

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

JOÃO LOURIVAL DE SOUZA JUNIOR

CROTOXINA INDUZ O INFLAMASSOMA NLRP3 E RESPOSTA INFLAMATÓRIA
TH1 E TH17 CONTRA A ENCEFALITOOZONOSE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS

SÃO PAULO

2024

JOÃO LOURIVAL DE SOUZA JUNIOR

**CROTOXINA INDUZ O INFLAMASSOMA NLRP3 E RESPOSTA INFLAMATÓRIA
TH1 E TH17 CONTRA A ENCEFALITOOZONOSE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS**

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, sob a orientação do prof (a) Dr (a): Maria Anete Lallo.

SÃO PAULO

2024

Souza Junior, João Lourival de.

Crotoxina induz o inflamassoma NLRP3 e resposta inflamatória Th1 e Th17 contra a encefalitozoonose experimental em camundongos / João Lourival de Souza Junior. - 2024.

36 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2024.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

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

1. Citocinas. 2. Imunomodulação. 3. Inflamação. 4. Microsporídios. 5. Zoonose. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

Tese apresentada no formato de artigo a ser encaminhado para o periódico
Toxicon

**CROTOXINA INDUZ O INFLAMASSOMA NLRP3 E RESPOSTA INFLAMATÓRIA
TH1 E TH17 CONTRA A ENCEFALITOZOONOSE EXPERIMENTAL EM
CAMUNDONGOS.**

João Lourival de Souza Júnior¹, Eluane de Luca da Silva Martins¹, Anuska Marcelino
Alvares Saraiva¹, Elizabeth Christina Perez¹, Sandra Coccuzzo Sampaio², Rodrigo Augusto
dos Santos¹, Maria Anete Lallo¹

¹Programa de Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo,
Brasil

²Departamento de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

* Corresponding author

E-mail: anetelallo@hotmail.com (MAL); maria.lallo@docente.unip.br

orcid.org/0000-0003-3578-3087

AGRADECIMENTOS

À CAPES-PROSUP pela bolsa recebida para a realização desse programa de doutorado;

Aos funcionários do laboratório da UNIP, especialmente Bruno, Suzana e Cleide, que me acolheram com tanto carinho nesse tempo;

Aos professores do programa de patologia ambiental e experimental, representados aqui por Anuska, Beth e Rodrigo, tão generosos e comprometidos com o ensino;

Aos amigos do Hospital Universitário em Maceió, que me possibilitaram cursar o programa: Elisângela, Monik, Fernanda, Janekelly, aos pediatras que sustentaram minha ausência, e ao amigo Iramirton que me apresentou o programa;

As amigas Marta e Magna, sempre me incentivando nas escolhas;

Ao Pablo por ter me dado todo apoio que eu precisava para seguir, sendo paciente em todo o tempo;

À minha família, meu pai, minha mãe, minhas irmãs, sobrinhos, e aos meus filhos Lucas e Laís, por fazerem tanto sentido à minha vida;

À amiga Eluane, por dividir comigo tantos momentos especiais, sempre com um sorriso acolhedor;

À professora Anete, que certamente é merecedora de todas as homenagens, por levar a docência com tanta leveza e sabedoria, eu sou privilegiado por tê-la como orientadora nessa jornada, muito obrigado!

RESUMO

Encephalitozoon cuniculi são fungos atípicos, oportunistas, intracelulares obrigatórios que infectam hospedeiros vertebrados e que possuem extrema habilidade de manipular a resposta imune e sobreviver no hospedeiro. A crotoxina (CTX), bioativo isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, demonstra capacidade de modificar a resposta imune. Macrófagos desafiados com *E. cuniculi* e tratados com CTX apresentaram maior atividade microbicida e perfil M1, revertendo o predomínio do perfil M2 provocado pelo patógeno. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da CTX sobre a resposta imune desenvolvida na infecção pelo *E. cuniculi* em camundongos. Para tal, camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida (Cy) foram infectados com esporos de *E. cuniculi* e após 7 dias tratados com uma dose CTX. Aos 14 dias de infecção foi realizada a eutanásia dos animais, seguida da análise de citocinas Th1, Th2 e Th17 no plasma, quantificação fenotípica de macrófagos e linfócitos no lavado peritoneal e no baço, análise histopatológica e mensuração da carga fúngica no fígado, e quantificação das expressões de mRNA para o inflamassoma NLRP3 em leucócitos circulantes. Conforme esperado, a Cy reduziu as populações de macrófagos e linfócitos. Contudo, camundongos infectados com *E. cuniculi* e tratados com CTX tinham maior perfil de citocinas inflamatórias Th1 e Th17, ativação do inflamassoma NLRP3 e os linfócitos T CD4 e T CD8 tinham aumento da expressão de IFN- γ associados a redução da carga fúngica. Ao contrário, nos camundongos não tratados com CTX, a infecção resultou em maior perda de peso, aumento apenas de citocinas Th1, baixa expressão do inflamassoma NLRP3 e menor expressão de IFN- γ em os linfócitos T CD4 e T CD8. Concluímos que o tratamento com CTX modulou a resposta imune para um perfil mais pró-inflamatório, com atividade demonstrada do inflamassoma NLRP3 ativado, resultando em maior atividade microbicida contra *E. cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com Cy e infectados.

Palavras-chave: Citocinas. Imunomodulação. Inflamação. Microsporídios. Zoonose.

ABSTRACT

Encephalitozoon cuniculi are atypical, opportunistic, obligate intracellular fungi that infect vertebrate hosts and have extreme ability to manipulate the immune response and survive in the host. Crotoxin (CTX), a bioactive isolated from the venom of the *Crotalus durissus terrificus* snake, demonstrates the ability to modify the immune response. Macrophages challenged with *E. cuniculi* and treated with CTX showed greater microbicidal activity and M1 profile, reversing the predominance of the M2 profile caused by the pathogen. The objective of the present work was to evaluate the effects of CTX on the immune response developed in *E. cuniculi* infection in mice. To this end, mice immunosuppressed with cyclophosphamide (Cy) were infected with *E. cuniculi* spores and after 7 days treated with a CTX dose. At 14 days of infection, the animals were euthanized, followed by analysis of Th1, Th2 and Th17 cytokines in plasma, phenotypic quantification of macrophages and lymphocytes in peritoneal lavage and spleen, histopathological analysis, and measurement of fungal load in the liver, and quantification of mRNA expressions for the inflammasome were performed. NLRP3 in circulating leukocytes. As expected, Cy reduced macrophage and lymphocyte populations. However, mice infected with *E. cuniculi* and treated with CTX had a greater profile of Th1 and Th17 inflammatory cytokines, activation of the NLRP3 inflammasome, CD4 T and CD8 T lymphocytes had increased expression of IFN- γ associated with a reduction in fungal load. On the contrary, in mice not treated with CTX, the infection resulted in greater weight loss, an increase only in Th1 cytokines, low expression of the NLRP3 inflammasome and lower expression of IFN- γ in CD4 T and CD8 T lymphocytes. We conclude that CTX treatment modulated the immune response to a more pro-inflammatory profile, with demonstrated activity of the activated NLRP3 inflammasome, resulting in greater microbicidal activity against *E. cuniculi* in Cy-immunosuppressed and infected mice.

Keywords: Cytokines. Crotoxin. Inflammation. Immunomodulation. Microsporidia. Zoonosis.

INTRODUÇÃO

Encephalitozoon cuniculi, pertencente ao filo Microsporidia, são fungos atípicos, unicelulares, intracelulares obrigatórios e considerados patógenos oportunistas emergentes e causadores da encefalitozoonose (Han, Weiss, 2017). Os microsporídios são ubíquos na natureza e, entre os vertebrados, infectam mamíferos 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). Nos humanos, os microsporídios são frequentes em 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 indivíduos imunocompetentes (Seatamanoch et al., 2022). Contudo, esse grupo de patógenos primitivos são muito eficientes como parasitas intracelulares, utilizando vários mecanismos para melhor interagir com as células hospedeiras, garantindo sua sobrevivência metabólica e evasão da resposta imune (Magalhães et al., 2022).

Camundongos infectados com *E. cuniculi* têm sido utilizados para compreender diferentes aspectos da fisiopatologia da microsporidiose. Como patógenos oportunistas, determinam infecção disseminada e letal em camundongos *Nude* ou *SCID*, porém, tais condições não representam os estados imunossupressores mais observados na rotina clínica (Han et al., 2019). Assim, modelos de imunossupressão farmacológica, com uso de ciclofosfamida (Lallo, Hirshfeld, 2012) ou dexametasona (An et al., 2020), são empregados para mimetizar as condições usuais de maior suscetibilidade à infecção. A ciclofosfamida (Cy) é um fármaco alquilante citotóxico que afeta principalmente proliferação de compartimentos linfócitos, esgotando rapidamente as células B e T. Cy tem sido amplamente utilizada como agente quimioterápico contra certos tumores sólidos e linfomas, reduzindo a massa tumoral, contudo possui emprego amplo em doenças autoimunes, por seu papel imunossupressor (Shirani et al., 2015). Nosso grupo tem utilizado com sucesso a Cy como imunossupressor, aumentando a suscetibilidade de camundongos à infecção por *Encephalitozoon*, sendo observadas reduções expressivas nas populações de células T CD8, T CD4, B-1 e B-2, bem como de macrófagos, em diferentes locais de análise, como peritônio, baço, soro, pulmões e intestinos. Dessa forma, camundongos tratados com Cy constituem um modelo biológico já consolidado para estudos de encefalitozoonose (Lallo, Hirschfeld, 2012; da Costa et al., 2017; Francisco Neto et al., 2017; Langanke dos Santos et al., 2018; De Moura et al., 2019; Figuerêdo Moreira et al., 2022; Moysés et al., 2022). Recentemente, foi demonstrado que camundongos

C57BL/6 imunossuprimidos com Cy e infectados com *E. cuniculi* apresentaram redução nas populações de macrófagos e de linfócitos T CD4, T CD8, B-1 e B-2, porém houve predomínio de macrófagos M1 associado ao aumento sérico de citocinas Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2), Th2 (IL-4), Th17 e maior carga fúngica. Entretanto, foi demonstrado *in vitro*, que *E. cuniculi* foi capaz de alterar o perfil de macrófagos previamente polarizados para M1 para o perfil M2, nos quais o patógeno pode sobreviver e se multiplicar (Dalboni et al., 2021; Camargo Konno et al., 2023). Estudos sugerem que diferentes suscetibilidades às infecções estão fortemente vinculadas às funções do sistema imunológico inato, em parte atribuídas à polarização dos perfis de macrófagos M1 e M2 (Mills et al., 2012). Em conjunto, esses dados ressaltam a importância da imunidade inata, objeto dos nossos estudos com encefalitozoonose.

