos apoptóticos, variando de 50 nm a 5  $\mu$ m de diâmetro, são formados durante a formação de bolhas na membrana plasmática na apoptose (Buzas, 2023). Exossomos liberados de células infectadas com *Mycoplasma* induzem uma resposta mista de citocinas, incluindo a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 a partir de células B, porém com atividade inibitória para células T (Yang et al., 2012). As EVs podem carrear antígenos processados, moléculas MHC de classe I e II ou ainda moléculas coestimuladoras, mediando à ativação de células T

(Schorey, Harding, 2016). Foi demonstrado também que EVs liberadas por macrófagos infectados por *T. gondii* determinaram a produção de TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias por macrófagos não infectados (Bhatnagar et al., 2007). A infecção pelo protozoário *Cryptosporidium parvum* determinou a liberação de EVs por células epiteliais intestinais e de vias biliares, contendo peptídeos antimicrobianos de células epiteliais, cuja produção aumentou mediante estímulo de TLR4 (Hu et al., 2013). A EVs liberadas por células B-1 infectadas por promastigotas de *L. amazonensis*, diminuem a lesão e a carga parasitária dos animais desafiados com o protozoário (Arcanjo et al. 2017, Toledo et al., 2020). O objetivo do presente estudo foi caracterizar as EVs liberadas por células B-1 peritoneais e seus efeitos imunomoduladores de macrófagos de diferentes origens desafiados pelo *E. cuniculi*.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1 Cultura de *Encephalitozoon cuniculi***

Os esporos de *E. cuniculi* foram cultivados em células RK-13 (*Rabbit Kidney*) mantidas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% e neomicina (20 mg/mL) (R10), incubadas à 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Os esporos obtidos dos sobrenadantes foram armazenados a 4°C, purificados em gradiente de Percoll e mantidos em R10.

### **2.2 Comitê de Ética**

Os procedimentos foram realizados com a anuência do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista, de acordo com a diretiva do CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, sob protocolo número 3502290719.

### **2.3 Camundongos**

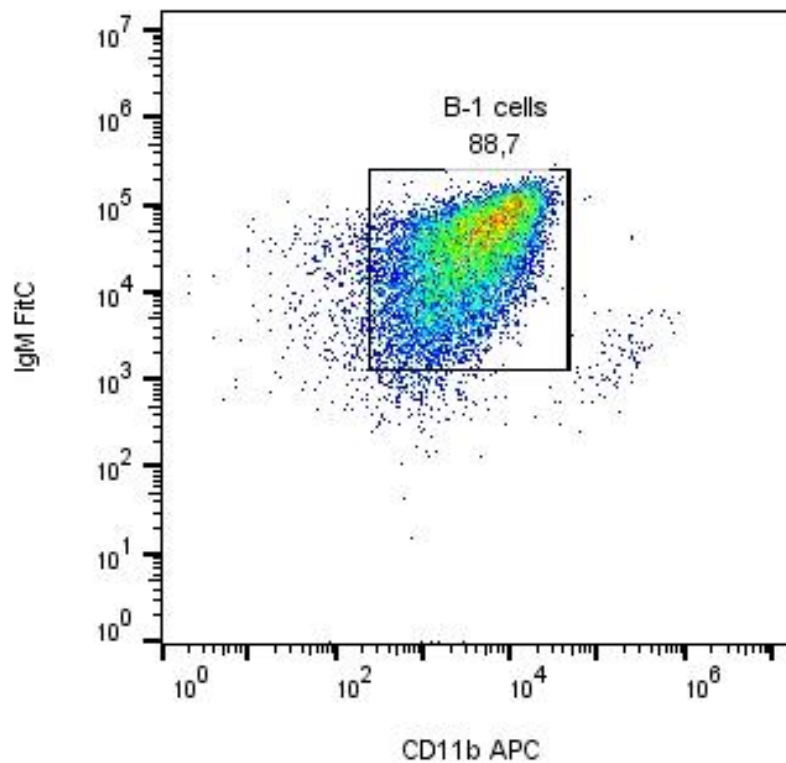
Os camundongos isogênicos *specific pathogen free (SPF)* das linhagens Balb/c com 8 a 12 semanas de idade, de ambos gêneros, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (Cedeme/UNIFESP), foram mantidos durante o período experimental no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista, em microisoladores

com capacidade para cinco animais, em cada gaiola, com controle de luminosidade em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 21°C, umidade relativa do ar de 45 a 55% e ventilação. Os animais receberam *ad libitum* ração peletizada irradiada e água esterilizada por autoclavagem.

## **2.4 Obtenção e enriquecimento de células B-1**

Camundongos foram submetidos ao aprofundamento anestésico com sevoflurano até a completa parada cardiorrespiratória. A seguir, foram imersos em álcool e colocados no fluxo laminar para a realização do lavado peritoneal. Após dissecação da pele, cerca de 10 a 14 mL de tampão Macs foram introduzidos no abdome e aspirados com seringa e agulha hipodérmica. O lavado foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento foi analisado em câmara de Neubauer para contagem das células. Para a purificação, as células foram incubadas por 30 minutos com anticorpos anti-CD16/CD32, e depois foram incubados por 1 hora com anticorpos anti-CD23 em microbeads e lentamente passadas em colunas magnéticas (e Brito et al., 2007). Nessa primeira passagem, células com marcadores CD23 (linfócitos B-2 convencionais) ficaram aderidas ao magneto e descartadas, o fluido resultante foi utilizado para a próxima etapa. A seguir, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpos anti-CD19 em microbeads e lentamente passadas em colunas magnéticas. O fluido foi descartado e a coluna foi lavada para a liberação das células CD19<sup>+</sup> ou células B-1 aderidas à coluna magnética. As células B-1 (CD19<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup>) enriquecidas foram marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD11b e anti-IgM-A, para análise do grau de pureza pela citometria de fluxo no citômetro Acuri A6. A concentração de células B-1 obtida pela purificação em colunas magnéticas foi de 88,7% (Fig. 1).





**Figura 1.** Células B-1 obtidas de lavado peritoneal de camundongos Balb/c foram enriquecidas usando anticorpo anti-CD23 (seleção negativa) e anticorpo anti-CD19 (seleção positiva) conjugados a microbeads magnéticas. Dot plots indicando estratégia de gates para análise da purificação de células B-1 obtidas.

## 2.5 Infecção *in vitro* de células B-1 para obtenção das vesículas

As células B-1 obtidas foram cultivadas em placas com 24 poços na concentração de  $1 \times 10^6$  células por poço, com a adição de esporos de *E. cuniculi* na proporção de 2:1 ( $2 \times 10^6$  esporos por poço) e mantidos por 24h (Fig. 2A). Após da coleta dos sobrenadantes das células infectadas e não infectadas (controle) as amostras foram submetidas a diferentes etapas de centrifugação, (1) centrifugação de 500 g por 10 minutos para retiradas de células e parasitas; (2) depois o sobrenadante de foi centrifugado a 1.500 g por 10 minutos; (3) o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos para a remoção de células e debris celulares; e (4) o sobrenadante foi submetido a uma centrifugação de 100.000 g por 1 hora e 30 minutos e o pellet contendo as vesículas foi ressuscitado em PBS e novamente centrifugado a 100.000 g por 1 hora e 30 minutos (Ultracentrífuga Sorvall® RC 90 – rotor T-1250). Ao final o *pellet* contendo as vesículas extracelulares foi ressuscitado em PBS 1X filtrado e armazenado a 4°C até sua utilização.

## **2.6 Determinação da concentração e tamanho das vesículas extracelulares**

As vesículas extracelulares obtidas a partir de células B-1 foram diluídas 50 vezes em PBS (1X) filtrado e analisadas no equipamento Nanosight (NS300 Malvern™) para determinar a concentração e o tamanho das partículas. Foram realizadas cinco capturas com um minuto de duração (20 frames por segundo), sob uma temperatura de 25°C. O equipamento utilizado encontra-se no Laboratório de Nefrologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

## **2.9 Obtenção de macrófagos a partir de precursores da medula óssea (MMO)**

Os fêmures e tíbias dos camundongos Balb/c foram coletados assepticamente, pela lavagem com 10 mL de R10 e ressuspensa em meio com 50% de sobrenadante de células L929, 30% de RPMI e 20% de SFB, mantidas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> (Zamboni, Rabinovitch, 2003). No 3º. dia o sobrenadante foi retirado e novo meio com 30% de sobrenadante de L929, 50% de RPMI e 20% de SFB foi adicionado, sendo realizada nova troca com este mesmo meio após 72h. Ao final, os macrófagos foram analisados quanto ao seu fenótipo com anticorpo anti-F4/80 e CD11b em citômetro de fluxo para confirmação da diferenciação. MMO foram cultivados em placas de 24 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células por poço em R10 (livre de EVs) por 4 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, para os subsequentes tratamentos.

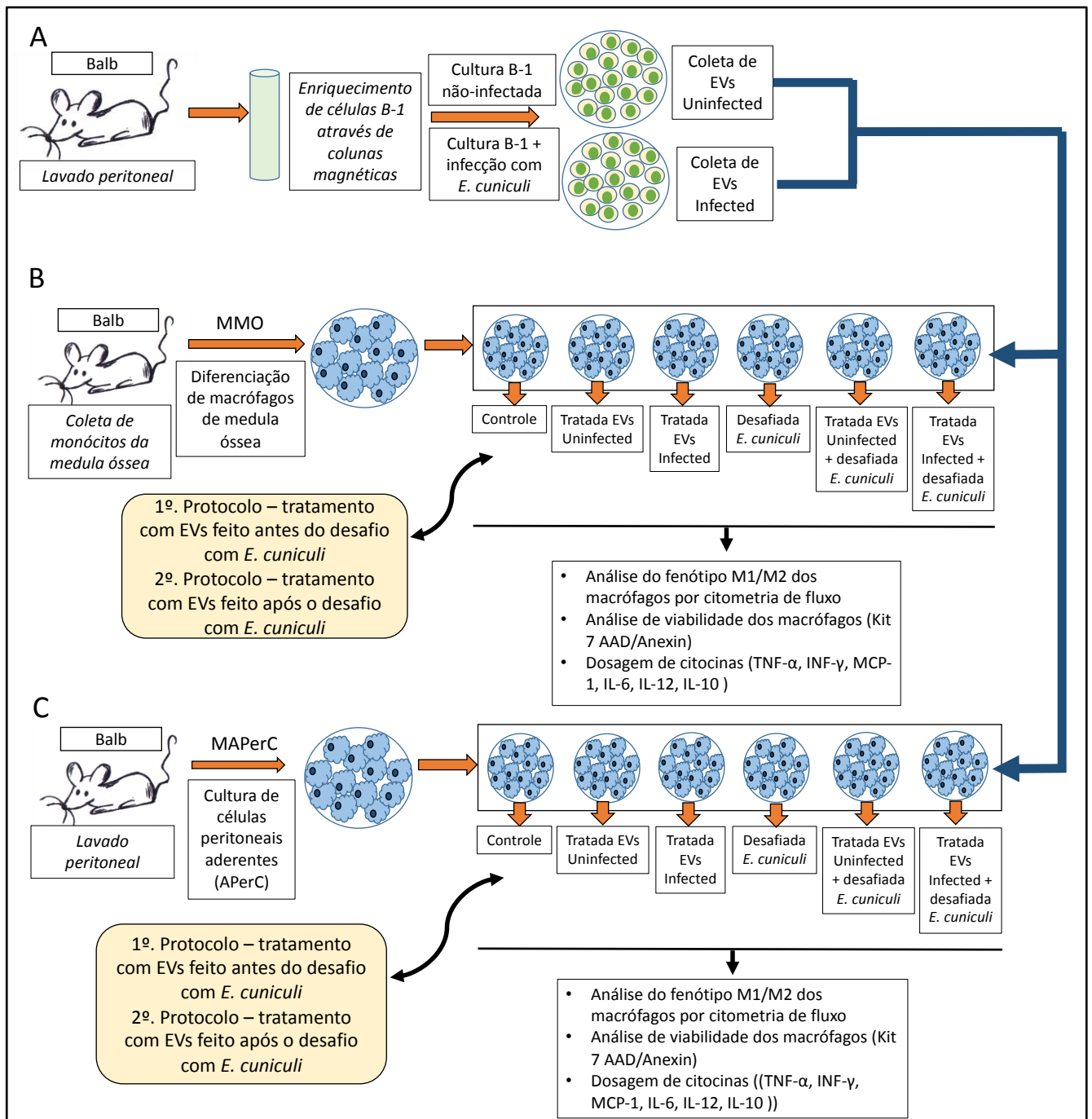
## **2.10 Obtenção de macrófagos peritoneais aderentes (MPerC)**

