

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

CROTOXINA MODULA MACRÓFAGOS INFECTADOS
PELO *Encephalitozoon cuniculi* PARA PERFIL
MICROBICIDA M1

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

CRISTINA GABRIELA NASCIMENTO DE OLIVEIRA

SÃO PAULO
2023

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

CROTOXINA MODULA MACRÓFAGOS INFECTADOS
PELO *Encephalitozoon cuniculi* PARA PERFIL
MICROBICIDA M1

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo.

CRISTINA GABRIELA NASCIMENTO DE OLIVEIRA

SÃO PAULO

2023

Oliveira, Cristina Gabriela Nascimento de.

Crotoxina modula macrófagos infectados pelo *Encephalitozoon cuniculi* para perfil microbicida M1 / Cristina Gabriela Nascimento de Oliveira. - 2023.

31 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: Patogenia de Infecções de Origem Fúngica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva.

1. Crotoxina. 2. Inflamação. 3. Macrófagos. 4. Microsporidia. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Saraiva, Anuska Marcelino Alvares (coorientadora). III. Título.

CRISTINA GABRIELA NASCIMENTO DE OLIVEIRA

**CROTOXINA MODULA MACRÓFAGOS INFECTADOS
PELO *Encephalitozoon cuniculi* PARA PERFIL
MICROBICIDA M1**

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

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA:

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr.^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr.^a Diva Denelle Spadacci Morena
Instituto Butantan

Prof.^a Dr.^a Sandra Coccuzzo Sampaio
Instituto Butantan

Esse artigo será encaminhado para o periódico Toxicon

Crotoxina modula macrófagos infectados pelo *Encephalitozoon cuniculi* para perfil microbicida M1

Cristina Gabriela Nascimento de Oliveira¹, Anuska Marcelino Alvares Saraiva¹,
Elizabeth Cristina Perez¹, Sandra Coccuzzo Sampaio², Maria Anete Lallo^{1*}

¹Programa de Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista–Unip,
São Paulo, São Paulo, Brazil

²Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil

Resumo

A crotoxina (CTX), uma fração bioativa isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, possui propriedades antibacteriana, antitumorais e antiinflamatória identificadas em estudos *in vitro* e *in vivo*. O microsporídio *Encephalitozoon cuniculi* pertence a um grupo amplo de fungos oportunistas, intracelulares obrigatórios que infectam vertebrados e invertebrados e apresentam grande resistência aos fármacos convencionais. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos fungicida e/ou fungistático da CTX sobre os esporos do microsporídio *Encephalitozoon cuniculi*, bem como avaliar sua capacidade de modular a atividade microbicida de macrófagos *in vitro*. Esporos de *E. cuniculi* foram tratados com duas concentrações de CTX (2,4 e 4,8 µg/mL) e, posteriormente, cultivados em células RK-13 para análise de sua viabilidade. Adicionalmente, macrófagos foram obtidos a partir de células peritoneais aderentes (APerC) após lavados peritoneais de camundongos BALB/c. APerCs foram infectadas com esporos de *E. cuniculi* e após uma hora tratadas com CTX por 3h, para posterior análise do perfil dos macrófagos, da produção de citocinas, da viabilidade dos macrófagos e dos esporos. Não foi demonstrado efeito fungicida, contudo com o tratamento dos esporos de *E. cuniculi* com 2,4 µg/mL de CTX teve efeito fungistático, com a redução da proliferação e viabilidade. Os esporos tratados com CTX determinaram maior porcentagem de necrose das células RK infectadas. Nessa mesma concentração de CTX (2,4 µg/mL), macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados apresentaram predomínio de macrófagos com perfil M1, o que foi confirmado pela razão entre CD40/CD206 com predomínio de M1 em relação ao M2, com produção de aumentada de citocina pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e com atividade microbicida confirmada pela menor viabilidade dos esporos demonstrada pela menor razão de proliferação. A CTX aumentou a morte por necrose de macrófagos infectados ou não com *E. cuniculi*. Os resultados permitem concluir que a CTX modulou macrófagos infectados pelo *E. cuniculi* perfil M1 com maior produção de citocinas pró-inflamatórias e com maior atividade microbicida, assim como teve efeito fungistático sobre os esporos.

Palavras-chave: Crotoxina, Inflamação, Macrófagos, Microsporidia.

Crotoxin modulates macrophages infected by *Encephalitozoon cuniculi* for M1 microbicidal profile

Abstract

Crotoxin (CTX), a bioactive fraction isolated from the venom of the snake *Crotalus durissus terrificus*, has antibacterial, antitumor and anti-inflammatory properties identified in in vitro and in vivo studies. Microsporidia *Encephalitozoon cuniculi* belongs to a broad group of opportunistic, obligate intracellular fungi that infect vertebrates and invertebrates and are highly resistant to conventional drugs. Thus, the aim of this study was to evaluate the fungicidal and/or fungistatic effects of CTX on spores of the microsporidian *E. cuniculi*, as well as to evaluate its ability to modulate the microbicidal activity of macrophages in vitro. *E. cuniculi* spores were treated with two concentrations of CTX (2.4 and 4.8 µg/mL) and subsequently cultivated in RK-13 cells for viability analysis. Additionally, macrophages were obtained from adherent peritoneal cells (APerC) after peritoneal washings from BALB/c mice. APerCs were infected with spores of *E. cuniculi* and after one hour treated with CTX for 3h, for further analysis of the profile of macrophages, cytokine production, viability of macrophages and spores. No fungicidal effect was demonstrated, however, treatment of *E. cuniculi* spores with 2.4 µg/mL of CTX had a fungistatic effect, with a reduction in proliferation and viability. Spores treated with CTX determined a higher percentage of necrosis in infected RK cells. At the same concentration of CTX (2.4 µg/mL), macrophages challenged with *E. cuniculi* and treated showed a predominance of the M1 profile, confirmed by the CD40/CD206 ratio, with increased production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and IL-6 and higher microbicidal activity confirmed by reduced spore viability demonstrated by lower proliferation ratio. CTX increased death by necrosis of macrophages infected or not with *E. cuniculi*. The results allow us to conclude that CTX modulated macrophages infected by *E. cuniculi* profile M1 with greater production of proinflammatory cytokines and with greater microbicidal activity, as well as having a fungistatic effect on spores.

Key words: Crotoxin, Inflammation, Macrophages, Microsporidia.

1. Introdução

Os venenos de serpentes são misturas complexas de moléculas biologicamente ativas, de origem proteica ou peptídica, que exibem uma ampla gama de propriedades farmacológicas (Sartim et al., 2018; Bocian and Hus, 2020). Nesse contexto está a crotoxina (CTX), principal e maior toxina isolada do veneno da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. t.*), sendo ela resultante da associação não covalente de uma pequena subunidade enzimática e não tóxica a crotapotina ou CA, com uma subunidade básica e fracamente tóxica da fosfolipase A2 denominada CB ou PLA2 (Sampaio et al., 2010; Zambelli et al., 2016; Sartim et al., 2018; Hayashi et al., 2022). Como principal componente do veneno da C.d.t., a CTX é capaz de induzir a paralisia periférica neuromuscular e insuficiência cardiorespiratória, um dos principais efeitos letais. A escassa resposta inflamatória no local do acidente ofídico pela C.d.t. (Fonseca et al., 2002), despertou o interesse pelos efeitos antiinflamatório da CTX.

Os efeitos imunomoduladores da CTX já foram observados na proliferação de células esplênicas e na secreção de citocinas *in vitro* (Rangel Santos et al., 2004), na inibição das atividades fagocitárias e de migração de macrófagos peritoneais residentes (Sampaio et al., 2003; Nunes et al., 2010), na modulação negativa das vias de sinalização intracelulares essenciais para a fagocitose por macrófagos peritoneais, no recrutamento de linfócitos e produção de anticorpos (Zambelli et al., 2008). Foi também descrito aumento da liberação de H₂O₂ e da produção de NO e TNF- α em macrófagos pré-tratados com CTX e estimulados com LPS em cocultivos com neutrófilos inflamatórios, com aumento da atividade fungicida (De Oliveira et al., 2018). CTX demonstrou capacidade de modular os macrófagos infectados com *Leishmania amazonenses*, os quais tiveram aumento na capacidade fagocítica e na eliminação dos parasitos intracelulares, aumento na produção de NO, aumento da área celular (espraiamento) e intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando macrófagos microbicidas com perfil M1 (Faria et al., 2017).

Adicionalmente, o mesmo estudo mostrou que *L. amazonenses*, protozoário intracelular muito resistente aos tratamentos convencionais, apresentou redução do crescimento das formas promastigotas após exposição a concentrações variadas de CTX (Faria et al., 2017). Adicionalmente, o veneno de *C. d. terrificus* apresentou ação antimicrobiana frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* (Dietz et al.,

2018). Em relação às bactérias, a ação do veneno crotálico surge da associação sinérgica dos peptídeos e enzimas antimicrobianos, tais como a PLA₂, que degrada os fosfolipídios da membrana bacteriana (Bocian and Hus, 2020), e a L-aminoácido oxidase (LAAO), que desempenha um papel antimicrobiano mediado pela produção de H₂O₂, composto que induz a ruptura de membranas do microrganismo pela promoção do estresse oxidativo e, conseqüentemente, indução de morte nas células microbianas (Guo et al., 2012). Fatos esses que despertam interesse para a utilização de CTX em relação a outros patógenos.

Os microsporídios são fungos intracelulares obrigatórios que infectam grande variedade de hospedeiros invertebrados e vertebrados (Han et al., 2020). A partir dos anos 90, emergiram como patógenos oportunistas com a pandemia da AIDS como agentes de enterites. Hoje se sabe além dos pacientes imunossuprimidos e/ou imunodeficientes, outros grupos de pessoas são considerados de risco, como pacientes com câncer em quimioterapia, idosos e crianças, pacientes diabéticos e viajantes (Didier and Weiss 2011), mas também receptores de órgãos transplantados (Kicia et al., 2019), funcionários de matadouros (Halánová et al., 2003) e trabalhadores que cuidam de animais (Carhan et al., 2015). Além disso, em uma revisão recente, foi destacado o potencial risco zoonótico para pacientes submetidos a intervenções assistidas por animais, devido ao contato físico próximo e contínuo que essas terapias geralmente exigem (Santaniello et al., 2021). A microsporidiose em mamíferos são causadas por cerca de 17 espécies, destacando-se *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi* e *Encephalitozoon hellem* (Han and Weiss, 2017; Han et al., 2021). Essas infecções envolvem um amplo espectro de apresentações clínicas, contudo a diarreia crônica é a mais comum (Magalhães et al., 2022).