Os inflamassomas são um conjunto de complexos proteicos intracelulares que permitem a ativação autocatalítica de caspases inflamatórias, como a caspase-1, que modulam as respostas imunes do hospedeiro, liberando citocinas pró-inflamatórias e induzindo piroptose (Zitvogel et al., 2012). Nas infecções, a ativação dos inflamassomas promovem a maturação de citocinas IL-1 β e IL-18, sendo essa última uma indutora da resposta de IFN- γ . Dessa forma, os inflamassomas evitam a replicação bacteriana e viral e eliminam as células infectadas pela piroptose (Kumar et al., 2009; Lamkanfi, Dixit, 2011).

Foi demonstrado que o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.terrificus*) determina uma modulação negativa do sistema imunológico em estudos *in vivo*, com redução na produção de anticorpos anticrotálicos (Cardoso, Mota, 1997). Tal achado tem motivado estudos fisiopatológicos com as frações constitutivas do veneno, dentre as quais se destaca de forma relevante a capacidade imunomoduladora da fração denominada crotoxina - CTX (Sartim et al., 2018). Pesquisas mostraram que a CTX inibiu a proliferação de células esplênicas e a secreção de citocinas *in vitro* (Rangel Santos et al., 2004), a atividade fagocitária e a migração de macrófagos peritoneais residentes (Sampaio *et al.*, 2003; Nunes et al., 2010), o recrutamento de linfócitos e a produção de anticorpos (Zambelli et al., 2008). Adicionalmente, em modelos animais, a administração de uma dose de CTX inibiu o edema, a migração celular e as interações entre os leucócitos e endotélio induzida pela carragenina e pelo BCG, sendo os efeitos atribuídos a ativação de receptores peptídico formil, menor expressão de moléculas de adesão (P-selectina e ICAM-1) e inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (Nunes et al., 2007; Nunes et al., 2010; da Silva et al., 2013). Adicionalmente, macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*, os quais apresentam predominância do perfil M2 mais permissivo ao desenvolvimento do protozoário, apresentaram maior polarização para M1 após o tratamento com CTX (Farias et al., 2017). O aumento da produção de óxido nítrico e citocinas

pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) demonstraram a maior atividade microbicida dos macrófagos, revertendo a ação anti-inflamatória causada pelo protozoário, como mecanismo de escape da imunidade. *In vitro*, o tratamento com CTX de macrófagos peritoneais aderentes desafiados pelo *E. cuniculi* determinou aumento do perfil microbicida M1, com elevada produção das citocinas TNF- α e IL-6, aumento de morte de macrófagos por necrose e redução da capacidade proliferativa dos esporos recuperados de macrófagos (Nascimento, 2023), confirmando a ação microbicida e corroborando os resultados de Farias et al. (2017). Esses resultados sugerem que a CTX poderia potencializar a resposta microbicida contra esses patógenos e contribuir no prognóstico das infecções.

Considerando a possibilidade de a CTX modular macrófagos desafiados com *E. cuniculi* para o perfil M1, padrão menos permissivo ao patógeno (*in vitro*), o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da CTX sobre a resposta imune de camundongos imunossuprimidos com Cy e desafiados com *E. cuniculi*.

MÉTODOS

Camundongos

Os camundongos isogênicos da linhagem Balb/c (n=25), *specific pathogen free (SPF)*, com 8 a 12 semanas de idade, 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 micro isoladores com capacidade para cinco animais, em cada gaiola, com controle de luminosidade em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 22 a 24°C, umidade relativa do ar de 45 a 55% e ventilação. Os animais receberam *ad libitum* ração peletizada irradiada e água esterilizada por autoclavagem. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (protocolo número 1528190220).

Cultura de *E. cuniculi*

Os esporos de *E. cuniculi* foram cultivados em células RK-13 (*Rabbit Kidney-13*, ATCC CCL 34) mantidas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e gentamicina (20 mg/mL), incubadas à 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, Laboratório de Cultura Celular da Universidade Paulista. A cada 7 dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 30 minutos a 500 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. Para contagem dos esporos *E. cuniculi* foi utilizada a câmara de Neubauer (Hornitzky, 2008).

Tratamento com ciclofosfamida (Cy) e com crotoxina (CTX)

Vinte camundongos receberam 200 mg/kg de Cy por via intraperitoneal (Genuxal®, Asta Médica Oncologia, São Paulo, Brasil), sendo duas doses administradas antes da inoculação do patógeno (7 e 3 dias antes) e mais duas doses após a infecção (4 e 11 dias). No total foram 4 doses por todo o período experimental (Lallo, Hirschfeld, 2012).

A CTX foi gentilmente 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 desta, foram separadas em alíquotas para cada experimento, sendo mantidas a -20°C e descongeladas apenas no momento do uso. A dose de 44 µg/kg de peso foi utilizada, sendo

observada ausência de sinais clínicos típicos de envenenamento, de acordo com estudos anteriores (Sampaio et al., 2003; Zambelli et al., 2008). A CTX foi aplicada em dose única, via subcutânea na região dorsal, simultaneamente com a inoculação de *E. cuniculi*.

Delineamento experimental

Os camundongos foram distribuídos em 5 grupos: (a) Controle (n=5) – camundongos sem tratamento, imunossupressão e infecção; (b) Cy (n=5) – camundongos imunossuprimidos com Cy; (c) Cy-CTX (n=5) – camundongos imunossuprimidos com Cy e tratados com CTX; (d) Cy-Infectado: camundongos imunossuprimidos e infectados com *E. cuniculi*, (e) Cy-Infectado-CTX (n=5) – camundongos imunossuprimidos com Cy, inoculados com *E. cuniculi* e tratados com CTX (Fig. 1). O tratamento imunossupressor foi realizado com 4 doses de Cy, sendo duas aplicadas antes da infecção experimental, no 7º e no 3º dia antes da inoculação, e duas após a infecção, no dia 4 pós-infecção e 11º dia pós-infecção (DPI). O dia 0 (zero) foi considerado o dia da inoculação intraperitoneal de 1×10^7 esporos de *E. cuniculi* por animal, nos grupos infectados. Nesse mesmo dia, foi realizado o tratamento com CTX por via subcutânea, com uma única dose de 44 µg/kg de peso. Ao completar 14 dias de infecção, os camundongos individualmente foram pesados, e depois realizada a eutanásia pelo aprofundamento anestésico com solução contendo quetamina, xilazina e acepromazina. Com a evidência da parada cardiorrespiratória, foram realizados os seguintes procedimentos experimentais: - coleta de sangue total em EDTA para separação do plasma destinada à dosagem de citocinas Th1, Th2 e Th17, e os leucócitos foram utilizados para analisar as expressões de Nlpr3, IL-1, ASc e Casp; - lavado peritoneal e coleta do baço para separação e identificação fenotípica de células inflamatórias por citometria de fluxo; - análise histopatológica de fragmentos do fígado, - mensuração da carga fúngica no fígado pela qPCR. Todos os procedimentos serão detalhados abaixo.

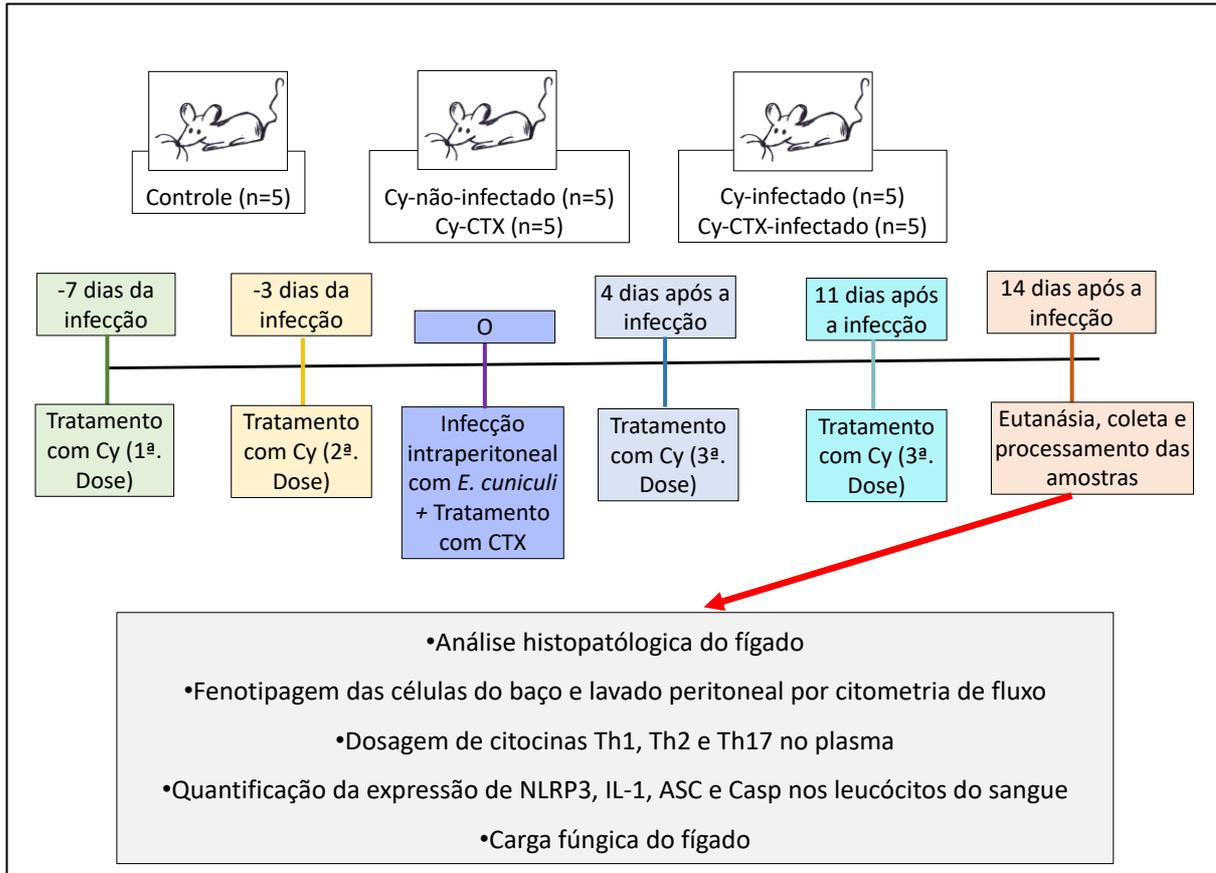


Figura 1. Delineamento experimental. Camundongos Balb/c foram tratados ou não com ciclofosfamida (Cy) ou crotoxina (CTX) e infectados ou não com esporos de *Encephalitozoon cuniculi* sendo distribuídos nos grupos: Controle – sem tratamento ou infecção, Cy-não-infectado (n=5) – camundongos imunossuprimidos com Cy e não-infectados com o patógeno; Cy-CTX (n=5) – camundongos imunossuprimidos com Cy e tratados com CTX; Cy-Infectado: camundongos imunossuprimidos com Cy e infectados com *E. cuniculi*, Cy-Infectado-CTX (n=5) – camundongos imunossuprimidos com Cy, infectados com *E. cuniculi* e tratados com CTX. Os animais receberam 4 doses de Cy, duas antes e duas após a infecção. Após 14 dias de infecção, foram coletadas amostras: sangue total para separar plasma para verificação dos níveis de Th1, Th2 e Th17 e nos leucócitos circulantes análise das expressões de Nlpr3, IL-1, ASc e Casp. Lavado peritoneal e baço para fenotipagem de células imunes. Fígado para análise histopatológica e mensuração da carga fúngica.