Camundongos foram submetidos ao aprofundamento anestésico com sevofluorano até a completa parada cardiorrespiratória. Após assepsia, procedeu-se o lavado peritoneal com cerca 14 mL de tampão Macs e centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, então o sobrenadante foi descartado e as células contadas em câmara de Neubauer, com a adição de azul de Tripán para conferir a viabilidade. Em placas com 24 poços, cultivou-se  $1 \times 10^5$  células por poço. Após uma hora, descartou-se o sobrenadante e as APerC foram cultivadas com R10 (livre de EVs) por mais uma hora, antes dos subsequentes tratamentos, esses denominados MPerC-1. Para ampliar a concentração de MPerC, um

segundo protocolo foi realizado, dessa vez, após uma hora, descartou-se o sobrenadante e as APerC foram cultivadas com R10 (livre de EVs) por mais 72 horas, esses denominados MPerC-2

### **2.11 Delineamento experimental**

Na sequência, os macrófagos derivados da medula e os procedentes de APerC foram submetidos a 2 protocolos distintos, conduzidos da seguinte maneira: no primeiro, macrófagos foram tratadas *overnight* com 40 a 50 partículas de B-1 EVs *Uninfected* ou EVs *Infected*, e após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células desafiadas com esporos de *E. cuniculi* por 3 h. No segundo experimento, os macrófagos foram infectados com esporos de *E. cuniculi* por 3 h, após retirar o sobrenadante, foram tratados *overnight* com com 40 a 50 partículas de B-1 EVs *Uninfected* ou EVs *Infected*. Após os períodos experimentais, os macrófagos foram coletados para análise do perfil M1/M2 e da sua viabilidade e a produção de citocinas foi realizada no sobrenadante (Fig. 2B, C).



**Figura 2.** Delineamento experimental para análise *in vitro* dos efeitos das EVs produzidas por células B-1 infectadas com *E. cuniculi* sobre macrófagos. A) Coleta de células B-1 a partir de lavados peritoneais de camundongos Balb/c, enriquecimento em coluna magnética, infecção (EVs *Infected*) ou não (EVs *Uninfected*) com *E. cuniculi* por 3 horas. As EVs isoladas foram analisadas (tamanho, concentração). B) Macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos foram tratados com EVs (*Uninfected* ou *Infected*) e depois desafiados com *E. cuniculi*. Macrófagos foram avaliados quanto aos fenótipos M1/M2, viabilidade e produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , MCP-1, IL-6, IL-12, IL-10). Procedeu-se um segundo protocolo com o desafio com *E. cuniculi* anterior ao tratamento com as EVs. C) Macrófagos de células peritoneais aderentes de camundongos foram tratados com EVs (*Uninfected* ou *Infected*) e depois desafiados com *E. cuniculi*. Macrófagos foram avaliados quanto aos fenótipos M1/M2, viabilidade e produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , MCP-1, IL-6, IL-12, IL-10). Procedeu-se um segundo protocolo com o desafio com *E. cuniculi* anterior ao tratamento com as EVs.

## 2.12 Avaliação do fenótipo dos macrófagos

Após os períodos experimentais, o sobrenadante foi coletado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de citocinas. As células foram liberadas com cell scraper e incubadas por 20 minutos em banho de gelo com anticorpo anti-CD16/CD32, em solução tampão Macs, para bloqueio dos receptores Fc. Posteriormente, as células foram lavadas e, incubadas por 30 (trinta) minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD11b de camundongo conjugado – FITC, anti-F4/80 de camundongo conjugado – PE (Ebioscience), anti-CD40 de camundongo conjugado - PE PCy5, e anti-CD206 de camundongo conjugado – Alexa fluor 647 (BD Biosciences). Então, as células foram lavadas e ressuspendidas em 200  $\mu\text{L}$  de PBS para realização da leitura em citometro de Fluxo BD Accuri™ C6 (Biosciences). Todas as lavagens foram realizadas com tampão Macs com centrifugação a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos com 1500 rpm.

### **2.13 Avaliação de morte celular**

Os macrófagos cultivados tiveram seus receptores Fc bloqueados com anticorpo anti-CD16/32, e então foram marcados com os anticorpos monoclonais anti-F4/80 e CD11b. Após incubação por 30 minutos, as células foram lavadas com tampão Macs, então foram marcadas para análise da viabilidade, acrescentado 100  $\mu\text{L}$  do tampão do Kit 7AAD/Anexina, 1  $\mu\text{L}$  de 7AAD e 1  $\mu\text{L}$  Anexina em cada amostra, seguindo as recomendações do fabricante, foram incubadas por 15 minutos protegido da luz a temperatura ambiente. Logo após este período, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  do tampão do kit e realizada a leitura no citômetro imediatamente ao término da marcação.

### **2.14 Determinação de citocinas por citometria de fluxo**

Os sobrenadantes das culturas de células foram coletados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram empregados para a análise das citocinas TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , MCP-1, IL-6, IL-12, IL-10 (Kit Inflammation BD) por citometria de fluxo pelo método Cytometric Bead Array (CBA), de acordo com as instruções do fabricante. A aquisição dos dados foi realizada em citometro de Fluxo BD Accuri™ C6 (Biosciences) e análise com *software FCAP 3.0 Bead array* (BD Bioescience).

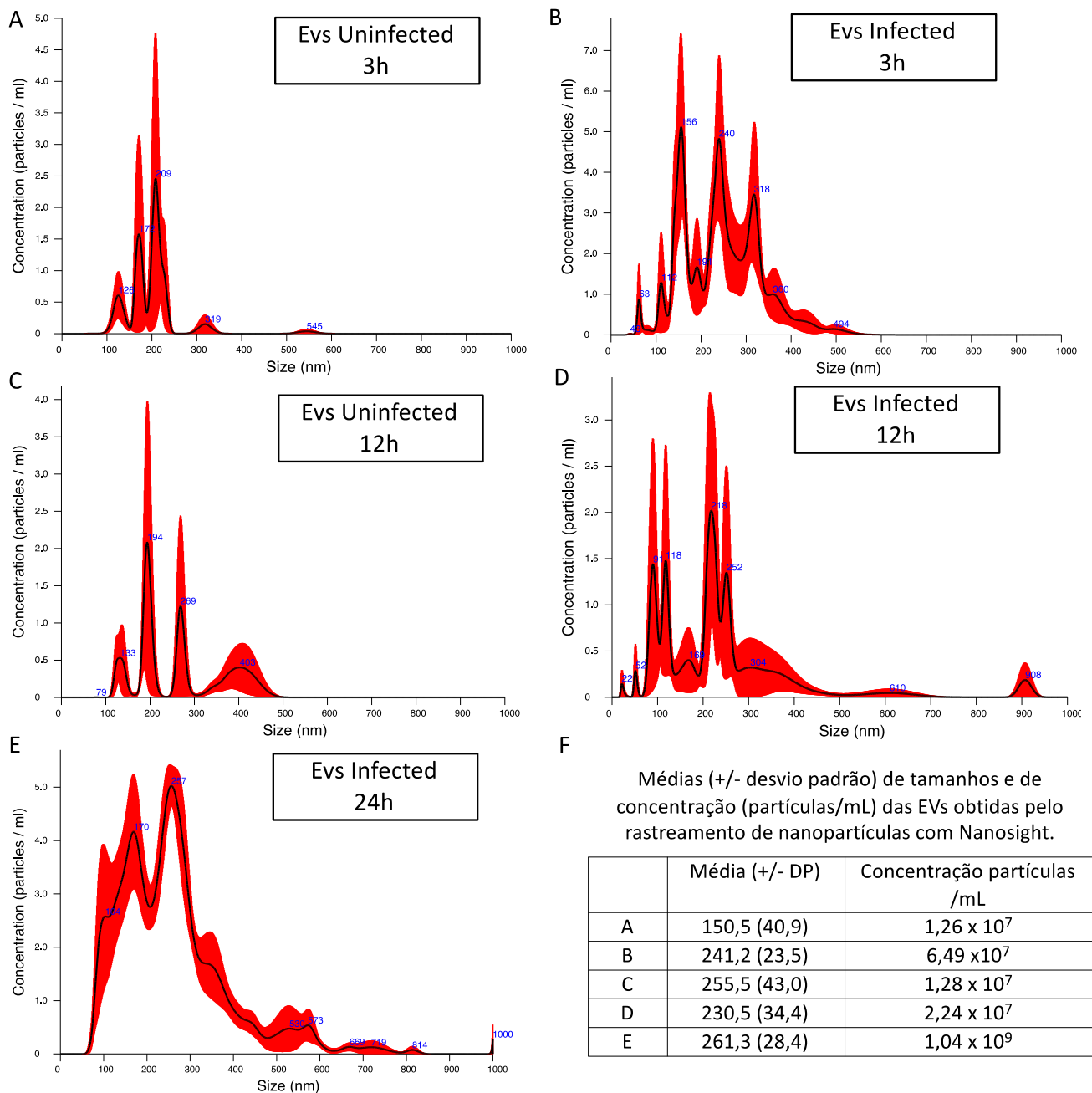
### **2.15 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism utilizando-se a análise de variância ANOVA de uma via para comparação entre os grupos. Os valores foram apresentados como média das quaduplicatas experimentais  $\pm$  o erro padrão. Os valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística, com intervalo de confiança de 95%.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 *E. cuniculi* determinou maior quantidade e diversidade de EVs produzidas por células B-1

A produção de EVs foi padronizada, utilizando 3 períodos de tempo de cultura de células B-1 infectadas com esporos de *E. cuniculi* (EVs *Infected*) ou na ausência (EVs *Uninfected*), 3, 12 e 24 horas (Fig. 3). Após 3h, para EVs *Uninfected*, observou-se que o tamanho médio das EVs foi de  $150,5 \pm 40,9$  nm e a concentração obtida foi de  $1,26 \times 10^7$  partículas por mL (Fig. 3A). Para as EVs *Infected* a concentração obtida de foi de  $6,49 \times 10^7$  partículas por mL e tamanho médio foi de  $241,2 \pm 23,5$  nm (Fig. 3B). Em 12 horas de infecção, observou-se menor produção de EVs (Fig. 3C, D) e maior variação de tamanhos grandes, sugerindo corpos apoptóticos. Da mesma forma, com 24 horas de infecção, as culturas tiveram menor viabilidade e maior variação de tamanhos (Fig. 3E). Portanto, optou-se por utilizar o tempo de 3 horas de infecção para a produção de EVs para todos os experimentos.