Após a infecção, as células comprometidas do hospedeiro induzem a liberação de citocinas Th1, como interleucina 12 (IL-12) e interferon gama (IFN- γ), estabelecendo uma resposta imune mediada por células T CD8⁺, que leva à destruição das células infectadas, através da perforina (Aseeja et al., 2021; Moretto and Khan, 2022). Entretanto, tem sido demonstrado que *E. cuniculi* pode evadir da resposta imune aproveitando-se da eferocitose, pela qual o patógeno é capaz de se multiplicar dentro dos macrófagos e modular sua atividade, induzindo a produção citocinas de antiinflamatórias como IL-6 e IL-10 e, conseqüentemente, promover um ambiente favorável para sua disseminação (Dalboni et al., 2021).

As espécies de microsporídios sofrem grande variação em sua resposta às terapêuticas disponíveis, o que torna o tratamento complexo. Por exemplo, o albendazol e outros derivados de benzimidazóis são altamente ativos *in vitro* contra *E. hellem*, *E. cuniculi* e *E. intestinalis*, porém não tem eficácia contra *Enterocytozoon* (Han, Weiss, 2018). A descoberta de novos tratamentos contra microsporídios é crucial para reduzir infecções graves e mortalidade (Kaya et al., 2021), da mesma forma que a modulação terapêutica da resposta imune pode ser fundamental para a resolução da infecção.

Assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar os efeitos fungicida e/ou fungistático da CTX sobre os esporos de *Encephalitozoon cuniculi*, assim como avaliar *in vitro* os efeitos da toxina na modulação da atividade de macrófagos previamente infectados com *E. cuniculi*.

2. Material e Métodos

2.1. Declaração de Ética

Todos os procedimentos realizados nessa pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIP, com base nos critérios do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo parecer favorável com certificado número 9690131020 de 16/12/2020.

2.2. Animais

Camundongos da linhagem BALB/c, isogênicos, *Specific Pathogen Free* (SPF), com 8 a 12 semanas de idade, de ambos os gêneros, foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil. Durante o período experimental, os animais foram alojados em microisoladores no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista, sob condições de temperatura (22 a 24°C) e umidade controladas (45 a 55%), com ciclo de claro e escuro (12/12 horas). Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração peletizada esterilizada por irradiação e água esterilizada por autoclavagem.

2.3. Crotoxina (CTX)

A crotoxina foi cedida pela Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan – São Paulo. A concentração estoque 2,3 mg/mL obtida em solução de purificação conforme descrito por Silva et al. (2013). A partir dessa, foram separadas em alíquotas para cada experimento, sendo mantidas a -20°C e descongeladas apenas no momento do uso.

2.4. Cultivo de células Rks.

Células RK-13 (ATCC CCL 34) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (20 µg/mL), denominado R10. As culturas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO₂ no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Paulista. Após a confluência celular completa do tapete celular, em cerca de 2 dias, o meio era descartado e as mesmas células eram liberadas utilizando tripsina-versene (ATV). Na sequência, as células eram replicadas para novas garrafas de cultura, sendo disponibilizadas para a infecção com *E. cuniculi*.

2.5. Esporos de *Encephalitozoon cuniculi*

Os esporos de *E. cuniculi* utilizados para a infecção foram multiplicados em culturas de células RK-13 com confluências de 95 a 100%, cultivados em meio R10 e incubadas a 37°C, com 5% de atmosfera de CO₂. A cada 7 dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 20 minutos a 300 g para obtenção dos esporos contidos no sedimento. Os esporos coletados do sobrenadante foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato-salina (PBS) e armazenados a 4°C. Antes dos experimentos, os esporos foram purificados em gradiente de Percoll a 50% e contabilizados em câmara de Neubauer.

2.6. Células Peritoneais Aderentes (APerCs)

Após a parada cardiorrespiratória pelo aprofundamento anestésico com Sevoflurano, os camundongos foram submetidos ao lavado peritoneal com 10 mL de meio RPMI-1640. Após centrifugação por 5 min a 1500 rpm, o sedimento foi diluído em RPMI para a contagem das células em câmara de Neubauer. As células foram incubadas na concentração de 1×10^5 células por poço em placas com 24 poços, em 300 µL de R10 a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por 60 min. Após esse período,

o sobrenadante foi desprezado e as células aderentes foram infectadas no meio R10 com 500 μ por poço com esporos na concentração de 2 esporos por APerC.

2.7. Delineamento experimental

Para verificar os efeitos da CTX sobre os esporos ou células peritoneais aderentes foram delineados experimentos que compreenderam duas fases. Na primeira fase, os esporos de *E. cuniculi* foram incubados por 24 ou 48 horas com CTX nas concentrações de 2,4 μ g/mL ou 4,8 μ g/mL, para avaliar possíveis efeitos fungicida ou fungistático da CTX sobre o microsporídeo *E. cuniculi* (Fig. 1). Como controles foram utilizadas as mesmas concentrações de esporos viáveis não tratados (Vivos) e inviáveis não tratados com CTX (Morto). Ao final do tempo de tratamento, os esporos tratados e não tratados foram centrifugados por 20 min. a 500g, a seguir o sobrenadante foi descartado. Para lavagem dos esporos foram adicionados 10 mL de PBS a cada tubo, devidamente homogeneizado e então centrifugado por 20 min. a 500g com o descarte do sobrenadante. Esse processo de lavagem foi repetido mais uma vez. Em seguida, para verificar a viabilidade dos esporos pela sua capacidade de proliferação, os mesmos foram incubados em cultura de células RK, respeitou-se a equivalência de 1 esporo para cada célula RK (1:1). Após 7 dias de incubação sem a troca do meio, os esporos proliferados nas culturas foram quantificados em câmara de Neubauer. Adicionalmente, também foi analisada a viabilidade das células RK infectadas pelos esporos tratados ou não com a CTX.

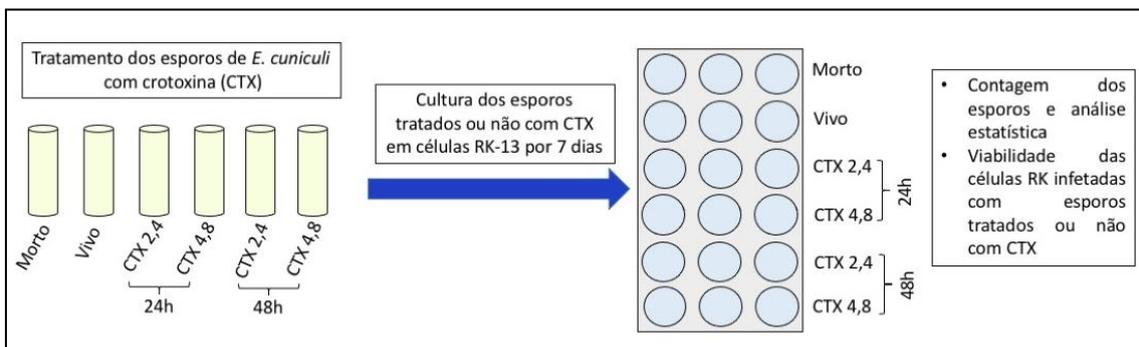


Figura 1. Primeira fase - Esporos de *E. cuniculi* foram tratados com 2,4 μ g/mL ou 4,8 μ g/mL crotoxina (CTX) por 24 ou 48 h, sendo mantidos controles vivo e o morto. Depois do tratamento, os esporos foram infectados em culturas de células RK-13 para observar sua capacidade de proliferação/viabilidade.

A segunda fase desse estudo compreendeu a avaliação dos efeitos da CTX sobre macrófagos infectados com *E. cuniculi* (Fig. 2). Foram realizados lavados peritoneais em camundongos Balb/c e as células APerCs obtidas foram incubadas em placas com 24 poços por uma hora e, a seguir, o sobrenadante foi descartado e novo meio com esporos de *E. cuniculi* (2 esporos para cada macrófago, 2:1) foi adicionado às células. Depois de uma hora, o sobrenadante foi removido, procedeu-se nova lavagem com PBS e novo meio com CTX, nas concentrações de 2,4 µg/mL ou 4,8 µg/mL, foi adicionado por uma ou 3 horas. Após os períodos referidos, realizou-se a quantificação das citocinas no sobrenadante, a viabilidade dos esporos do meio da sua proliferação em células RK, análise do perfil de macrófagos das culturas e a sua viabilidade pela quantificação de necrose e apoptose.

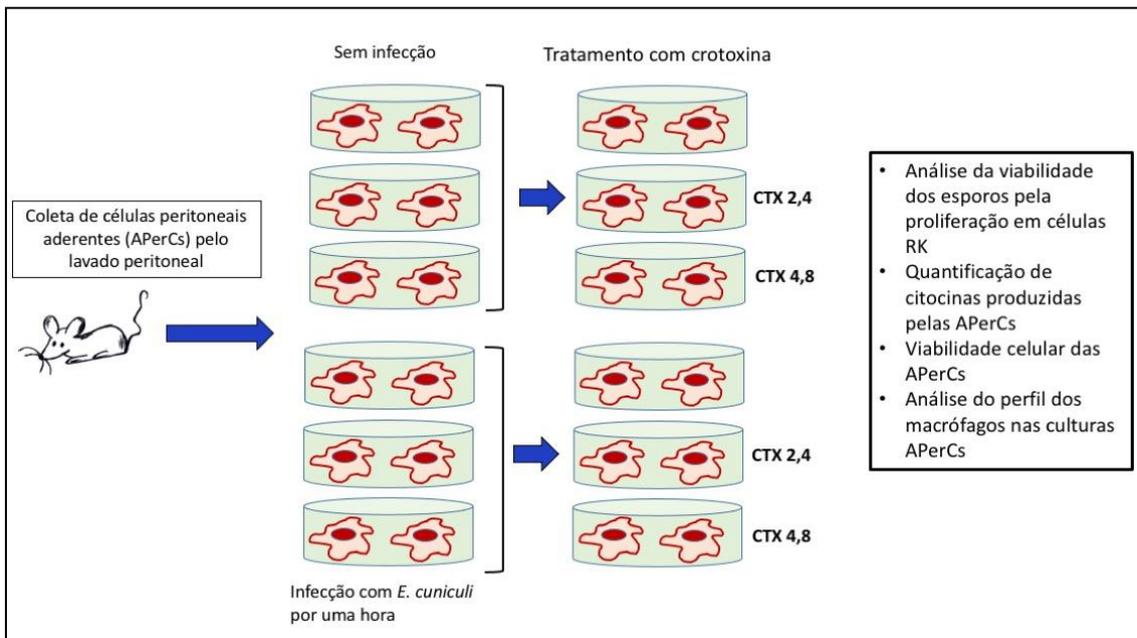


Figura 2. Delineamento experimental 2. Coleta de células por lavado peritoneal e cultivo em placas. Após uma hora, as células peritoneais aderentes (APerCs) foram infectadas com esporos de *E. cuniculi* por uma hora, sobrenadante coletado e a seguir tratadas com CTX. Avaliação da viabilidade dos esporos, das células APerCs, produção de citocinas e perfil dos macrófagos

2.8. Viabilidade celular

A viabilidade das células RK-13 ou das APerCs foi mensurada pela quantificação em números absoluto ou relativo de células vivas ou mortas, nesse caso decorrente de necrose, apoptose ou apoptose tardia, utilizando Kit 7AAD/Anexina (BD

Bioescience). De acordo com as diretrizes do fabricante, 1 µL de 7AAD e 1 µL Anexina foram adicionados a cada amostra previamente diluída em 100 µL do tampão do kit, sendo incubadas por 15 minutos protegidas da luz à temperatura ambiente. Logo após este período foram acrescentados 100 µL do mesmo tampão e a leitura imediata no citômetro de Fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences).