Necropsia e coleta de amostras

Aos 14 DPI, a eutanásia foi realizada pelo aprofundamento anestésico com solução de quetamina (100 mg/Kg), xilazina (2,5 mg/Kg) e acepromazina (2,5 mg/Kg) administrada por via intraperitoneal. O sangue, coletado por punção cardíaca, colocado em frasco de hemograma

com EDTA, centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm para separação do plasma, que foi congelado a -80°C e usado para mensuração das citocinas.

Então o sedimento celular foi tratado com tampão hemolítico, por duas ou 3 vezes, para a completa eliminação das hemácias. Após essas etapas foi lavado com tampão MACS, elaborado com PBS acrescido de 1% de BSA e 0,75% de EDTA. Os leucócitos totais foram armazenados a -80°C até os procedimentos de extração de RNA.

Depois da divulsão da pele da região abdominal, procedeu-se o lavado peritoneal com introdução de 10 mL de tampão Macs, em seguida foi centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm e o sedimento foi distribuído em placa com 96 poços e fundo em V e utilizados para fenotipagem. As células do baço foram mecanicamente dissociadas em *cell strainer* de 70 µm, com auxílio de um êmbolo de seringa de 5 mL. Para eliminação das hemácias, as células esplênicas foram tratadas com tampão hemolítico por duas vezes e, ao final, o sedimento contendo leucócitos foi distribuído em placa com 96 poços e fundo em V e utilizados para fenotipagem.

O fígado foi coletado e seu peso total foi mensurado. Um lobo constante foi separado, pesado e congelado a -80°C até o dia da extração de DNA. O restante do fígado foi fixado em formol tamponado a 10% por 72h e processado para análise histopatológica.

Análise histopatológica

Fragmentos do fígado foram processados rotineiramente para análise histopatológica, incluídos em parafina. Cortes histológicos de 5 µm foram dispostos em lâminas de vidro e corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina (HE) e examinados à microscopia de luz (Leica DMLD, Greenville, SC, USA).

Fenotipagem dos componentes imunológicos

As amostras celulares do lavado peritoneal e baço foram obtidas conforme já descrito. Os *pellets* celulares foram incubados por 20 minutos em banho de gelo com anticorpo anti-CD16/CD32 para o bloqueio dos receptores Fc. Posteriormente, as células foram lavadas em tampão MACS e separadas em quatro partes iguais para a marcação com diferentes painéis de anticorpos, conforme descrito a seguir: **PAINEL 1** para caracterização das subpopulações de linfócitos B, composto por anti-CD23 de camundongo conjugado a *Fluorescein Isothiocyanate* – FITC (BD Biosciences), anti-CD19 de camundongo conjugado a *Peridinin Chlorophyll Protein Complex* – PerCP (BD Biosciences), anti-CD11b de camundongo conjugado à *Allophycocyanin* – APC (BD Biosciences) e anti-CD5 de camundongo conjugado a

Phycoerithrin – PE (BD Biosciences); **PAINEL 2** para caracterização de macrófagos e perfil M1 e M2, composto pelos anticorpos anti-CD11b de camundongo conjugado a FITC (BD Biosciences), anti- F4/80 de camundongo conjugado à PE (Ebioscience), anti-CD40 de camundongo conjugado à *Phycoerithrin* with cyanin dye 5 – PE-Cy5 (BD Biosciences) e anti-CD206 de camundongo conjugado à Alexa fluor 647 (Ebioscience); **PAINEL 3** para caracterização da ativação de macrófagos, composto pelos anticorpos anti-CD11b de camundongo conjugado a *Peridinin Chlorophyll Protein Complex with cyanin dye 5* – PerCP-Cy5 (BD Biosciences), anti- F4/80 de camundongo conjugado à PE (Ebioscience), anti-CD80 e anti-CD86 de camundongo conjugado a FITC (Ebioscience); **PAINEL 4** para caracterização de linfócitos T, composto pelos anticorpos anti CD4 de camundongo conjugado a PerCP-Cy5 (BD Biosciences) e anti-CD8 de camundongo conjugado a FITC (BD Biosciences). Após a incubação, as células foram lavadas com tampão MACS, o sobrenadante descartado e as células dos painéis 1 e 2 foram fixadas em solução tamponada de paraformaldeído (PFA) 1% para leitura posterior. Para remover o PFA, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 5 minutos com 1500 rpm, e ressuspendidas em PBS (200 µL) para realização da leitura em citômetro de Fluxo BD Accuri™ C6 (BD Pharmigem). As células processadas para os painéis 3 e 4 foram submetidas a fixação e permeabilização para marcação intracelular com os anticorpos anti-IL-12 (p40/p70) de camundongo conjugado a APC (BD Biosciences), respectivamente e anti-IFN γ de camundongo conjugado a APC (Ebioscience). Brevemente, o pellet celular foi fixado com solução Fixation/Permeabilization contida no BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization kit (BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C, lavado com solução Perm/Wash do mesmo kit e incubadas por 30 minutos a 4°C, no escuro, em solução Perm/Walsh contendo os anticorpos anti-citocinas. As amostras foram lavadas em solução Perm/Wash e ressuspendidas em 200uL de PBS para leitura no citômetro de Fluxo BD Accuri™ C6 (BD Pharmigem).

Fenotipicamente as células foram assim caracterizadas: linfócitos B-1 totais (CD19⁺CD23⁻), linfócitos B-1a (CD19⁺CD23⁻CD5⁺), linfócitos B-1b (CD19⁺CD23⁻CD5⁻), linfócitos B-2 (CD19⁺CD23⁺), macrófagos totais (F4/80⁺CD11b⁺), linfócitos T CD4 (CD4⁺), linfócitos T CD8 (CD8⁺). As moléculas de ativação de macrófagos, as que caracterizam o perfil M1 e M2 em macrófagos e a expressão das citocinas foram avaliadas pela mediana da intensidade de fluorescência expressa na população de interesse. Todos os dados foram avaliados no software FlowJo V10.0 (BD Biosciences).

Quantificação das citocinas

O plasma sanguíneo foi descongelado e preparado de acordo com as normas técnicas determinadas pelo fabricante do kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) para detecção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ . Brevemente, 20 μ L de cada amostra foram incubados juntamente com 20 μ L das *beads* de captura, específicas para cada citocina, conjugadas a APC e com 20 μ L do anticorpo secundário conjugado a PE, por duas horas em temperatura ambiente protegidas por luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas com *wash buffer*, centrifugadas e ressuspensas no mesmo tampão para análise de 2 cores por citômetro de fluxo BD AccuriTMC6 (BD Biosciences, Mountain View, CA). As análises foram realizadas usando o software de análise FCAP *Array software* versão 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), os dados foram plotados em Excel, os limites de detecção respeitados, conforme indicação do fabricante e posteriormente representados em gráficos.

Extração de RNA total de leucócitos

Após o descongelamento dos leucócitos, o RNA total foi isolado das amostras utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das amostras em 250 μ L do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), seguido pela centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos devidamente identificados, em seguida, o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após a incubação por 10 minutos a temperatura ambiente as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria após sua ressuspensão em 20 μ L de água DEPC, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience) e armazenados a - 80°C.

Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da reação de transcrição reversa de 2000 ng de RNA total na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 μ L contendo

500 μ M de dNTP, 25 μ g/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 μ M de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a 50°C com posterior inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído para concentração final de 100 ng/ μ l e armazenado a -20°C.

Quantificação da expressão gênica do inflamassoma NRLP3 por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR)

Para o estudo do padrão de expressão gênica as reações foram realizadas com iniciadores específicos (Tabela 1) e tiveram como controle endógeno o gene *Rnu6*. Todas as reações tiveram volume final de 10 μ L; contendo 5 μ L de SYBR Green I Master, 0,4 μ M de iniciadores específicos, 1 μ L do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$. Neste método, a média do Ct do gene alvo foi subtraída pela média do Ct do gene controle, resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à expressão gênica do gene utilizado como normalizador. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais independentes realizados em duplicata técnica normalizados em relação ao grupo controle (atribuído valor 1).

Tabela 1. Condições de ciclagem e sequência dos iniciadores utilizados para estudo da expressão gênica.

Gene (ID)	Primer	Sequência 5'- 3'	Condições da reação	Tamanho do produto (pb)
Nrlp3 (11461)	Forward	ATT ACC CGC CCG AGA AAG G	95°C -15s; 58°C - 30s; 72°C - 30s	141
	Reverse	TCG CAG CAA AGA TCC ACA CAG		
Asc1 (14433)	Forward	AGA CAT GGG CTT ACA GGA	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	256
	Reverse	CTC CCT CAT CTT GTC TTG G		
Caspase 1 (14433)	Forward	TGA AAG AGG TGA AAG AAT T	95°C -15s; 59°C - 30s; 72°C - 30s	386
	Reverse	TCT CCA AGA CAC ATT ATC T		
Il 1 β (16176)	Forward	GAC CTT GGA TGA GGA CA	95°C -15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	183
	Reverse	AGC TCA TAT GGG TCC GAC AG		
Rnu6 (19862)	Forward	CTC GCT TCG GC AGC ACA	95°C - 15s; 60°C - 30s; 72°C - 30s	94
	Reverse	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT		

ID = número de identificação do gene, pb = pares de base.