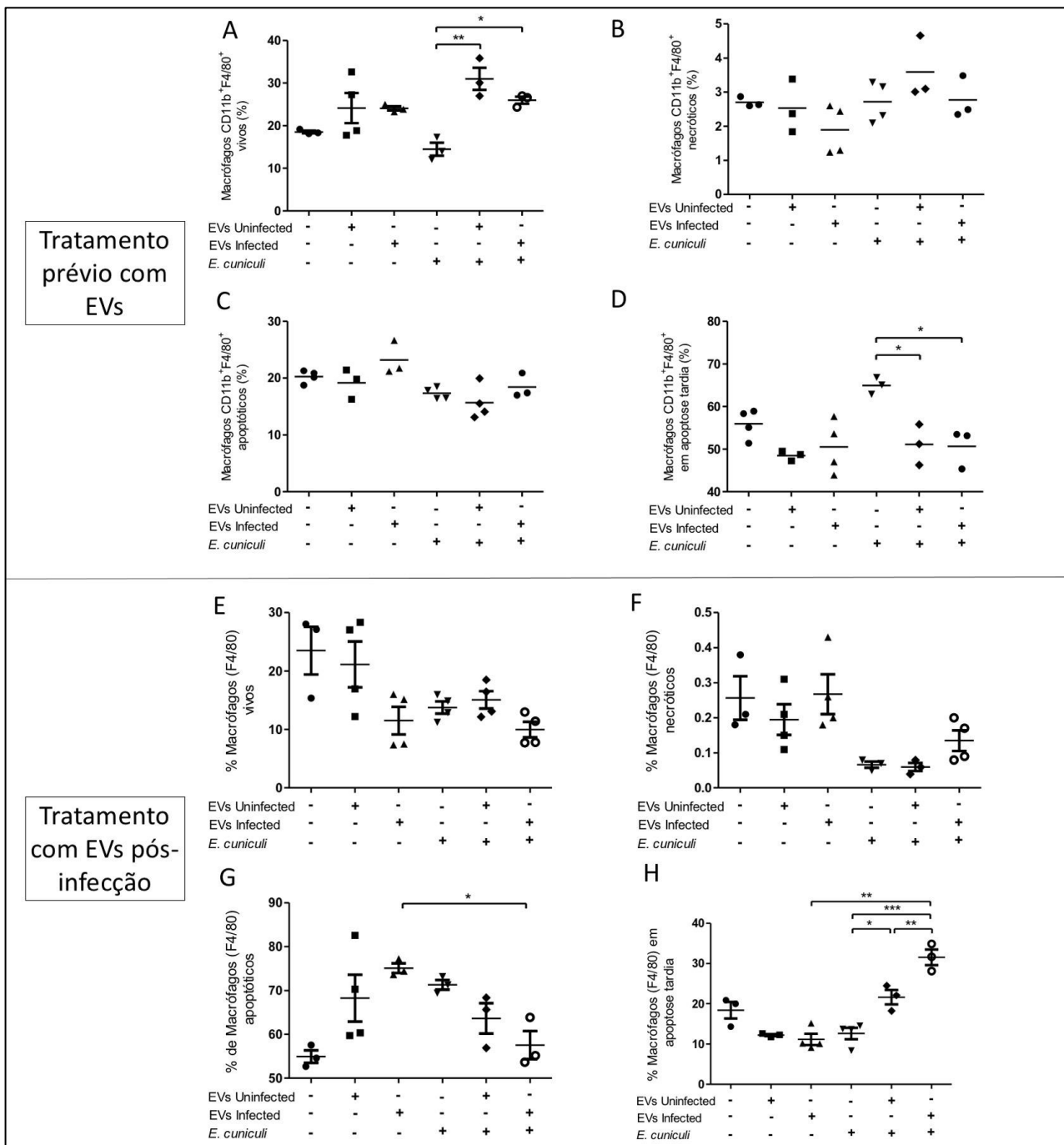


**Figura 3. Quantificação e mensuração de EVs produzidas por células B-1 infectadas (EVs *Infected*) ou não (EVs *Uninfected*) pelo *E. cuniculi* pelo rastreamento de nanopartículas (NTA) por NanoSight.** A) EVs *Uninfected* produzidas após 3 horas de cultivo. B) EVs *Infected* produzidas após 3 horas de cultivo com infecção. C) EVs *Uninfected* produzidas após 12 horas de cultivo. D) EVs *Infected* produzidas após 12 horas de cultivo com infecção. E) EVs *Infected* produzidas após 24 horas de cultivo com infecção. F) Tabela com as médias (+/- desvio padrão) de tamanhos em nanômetros e a concentração de partículas por mL obtidas pelo rastreamento de nanopartículas (NTA) por NanoSight, para EVs *Uninfected* 3h (A), EVs *Infected* 3h (B), EVs *Uninfected* 12h (C), EVs *Infected* 12h (D), EVs *Infected* 24h (E).

### 3.2 EVs aumentaram a viabilidade de MMO

A viabilidade de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea tratados previamente com EVs ou não variou de 10 a 40%, destacando maior percentual de células viáveis nos grupos tratados com EVs *Uninfected* (Fig. 4A). A morte celular por necrose foi baixa (de 1 a 4%) (Fig. 4B), contudo destacou-se a alta frequência de apoptose (cerca de 20%) e apoptose tardia que variou de 45 a 65% (Fig. 4C, D). Vale ressaltar marcada apoptose observada em macrófagos que não receberam tratamento com EVs e foram infectados com *E. cuniculi* em comparação com os grupos tratados com EVs e também infectados, indicando que o tratamento com EVs reduziu a apoptose (Fig. 4D). Ao realizar o tratamento com EVs de macrófagos após a infecção com *E. cuniculi*, resultados semelhantes foram observados, como baixa viabilidade de macrófagos (entre 10 e 30%, Fig. 4E), baixa necrose (inferior a 0,5%, Fig. 4F) e com alta frequência de apoptose, contudo prevalecendo a apoptose (com percentuais entre 50 e 80%, Fig. 4G) em detrimento a apoptose tardia (com porcentagens de 10 a 40%, Fig. 4H). Nesse contexto, o tratamento com EVs *Infected* determinou aumento de apoptose e a infecção desse mesmo grupo de macrófagos reduziu a apoptose (Fig. 4G), embora a apoptose tardia tenha sido observada com maior ocorrência mediante a infecção pelo patógeno (Fig. 4H).

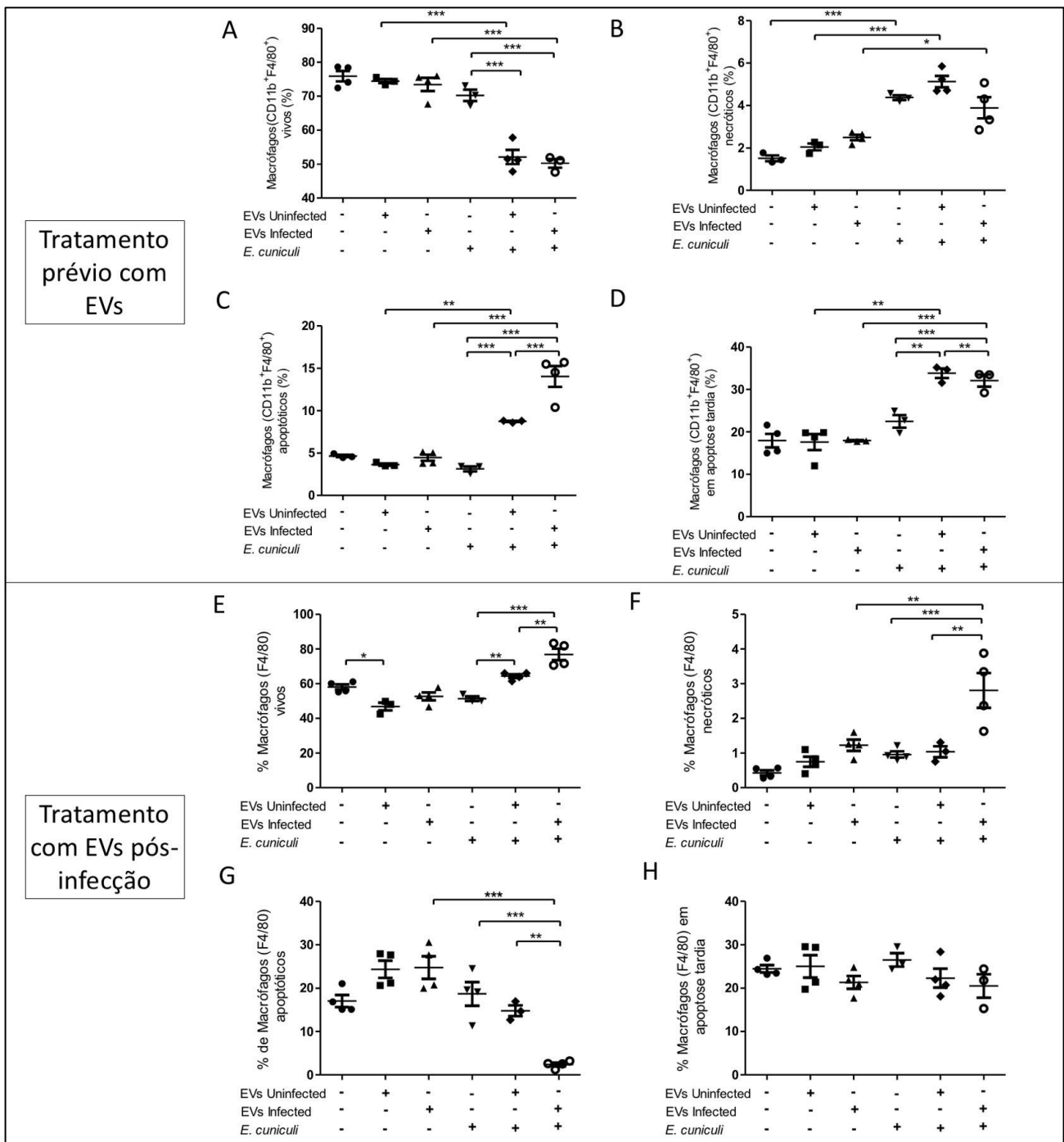




**Figura 4. Viabilidade de macrófagos de medula óssea tratados com EVs.** A- D) Análise da viabilidade de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* após o tratamento. A) Frequência (%) de macrófagos vivos; B) Frequência (%) de macrófagos necróticos; C) Frequência (%) de macrófagos apoptóticos; D) Frequência (%) de apoptose tardia em macrófagos. E- H) Análise da viabilidade de macrófagos peritoneais aderentes (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) previamente desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* e posteriormente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*). E) Frequência (%) de macrófagos vivos; F) Frequência (%) de macrófagos necróticos; G) Frequência (%) de macrófagos apoptóticos; H) Frequência (%) de apoptose tardia em macrófagos. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes p<0,05\*, p<0,01\*\*, p<0,001\*\*\*.

### 3.3 Tratamento prévio com EVs e infecção de *E. cuniculi* reduziu a viabilidade de MPerC-1

Em relação aos MPerC-1 observamos alta viabilidade, entre 70 e 80%, para todos os grupos com exceção dos grupos que receberam EVs e foram desafiados com *E. cuniculi*, que tiveram viabilidade entre 45 e 50% (Fig. 5A). Mais uma vez, destacamos que a ocorrência de necrose foi baixa (Fig. 5B), com predomínio a morte por apoptose (entre 3 e 15%, Fig. 5C) e apoptose tardia (entre 10 e 35%, Fig. 5D). De forma clara, a infecção pelo fungo *E. cuniculi* causou aumento de apoptose em macrófagos previamente tratados com EVs de células B-1 não infectadas (*Uninfected*) ou infectadas (*Infected*) pelo patógeno. Entretanto, ao realizar a infecção dos MPerC-1 previamente ao tratamento com EVs, ou seja, a ausência do tratamento com EVs, a viabilidade reduz para frequências de 40 a 60% e percentuais superiores a 60% são observados em macrófagos desafiados pelo patógeno e tratados com EVs (Fig. 5E). A morte dos macrófagos por necrose foi baixa (Fig. 5F) e os percentuais de apoptose foram elevados, respectivamente, entre 10 e 30% (Fig. 5G) e entre 15 e 30% (Fig. 5H) para a apoptose e apoptose tardia. Ressalta-se que o tratamento com EVs pós-infecção causou redução de apoptose (Fig. 5G). Não avaliamos a viabilidade de MPerC-2.