2.9. Viabilidade dos esporos

Os esporos tratados com CTX da primeira fase, ou os recuperados das culturas com APerCs e tratados ou não com CTX da segunda fase, foram cultivados em células RK para análise a viabilidade pela sua capacidade proliferativa. Inicialmente, os esporos foram contabilizados e, então, inoculados em células RK cultivadas em placas com 24 poços. Após 6 h de incubação, período necessário para a internalização dos esporos, o sobrenadante foi coletado e substituído por meio R-10 e essas culturas foram mantidas por 7 dias.

Os esporos não internalizados nessas 6 h foram contabilizados em câmara de Neubauer. Para o cálculo taxa de proliferação, o número de esporos basal (T0) foi obtido da diferença entre o número de esporos inoculados e o número de esporos não internalizados após 6 h, sendo considerados inviáveis ou mortos.

Após 7 dias, o sobrenadante das culturas foi coletado e reservado, então, as células RK liberadas da placa com auxílio de ATV. Para promover o rompimento das células e a liberação dos esporos, adicionou-se 1% de Tween 20 a cada poço e, então, a placa foi exposta a choques térmicos, intercalando sessões com 20 segundos de duração de exposição ao calor (banho em água quente) e ao frio (gelo), sendo necessárias no mínimo 20 sessões para ruptura das células. Em seguida, os esporos liberados foram adicionados aos sobrenadantes reservados e foram centrifugados a 4000 rpm (rotação por minuto) por 10 segundos, com a finalidade de sedimentarem os detritos celulares. Ao final, os esporos livres foram quantificados em câmara de Neubauer e considerados como esporos proliferados em 7 dias (T7). A razão de proliferação foi obtida da seguinte forma:

$$\text{Razão de proliferação} = \frac{\text{número de esporos proliferados em 7 dias (T7)}}{\text{número de esporos basal (T0)}}.$$

2.10. Fenotipagem por citometria de fluxo das APerCs

Após o tratamento com CTX, as APerCs foram destacadas dos poços com *cell scraper* em RPMI, com posterior centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com tampão Macs, sendo posteriormente incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 por 20 minutos em banho de gelo para bloqueio dos receptores Fc. Após este período, as células foram lavadas com tampão Macs e, em seguida, foram adicionados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-F4/80 de camundongo conjugado com Allophycocyanin – APC, anti-CD11b de camundongo conjugado a Pacific Blue (BD-Pharmingen, San Diego, CA), anti-CD40 de camundongo conjugado a Peridinin Chlorophyll Protein Complex – PerCP (BD-Pharmingen, San Diego, CA), anti-CD206 de camundongo conjugado a Allophycocyanin – APC (BD-Pharmingen, San Diego, CA). As células incubadas com os anticorpos marcados com os fluorocromos ficaram sob refrigeração e protegidas da luz por 30 minutos. Finalmente, as células foram lavadas com tampão Macs e depois ressuspendidas em 150 µL de PBS para análise em citômetro de fluxo. Os dados foram adquiridos em citômetro de Fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences).

2.11. Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes das culturas de células foram coletados e armazenados a –80°C para análise das citocinas TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-12p70, MCP-1 e IL-10 (Mouse Inflammation Kit) por citometria de fluxo pelo método Cytometric Bead Array (CBA). Resumidamente, 20 µL de amostra (tanto de curva padrão quanto das amostras a serem analisadas) foram incubados com 20 µL de uma mistura de *beads* de captura e anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo PE (*Phycoerythrin*). As amostras foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente no escuro. Após lavagem, a aquisição dos dados foi realizada no citômetro de Fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Um total de 1500 eventos foram adquiridos (correspondendo a 300 *beads* por analito a ser investigado). A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análise para CBA (FCAP *array software* – BD Bioscience).

2.12. Mensuração de nitritos e nitratos

A produção de óxido nítrico foi mensurada a partir da quantidade de nitritos e nitratos presentes no sobrenadante das culturas celulares pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Em uma placa de 96 poços acrescentou-se 100 µL de

reagente de Griess (0,2% N-1 naftiletilenediamina, 2% sulfanilamida em 5% de ácido acético) e mesmo volume de sobrenadante proveniente das culturas. Posterior à incubação por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi estabelecida em espectrofotômetro com filtro de ~540 nm. As concentrações de NO foram calculadas a partir de curva padrão utilizando nitrito de sódio e os resultados foram expressos em μM de nitrito para 3×10^5 macrófagos.

2.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância ANOVA de uma via para comparação entre os grupos, o programa GraphPad Prism. Os valores foram apresentados como média das replicatas experimentais \pm erro padrão. Os valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística, com intervalo de confiança de 95%.

3. Resultados

3.1. A concentração de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ de CTX por 24h reduziu a viabilidade dos esporos de *E. cuniculi*

A CTX é conhecida por exibir uma variedade de atividades farmacológicas incluindo efeitos antiparasitários, no entanto não há relato da ação da CTX sobre os microsporídios. Na primeira fase, os esporos foram tratados com CTX e a atividade fungicida e/ou fungistática foi analisada pela proliferação dos esporos em células RK. Observou-se a não proliferação dos esporos mortos em culturas de células RK, sendo esse grupo considerado o controle da perda de viabilidade. Os grupos com esporos tratados com CTX apresentaram proliferação e, portanto, preservação da sua viabilidade em relação ao Morto, excluindo-se o efeito fungicida da CTX. Em comparação ao grupo Vivo (esporos viáveis não tratados - controle positivo), o tratamento com CTX na dose de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ por 48 horas, bem como na concentração de 4,8 $\mu\text{g/mL}$ em 24 e 48 horas demonstram proliferação já que a razão aumentou entre duas a quatro vezes no número de esporos em relação ao Morto ou aos tratados com CTX na dose 2,4 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h (Fig. 3), sugerindo ausência de atividade fungistática para esses tratamentos. Ao contrário, o grupo que recebeu CTX na dosagem 2,4 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h demonstrou menor proliferação em comparação aos esporos vivos e demais outros tratamentos, indicando atividade fungistática (Fig. 3).

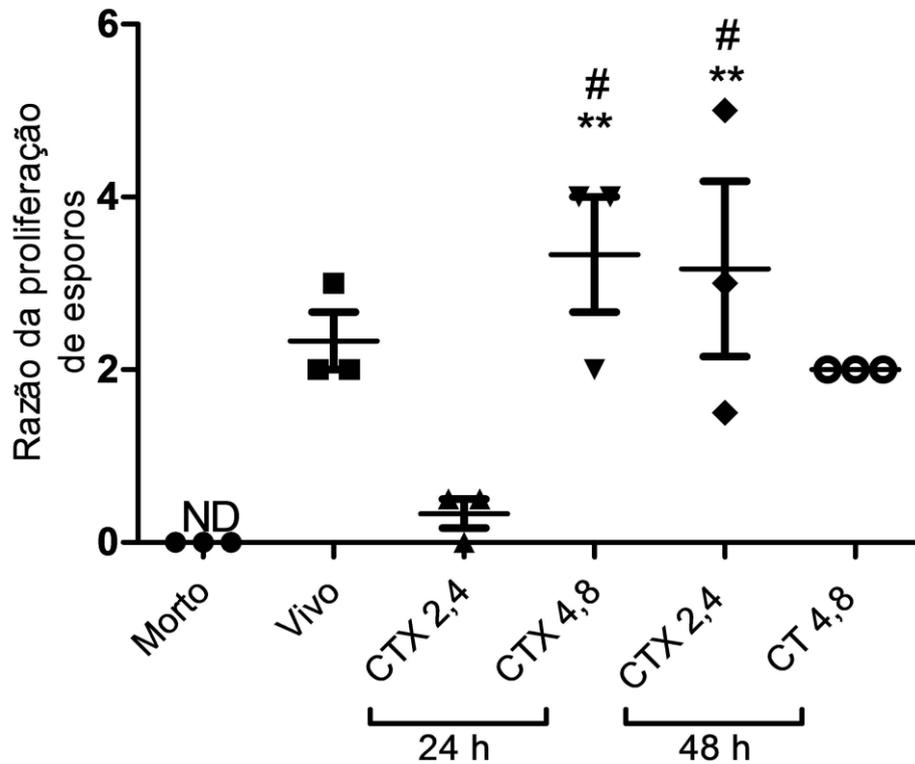


Figura 3. Razão de proliferação dos esporos após o tratamento com crotoxina (CTX). Esporos de *E. cuniculi* esporos inviáveis (Morto), viáveis não-tratados (Vivo) e esporos incubados com CTX nas concentrações de 2,4 µg/mL ou 4,8 µg/mL por 24 ou 48 horas cultivado por 7 dias. A razão de proliferação foi obtida pela diferença entre o número de esporos infectados que entraram nas células RK após 6 h de cultura e o número de esporos produzidos após 7 dias em cultura. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferença $p < 0,01^{**}$ em relação ao Morto e $p < 0,05^{\#}$ em relação ao CTX 2,4.