Carga fúngica

A carga fúngica foi determinada pela quantificação baseada em PCR em tempo real (qPCR) do DNA genômico fúngico presente no tecido hepático. Após a eutanásia, o fígado foi pesado e uma quantidade constante de lobo hepático foi posteriormente congelada em *RNAlater*. O kit de extração DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®) foi utilizado conforme instruções do fabricante e protocolo descrito por Moretto et al. (2015). As reações em cadeia da polimerase quantitativa (qPCRs) foram realizadas utilizando o QuantStudio™ 5 System Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os sistemas Syber Green (Promega Corporation®, EUA). A amplificação foi realizada em um volume total de 25 µL/reação contendo 12,5 µL do kit GoTaq® qPCR Master MixT® (Promega Corporation®, EUA) juntamente com 5 µL do DNA modelo e respectivos primers (20pmol). Os controles de qualidade incluíram amostras de DNA positivas obtidas de suspensões purificadas e controles não-modelo (NTC).

Fragmentos de DNA sintético (gBlock® Gene Fragment, IDT, Iowa, EUA) foram utilizados para estabelecer curvas padrão. A região alvo de 326 pb foi extraída do gene 18S rRNA da cepa de referência Donovan *E. cuniculi* (NCBI: txid X98470.1). Diluições seriadas de dez vezes de gBlock® foram utilizadas para construir as curvas padrão, atingindo de $2,8 \times 10^8$ a $2,8 \times 10^2$ cópias do gene por µL (GC/µL) em cada ciclo de amplificação (Cq) para o gene 18S rRNA de *E. cuniculi*. A curva padrão foi gerada utilizando regressão linear da relação entre o valor do ciclo de quantificação e o número de cópias. Após a amplificação, os valores quantificados em número de cópias (GC/µL) foram então convertidos em número de esporos/mg, considerando o número de cópias genômicas determinados em 22 cópias para o 18S rRNA (Katinka et al., 2001).

Análise Estatística

As comparações estatísticas foram feitas por análise de variância (ANOVA) e pelos pós teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média \pm erro padrão com significância para valores menores que $P < 0,05$.

RESULTADOS

Tratamento com CTX reduziu a carga fúngica

No grupo de camundongos tratados com Cy houve redução do peso corporal dos animais em cerca de 10% em comparação ao grupo controle, sendo atribuída ao efeito sistêmico do fármaco (Fig. 2). Ao introduzir o tratamento com CTX, observou-se uma perda de peso maior, em média 14%. Contudo, a maior redução do peso corporal foi atribuída à infecção pelo *E. cuniculi* de camundongos tratados com Cy (grupo Cy+infectado), que foi em média de 21% (Fig. 2). No grupo de camundongos tratados com Cy e CTX infectados com o fungo, notou-se discreta balanço positivo no peso corporal, com perda de peso média em torno de 14%, sugerindo que a CTX influenciou na menor de perda de peso, apesar da infecção pelo *E. cuniculi* e da imunossupressão com Cy (Fig. 2)

A análise histopatológica mostrou infiltrado inflamatório leucocitário no parênquima ou junto à veia porta de animais tratados com Cy e/ou CTX, com predomínio de neutrófilos (Fig. 3A, 3B). Nos grupos infectados com *E. cuniculi*, Cy-infectado e Cy-CTX-infectado, os infiltrados inflamatórios constituídos majoritariamente por células mononucleares, eram mais frequentes e maiores, localizados no parênquima hepático e junto à veia porta (Fig. 3C, 3D), evidenciando que a infecção determinou a exacerbação da resposta inflamatória. A partir do tecido hepático dos 2 grupos infectados, Cy-infectado e Cy-CTX-infectado, foi realizada a extração do DNA fúngico para a mensuração da carga do patógeno, sendo observada maior carga fúngica no grupo Cy-infectado, indicando redução da carga fúngica frente ao tratamento com CTX (Fig. 3E).

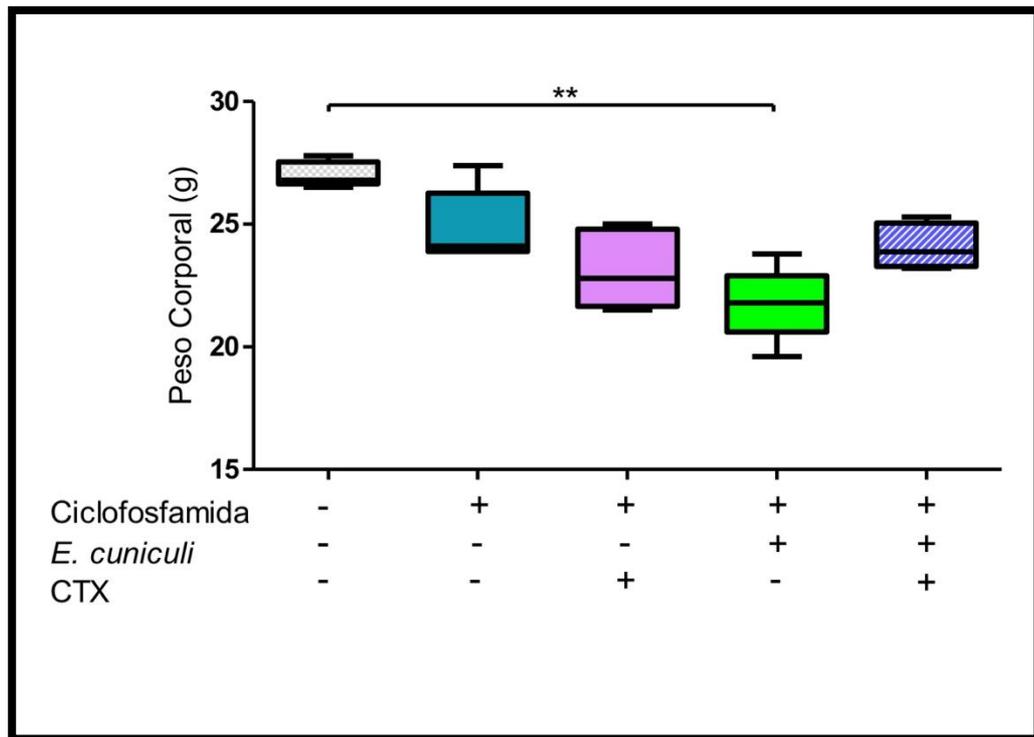


Figura 2. Análise das médias dos pesos corporais (em gramas) dos animais dos distintos grupos tratados (+) ou não (-) com ciclofosfamida (Cy) e/ou crotoxina (CTX) e infectados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,01^{**}$.

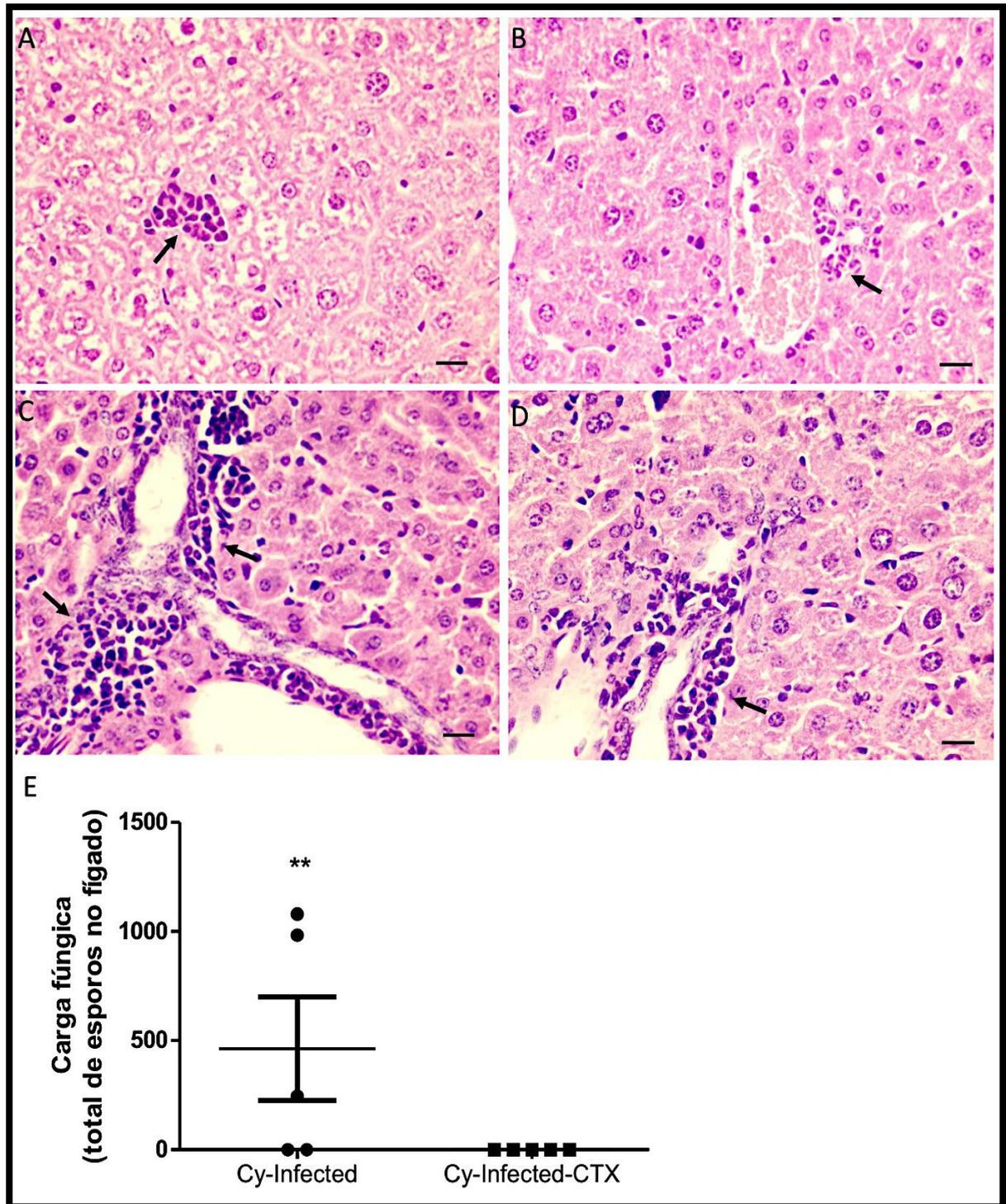


Figura 3. Lesões histopatológicas em tecido hepático associadas aos tratamentos, com ciclofosfamida (Cy) e crotoxina (CTX) e à infecção pelo *E. cuniculi* e análise comparativa da carga fúngica do fígado. A) Fotomicrografias do parênquima hepático de camundongos tratados com Cy e não infectado, presença de discreto infiltrado inflamatório leucocitário (seta). B) Fotomicrografias do parênquima hepático de camundongos tratados com Cy e CTX e não infectado, notar a presença (seta) de discreto infiltrado neutrofílico periportal. C) Fotomicrografias do parênquima hepático de camundongo tratado com Cy e infectado com *E. cuniculi* apresentando intenso infiltrado leucocitário portal (seta). D)

Fotomicrografias do parênquima hepático de camundongo tratado com Cy e CTX e infectado com *E. cuniculi* apresentando infiltrado leucocitário (seta) portal. E) Comparação entre a carga fúngica obtida pela qPCR dos grupos Cy-Infected (camundongo tratado com Cy e infectado com *E. cuniculi*) versus Cy-CTX-Infected (camundongo tratado com Cy e CTX e infectado com *E. cuniculi*) (Coloração HE).