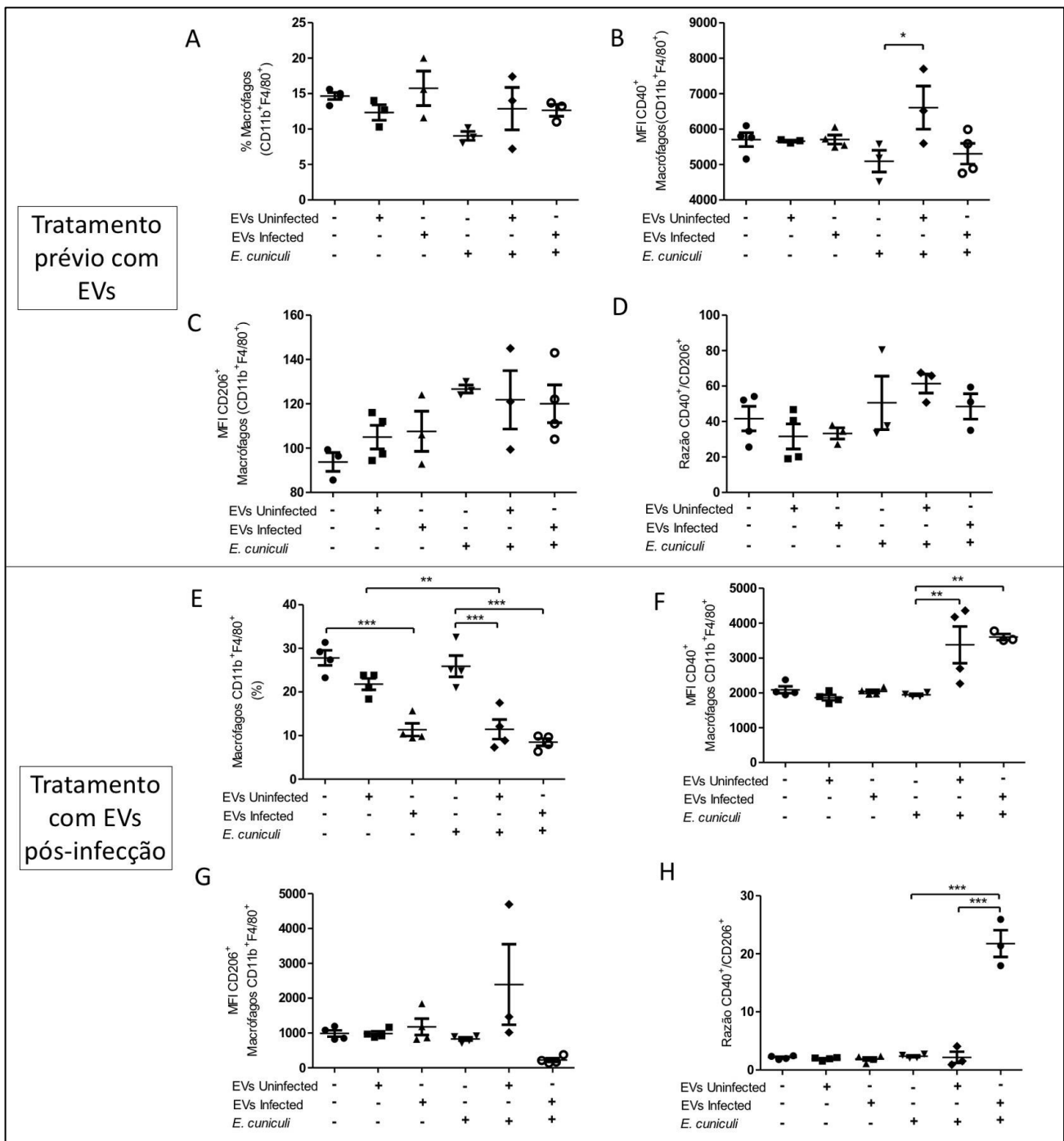


**Figura 5. Viabilidade de macrófagos aderentes peritoneais tratados com EVs. A- D)** Análise do perfil de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea ( $CD11b^+F4/80^+$ ) previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* após o tratamento. **A- D)** Análise da viabilidade de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea ( $CD11b^+F4/80^+$ ) previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* após o tratamento. A) Frequência (%) de macrófagos vivos; B) Frequência (%) de macrófagos necróticos; C) Frequência (%) de macrófagos apoptóticos; D) Frequência (%) de apoptose tardia em macrófagos. **E- H)** Análise da viabilidade de macrófagos peritoneais aderentes ( $CD11b^+F4/80^+$ ) previamente desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* e posteriormente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*). E) Frequência (%) de macrófagos vivos; F) Frequência (%) de macrófagos necróticos; G) Frequência (%) de macrófagos apoptóticos; H) Frequência (%) de apoptose tardia em macrófagos. Análise de variância (ANOVA) de

uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ .

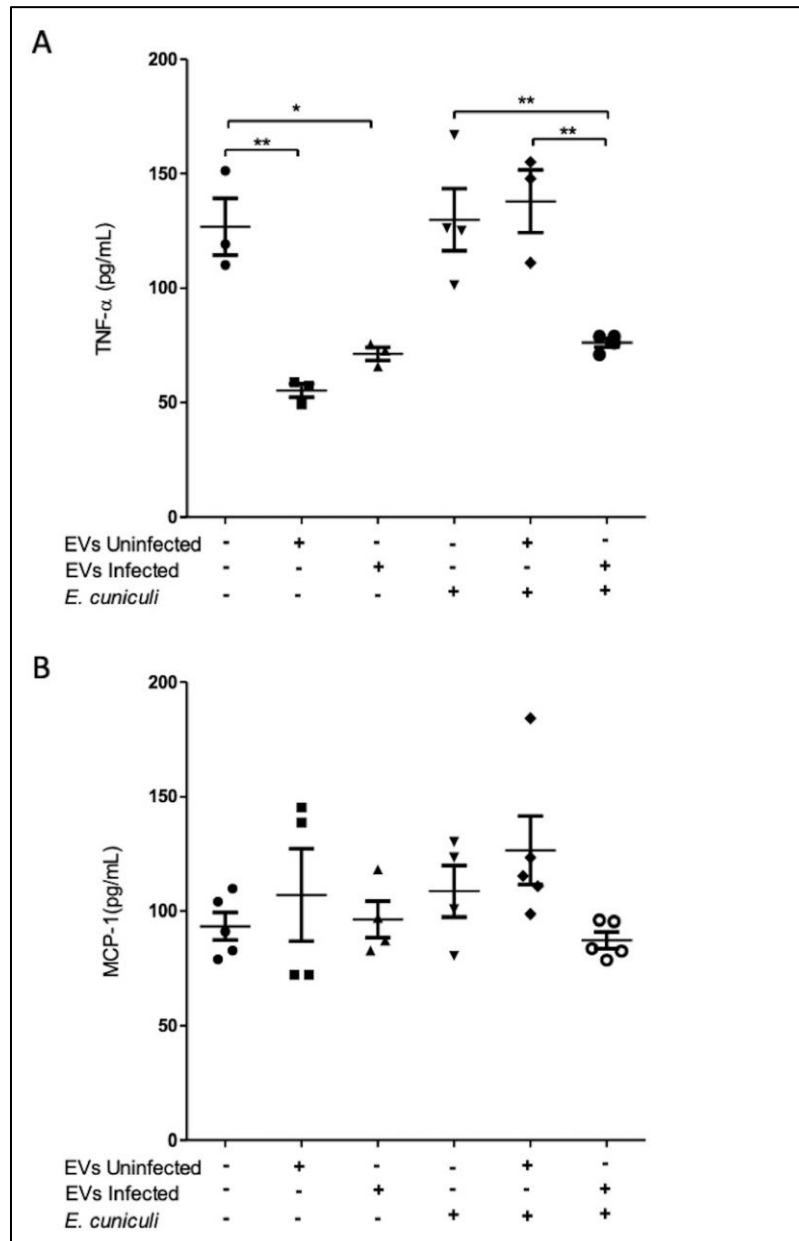
### 3.4 EVs modularam os macrófagos para o perfil M1

Macrófagos diferenciados a partir da medula óssea com expressão de  $CD11b^+F4/80^+$  e tratados previamente com EVs apresentaram porcentagens semelhantes em todas as condições utilizadas (Fig. 6A). Os macrófagos desse experimento demonstraram predomínio do perfil M1 (macrófagos  $CD11b^+F4/80^+CD40^+$ ), que se destacou após o desafio com *E. cuniculi* no grupo tratado previamente com EVs de células B-1 não-infectadas (Fig. 6B, C, D). Também se observou tendência ao perfil M2 (macrófagos  $CD11b^+F4/80^+CD206^+$ ) mediante a infecção pelo patógeno, independentemente do tratamento prévio com EVs (Fig. 6C, D). Ao realizar o tratamento com EVs após o desafio de macrófagos de medula com *E. cuniculi*, demonstramos redução da frequência de macrófagos decorrente do tratamento com EVs e/ou infecção pelo patógeno (Fig. 6E). Mais uma vez, o perfil M1 (macrófagos  $CD11b^+F4/80^+CD40^+$ ) prevaleceu mediante o desafio com *E. cuniculi* nos grupos tratados com EVs, com destaque para os macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com EVs de células B-1 infectadas (Fig. 6F, G, H). A diferenciação de macrófagos de medula óssea pela expressão de  $CD11b^+F4/80^+$  foi demonstrada (Anexo 1). Apesar do perfil M1 observado associado aos MMO, o tratamento prévio com EVs reduziu a produção de TNF- $\alpha$  em comparação ao controle não tratado, já nos grupos desafiados com *E. cuniculi*, houve redução da produção e liberação apenas para macrófagos tratados com EVs *Infected* (Fig. 7A). Houve produção de MCP-1, porém sem diferenças entre os grupos (Fig. 7B). As citocinas INF- $\gamma$ , IL-12, IL-6, IL-10 não foram identificadas nos sobrenadantes desses macrófagos, assim como, nenhuma delas foi identificada nos sobrenadantes de macrófagos diferenciados da medula óssea nos grupos que foram desafiados e depois receberam o tratamento com EVs (dados não apresentados).



**Figura 6. Perfil de macrófagos de medula óssea mediante tratamento com EVs e desafio com *E. cuniculi*.** A- D) Análise do perfil de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* após o tratamento. A) Frequência (%) de macrófagos CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>; B) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de macrófagos M1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>); C) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de macrófagos M2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>); D) Razão entre MFI CD40<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>. E- H) Análise do perfil de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) previamente desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* e posteriormente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*). E) Frequência (%) de macrófagos CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>; F) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de macrófagos M1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>); G) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de macrófagos M2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>); H) Razão entre MFI CD40<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>. Análise de variância

(ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ .

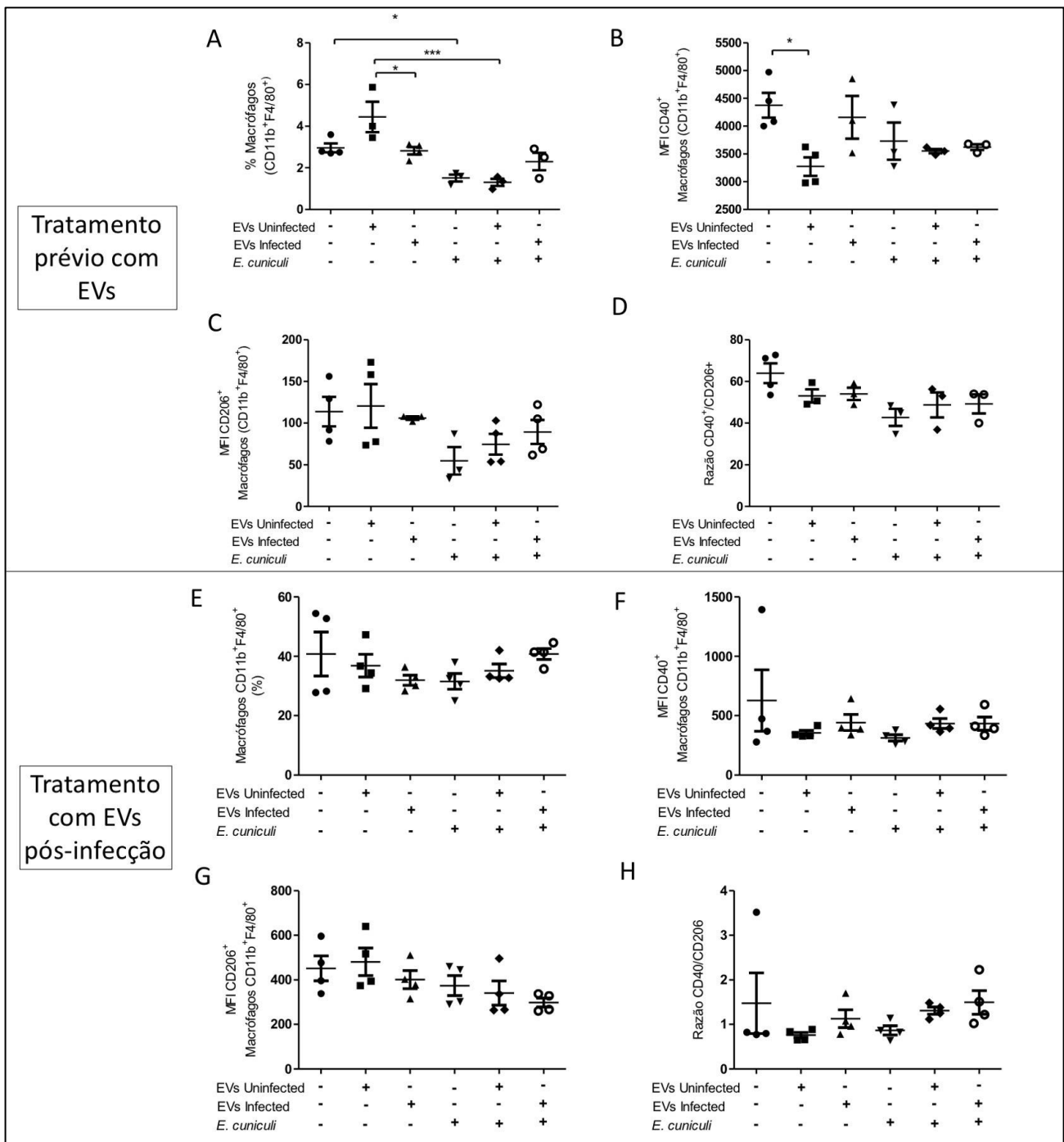


**Figura 7. Citocinas TNF- $\alpha$  e MCP-1 identificadas no sobrenadante de macrófagos diferenciados de medula óssea (MMO) previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* após o tratamento. A) TNF- $\alpha$ ; B) MCP-1 Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ .**