3.2. Esporos tratados com CTX determinaram maior porcentagem de necrose das células RK infectadas

Foi então mensurada a viabilidade das células RK infectadas pelos esporos tratados ou não com CTX, sendo observada em todos os grupos uma média de 30 a 35% de células RK viáveis após 7 dias de cultura. Ressalta-se que a necrose foi o tipo de morte celular predominante nos grupos tratados por 24 h com CTX 2,4 µg/mL e 4,8 µg/mL e por 48 h com CTX 2,4 µg/mL. Por outro lado, a apoptose e apoptose tardia predominaram como forma de morte celular nos grupos RK, Morto, Vivo e CTX 4,8 µg/mL por 48 h.

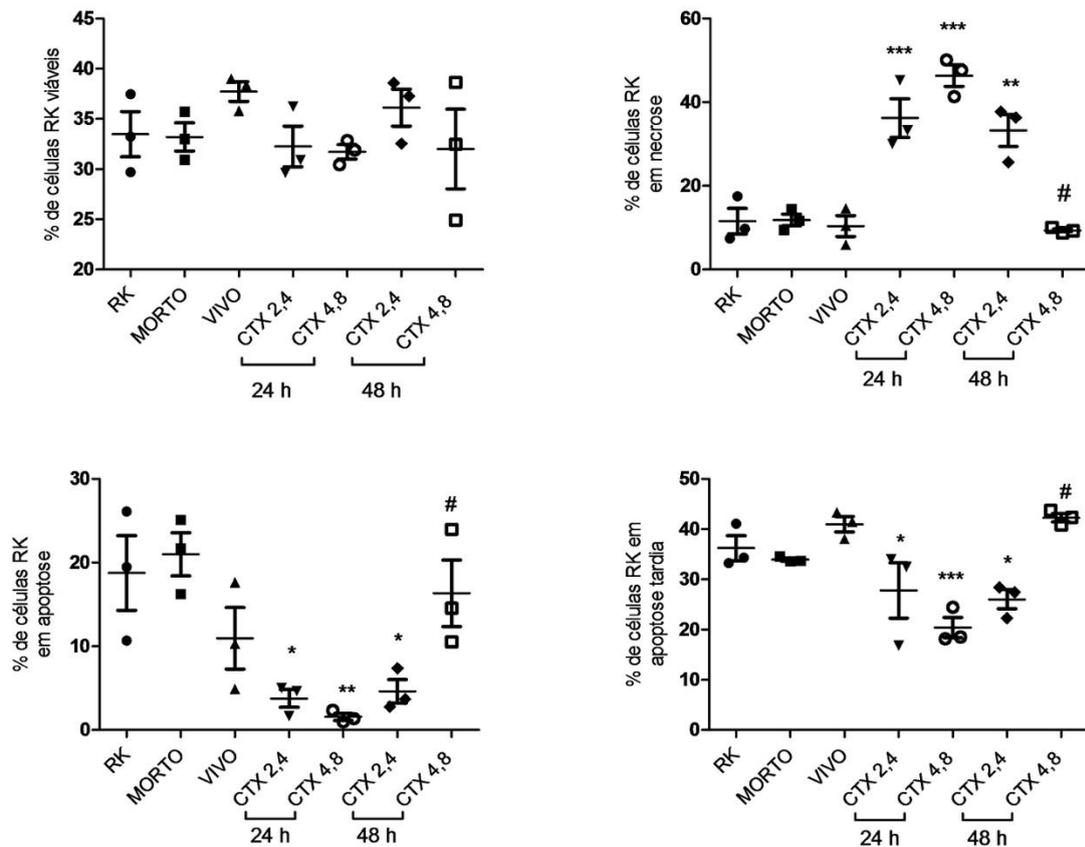


Figura 4. Viabilidade das células RK infectadas com esporos tratados ou não com CTX. Porcentagem de viabilidade de células RK infectadas por 7 dias com esporos de *E. cuniculi* viáveis não-tratados (Vivo), esporos inviáveis (Morto) e esporos incubados com CTX nas concentrações de 2,4 µg/mL ou 4,8 µg/mL por 24 ou 48 horas. A) Porcentagem de células viáveis. B) Porcentagem de necrose. C) Porcentagem de apoptose. D) Porcentagem de apoptose tardia. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ em relação aos controles não tratados (RK, Morto, Vivo), $p < 0,05^{\#}$ em relação aos esporos tratados com CTX 4,8 em 24h.

3.4. CTX e/ou *E. cuniculi* modulam o perfil dos macrófagos

Em seguida, as células APerCs coletadas foram infectadas com esporos com *E. cuniculi* e tratadas com 2,4 µg/mL de CTX para observar o perfil de modulação dos macrófagos em intervalos de tempo diferentes (Fig. 5). Poucas modificações significativas foram encontradas em uma hora de incubação (Fig. 5A, B, C). Em 3 h de incubação, observou-se predomínio de macrófagos com MFI $F4/80^+CD40^{high}CD206^{low}$ ou perfil M1 nos grupos controle e tratados com CTX em

comparação aos infectados (Fig. 5D). Nesse mesmo período, CTX aumentou a MFI de $F4/80^+CD40^{low}CD206^{high}$ compatível com perfil M2, porém a análise da razão entre $CD40^+/CD206^+$ mostrou que apenas o grupo controle tinha perfil M1 predominante, com proporção de 1,5 macrófagos M1 para cada M2 e nos demais grupos houve equilíbrio entre os 2 perfis. Em 6 h de incubação, os macrófagos com perfil M2 estavam aumentados no grupo tratado com CTX (Fig. 5H) e a razão entre M1/M2 estava próxima de zero (Fig. 5I), evidenciando uma tendência de equiparação entre os perfis de macrófagos. Já em 12 h, os macrófagos M2 constituíram o perfil predominante no grupo infectado em *E. cuniculi* e tratado com CTX, embora a razão entre os perfis tenha sido menor que o controle. Em 24 h, o comportamento dos macrófagos foi semelhante ao de 6 h (Fig. 6E). Com base nesses resultados, os experimentos seguintes foram realizados no intervalo de incubação de 3 h.

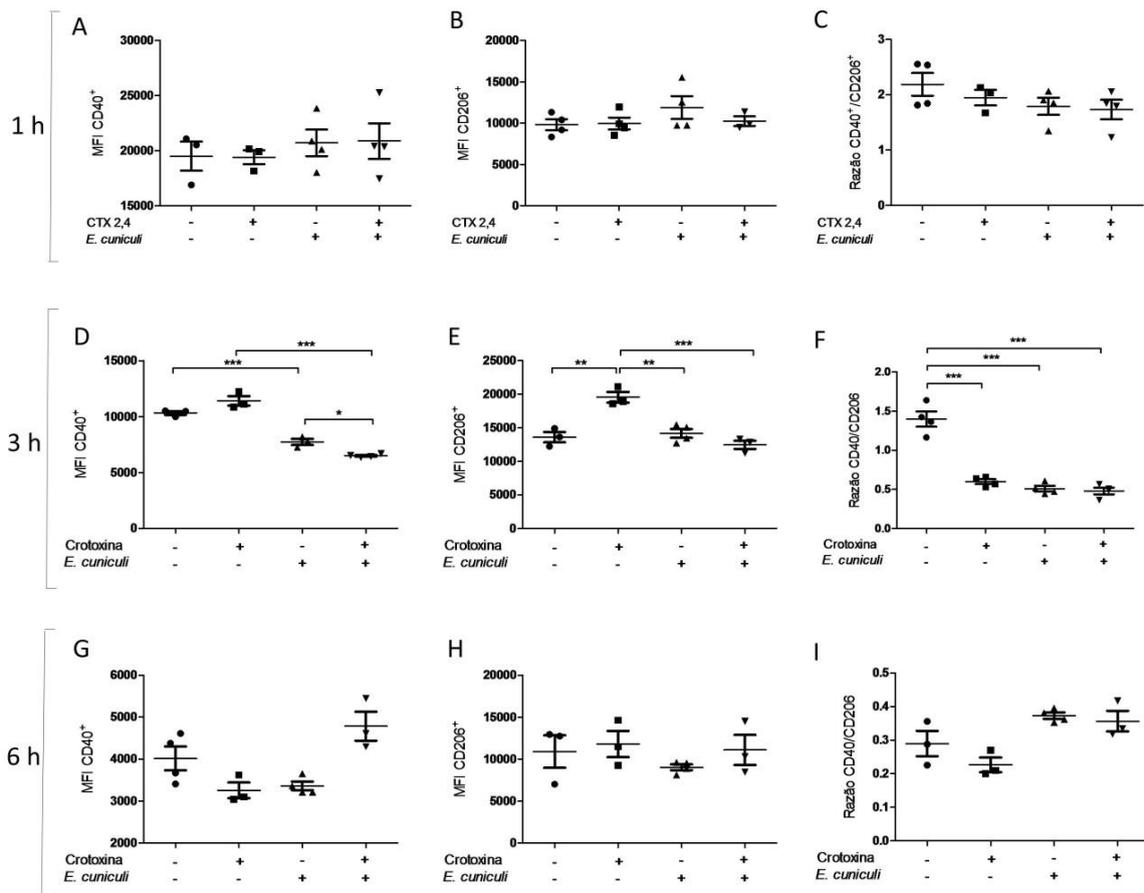


Figura 5. Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células peritoneais aderentes desafiadas ou não com *Encephalitozoon cuniculi* (- ou +) e tratadas ou não com crotoxina 2,4 $\mu\text{g/mL}$ (- ou +), por 1 hora, 3 ou 6 horas. A) MFI para $CD40^+$ em 1 h. B)

MFI para CD206⁺ em 1 h. C) Razão entre MFI de CD40⁺/ MFI de CD206⁺ em 1 h. D) MFI para CD40⁺ em 3 h. E) MFI para CD206⁺ em 3 h. F) Razão entre MFI de CD40⁺/ MFI de CD206⁺ em 3 h. G) MFI para CD40⁺ em 6 h. H) MFI para CD206⁺ em 6 h. I) Razão entre MFI de CD40⁺/ MFI de CD206⁺ em 6 h. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