Infecção pelo *E. cuniculi* e tratamento com CTX e/ou Cy aumentaram a polarização de macrófagos peritoneais para o perfil M2

A análise fenotípica dos macrófagos peritoneais demonstrou menor percentual dessa população nos animais Cy-infectados pelo *E. cuniculi* em relação aos demais grupos (Fig. 4A), esse mesmo achado foi observado em relação ao número absoluto, um dos menores entre os demais grupos que receberam um dos tratamentos (Fig. 4B). O número absoluto de macrófagos estava aumentado nos grupos Cy-não-infectado e Cy-CTX-não-infectado em comparação ao grupo controle (Fig. 4B). No Cy-CTX-infectado, uma tendência de aumento da população de macrófagos foi observada (Fig. 4B).

Adicionalmente, nos macrófagos peritoneais foi demonstrada redução da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de CD40 (Fig. 4C) e aumento de MFI para CD206 (Fig. 4D) nos grupos Cy-infectado e Cy-CTX-infectado, indicando que a população de macrófagos peritoneais apresentava mais o perfil polarizado para M2 (CD11b⁺/F4-80⁺CD206^{high}). Para complementar, a razão da MFI CD40/CD206 confirmou esse perfil, evidenciando redução da população M1 (CD40) em relação a população M2 (CD206), de forma semelhante aos grupos Cy-não-infectados e Cy-CTX-não-infectado (Fig. 4E). Corroborando esses resultados, macrófagos peritoneais dos animais Cy-CTX-infectados tinham menor MFI de CD80 e CD86 (Fig. 4F) e menor expressão de IL-12 (Fig. 4G, 4H). Esses resultados indicam predomínio do perfil M2 para os macrófagos peritoneais de camundongos infectados, demonstrando a capacidade do patógeno em modular a atividade de macrófagos *in vivo* e, ao contrário do que foi observado *in vitro*, no momento observado, aos 14 dias de infecção, a CTX potencializou o perfil anti-inflamatório de macrófagos.

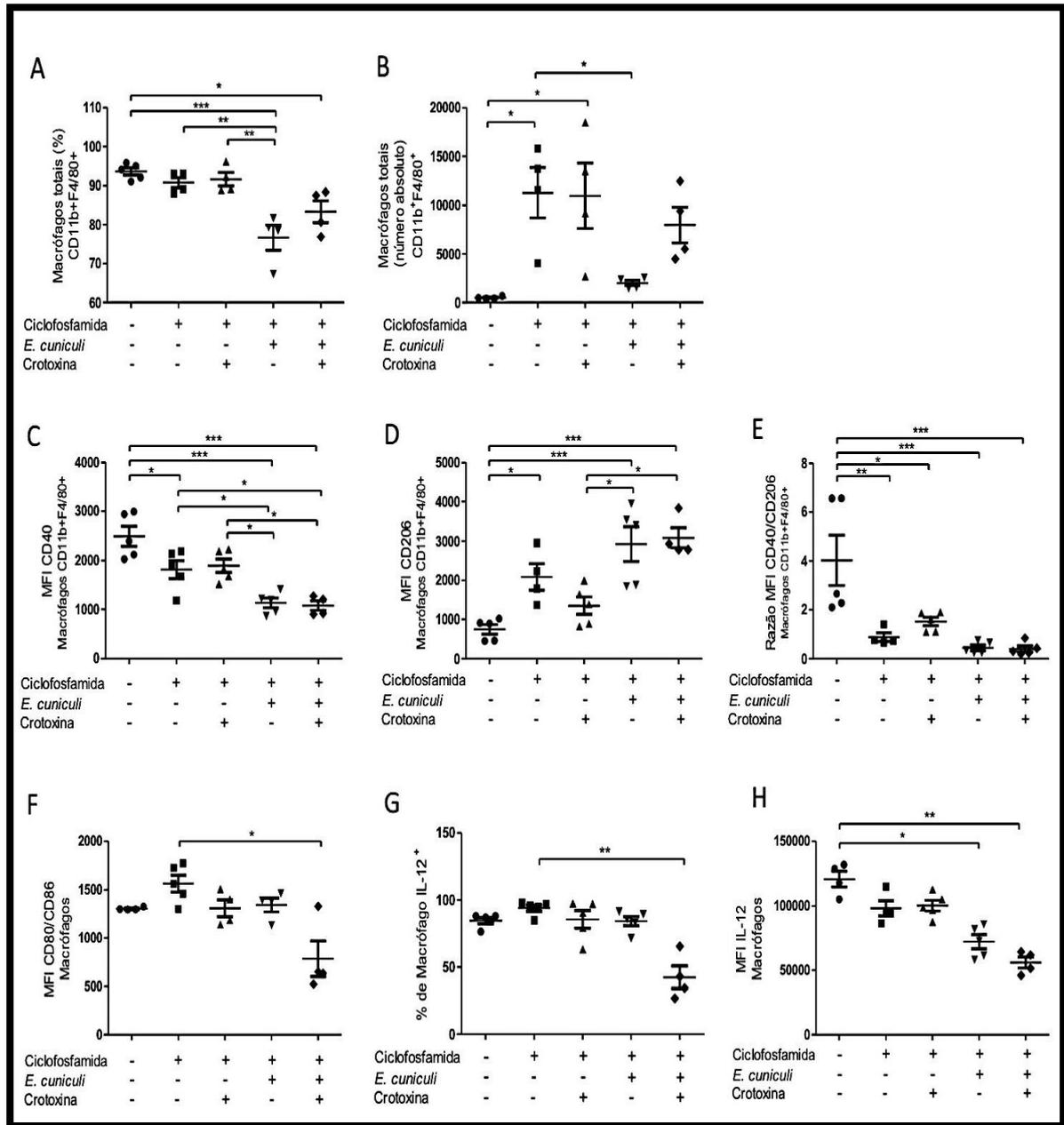


Figura 4. Avaliação da população de macrófagos presentes no lavado peritoneal de camundongos tratados (+) ou não (-) com ciclofosfamida e com crotoxina e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) Percentual (%) de macrófagos totais CD11b⁺F4/80⁺. B) Número absoluto de macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. C) Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de CD40 em macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. D) MFI de CD206 em macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. E) Razão entre MFI CD40/CD206 dos macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. F) MFI de CD80 e CD86 em macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. G) % de macrófagos CD11b⁺F4/80⁺ positivos para IL-12A. H) MFI de IL-12A em macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferença estatística, p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***.

No baço não houve diferença no percentual da população dos macrófagos nos grupos estudados (Fig. 5A), no entanto, a MFI do CD80/CD86 foi menor no grupo Cy-CTX-infetado (Fig. 5B), quando comparado ao Cy-não-infetado e ainda, no grupo (Cy-CTX-infetado), a MFI de IL12-A estava reduzida (Fig. 5C), o que remete a diminuição da resposta inflamatória nessa população, corroborando o perfil visto no peritônio.

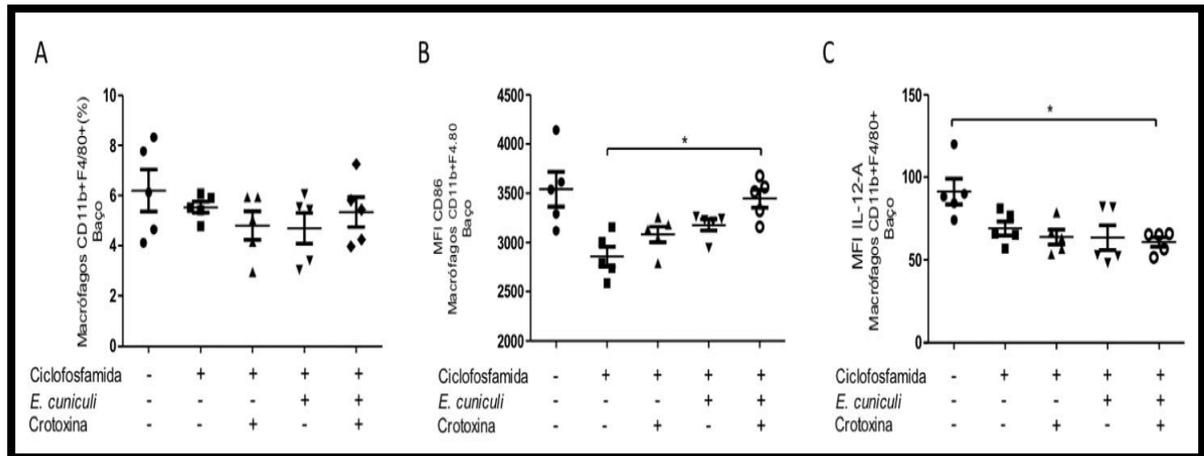


Figura 5. Avaliação dos macrófagos do baço de camundongos tratados (+) ou não (-) com ciclofosfamida e com crotoxina e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) Percentual (%) de macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. B) Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de CD80 e CD86 em macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. C) MFI de IL-12A em macrófagos CD11b⁺F4/80⁺. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferença estatística, $p < 0,05^*$.