A frequência de macrófagos peritoneais aderentes (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) no experimento de tratamento prévio com EVs foi baixa, sendo que as células B-1 predominaram as nessas análises, portanto, os efeitos relacionados com os tratamentos não demonstraram grandes alterações (Fig. 8A, B, C, D). Ao desafiar os macrófagos antes do tratamento com EVs, observamos que a frequência de MPerC-1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) se manteve equilibrada entre os grupos experimentais (Fig. 8E), entretanto, foi

demonstrado aumento do perfil M2 em todos os grupos independente de tratamento ou da infecção (Fig. 8F, G, H). Com o protocolo de cultivo de APerC por 72h, a frequência de MPerC-2 foi superior a 80% no tratamento prévio com EVs (Fig. 9A) com claro predomínio de macrófagos com perfil M1 (Fig. 9B, C, D), especialmente vinculado ao tratamento com EVs *Uninfected* ou *Infected*. Resultados semelhantes foram observados para os MPerC-2 tratamento com EVs de após a infecção, com frequências acima de 50% (Fig. 9E) e perfil dominante de macrófagos M-1 (Fig. 9F, H). Contudo vale ressaltar que o grupo MPerC-2 desafiado com *E. cuniculi* e tratado com EVs *Infected* demonstraram aumento de macrófagos M2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) (Fig. 9G).

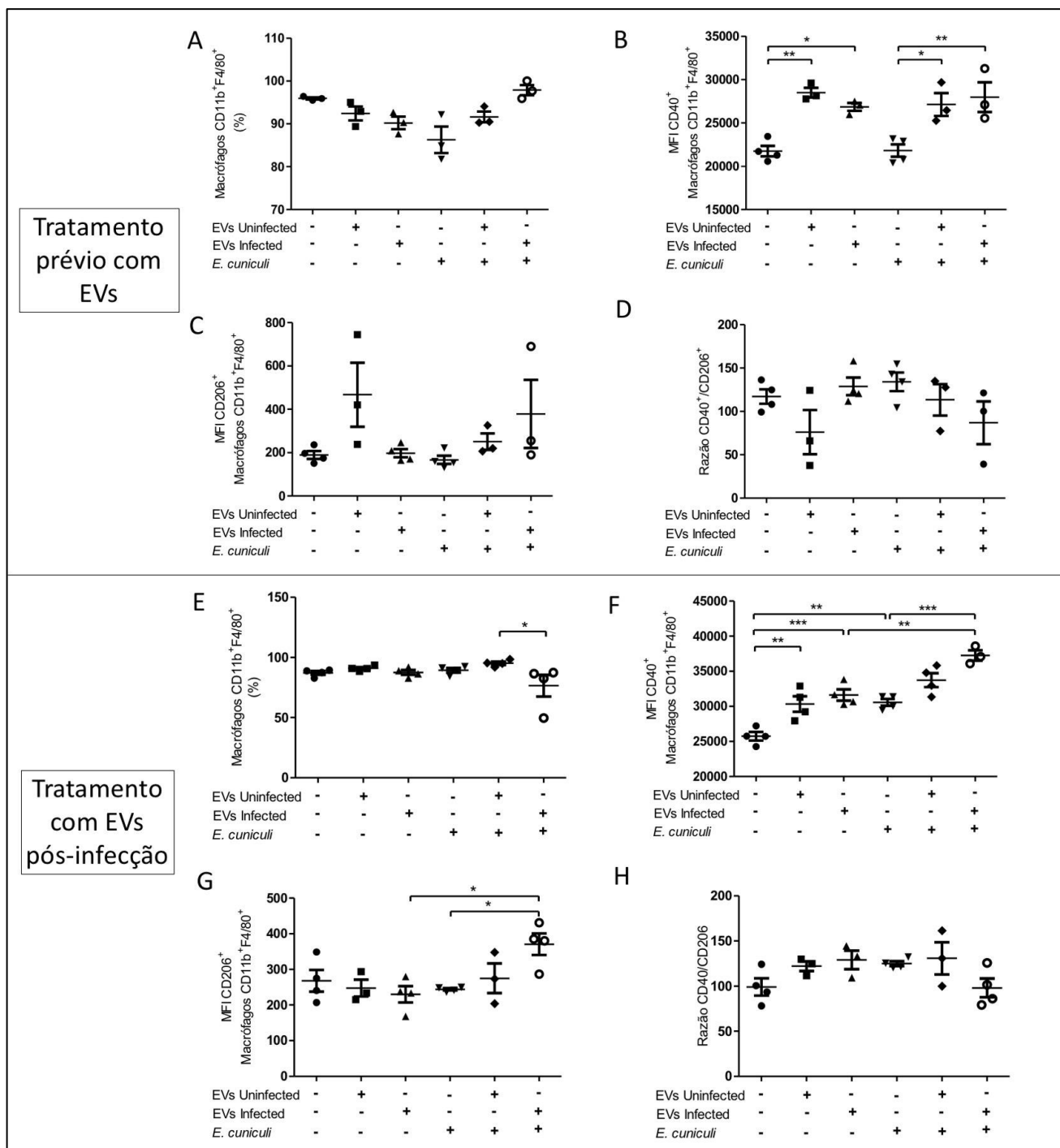
As citocinas pró-inflamatórias foram identificadas no sobrenadantes de MPerC-1, sendo que a infecção pelo *E. cuniculi* a responsável por aumentar significativamente as mesmas (Fig. 10A, B). No tratamento prévio com EVs (Fig. 10A) ou posterior à infecção (Fig. 10B), as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 estavam elevadas nos grupos infectados. A análise separada da produção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 por MPerC-1 demonstrou aumento no grupo que foram tratados com EVs (Fig. 10B). Ainda destacamos redução de MCP-1 em macrófagos tratados com EVs *Uninfected*, contudo sua produção aumenta mediante o desafio (Fig. 8A). A presença de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 nos sobrenadantes de MPerC-2 nos grupos infectados reforçam o padrão fenotípico M1 (Fig.11). Apesar do fenótipo dos MPerC-1 não revelar perfil dominante, as citocinas liberadas corroboram para uma modulação M1, o que foi confirmado no protocolo com MPerC-2. A citocina antiinflamatória IL-10 estava aumentada nos mesmos grupos de MPerC-1 desafiados com *E. cuniculi* antes do tratamento com EVs, fato que corrobora o perfil identificado pelo aumento da expressão de CD206, tanto observado em MPerC-1 como em MPerC-2 (Fig. 8H, 9G).



**Figura 8. Perfil de macrófagos peritoneais aderentes (MPerC-1<sup>#</sup>) tratados com EVs e desafio com *E. cuniculi*.** A- D) Análise do perfil de MPerC-1 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* após o tratamento. A) Frequência (%) de MPerC-1 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>; B) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de MPerC-1 M1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>); C) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de MPerC-1 M2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>); D) Razão entre MFI de MPerC-1 CD40<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>. E- H) Análise do perfil de MPerC-1 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> previamente desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* e posteriormente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*). E) Frequência (%) de MPerC-1 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>; F) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de MPerC-1 M1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>); G) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de MPerC-1 M2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>); H) Razão entre MFI de MPerC-1 CD40<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou

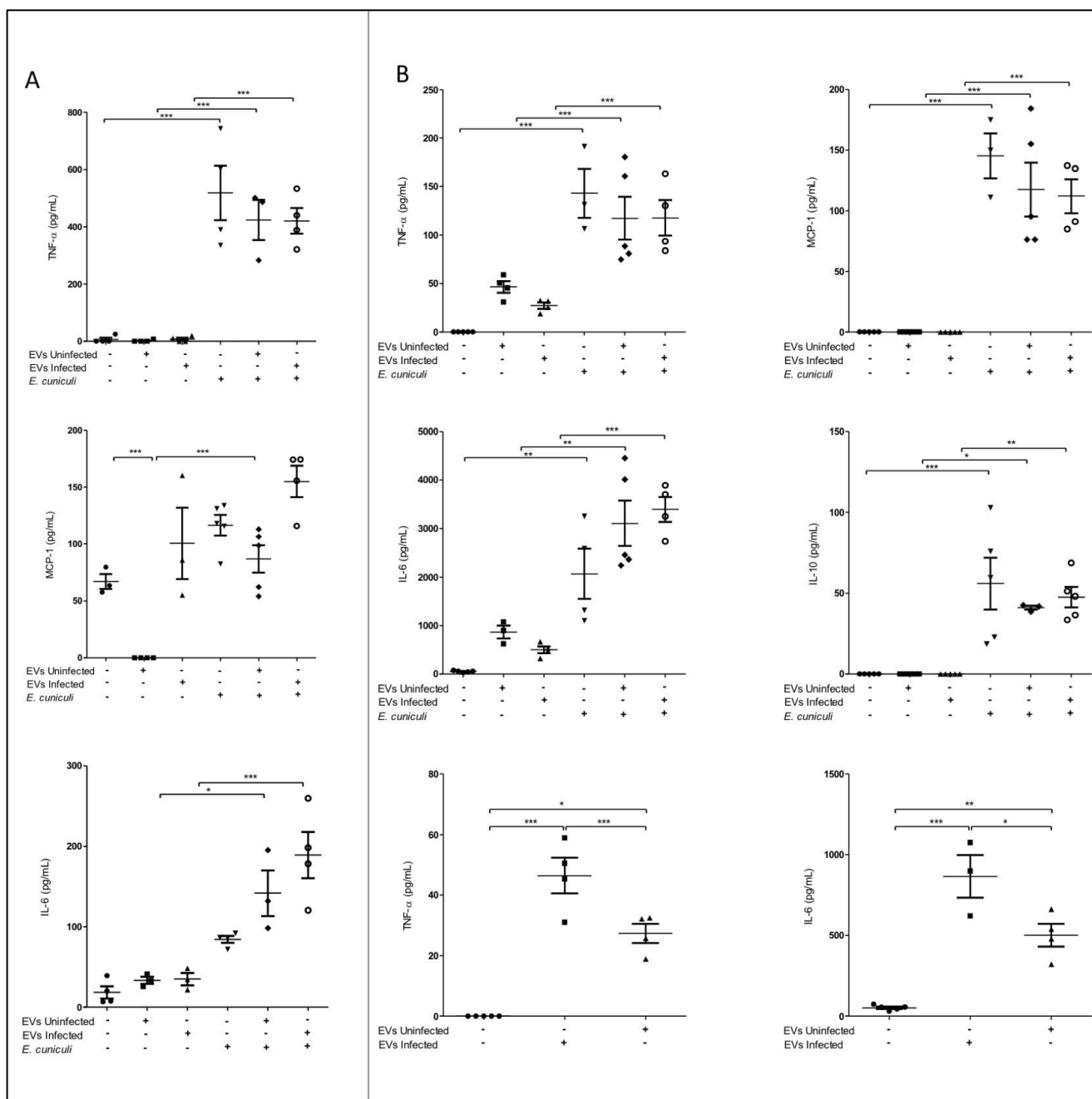


diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . # Culturas de MPerC-1 por uma hora.