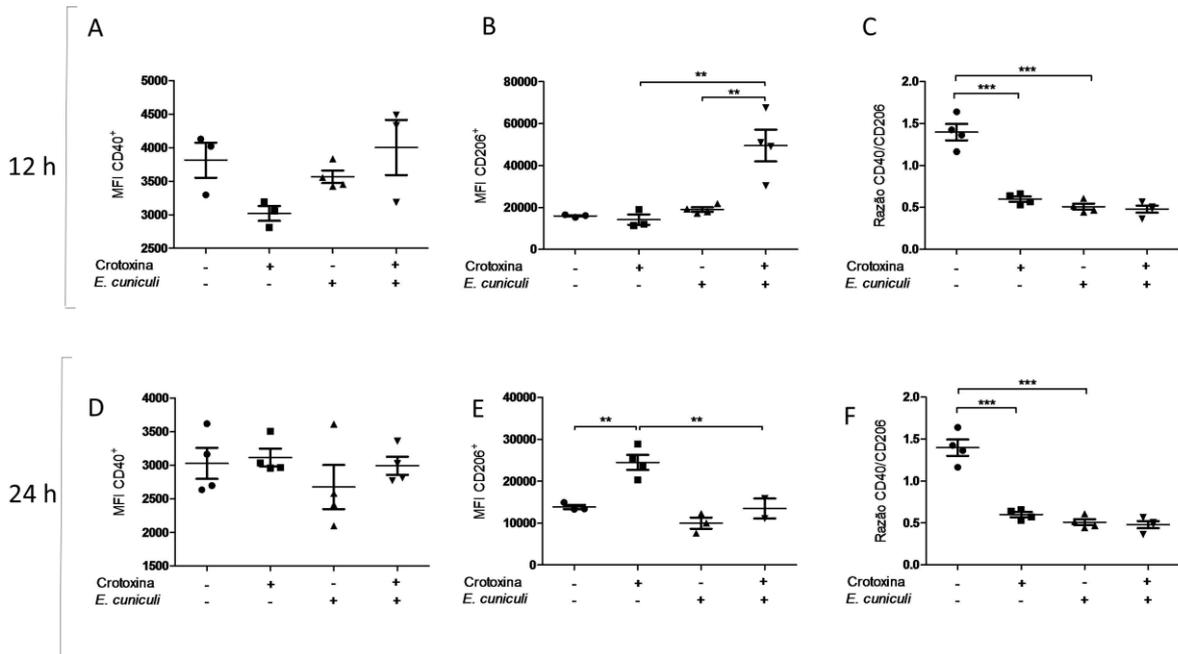


Figura 6. Média de intensidade de fluorescência (MFI) de células peritoneais aderentes desafiadas ou não com *E. cuniculi* (- ou +) e tratadas ou não com crotoxina 2,4 µg/mL (- ou +), por 12 horas e 24 horas. A) MFI para CD206⁺ em 12 h. B) MFI para CD40⁺ em 12 h. C) Razão entre MFI de CD40⁺/ MFI de CD206⁺ em 12 h. D) MFI para CD206⁺ em 24 h. E) MFI para CD40⁺ em 24 h. F) Razão entre MFI de CD40⁺/ MFI de CD206⁺ em 24 h. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

3.5. A concentração de 2,4 µg/mL de CTX aumentou a atividade microbicida de macrófagos

Os macrófagos tratados com 2,4 µg/mL por 3 h apresentaram aumento de MFI F4/80⁺CD40^{high} ou perfil M1 em relação os grupos controle ou tratado com 4,8 µg/mL de CTX (Fig. 7A). Os macrófagos com perfil M2 (F4/80⁺CD40^{low}CD206^{high}) estavam

aumentados no grupo controle (Fig. 7B), contudo a razão entre os 2 perfis revelou prevalência de M1 em relação ao M2 (Fig. 7C).

Entre as citocinas quantificadas (TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-12p70, MCP-1 e IL-10) somente TNF- α e IL-6 foram detectadas segundo critérios do kit CBA utilizado, as demais foram indetectáveis. Houve uma tendência de aumento de IL-6 mediante o tratamento com 2,4 $\mu\text{g/mL}$ de CTX (Fig. 7E).

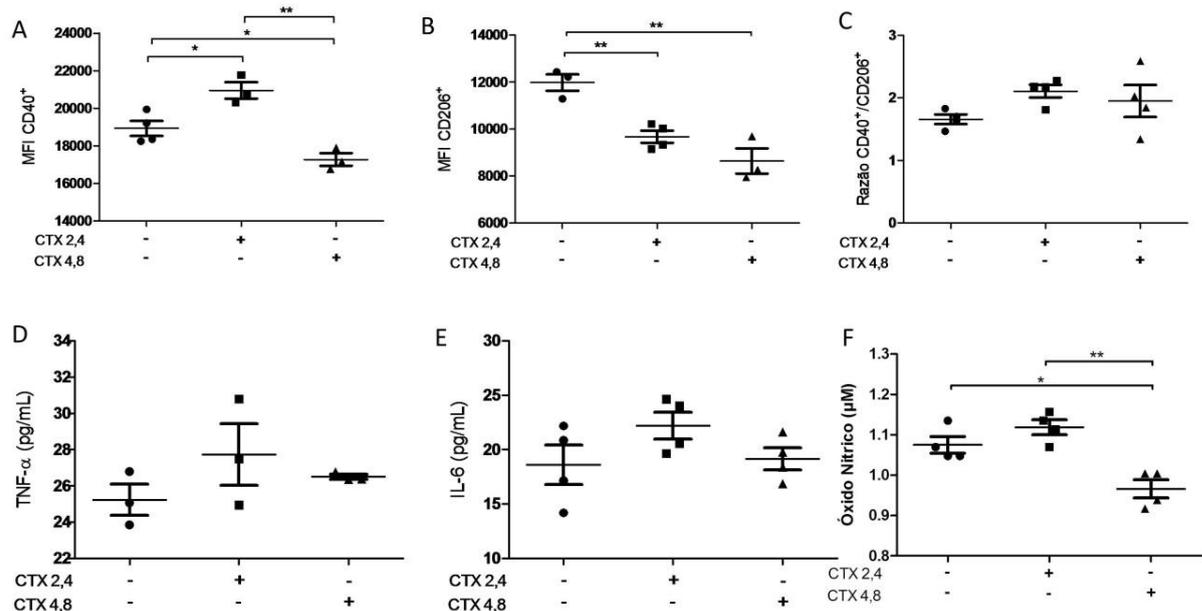


Figura 7. Perfil funcional dos macrófagos obtidos de células peritoneais aderentes tratados por 3 horas com crotoxina (CTX). Média de intensidade de fluorescência (MFI) e produção de citocinas TNF- α e IL-6 de macrófagos obtidas de células peritoneais tratadas (+) ou não (-) com crotoxina nas concentrações de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ ou 4,8 $\mu\text{g/mL}$. A) MFI de F4/80⁺CD40⁺ em macrófagos. B) MFI de F4/80⁺CD206⁺ em macrófagos. C) Razão entre MFI CD40⁺/ MFI CD206⁺. D) Produção de TNF- α no sobrenadante das culturas. E) Produção de IL-6 no sobrenadante das culturas. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$.

Os macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com 2,4 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram aumento de MFI F4/80⁺CD40^{high} ou perfil M1 em relação o grupo infectado com *E. cuniculi* ou infectado e tratado com 4,8 $\mu\text{g/mL}$ de CTX (Fig. 8A). Ao mesmo tempo, demonstrou-se prevalência de macrófagos com perfil M2 (F4/80⁺CD40^{low}CD206^{high}) no grupo infectado (Fig. 8B), contudo a razão entre os 2

perfis revelou maior quantidade de M1 em relação ao M2 (Fig. 8C). Assim, pode-se atribuir a modulação do perfil dos macrófagos ao tratamento com CTX na concentração de 2,4 $\mu\text{g/mL}$.

Em adição, a produção de citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 foi maior nos macrófagos com perfil M1 (MFI F4/80⁺CD40^{high}) tratados com a concentração de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ de CTX, corroborando a funcionalidade do perfil identificado. Já o comportamento funcional dos macrófagos infectados com *E. cuniculi* e tratados com 4,8 $\mu\text{g/mL}$ de CTX mostrou-se semelhante ao grupo infectado não tratado, ou seja, com baixa produção de citocinas inflamatórias (Fig. 8). Na produção de óxido nítrico foi baixa e não se identificou divergências entre os grupos (Fig. 8F).

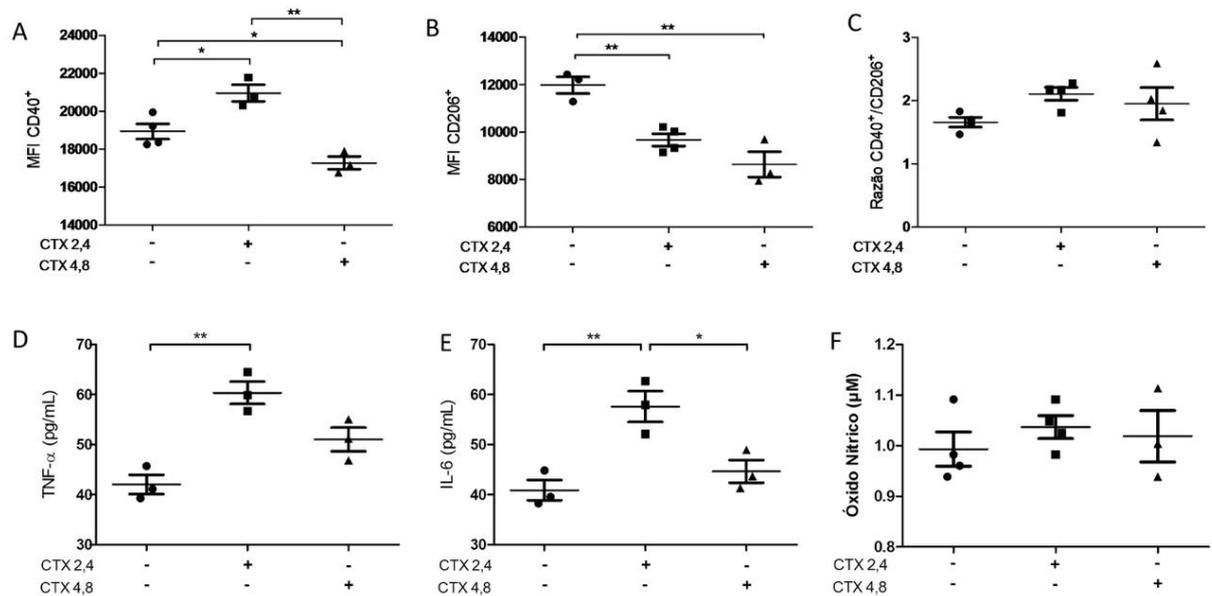


Figura 8. Perfil funcional dos macrófagos obtidos de células peritoneais aderentes mediante à infecção com *E. cuniculi* e tratamento com crotoxina (CTX) por 3 horas. Média de intensidade de fluorescência (MFI) de macrófagos obtidos de células peritoneais aderentes desafiadas (+) ou não (-) com *E. cuniculi* e tratados (+) ou não (-) com crotoxina nas concentrações de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ ou 4,8 $\mu\text{g/mL}$. A) MFI de F4/80⁺CD40⁺ em macrófagos. B) MFI de F4/80⁺CD206⁺ em macrófagos. C) Razão entre MFI CD40⁺/ MFI CD206⁺. D) Produção de TNF- α no sobrenadante das culturas. E) Produção de IL-6 no sobrenadante das culturas. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$.