Cy reduziu as populações de células B com excepcional predomínio da população de B-1b nos grupos infectados

A imunossupressão com Cy reduziu a população de células B-1 e B-2 tanto no peritônio quanto no baço (Fig. 6A, 6B, 6C e 6D), em adição, a infecção pelo *E. cuniculi* também reduziu a população de células B-2 do peritônio (Fig. 6C). Dentre as subpopulações de células B-1, nos grupos não infectados, as células B-1a predominaram (Fig. 6E). Contudo, nos grupos infectados (Cy-infetado e Cy-CTX-infetado) houve predomínio de B-1b, com população variando de 60 a 95% das células B-1 (Fig. 6F).

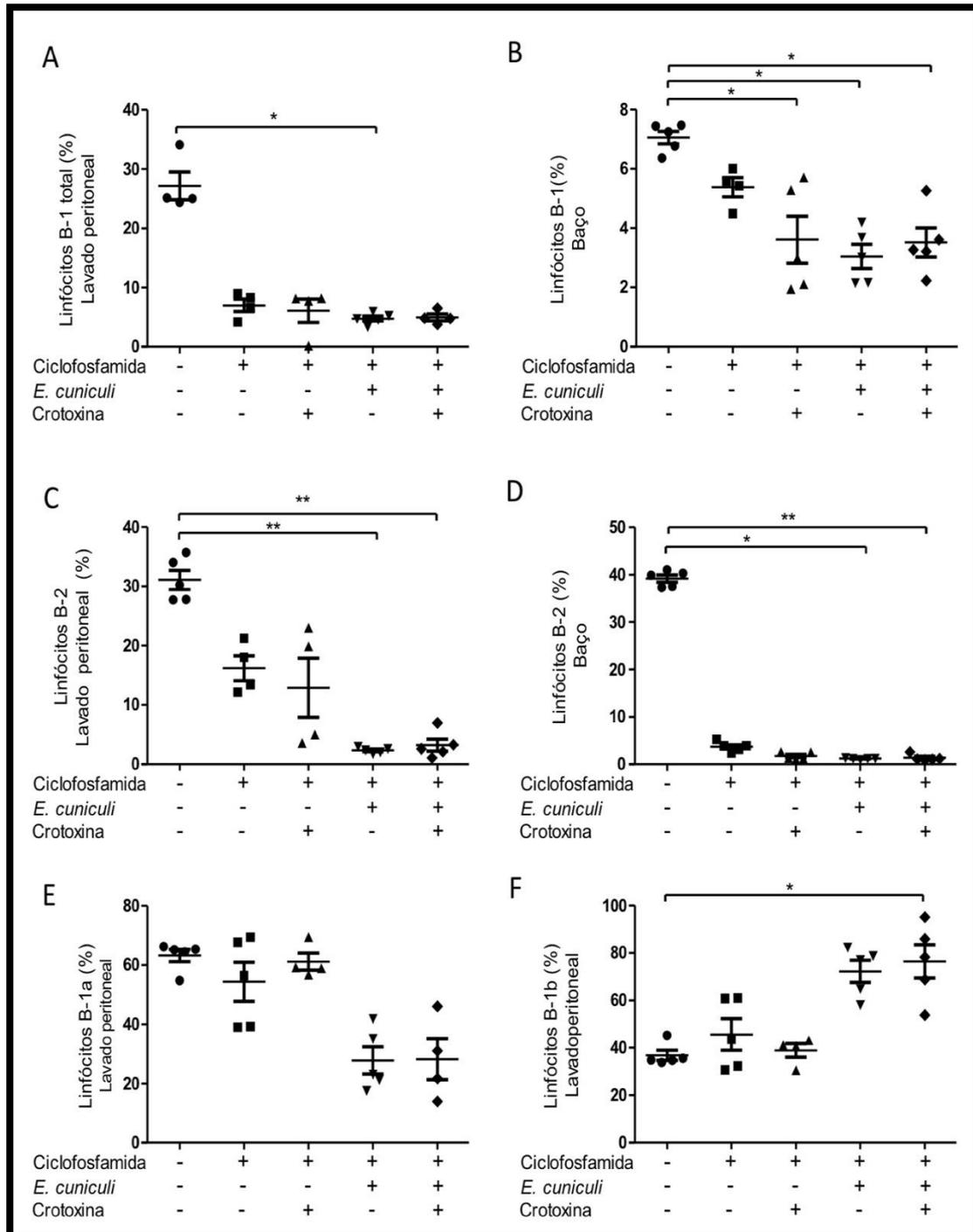


Figura 6. Avaliação das células B presentes no lavado peritoneal e no baço dos camundongos tratados (+) ou não (-) com ciclofosfamida e com crotoxina e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) Percentual (%) de linfócitos B-1 CD19⁺CD23⁻ do lavado peritoneal. B) Percentual (%) de células B-1 CD19⁺CD23⁻ do baço. C) Percentual (%) de células B-2 CD19⁺CD23⁺ do lavado peritoneal. D) Percentual (%) de células B-2 CD19⁺CD23⁺ do baço. E) Percentual (%) de linfócitos B-1a CD19⁺CD23⁻CD5⁺ do lavado peritoneal. F) Percentual (%) de linfócitos B-1b CD19⁺CD23⁻CD5⁺ do lavado peritoneal. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$.

Aumento da expressão MFI de IFN- γ em linfócitos T

Foi demonstrada redução no percentual de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ quantificados no lavado peritoneal e no baço dos animais dos grupos Cy, Cy-CTX, Cy-infectado e Cy-infectado-CTX em comparação com o grupo controle, demonstrando que a Cy foi a responsável pela supressão das células T (Fig. 7). Contudo, identificou-se maior MFI para IFN- γ nos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ nos grupos infectados com *E. cuniculi* (Cy-infectado e Cy-CTX-infectado), sendo maior ativação dos linfócitos provocada pela infecção (Fig.7 B, D, F, H). Embora sem diferenças estatísticas, existe uma tendência de maior MFI para IFN- γ nos grupos Cy e Cy-CTX, fato que aponta para um estado mais ativado para esses linfócitos T CD4 e CD8 (Fig 7 B, D, F, H).

CTX intensificou o perfil inflamatório Th1 e Th17 e a ativação do inflamassoma NLRP3 dos camundongos infectados

As citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-6 estavam aumentadas no plasma dos grupos Cy-infectado e Cy-CTX-infectado, o que pode ser associado à resposta inflamatória consequente à infecção pelo *E. cuniculi* (Fig. 8). Vale destacar que o aumento de IFN- γ nos animais do grupo Cy-CTX-infectado foi cerca de 10 x superior aos animais Cy-infectado (Fig. 8A). Em adição, as citocinas IL-2, IL-6 e IL-17 também demonstraram aumento no grupo Cy-CTX-infectado, revelando padrão mais inflamado desse grupo quando comparado aos demais grupos (Fig. 8B, 8C, 8D). A citocina anti-inflamatória IL-4 aumentou apenas no grupo Cy-CTX (Fig. 8E), enquanto IL-17 estava aumentada apenas no grupo Cy-CTX-infectado (Fig. 8F).

Foi analisada a expressão relativa dos genes relacionados ao inflamassoma complexo NLRP3 em leucócitos coletados do sangue periférico, sendo constatado expressão aumentada de mRNA para NLRP3 para todos os grupos tratados com Cy e/ou CTX e infectados ou não com *E. cuniculi* (Fig. 9), contudo, somente o grupo Cy-CTX-infectado apresentou maior expressão relativa de genes que codificam a caspase-1 e IL-1 β , identificando a expressão do complexo como um todo.

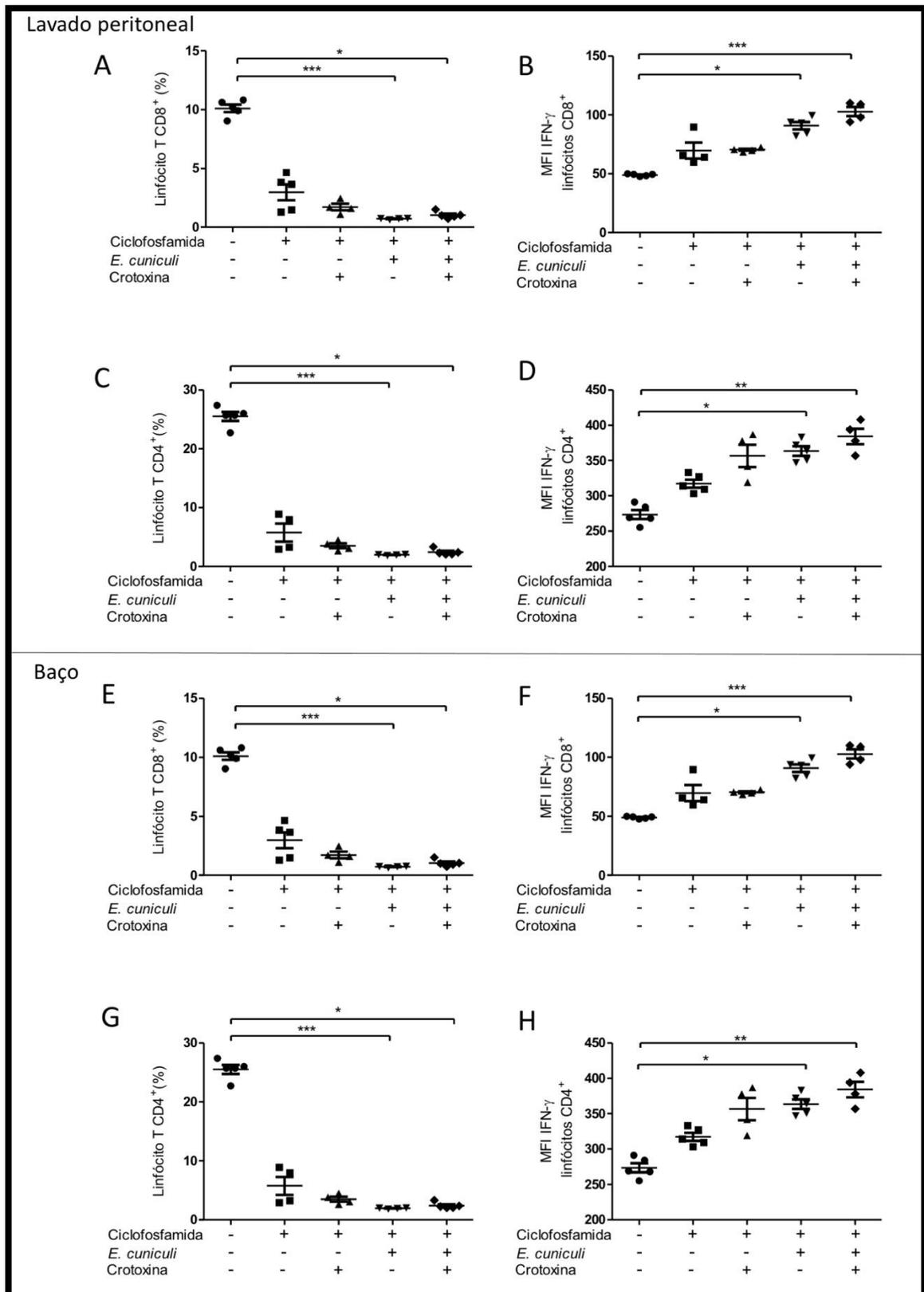


Figura 7. Avaliação dos linfócitos T presentes no lavado peritoneal e no baço dos camundongos tratados (+) ou não (-) com ciclofosfamida e com crotoxina e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) percentual de Linfócito T CD8⁺ do lavado peritoneal. B) Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de IFN- γ em linfócito T CD8⁺ do lavado peritoneal. C) Linfócito T CD4⁺ do lavado peritoneal.