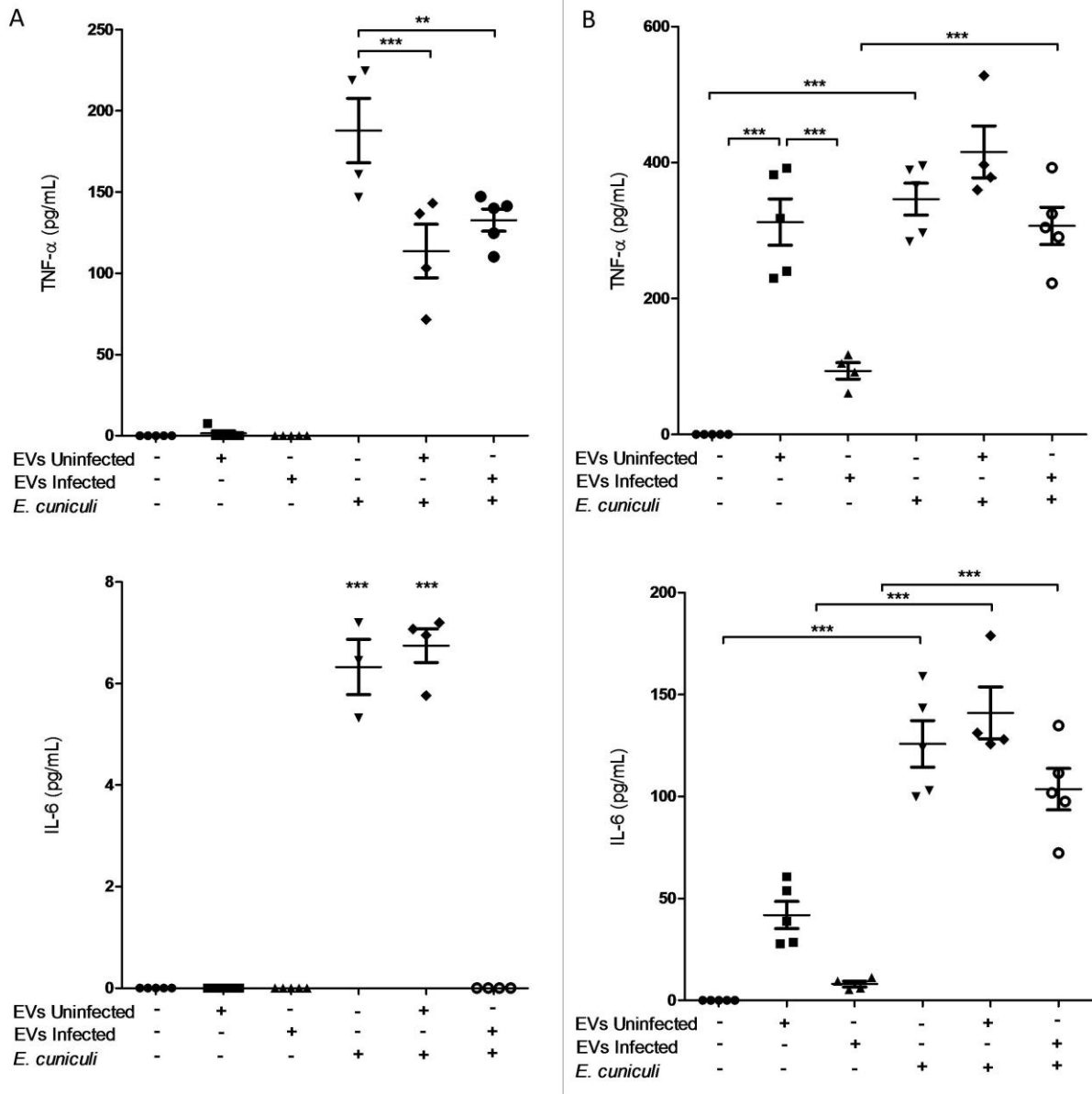


**Figura 9. Perfil de macrófagos peritoneais aderentes (MPerC-2<sup>#</sup>) tratados com EVs e desafio com *E. cuniculi*.** A- D) Análise do perfil de MPerC-2 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* após o tratamento. A) Frequência (%) de MPerC-2 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>; B) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de MPerC-2 M1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>); C) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de MPerC-2 M2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>); D) Razão entre MFI de MPerC-2 CD40<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>. E- H) Análise do perfil de MPerC-2 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> previamente desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* e posteriormente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*). E) Frequência (%) de MPerC-2 CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>; F) Mediana

de intensidade de fluorescência MFI de MPerC-2 M1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>); G) Mediana de intensidade de fluorescência MFI de MPerC-2 M2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>); H) Razão entre MFI de MPerC-2 CD40<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup>. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . # Culturas de MPerC-2 por 72 horas.



**Figura 10. Citocinas identificadas no sobrenadante dos experimentos com macrófagos peritoneais aderentes (MPerC-1<sup>#</sup>) tratados com EVs e desafiados com *E. cuniculi*.** A) Citocinas TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 identificadas no sobrenadantes de MPerC-1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi*. B) Citocinas TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e IL-10 identificadas no sobrenadante de MPerC-1 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* (+) e posteriormente tratados com EVs de células B-1 (+) ou não (-) infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*). TNF- $\alpha$  e IL-6 mostraram diferenças nos grupos somente tratados com EVs. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ . # Culturas de MPerC-1 por uma hora.



**Figura 11. Citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 identificadas no sobrenadante dos experimentos com macrófagos peritoneais aderentes (MPerC-2<sup>#</sup>) tratados com EVs e desafiados com *E. cuniculi*.** A) Citocinas no sobrenadante de MPerC-2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) previamente tratados (+) ou não (-) com EVs de células B-1 não infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*) e desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi*. B) Citocinas identificadas no sobrenadante de MPerC-2 (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) desafiados (+) ou não (-) com esporos de *E. cuniculi* (+) e posteriormente tratados com EVs de células B-1 (+) ou não (-) infectadas (EVs *Uninfected*) ou infectadas com *E. cuniculi* (EVs *Infected*). Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, p<0,05\*, p<0,01\*\*, p<0,001\*\*\*. <sup>#</sup> Culturas de MPerC-2 por 72 horas.

Ao avaliar o conjunto dos resultados (Quadro 1), pode-se observar que as EVs modularam o perfil dos macrófagos, MMO e MPerC, para perfil M1. A produção de citocinas no sobrenadante de MMO foi indetectável ou não mostrou diferenças entre os grupos, e a viabilidade dos macrófagos aumentou. Para MPerC houve aumento da produção citocinas pró-inflamatórias e redução da viabilidade

ao tratamento com EVs anterior ao desafio, entretanto a viabilidade aumentou e a produção de citocinas teve perfil misto quando o tratamento com EVs ocorreu depois do desafio com *E. cuniculi*.

**Quadro 1.** Resumo das principais observações experimentais, indicando aumento ou diminuição (seta) ou ausência de alteração (-) em perfil de macrófago M1 ou M2, produção de citocinas, viabilidade e apoptose.

|             | MMO* + EVs** + <i>E. cuniculi</i> | MMO <i>E. cuniculi</i> + EVs | MPerC*** + EVs + <i>E. cuniculi</i> | MPerC <i>E. cuniculi</i> + EVs |
|-------------|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| M1          | ↑                                 | ↑                            | ↑                                   | ↑                              |
| M2          | ↓                                 | ↓                            | ↓                                   | ↑                              |
| TNF         | -                                 | -                            | ↑                                   | ↑                              |
| MCP-1       | -                                 | -                            | ↑                                   | ↑                              |
| IL-6        | -                                 | -                            | ↑                                   | ↑                              |
| IL-10       | -                                 | -                            | -                                   | ↑                              |
| Vivas       | ↑                                 | -                            | ↓                                   | ↑                              |
| Apoptóticas | ↓                                 | ↓                            | ↑                                   | ↓                              |

\*MMO – macrófago diferenciado de medula óssea

\*\* EVs – vesícula extracelular de células B-1

\*\*\*MPerC – macrófagos derivados de células peritoneais aderentes

## 4 DISCUSSÃO

As células imunes que participam da inflamação podem secretar EVs, as quais carregam mediadores lipídicos bioativos derivados do ácido araquidônico, como os eicosanóides e as enzimas envolvidas em sua produção, que podem ter efeitos quimiotáticos (Boilard, 2018). Na sepse, as EVs demonstraram ter funções pró-inflamatórias e antiinflamatórias na dependência da célula doadora e da fase da sepse (Burgelman et al., 2021). Os efeitos pró-inflamatórios estão relacionados com EVs carregando citocinas ou padrão molecular associado a danos (DAMPs), como histonas, proteínas de choque térmico (HSPs) e DAMPs mitocondriais, que induzem a polarização dos macrófagos para o fenótipo M1 com secreção de citocinas, diferenciação de células T auxiliares de células T virgens e quimiotaxia de leucócitos. Por outro lado, algumas EVs na sepse têm efeitos antiinflamatórios, que incluem regulação negativa de complemento e da sinalização de fase aguda, redução da quimiotaxia de

leucócitos, redução dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e redução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (Burgelman et al., 2021).

Aqui, nós mostramos que MMO tratados com EVs apresentavam predominantemente perfil M1, especialmente quando os mesmos foram desafiados com o patógeno. Corroborando os resultados de Pereira et al. (2019), que demonstraram macrófagos peritoneais aderentes com perfil M1, com maior capacidade fagocítica e expressão de CD80/86, na presença de células B-1 e perfil M2 na ausência de células B-1. De forma similar, EVs produzidas por macrófagos RAW infectados por *Salmonella typhimurium* estimularam a transcrição de genes associados à polarização M1 e induziram maior expressão de TNF- $\alpha$  e iNOS (Emerson et al., 2022). Contudo, nossos resultados não demonstraram aumento na produção de citocinas inflamatórias, ao contrário do observado em macrófagos de medula óssea procedentes de camundongos C57BL/6 tratados com EVs de células B-1 infectadas *L. amazonensis* que mostraram aumento na expressão de TNF- $\alpha$  (Toledo et al., 2020). Vale ressaltar que os experimentos utilizaram metodologias diversas, a quantificação no sobrenadante (nossos resultados) vs expressão (Toledo et al., 2020). Anteriormente, nosso grupo demonstrou que o tratamento de macrófagos de medula óssea com corpos apoptóticos de linfócitos infectados com *E. cuniculi* tinham expressão acentuada de CD206 e liberaram de grandes quantidades de IL-10 e IL-6, indicando polarização dos macrófagos para o perfil M2, permitindo a sobrevivência e multiplicação do patógeno no interior dos macrófagos (Dalboni et al., 2021).

Os macrófagos exibem grau considerável de plasticidade dependendo dos sinais do ambiente extracelular, com possibilidade contínua de polarização M1 vs. M2. Macrófagos M1 são considerados um fenótipo pró-inflamatório, com capacidade fagocítica e citotóxica robusta, assim como produzem citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (por exemplo, CCL2, CCL5), refletindo sua capacidade de recrutar outras células imunes (células T e B) ao local da infecção e mantêm sua ativação (Saradna et al., 2018). Por outro lado, os macrófagos M2 atuam na resolução da inflamação e reparo tecidual e, funcionalmente, possuem vários subtipos (M2a, M2b, M2c, M2d), os quais expressam diferentes combinações de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Saradna et al., 2018). No entanto, é importante notar que o estado de polarização dos macrófagos é um

processo contínuo, com multiplicidade de fenótipos intermediários e subpopulações heterogêneas, assumindo uma variedade de papéis fisiológicos (Ross et al., 2021). Corroborando tais informações, foi descrito que coelhos infectados com *E. cuniculi* tinham lesões granulomatosas no encéfalo com predomínio de macrófagos M1 e M2 respectivamente, na periferia da lesão e no centro das lesões (Soto-Domínguez et al., 2022).