Após o tratamento com CTX por 3 horas, os esporos recuperados das culturas de APerC foram inoculados em células RK e cultivados por 7 dias para análise da proliferação e, portanto, viabilidade. Após esse período, observou-se proliferação significativamente menor nos recuperados de macrófagos infectados tratados com 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CTX em relação aos esporos obtidos de macrófagos tratados com CTX na concentração de 4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 9).

Em resumo, macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram predomínio de macrófagos com perfil M1, o que foi confirmado pela razão entre CD40/CD206 com predomínio de M1 em relação ao M2, com produção de aumentada de citocina pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e com atividade microbicida confirmada pela menor viabilidade dos esporos demonstrada pela menor razão de proliferação.

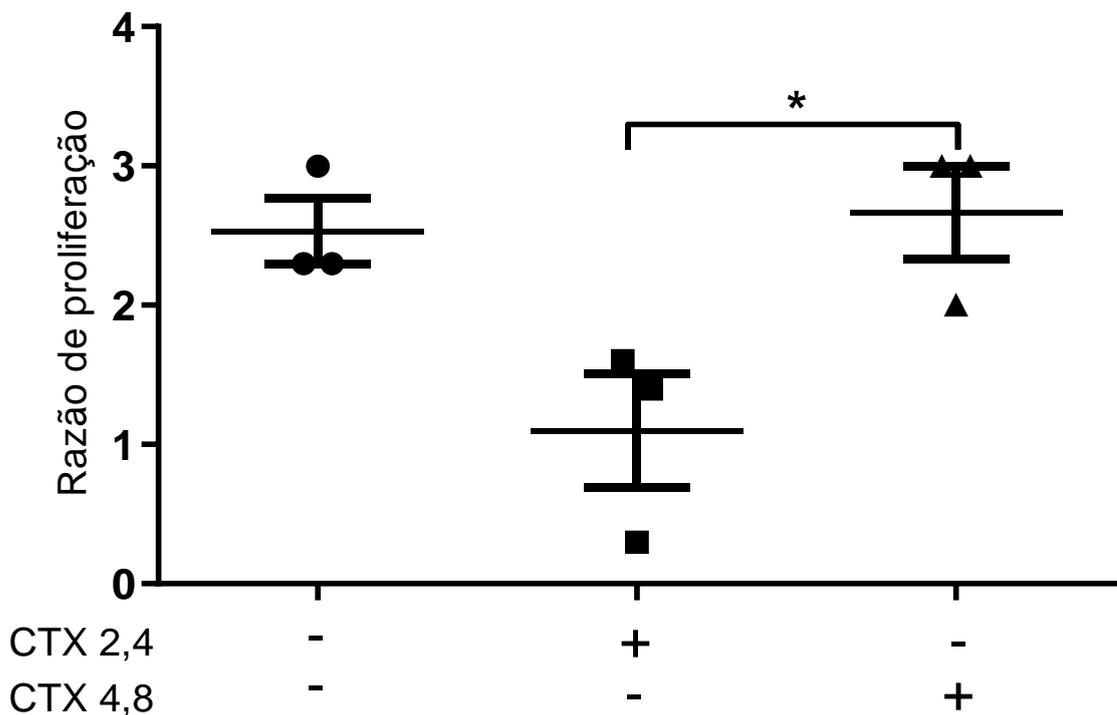


Figura 9. Razão de proliferação dos esporos tratados com CTX. Número esporos obtidos após 7 dias em cultura células RK infectadas com esporos de *E. Cuniculi* infectadas com esporos tratados 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 4,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CTX por 3 horas. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$.

3.6. CTX aumentou a necrose de macrófagos infectados ou não com *E. cuniculi*

Observou-se que a viabilidade de macrófagos F4/80 presentes nas culturas APerC após 3 h de tratamento com CTX foi superior 80% em todos os grupos analisados (Fig. 10A). Mais uma vez a necrose foi o tipo de morte celular predominante nos macrófagos tratados com CTX (Fig. 10B) e a apoptose tardia foi dominante nos macrófagos controle (Fig. 10C, D). Para os macrófagos infectados e posteriormente tratados a viabilidade celular também foi superior 80%, embora a exposição à CTX na concentração de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ de CTX tenha reduzido de forma significativa a população de células vivas em relação ao controle (Fig. 11A), sendo a necrose a causa da morte celular mais frequente para esse grupo (Fig. 11B).

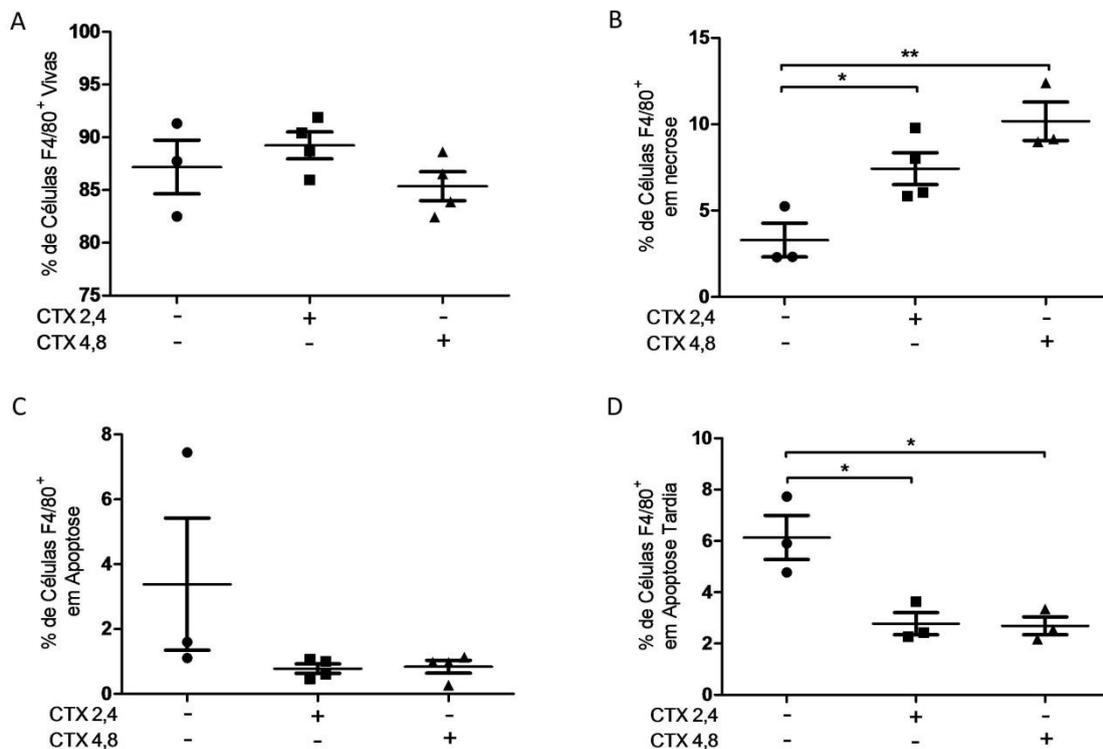


Figura 10. Comparação da viabilidade de macrófagos (Células F4/80⁺) tratados (+) ou não (-) com crotoxina (CTX) nas concentrações de 2,4 $\mu\text{g/mL}$ ou 4,8 $\mu\text{g/mL}$. A) Porcentagem de células F4/80⁺ em vivas. B) Porcentagem de células F4/80⁺ mortas. C) Porcentagem células F4/80⁺ em apoptose. D) Porcentagem de células F4/80⁺ em apoptose tardia. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{}$.**

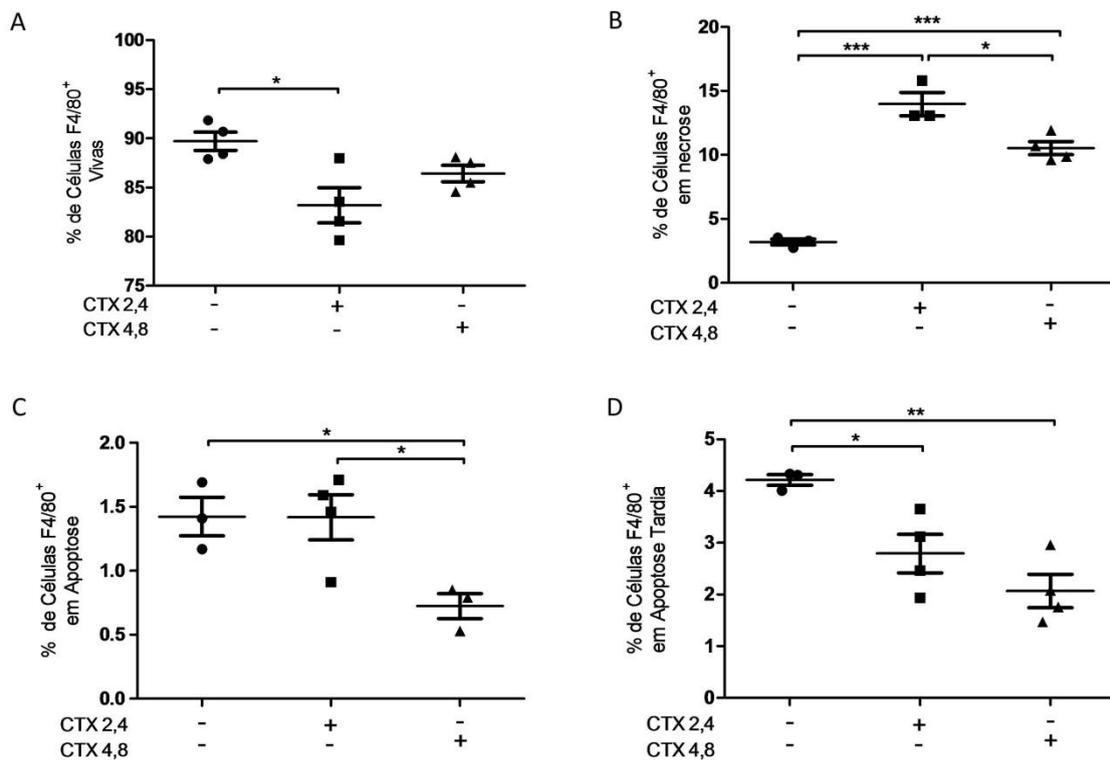


Figura 11. Comparação da viabilidade de macrófagos (Células F4/80⁺) infectados com *Encephalitozoon cuniculi* e tratados (+) ou não (-) com crotoxina (CTX) nas concentrações de 2,4 µg/mL ou 4,8 µg/mL. A) Porcentagem de células F4/80⁺ em vivas. B) Porcentagem de células F4/80⁺ mortas. C) Porcentagem células F4/80⁺ em apoptose. D) Porcentagem de células F4/80⁺ em apoptose tardia. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{}$, $p < 0,001^{***}$.**