D) MFI de IFN- γ em linfócito T CD4⁺ do lavado peritoneal. E) Percentual (%) de Linfócito T CD8⁺ do baço. F) MFI de IFN- γ em linfócito T CD8⁺ do baço. G) % Linfócito T CD4⁺ do baço. H) MFI de IFN- γ em linfócito T CD4⁺ do baço. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$

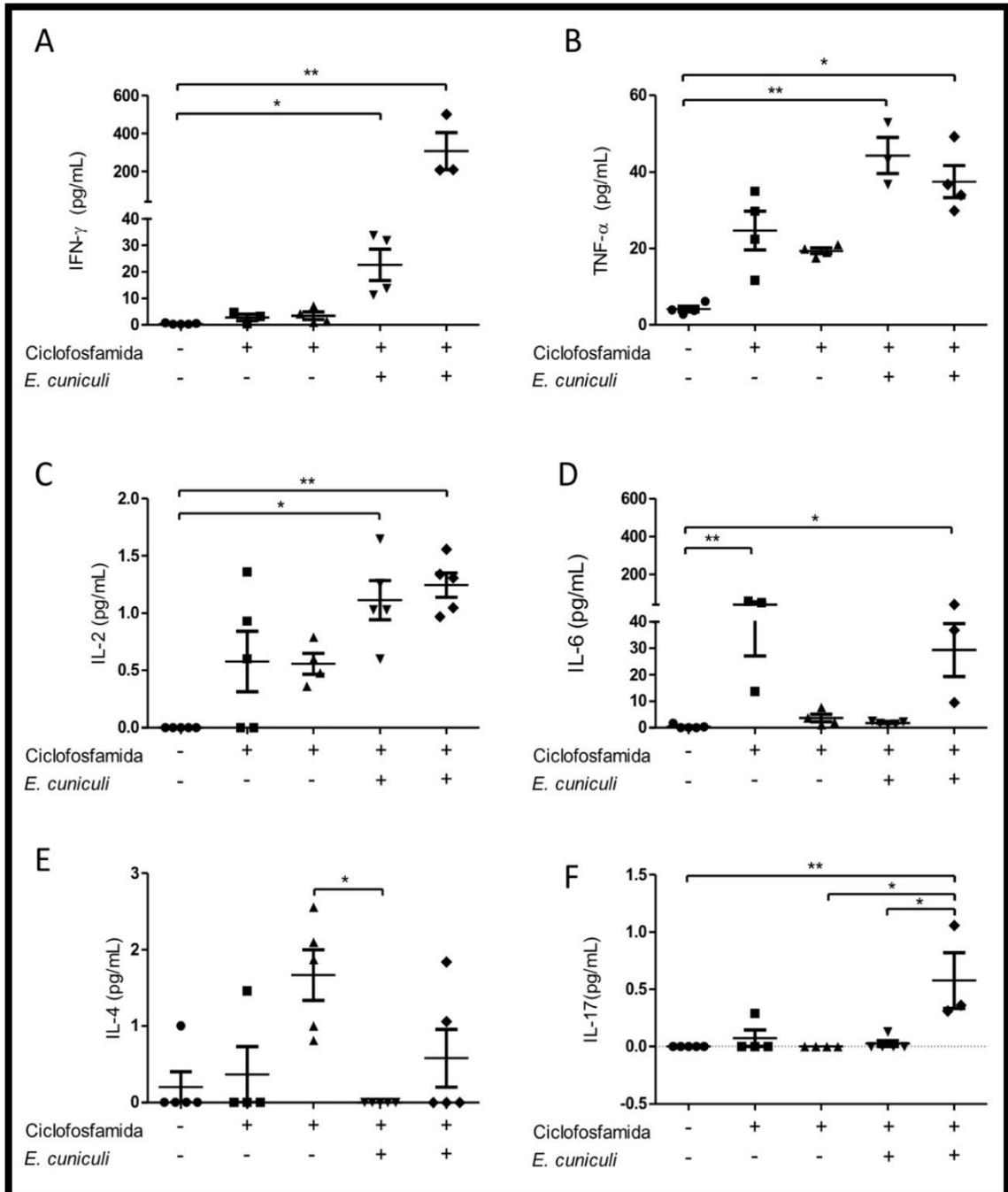


Figura 8. Mensuração de citocinas Th1, Th2 e Th17 (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-17) no plasma de camundongos tratados (+) ou não (-) com ciclofosfamida e/ou crotoxina e infectados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatísticas, $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$.

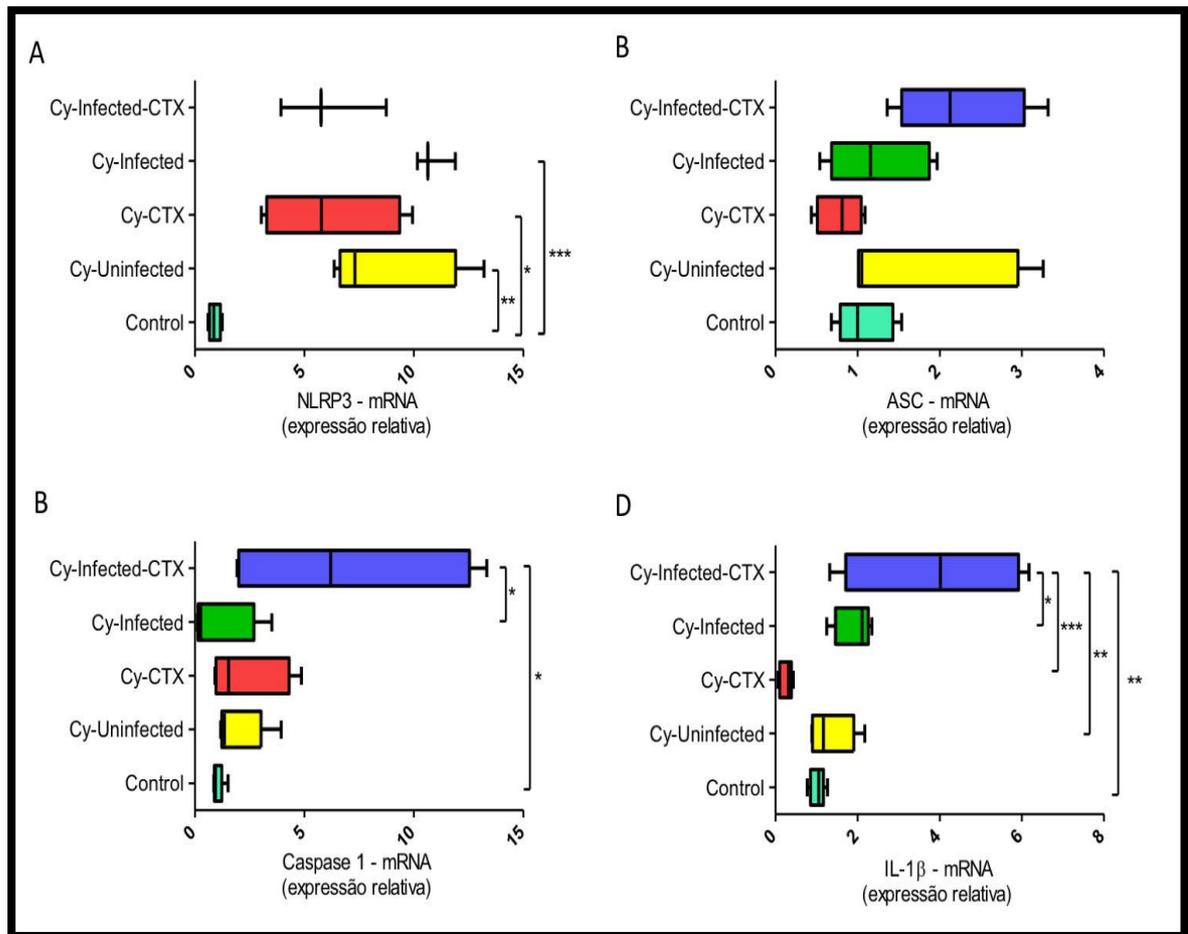


Figura 9. Expressão de RNA mensageiro (mRNA) para NLRP3, ASC, Caspase 1 e IL-1 β em leucócitos coletados do sangue periférico de camundongos submetidos a diferentes tratamentos: Control – camundongos não tratados e não infectados; Cy-Uninfected; - camundongos tratados somente com Cy e não infectados; Cy-CTX - camundongos tratados com Cy + CTX e não infectados; Cy-Infected - camundongos tratados com Cy e infectados com *E. cuniculi*; Cy-Infected-CTX - camundongos tratados com Cy + CTX e infectados com *E. cuniculi*. A) Expressão relativa de mRNA para NLRP3 em leucócitos circulantes. B) Expressão relativa de mRNA para ASC em leucócitos circulantes. C) Expressão relativa de mRNA para Caspase 1 em leucócitos circulantes. D) Expressão relativa de mRNA para IL-1 β em leucócitos circulantes. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que o tratamento com CTX de camundongos infectados pelo *E. cuniculi* acentuou o perfil pró-inflamatório, com aumento plasmático de citocinas Th1 e Th17 associado a maior expressão do inflamassoma NLRP3 e redução da carga fúngica, resultados que corroboram o incremento da atividade microbicida para esse grupo. Apesar de serem observadas reduções das populações de macrófagos, células B e linfócitos T nesse grupo, os linfócitos T CD4 e T CD8 tinham maior expressão de IFN- γ , fato que reflete seu estado de ativação em resposta ao patógeno, mediada pela CTX. Por sua vez, o grupo Cy-infectado apresentou aumento das citocinas Th1, porém em concentrações menores e sem ativação do complexo inflamassoma NLRP3, o que aconteceu no grupo tratado com a CTX, fato que ressalta a participação do inflamassoma nos mecanismos imunitários contra *E. cuniculi*, mediados por essa ativo biológico.