As EVs administradas previamente ao desafio com *E. cuniculi*, determinaram um perfil M1 para MPerC e produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias. Corroborando os achados de Pereira et al. (2019), que encontraram predomínio de macrófagos com perfil M1 e de citocinas proinflamatórias na presença de células B-1 em APerC de camundongos Balb/c, ao contrário, na ausência de células B-1, os macrófagos peritoneais mostraram perfil M2. Ao infectar MPerC com *E. cuniculi* e depois tratar com EVs, as observações mostraram também macrófagos com perfil M2 e com produção de citocinas pró- e antiinflamatórias TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e IL-10. Padrão semelhante na expressão de citocinas foi observado em macrófagos de medula óssea de camundongos Balb/c tratados EVs de células B-1 infectadas *L. amazonensis*, os quais demonstraram aumento significativo na expressão de IL-6 e IL-10 em comparação com as mesmas células estimuladas com EVs de células B-1 não infectadas. Nesse protocolo experimental, deve-se considerar que a presença de células B-1 e B-1 CDP entre os fagócitos peritoneais aderentes não pode ser descartada, sendo que as EVs também podem ter modulado o funcionamento das mesmas e influenciado nos resultados. Por essa razão, MPerC foram incubados por 72 h antes dos tratamentos e desafio, fato que reforçou a presença do perfil M-1 dominante. Também foi demonstrado que EVs produzidas por macrófagos infectados com *L. amazonensis* induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por macrófagos naïve, sugerindo sua participação na estimulação da resposta imune e na atribuição de um fenótipo (Cronemberger-Andrade et al., 2014). Ainda podemos comparar essa resposta mista, com presença de citocinas pró- e anti-inflamatórias e perfil M2, com as observações feitas em camundongos tratados EVs obtidas de macrófagos RAW infectados com *L. donovani*, que apresentaram macrófagos com as assinaturas M1 e M2 no fígado, após o desafio com *L. donovani*.

A viabilidade celular após tratamento com EVs pode aumentar ou diminuir. Foi demonstrado que as EVs podem promover maior sobrevivência celular, ao liberar moléculas antiapoptóticas ou fatores de crescimento que suportam a viabilidade celular e a função celular adequada (Zhang et al., 2014). No presente estudo, a redução de apoptose foi observada em macrófagos que receberam tratamento com EVs em comparação com o grupo não tratados com EVs, contudo tal diferença ficou mais evidenciada com o desafio com *E. cuniculi*. Nós hipotetizamos que as EVs possam ter conduzido fatores antiapoptóticos, atuando como veículos para a transferência de sinais benéficos para a viabilidade celular, porém quando essas células foram desafiadas com o patógeno antes de receber o tratamento com EVs, o efeito antiapoptótico não conseguiu preservar a viabilidade das células. A morte celular programada é uma forma potencial para a eliminação de células infectadas. Foi relatado que microsporídios inibem a apoptose em abelhas, bichos-da-seda e células humanas, fato que pode explicar a redução da viabilidade dos macrófagos infectados nesse estudo (del Aguila et al., 2006; He et al., 2015; Higes et al., 2013; Sokolova et al., 2019).

Para os macrófagos peritoneais aderentes, a infecção pelo fungo *E. cuniculi* determinou maior apoptose nos macrófagos previamente tratados com EVs. Corroborando os achados em macrófagos infectados com *E. cuniculi* e tratados com corpos apoptóticos de linfócitos que apresentaram aumento de apoptose (Dalboni et al., 2021). Esses autores sugeriram que a presença de grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , uma citocina que determina a apoptose pela via extrínseca que se liga aos receptores nos macrófagos e subsequentemente ativa a apoptose via caspase 8, poderia estar associada a apoptose, hipótese que pode explicar o ocorrido na presente investigação, uma vez que o TNF- $\alpha$  estava aumentado nos grupos infectados. De forma interessante, o tratamento com EVs após a infecção conseguiu diminuir a apoptose induzida pelo fungo, de forma contrária ao que foi visto em macrófagos de medula. Ao contrário, estudos anteriores mostram que certos tipos de EVs podem induzir apoptose ou necrose nas células receptoras. Yin et. al. (2014) demonstraram que as EVs células tumorais possuem fatores pró-apoptóticos que causam a morte de células saudáveis. Chen et. al. (2016) mostraram que as EVs liberados durante a lesão cerebral traumática podem conter substâncias tóxicas que induzem a morte das células neuronais. É importante destacar que a resposta celular as EVs pode ser altamente dependente

do contexto e das condições experimentais. Diferentes tipos de células podem ter diferentes sensibilidades a EVs, e a mesma população de células pode responder de forma diferente dependendo das condições ambientais. Além disso, a quantidade e concentração dos EVs, bem como o tempo de exposição, podem influenciar nos efeitos observados (Schwab *et al.*, 2015; Hassanpour *et al.*, 2020).

Podemos concluir que as células B-1 infectadas com *E. cuniculi* produziram EVs de forma expressiva após 3 h. As EVs modularam o fenótipo de macrófagos naïve de medula óssea para o perfil M1 e macrófagos peritoneais aderentes para perfil misto, M1 e M2, condicionado ao momento do desafio com *E. cuniculi*. Esses resultados abrem perspectivas quanto ao uso de EVs procedentes de células B-1 na modulação da resposta imune contra microsporídios. Novos estudos deverão incluir a análise de concentrações maiores de EVs para a modulação de macrófagos, identificação do seu conteúdo, avaliação da produção de EVs por macrófagos e outras células infectadas como possíveis transportadores dos mesmos sinais como forma de intervenção terapêutica.

## 5. Referências

- Arcanjo AF, Nunes MP, Silva-Junior EB, Leandro M, da Rocha JDB, Morrot A, Decote-Ricardo D, Freire-de-Lima CG. B-1 cells modulate the murine macrophage response to *Leishmania major* infection. *World J Biol Chem.* 2017; 8(2):151-162. doi: 10.4331/wjbc.v8.i2.151.
- Aseeja P, Shaikh Y, Bajpai A, Sirsikar P, Kalra SK. Advancement in our understanding of immune response against *Encephalitozoon* infection. *Parasite Immunol.* 2021; 43(6):e12828. doi: 10.1111/pim.12828.
- Aziz M, Holodick NE, Rothstein TL, Wang P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res.* 2015; 63(1-3):153-66. doi: 10.1007/s12026-015-8708-3.
- Baumgarth N. A hard(y) look at B-1 cell development and function. *J Immunol.* 2017, 199(10):3387-3394.
- Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood.* 2007.110, 3234–3244. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079152>.
- Boilard E. Extracellular vesicles and their content in bioactive lipid mediators: more than a sack of microRNA. *J Lipid Res.* 2018; 59(11):2037-2046. doi: 10.1194/jlr.R084640.
- Burgelman M, Vandendriessche C, Vandenbroucke RE. Extracellular vesicles: a double-edged sword in sepsis. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14(8):829. doi: 10.3390/ph14080829.



Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2023; 23(4):236-250. doi: 10.1038/s41577-022-00763-8.

Chen CC, Liu L, Ma F, Wong CW, Guo XE, et al.. Elucidation of Exosome Migration Across the Blood–Brain Barrier Model In Vitro. *Cell Mol Bioeng.* 2016; 9:509–529.

Cronemberger-Andrade A, Aragão-França L, de Araujo CF, Rocha VJ, Borges-Silva Mda C, Figueira CP, Oliveira PR, de Freitas LA, Veras PS, Pontes-de-Carvalho L. Extracellular vesicles from *Leishmania*-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naïve macrophages. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(9):e3415. doi: 10.1371/journal.pntd.0003161.

da Costa LFV, Alvares-Saraiva AM, Dell'Armeline Rocha PR, Spadacci-Morena DD, Perez EC, Mariano M, Lallo MA. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *Immunobiology.* 2017; 222(2):218-227. doi: 10.1016/j.imbio.2016.09.018.

Dalboni LC, Alvares Saraiva AM, Konno FTC, Perez EC, Codeceira JF, Spadacci-Morena DD, Lallo MA. Encephalitozoon cuniculi takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. *PLoS One.* 2021; 16(3):e0247658. doi: 10.1371/journal.pone.0247658.

del Aguila, C., Izquierdo, F., Granja, A.G., Hurtado, C., Fenoy, S., Fresno, M., Revilla, Y., 2006. *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *Int. J. Parasitol.* 36, 869–876.

e Brito RR, De Lorenzo BH, Xander P, Godoy LC, Lopes JD, da Silva NP, Sampaio SC, Mariano M. Role of distinct immune components in the radiation-induced abrogation of systemic lupus erythematosus development in mice. *Lupus.* 2007; 16(12):947-54. doi: 10.1177/0961203307084298.

Emerson LE, Gioseffi A, Barker H, Sheppe A, Morrill JK, Edelmann MJ, Kima PE. *Leishmania* infection-derived extracellular vesicles drive transcription of genes involved in M2 polarization. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12:934611. doi: 10.3389/fcimb.2022.934611.

Han B, Takvorian PM, Weiss LM. Invasion of Host Cells by Microsporidia. *Front Microbiol.* 2020; 11:172. doi: 10.3389/fmicb.2020.00172.

Han B, Weiss LM. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol Spectr.* 2017; 5(2). 10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016.

Hassanpour M, Rezaie J, Nouri M, Panahi Y. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 85, n. May, 2020.

He X, Wei Z, Zhou E, Chen L, Kou J, Wang J, Yang Z. Baicalein attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4 mediated NF-κB and MAPK signaling pathways in LPS-induced mastitis in mice, *International Immunopharmacology*, Volume 28, Issue 1, 2015, Pages 470-476, ISSN 1567-5769, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.07.012>.

Higes M, Juarranz Á, Dias-Almeida J, Lucena S, Botías C, Meana A, García-Palencia P, Martín-Hernández R. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology Reports*, v. 5, n. 4, p. 530–536, 2013.

Langanke dos Santos D, et al. B-1 cells upregulate CD8 T lymphocytes and increase proinflammatory cytokines serum levels in oral encephalitozoonosis. *Micr Infec.* 2018; 20:196-204.

Magalhães TR, Pinto FF, Queiroga FL. A multidisciplinary review about *Encephalitozoon cuniculi* in a One Health perspective. *Parasitol Res.* 2022;121(9):2463-2479. doi: 10.1007/s00436-022-07562-z.

Martin F, Kearney JF. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 2001 Apr;13(2):195-201. doi: 10.1016/s0952-7915(00)00204-1. PMID: 11228413.

Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011; 2:282. doi: 10.1038/ncomms1285.

Moretto MM, Khan IA. Immune Response to Microsporidia. *Exp Suppl.* 2022; 114:373-388. doi: 10.1007/978-3-030-93306-7\_13.

Pereira A, Alvares-Saraiva AM, De Camargo Konno FT, Spadacci-Morena DD, Perez EC, Mariano M, Lallo MA. B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile ameliorates microbicidal functions and disrupt the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 9, p. 1–22, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007674>>.

Popi AF, et al. Could a B-1 cell derived phagocyte “be one” of the peritoneal macrophages during LPS-driven inflammation? *PLoSOne.* 2012, 7:e34570.

Popi AF, Longo-Maugéri IM, Mariano M. An Overview of B-1 Cells as antigen-presenting cells. *Front Immunol.* 2016, 7:138.

Popi AF, Lopes JD, Mariano M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunol.* 2004, 113:348–354.

Ross EA, Devitt A, Johnson JR. Macrophages: The Good, the bad, and the gluttony. *Front Immunol.* 2021; 12:708186. doi: 10.3389/fimmu.2021.708186.

Sak B, Kotková M, Hlásková L, Kváč M. Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. *Parasite Immunol.* 2017;39(12). doi: 10.1111/pim.12496.

Saradna A, Do DC, Kumar S, Fu QL, Gao P. Macrophage polarization and allergic asthma. *Transl Res.* 2018; 191:1-14. doi: 10.1016/j.trsl.2017.09.002.