4. Discussão

Os microsporídios são patógenos intracelulares que demonstram enorme resistência aos fármacos fungicidas ou fungistáticos disponíveis, o que impulsiona a pesquisa por novas substâncias que possam eliminar e/ou controlar desenvolvimento do patógeno e, portanto, a infecção. No presente estudo, nenhum efeito fungicida foi identificado no tratamento dos esporos com as diferentes concentrações de CTX e os tempos de exposição. Entretanto, a crotoxina na concentração 2,4 µg/mL por 24 h reduziu a capacidade de proliferação dos esporos, indicando efeito fungistático de forma semelhante ao encontrado no tratamento de promastigotas de *Leishmania amazonenses* com concentrações similares de CTX, as quais tiveram 24% de redução do crescimento para a concentração de 4,8 µg/mL e 14,6% para a concentração de

2,4 µg/mL (Farias et al., 2017). Corroborando nossos resultados, houve redução da multiplicação de *Staphylococcus aureus* tratado com CTX, indicando efeito bacteriostático, entretanto para *Micrococcus luteus* foi demonstrada atividade bactericida e bacteriostática, sendo essas atividades relacionadas às modificações no metabolismo bacteriano e na permeabilidade da membrana celular (Nemezc and Golińska, 2022). Como o efeito fungistático não foi demonstrado nas demais concentrações e tempo de tratamento, novos estudos devem realizados para a obtenção de resultados mais conclusivos, inclusive com foco nas alterações metabólicas que possam justificar os resultados aqui observados. Por outro lado, existem diferenças entre as subunidades de CTX na atividade citotóxica, microbicida e imunomoduladora que podem ser exploradas para os microsporídios, por exemplo, resultados sugerem a Crotoxina B como composto principal para atividade antimalárica (Quintana et al., 2012).

Nas microsporidioses, a sobrevivência do patógeno e sua disseminação dependem da célula hospedeira, da duração do ciclo celular e do seu metabolismo, fatos que induzem a mecanismos adaptativos do patógeno como a supressão ou ativação de genes que possam controlar o funcionamento da célula infectada, incluindo sua sobrevivência. Foram identificados 84 genes relacionados à apoptose em linhagem celular THP1 (monócitos derivados de leucemia monocítica) infectada pelos microsporídios *E. cuniculi* e *Vittaforma cornea*, mostrando que ambos podem manipular as vias de apoptose intrínseca e diminuir sua frequência (Sokolova et al., 2019). Com a finalidade de ganhar tempo para a proliferação, parasitas intracelulares como microsporídios e *Toxoplasma gondii* podem suprimir a apoptose do hospedeiro (Nash et al., 1998; Higes et al., 2013; Kurze et al., 2015; Sinpoo et al., 2017; Sokolova et al., 2019). No presente estudo, ao analisar a viabilidade celular e o mecanismo de morte nas células RK infectadas com esporos tratados, observou-se predominância de necrose em células RK infectadas com *E. cuniculi* tratados com CTX, em oposição aos resultados anteriores do nosso grupo que demonstraram altas porcentagens de apoptose em macrófagos provenientes de medula óssea e infectados com *E. cuniculi*, especialmente após serem pré-incubados com células Jurkat apoptóticas, fato que apontou ser a eferocitose observada um mecanismo de disseminação e evasão da imunidade (Dalboni et al., 2020). Nesse contexto, a inibição de apoptose causada pelo tratamento de esporos com CTX demonstra, que de forma mais sutil, a toxina modificou as estratégias de sobrevivência no patógeno na célula hospedeira, fato que

deverá ser mais explorado.

Diante da ausência de efeito fungicida da CTX sobre os esporos, foram realizados experimentos para avaliar sua atividade imunomoduladora da toxina sobre os macrófagos. Os macrófagos, como uma das principais células inatas, possuem plasticidade na dependência do estímulo recebido podem apresentar perfil microbicida (M1) ou antiinflamatório (M2) (Martinez and Gordon, 2014). Verificou-se que M1 pode reduzir significativamente a infecção por *Encephalitozoon* dependendo das espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio (Didier, 1995; Didier et al., 2010; Gonzalez-Machorro et al., 2019). No presente estudo, a concentração de 2,4 µg/mL de CTX determinou predomínio de macrófagos do perfil M1 com elevada produção das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6, e incremento na atividade microbicida demonstrada pela redução na capacidade proliferativa e, portanto, viabilidade de esporos recuperados dos macrófagos. Nossos resultados corroboram perfil microbicida identificado em macrófagos desafiados com *L. amazonenses* e tratados com CTX, os quais apresentaram aumento significativo na capacidade fagocítica e na eliminação dos parasitos intracelulares (Farias et al., 2017). Em adição, o aumento em até 42% na atividade fungicida contra *Candida albicans* foi observado após o tratamento de neutrófilos com CTX, na concentração de 0,3 µg/mL por duas horas, e cocultivados com macrófagos (De Oliveira et al., 2018).

L. amazonenses também é conhecida por ter efeito inibitório na produção de NO por macrófagos, porém no tratamento com CTX 2,4 µg/mL e 4,8 µg/mL reverteu essa condição, sendo mensuradas produções aumentadas de NO e de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α (Farias et al., 2017). Corroborando esses resultados nós identificamos o aumento das mesmas citocinas pró-inflamatórias, contudo a produção de NO não se diferenciou entre os grupos infectados ou não. De forma oposta, o tratamento camundongos com sepse experimentalmente induzida com CTX revelou menores concentrações plasmáticas de IL-6 e TNF- α e aumento de LXA4, PGE2 e IL-1 β (Bretones et al., 2022). Segundo os autores, os macrófagos procedentes da medula óssea desses camundongos apresentaram diminuição da capacidade de fagocitose de *E. coli* mediante tratamento com CTX, também divergindo dos resultados aqui apresentados.

Foi observado que os macrófagos provenientes de camundongos deficientes em células B-1 (Xid) tiveram perfil M2 modulado pela infecção com *E. cuniculi*, com consequente redução da capacidade microbicida (Pereira et al., 2019). De forma

semelhante, os resultados desse estudo também mostraram maior expressão do perfil M2 em macrófagos com infectados com *E. cuniculi*, assim como menor produção de citocinas inflamatórias e maior proliferação de esporos. Entretanto, CTX na reverteu essa tendência de modulação do perfil M1 para M2, promovendo ganho expressivo na eliminação do patógeno pela atividade microbicida. De forma oposta, foi demonstrado que CTX e sua subunidade CB atuaram sobre as células dendríticas, coestimuladas com LPS, impedindo a expressão de MHCII e das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86, assim como diminuíram a produção de citocinas inflamatórias (Freitas et al., 2018).

A morte celular ocorre frequentemente após a infecção intracelular e muitos patógenos têm como alvo as vias de morte celular como uma estratégia de virulência (Faherty and Maurelli, 2008). A eferocitose de células apoptóticas é um evento altamente regulado. Em contraste, as células necróticas liberam material celular heterogêneo e bastante indefinido no espaço extracelular. Anteriormente, nosso grupo demonstrou que a eferocitose favoreceu *E. cuniculi* e polarizou os macrófagos para um perfil M2, permitindo a sobrevivência e multiplicação do patógeno no interior dos macrófagos e explicando a possibilidade de os macrófagos atuarem como cavalos de Tróia na microsporidiose. Nesse sentido, a indução de necrose nos macrófagos infectados pelo *E. cuniculi* e tratados com CTX mostrou-se como resultado interessante para a resolução da infecção, evitando a eferocitose e os benefícios da mesma para o patógeno. Pode-se hipotetizar que a CTX tenha atuado sobre a expressão dos genes indutores de apoptose do *E. cuniculi* ou tenha modulado as vias de morte celular desses macrófagos. Aparentemente, a necrose pode ser deletéria ao patógeno, contudo esse fenômeno deverá ser mais explorado, uma vez que não se pode negligenciar o fato da necrose também ser um mecanismo de fuga da atividade microbicida. Foi demonstrado em polimorfonucleares infectados por *M. tuberculosis* necróticos foram eficientemente fagocitados por macrófagos e, dentro desses, *M. tuberculosis* foi capaz de crescer (Dallenga et al., 2017).

Conclusão

A exposição de macrófagos peritoneais infectados *E. cuniculi* à crotoxina na concentração de 2,4 µg/mL resultou na modulação para o perfil M1 com maior produção de citocinas TNF- α e IL-6 e com maior atividade microbicida. O tratamento dos esporos de *E. cuniculi* com 2,4 µg/mL de CTX demonstrou atividade fungistática.

Referências

- Aseeja, P., Shaikh, Y., Bajpai, A., Sirsikar, P., & Kalra, SK., 2021. Advancing our understanding of the immune response against *Encephalitozoon infection*. *Parasit Immunol.* 43 (6), e12828. doi: 10.1111/pim.12828
- Bocian, A., Hus, K.K., 2020. Antibacterial properties of snake venom components. *Chem Papers.* 74 (2), 407-419. doi.:10.1007/s11696-019-00939-y
- Bretones, M.L., Sampaio, S.C., Barbeiro, D.F., Kubo Ariga, S.K., Soriano, F.G., de Lima, T.M., 2022. Crotoxin modulates inflammation and macrophages' functions in a murine sepsis model. *Toxicon.* 216, 132-138. doi: 10.1016/j.toxicon.2022.07.007
- Carhan A., Ozkan, O., Ozkaya, E., 2015. The first identification of *Encephalitozoon cuniculi* infection in an animal care worker in Turkey. *Iran J Parasitol.* 10(2), 280-5. PMID: 26246827
- Dalboni, L. C., Alvares Saraiva, A. M., Konno, F. T. D. C., Perez, E. C., Codeceira, J. F., Spadacci-Morena, D. D., & Lallo, M. A., 2021. *Encephalitozoon cuniculi* takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. *Plos One.* 16(3), e0247658. doi: 10.1371/journal.pone.0247658
- Dallenga, T., Repnik, U., Corleis, B., Eich, J., Reimer, R., Griffiths, G.W., Schaible, U.E., 2017. *M. tuberculosis*-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages. *Cell Host Mic.* 22(4), 519-530. doi: 10.1016/j.chom.2017.09.003
- De-Oliveira, R.B.B., Kato, E., Soares de Lima, T., Alba-Loureiro, T.C., Curi, R., Cirillo, M.C., Sampaio, S.C., 2018. Crotoxin-treated macrophages stimulate ros production and killing activity in co-cultured neutrophils. *Preprints.* 2018050322 doi: 10.20944/preprints201805.0322.v1.
- Didier, E.S., Weiss LM., 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis.* 24(5), 490-5. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834aa152.
- Didier, E. S., 1995. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum Microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol.* 17(8), 405-412. doi: 10.1111/j.1365-3024.1995.tb00908.x.
- Didier, E.S., Bowers, L.C., Martin, A.D., Kuroda, M.J., Khan, I.A., Didier, P.J., 2010. Reactive nitrogen and oxygen species, and iron sequestration contribute to macrophage-mediated control of *Encephalitozoon cuniculi* (Phylum Microsporidia) infection in vitro and in vivo. *Microbes Infec.*, 12(14-15), 1244-1251. doi: 10.1016/j.micinf.2010.09.010.
- Dietz, J. do C., Almeida, D. A. de, Cintra, L. C., Oliveira, B. F. R. de, Magalhães, M. R., Jesuíno, R. S. A., 2018. Evaluation of the antibacterial activity of *Crotalus durissus terrificus* crude venom. *Ciênc Anim Bras* 19. doi: 10.1590/1809-6891v19e-51322

Faherty, C.S., Maurelli, A.T., 2008. Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection. *Trends Microbiol.* 16, 173-180. doi: 10.1016/j.tim.2008.02.001.

Farias, L. H. S., Rodrigues, A. P. D., Coêlho, E. C., Santos, M. F. D., Sampaio, S. C., & Silva, E. O., 2017. Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol.* 144(11), 1458-1467. doi: 10.1017/S0031182017000944.

Fonseca, M. G., Mathias, M. R. C., Yamashita, S., Morceli, J., Barraviera, B., 2002. Local edema and hemorrhage caused by *Crotalus durissus terrificus* envenoming evaluated by magnetic resonance imaging (MRI). *J Venom Anim Toxins.* 8(1). doi: 10.1590/S0104-79302002000100005

Freitas, A.P., Favoretto, B.C., Clissa, P.B., Sampaio, S.C., Faquim-Mauro, E.L., 2018. Crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* Venom modulates the functional activity of dendritic cells via formyl peptide receptors. *J Immunol Res.* 3, 7873257. doi: 10.1155/2018/7873257.

González-Machorro, J. R., Rodríguez-Tovar, L. E., Gómez-Flores, R., Soto-Dominguez, A., Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Garcia, A., Castillo-Velázquez, U., 2019. Increased phagocytosis and growth inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* by LPS-activated J774A. 1 murine macrophages. *Parasitol Res.* 118(6), 1841-1848. doi: 10.1007/s00436-019-06310-0.

Guo, C., Liu, S., Yao, Y., Zhang, Q., Sun, M-Z., 2012. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon.* 60(3), 302-311. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.05.001.

Halánová, M., Cisláková, L., Valencáková, A., Bálent, P., Adam, J., Trávnicek, M., 2003. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med.* 10(1), 117-20. PMID: 12852743.

Han, B., Weiss, L.M., 2018. Therapeutic targets for the treatment of microsporidiosis in humans. *Expert Opin Ther Targets.* 22, 903–915. doi: 10.1080/14728222.2018.1538360.

Han, Y., Gao, H., Xu, J., Luo, J., Han, B., Bao, J., Pan, G., Li, T., Zhou, Z., 2020. Innate and adaptive immune responses against microsporidia infection in mammals. *Front Microbiol.* 11, 1468. doi: 10.3389/fmicb.2020.01468.

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

Han, B., Pan, G., Weiss, L. M., 2021. Microsporidiosis in humans. *Clin Microbiol Ver.* 34(4), e00010-20. doi: 10.1128/CMR.00010-20.

- Hayashi, M.A.F., Campeiro, J. D. Yonamine, C. M., 2022. Revisiting the potential of South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* toxins as therapeutic, theranostic and/or biotechnological agentes. *Toxicon*. 206, 1-13, doi: 10.1016/j.toxicon.2021.12.005.
- Higes, M., Juarranz, Á., Dias-Almeida, J., Lucena, S., Botías, C., Meana, A., Martín-Hernández, R., 2013. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Microbiol Reports*. 5(4), 530-536. doi: 10.1111/1758-2229.12059.
- Kaya, F., İnkaya, A.Ç., Aksoy, S., Abbasoğlu, O., Ertenli, A.İ., Büyükaşık, Y., Akdağlı, S., Akyön, Y., Ergüven, S., 2021. Investigation of intestinal protozoon prevalence in immunocompromised patients at a University Hospital. *Turkiye Parazitol Derg*. 45(1), 39-44. English. doi: 10.4274/tpd.galenos.2020.6819.
- Kicia, M., Szydłowicz, M., Cebulski, K., Jakuszko, K., Piesiak, P., Kowal, A., Sak, B., Krajewska, M., Hendrich, A.B., Kváč, M., Kopacz, Ž., 2019. Symptomatic respiratory *Encephalitozoon cuniculi* infection in renal transplant recipients. *Int J Infect Dis*. 79, 21-25. doi: 10.1016/j.ijid.2018.10.016.
- Kurze, C., Le Conte, Y., Dussaubat, C., Eler, S., Kryger, P., Lewkowski, O., 2015. Abelhas tolerantes a *Nosema* (*Apis mellifera*) escapam da manipulação parasitária da apoptose. *PLoS One*. 10, e0140174. doi: 10.1371/journal.pone.0140174.
- Magalhães, T.R., Pinto, F.F., Queiroga, F.L., 2022. A multidisciplinary review about *Encephalitozoon cuniculi* in a One Health perspective. *Parasitol Res*. 121(9), 2463-2479. doi: 10.1007/s00436-022-07562-z.
- Moretto, M.M., Khan, I.A., 2022. Immune response to Microsporidia. *Exp Suppl*. 114, 373-388. doi: 10.1007/978-3-030-93306-7_13.
- Munawar, A., Ali, S.A., Akrem, A., Betzel, C., 2018. Snake Venom peptides: tools of biodiscovery. *Toxins*. 10(11), 474. doi: 10.3390/toxins10110474.
- Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., Curiel, T.J., 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *J Immunol*. 160(4), 1824-1830. PMID: 9469443.
- Nemecz, D., Golińska, P., 2022. Antibacterial properties of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus*—insight into the mechanism of action. *Molecules*. 27, 7726. doi: 10.3390/molecules27227726
- Nunes, F.P., Zychar, B.C., Della-Casa, M.S., Sampaio, S.C., Gonçalves, L.R., Cirillo, M.C., 2010. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon*. 55(6), 1100-6. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.12.011.

- Pereira, A., Alvares-Saraiva, A.M., Konno, F.T.C., Spadacci-Morena, D.D., Perez, E.C., Mariano, M., Lallo, M.A., 2019. B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile ameliorates microbicidal functions and disrupt the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 13(9), e0007674. doi: 10.1371/journal.pntd.0007674.
- Quintana, J.C., Chacón, A.M., Vargas, L., Segura, C., Gutiérrez, J.M., Alarcón, J.C., 2012. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. *Acta Tropica.* 124 (2), 126-132. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.07.003.
- Rangel-Santos, A., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., Cardoso, D.F., 2004. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon.* 44, 609–616. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.07.004.
- Sampaio, S.C., Brigatte, P., Sousa-e-Silva, M.C., dos-Santos, E.C., Rangel-Santos, A.C., Curi, R., Cury, Y., 2003. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon.* 41(7), 899-907. doi: 10.1016/s0041-0101(03)00069-2.
- Sampaio, S. C., Hyslop, S., Fontes, M. R., Prado-Franceschi, J., Zambelli, V. O., Magro, A. J., Brigatte, P., Gutierrez, V.P., Cury, Y., 2010. Crotoxin: novel activities for a classic β -neurotoxin. *Toxicon.* 55(6), 1045-1060. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.01.011.
- Santaniello, A., Cimmino, I., Dipineto, L., Agognon, A.L., Beguinot, F., Formisano, P., Fioretti, A., Menna, L.F., Oriente, F., 2021. Zoonotic risk of *Encephalitozoon cuniculi* in animal-assisted interventions: laboratory strategies for the diagnosis of infections in humans and animals. *Int J Environ Res Public Health.* 18(17), 9333. doi: 10.3390/ijerph18179333.
- Sartim, M.A., Menaldo, D.L., Sampaio, S.V., 2018. Immunotherapeutic potential of Crotoxin: anti-inflammatory and immunosuppressive properties. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 24, 39. doi: 10.1186/s40409-018-0178-3.
- Silva, M.C., Gonçalves, L.R., Mariano, M., 1996. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediators Inflamm.* 5, 18–23. doi: 10.1155/S0962935196000038.
- Sinpoo, C., Paxton, R. J., Disayathanoowat, T., Krongdang, S., Chantawannakul, P., 2018. Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* on individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *J Insect Physiol.* 105, 1-8. doi: 10.1016/j.jinsphys.2017.12.010.
- Sokolova, Y.Y., Bowers, L.C., Alvarez, X., Didier, E.S., 2019. *Encephalitozoon cuniculi* and *Vittaforma corneae* (Phylum Microsporidia) inhibit staurosporine-induced apoptosis in human THP-1 macrophages in vitro. *Parasitol.* 146(5), 569-579. doi: 10.1017/S0031182018001968.

Zambelli, V.O., Sampaio, S.C., Sudo-Hayashi, L.S., Greco, K., Britto, L.R.G., Alves, A.S. Zychar, B.C. Gonçalves, L.R.C., Spadacci-Morena, D.D., Otton, R., Della-Casa, M. S., Curi, R., Cury, Y., 2008. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: involvement of adhesion molecules and lipoxigenase-derived mediators. *Toxicon*, 51 (8), 1357–1367. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.03.004.

Zambelli, V.O.; Pasqualoto, K.F.M.; Picolo, G.; Chudzinski-Tavassi, A.M.; Cury, Y., 2016. Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs. *Pharmacol Res.*, 112, 30-36 doi: 10.1016 / j.phrs.2016.01.009.