Schorey JS, Harding CV, 2016. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *J. Clin. Invest.* 126, 1181–1189. <https://doi.org/10.1172/JCI81132>.

Schwab A, Meyering SS, Lepene B, Iordanskiy S, van Hoek ML, Hakami RM, Kashanchi F. Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front Microbiol.* 2015; 6:1132. doi: 10.3389/fmicb.2015.01132.

Seatamanoch N, Kongdachalert S, Sunantaraporn S, Siriyasatien P, Brownell N. Microsporidia, a Highly Adaptive Organism and Its Host Expansion to Humans. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022: 12:924007. doi: 10.3389/fcimb.2022.924007.

Smith FL, Baumgarth N. B-1 cell responses to infections. *Curr Opin Immunol*. 2019; 57:23-31. doi: 10.1016/j.coi.2018.12.001.

Sokolova YY, Bowers LC, Alvarez X, Didier ES. *Encephalitozoon cuniculi* and *Vittaforma corneae* (Phylum Microsporidia) inhibit staurosporine-induced apoptosis in human THP-1 macrophages in vitro. *Parasitology*. 2019; 146(5):569-579. doi: 10.1017/S0031182018001968.

Soto-Domínguez A, González-Castillo JA, Castillo-Velázquez U, Rodríguez-Tovar LE, Méndez-Zamora G, Zamora-Avila DE, Nevárez-Garza AM. Distribution of M1 and M2 macrophages in cerebral granulomas caused by *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2022; 252:110481. doi: 10.1016/j.vetimm.2022.110481.

Texier C, Vidau C, Viguès B, El Alaoui H, Delbac F. Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2010;13(4):443-9. doi: 10.1016/j.mib.2010.05.005.

Toledo MDS, Cronemberger-Andrade A, Barbosa FMC, Reis NFC, Dupin TV, Soares RP, Torrecilhas AC, Xander P. Effects of extracellular vesicles released by peritoneal B-1 cells on experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *J Leukoc Biol*. 2020;108(6):1803-1814. doi: 10.1002/JLB.3MA0220-464RR.

van Ooij C, Tamez P, Bhattacharjee S, Hiller NL, Harrison T, Liolios K, Kooij T, Ramesar J, Balu B, Adams J, Waters AP, Janse CJ, Haldar K. The malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. *PLoS Pathog*. 2008; 4(6):e1000084. doi: 10.1371/journal.ppat.1000084.

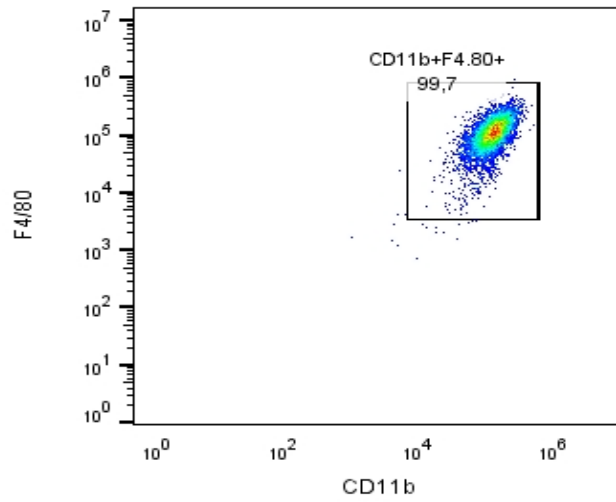
Yang C, Chalasani G, Ng YH, Robbins PD. Exosomes released from *Mycoplasma* infected tumor cells activate inhibitory B cells. *PLoS One*. 2012; 7(4):e36138.

Yin Y, Cai X, Chen X, Liang H, Zhang Y, Li J, Wang Z, Chen X, Zhang W, Yokoyama S, Wang C, Li L, Li L, Hou D, Dong L, Xu T, Hiroi T, Yang F, Ji H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Tumor-secreted miR-214 induces regulatory T cells: a major link between immune evasion and tumor growth. *Cell Res*. 2014; 24(10):1164-80. doi: 10.1038/cr.2014.121.

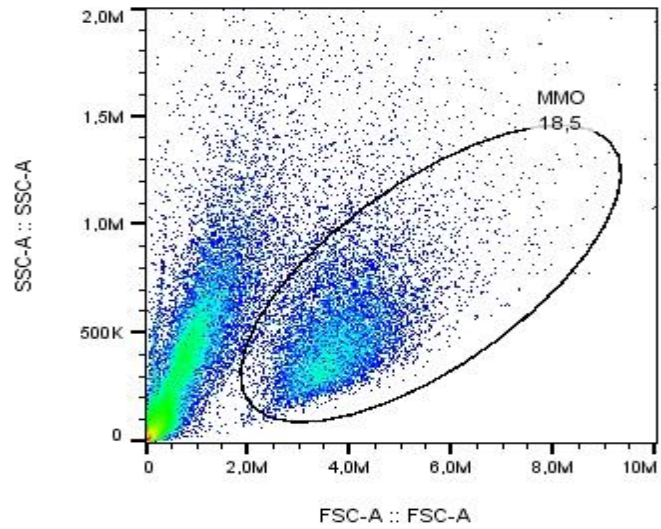
Zamboni DS, Rabinovitch M. Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect Immun*. 2003; 71:1225- 1233. doi: 10.1128/IAI.71.3.1225-1233.2003.

Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes: a novel pathway of local and distant intercellular communication that facilitates the growth and metastasis of neoplastic lesions. *Am J Pathol*. 2014; 184(1):28-41. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.09.027.

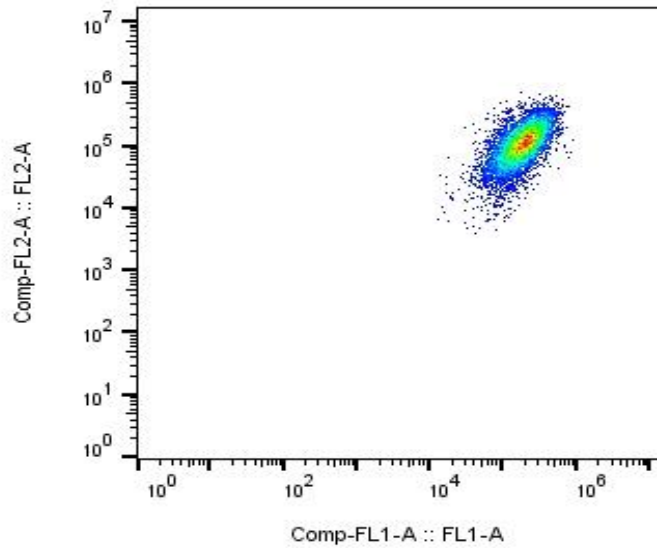
A01 MMO.fcs  
MMO  
7832



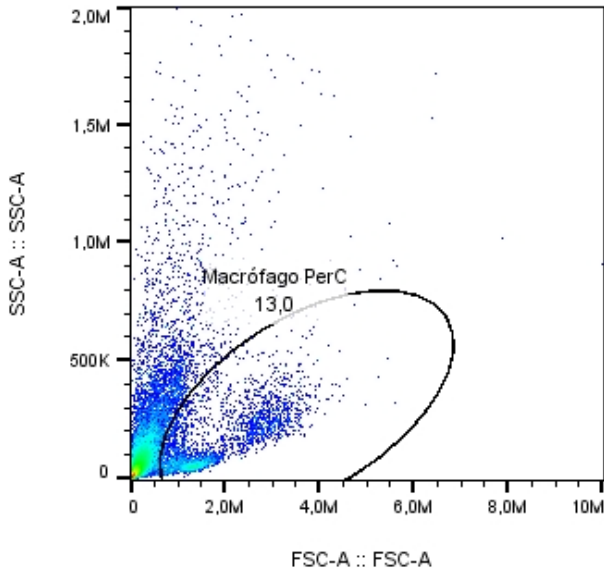
B02 MMO+Evs Ninfect.fcs  
Ungated  
50000



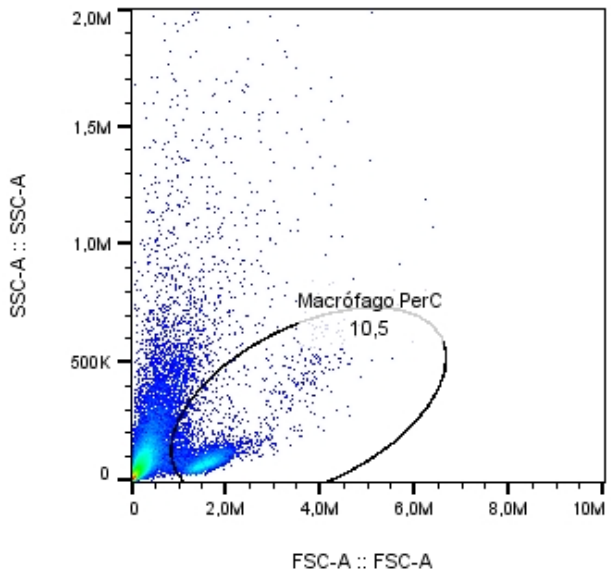
A05 MMO+Evs Ninfect.fcs  
CD11b+F4.80+  
10516



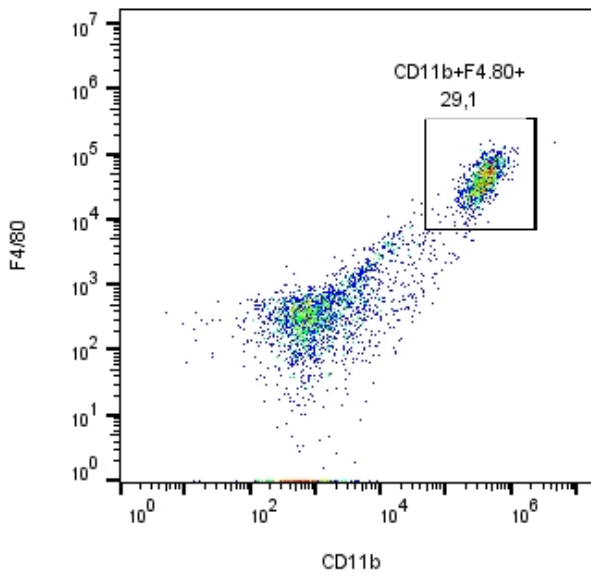
**Anexo 1.** Estratégia de gates para análise de macrófagos diferenciados a partir da medula óssea (MMO) ( $CD11b^+F4/80^+$ ) e tratado ou não com vesículas extracelulares não infectadas.



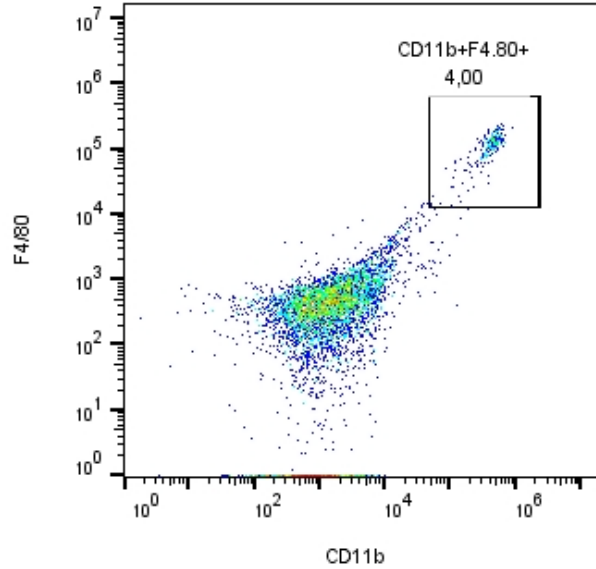
A06 MoP+EVs Ninfect.fcs  
Ungated  
24603



A06 Mo+EVs Ninfect.fcs  
Ungated  
50000



A06 MoP+EVs Ninfect.fcs  
Macrófago PerC  
3200



A06 Mo+EVs Ninfect.fcs  
Macrófago PerC  
5228

**Anexo 2.** Estratégia de gates para análise de macrófagos de lavados peritoneal aderente (MPerC) ( $CD11b^+F4/80^+$ ) e tratado ou não com vesículas extracelulares não infectadas.