Os inflamassomas são complexos multiproteicos ativados em resposta às infecções, inflamações e processos autoimunes. Em relação ao inflamassoma NLRP3, expresso em células imunes da linhagem mieloide, como neutrófilos, monócitos e células dendríticas, acredita-se que patógenos fúngicos, bacterianos, virais e toxinas formadoras de poros induzam perturbação citosólica que são detectadas pelo complexo NLRP3 (Lamkanfi, Dixit, 2011; Fu, Wu, 2023). Esse complexo consiste no receptor semelhante a NOD NLRP3, na molécula adaptadora ASC, na protease Caspase-1 que atua na transcrição, maturação e a produção de IL-1 β (Lamkanfi, Dixit, 2014). No âmbito da cascata do inflamassoma NLRP3, a caspase-1 desempenha um papel central na imunidade inata, respondendo aos sinais citosólicos e iniciando uma resposta dupla. Primeiro, a caspase-1 induz a ativação e secreção de duas citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-18. Em segundo lugar, a caspase-1 desencadeia a piroptose, mecanismo de morte de células infectadas que remove o nicho intracelular protetor do patógeno e os torna suscetíveis à morte por um fagócito secundário (Jorgensen, Miao, 2015). Pela primeira vez, nós demonstramos que o tratamento com CTX promoveu aumento da expressão relativa dos genes associados ao inflamassoma NLRP3 nos animais infectados, tornando-os mais inflamados e com menor carga fúngica, corroborando o conceito de que os estímulos gerados pela IL-1 β são mediadores da inflamação e das respostas imunes e que desempenham papel importante na atividade microbicida, agora demonstrada contra *E. cuniculi*. Contudo, não se pode descartar a possibilidade da indução de piroptose de células infectadas como forma de contenção do patógeno. A piroptose não foi descrita como mecanismo de morte celular na encefalitozoonose, contudo tem sido identificada em relação a

outros patógenos intracelulares (Yu et al., 2021).

Ao contrário dos nossos resultados, anteriormente foi relatada a inibição da secreção de citocinas em camundongos injetados com veneno total de *Crotalus terrificus* ou com a fração CTX (Rangel-Santos et al., 2004). A CTX também foi capaz de exercer um potente efeito inibitório nas respostas humorais e celulares induzidas pela imunização com albumina sérica humana (HSA), mesmo quando injetada após o desencadeamento da imunidade inata (Favoretto et al., 2011). Embora a citocina IL-1 β não tenha sido quantificada em nosso estudo, a expressão aumentada do inflamassoma NLRP3 associada com o aumento do perfil de citocinas Th1 e Th17, é exatamente oposta ao que foi relatado com a administração de CTX em camundongos com colite murina experimental, nos quais houve redução da secreção IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos homogenatos de segmento colônico e diminuição do influxo de células inflamatórias no intestino (Almeida et al., 2015).

Aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-6 foi evidenciado nos grupos infectados e tratados com Cy e/ou CTX. Além da atuação da Cy sobre o DNA e RNA celular, seus efeitos sobre o metabolismo resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Khurshid et al., 2020). As ROS geradas induzem a ativação de diferentes fatores de transcrição como NF- κ B, que regulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α que, subsequentemente, resultam na ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2) (Mahrous et al., 2022). Anteriormente, o aumento de citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 foi observado em camundongos imussuprimidos com Cy e infectados pelo *E. cuniculi* (Da Costa et al., 2017; Francisco Neto et al., 2017; Moysés et al., 2022), os resultados aqui corroboram os dados anteriores observados nos camundongos tratados com Cy. Moschella et al., (2011), demonstraram em camundongos tratados com Cy maior expressão de genes e proteínas pertencentes a membros da família IL-1, como IL-1 β , IL-18 e IFN- γ . Os resultados observados no grupo Cy-CTX-infectado sugerem que a CTX ativou genes ligados ao inflamassoma NLRP3 com subsequente aumento na expressão do gene de IL-1 β .

No presente estudo, nós demonstramos redução de macrófagos associada ao tratamento com Cy e, por sua vez, um aumento da polarização de macrófagos para o perfil M2 foi associado à infecção pelo *E. cuniculi*, mostrando a capacidade do patógeno em modular a atividade de macrófagos *in vivo*. Ao administrar CTX houve redução de expressão de moléculas de ativação (CD80/86 e IL-12) nos macrófagos, sugerindo menor perfil microbicida. *In vitro*, o tratamento com CTX de macrófagos peritoneais aderentes desafiados pelo *E. cuniculi* determinou aumento do perfil M1, com elevada produção das citocinas TNF- α e IL-6 e aumento de morte de macrófagos por necrose (Nascimento, 2023). Resultados semelhantes

foram relatados na infecção por *L. amazonenses* em macrófagos peritoneais tratados com CTX, os quais apresentaram aumento na capacidade fagocítica e na eliminação dos parasitos intracelulares, elevada produção de NO e de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando o perfil M1 (Farias *et al.*, 2017). Porém macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos séptico tratados com CTX tiveram menor atividade microbicida e perfil M2 (Bretones *et al.*, 2022). Nossos resultados também mostraram que os macrófagos peritoneais tinham predomínio do perfil M2, contudo a carga fúngica foi menor com o uso de CTX, fenômeno que deverá ser melhor investigado e que poderia estar vinculado à ação microbicida de outras células imunitárias.

Foi relatado que o tratamento de camundongos com CTX suprimiu a proliferação de células T do baço e a produção de IL-4 após imunização com soro albumina humana (Favoretto *et al.*, 2011). Adicionalmente, Zambelli *et al.* (2008) mostraram que a CTX reduziu o número de linfócitos circulantes no sangue e na linfa e aumentou o número de linfócitos T (CD3⁺) e B (CD45R⁺) no linfonodo mesentérico. Aqui, a redução observada nas populações de linfócitos T CD4 e T CD8 foi vinculada ao tratamento com Cy, entretanto, nos grupos tratado com CTX e desafiados com *E. cuniculi*, esses linfócitos estavam mais ativados, com maior expressão de IFN- γ , fato que pode ser atribuído a atividade contra presença do patógeno, porém intensificado pela modulação causada pela CTX, e que poderia ser aventado como responsável pela menor carga fúngica desse grupo.

A Cy é um alquilante citotóxico, biotransformada pelo citocromo P450, que impede a divisão celular, facilita a apoptose, retarda e suprime a resposta de células T, B e macrófagos, favorece a mielossupressão, e afeta a função e o número dos neutrófilos, linfócitos, hemácias e plaquetas (Girard *et al.*, 2011; Khurshid *et al.*, 2020; Mahrous *et al.*, 2022). No presente estudo, observou-se diminuição dos linfócitos B-1 e B-2 em todos os grupos imunossuprimidos, achado que pode ser atribuído aos efeitos esperados com o uso de Cy. As células B compreendem 2 subconjuntos, as células B-1 e as células B-2, que diferem no fenótipo e na distribuição tecidual (Baumgarth, 2021). Estudos anteriores mostraram a participação das células B na resposta imune contra a encefalitozoonose, em camundongos Xid deficientes em células B-1 e B-2, infectados com *E. cuniculi*, por via intraperitoneal (da Costa *et al.*, 2017) e por via oral (dos Santos *et al.*, 2018), que apresentaram menor resistência à infecção. Quando os camundongos Xid são tratados com Cy, a infecção dissemina e se intensifica com padrão semelhante ao observado em camundongos SCID ou Nude (Moysés *et al.*, 2022). Portanto, a redução das células B também está vinculada à infecção mais grave, com maior infiltrado inflamatório e perda de peso nos camundongos Cy-infectado e Cy-CTX-

infectado.

As células B-1 são distintas em sua origem de desenvolvimento e muitas residem nos compartimentos pleural e peritoneal, podendo ainda ser divididas em dois subconjuntos: B-1a, que expressa CD5 na superfície celular, e B-1b, que não o faz. As células B1a produzem a maior parte dos anticorpos IgM naturais no soro e participam na primeira linha de defesa, enquanto as células B1b são essenciais para o desenvolvimento de células B1 produtoras de IgM de memória e formam uma ponte para o sistema imunitário adaptativo (Griffin, Rothstein, 2012; Popi et al., 2016). Demonstrou-se que as células B1b cumprem uma função mais “semelhante a APC” (célula apresentadora de antígeno) do que as células B1a (Smith, Baumgarth, 2018). Apesar da redução de células B-1, foi evidenciado o aumento da população de B-1b, fato sugestivo do desempenho das células B-1b na apresentação antigênica, talvez em compensação a função de macrófagos que estavam numericamente diminuídos, e são diretamente afetados pela infecção pelo *E. cuniculi*.

Para concluir, o tratamento com CTX de camundongos imunossuprimidos com Cy e infectados com *E. cuniculi* determinou a ativação do complexo inflamassoma NLRP3 e aumento de citocinas Th1 e Th17 associado a redução da carga fúngica. Por sua vez, sem o tratamento com CTX, a infecção causou produção de citocinas predominantemente Th1 e sem expressão dos genes associados ao complexo NLRP3. A modulação da resposta imune pode ser uma estratégia interessante no controle de agentes infecciosos que tenham capacidade de manipular e evadir dos mecanismos microbicidas, nesse sentido, os resultados do presente estudo demonstram a importância de explorar os efeitos imunomoduladores da CTX na encefalitozoonose.

REFERÊNCIAS

- Almeida, C. de S., Andrade-Oliveira, V., Câmara, N.O., Jacysyn, J.F., Faquim-Mauro, E.L. 2015. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. PLoS One. 10(4), e0121427. doi: 10.1371/journal.pone.0121427.
- An, G., Tang, Y., Mo, B., Ran, M., He, X., Bao, J., Zhou, Z. 2020. Characterization of a murine model for *Encephalitozoon hellem* infection after dexamethasone immunosuppression. Microorganisms. 8(12), 1891. doi: 10.3390/microorganisms8121891.
- Baumgarth, N. 2021. The shaping of a B cell pool maximally responsive to infections. Annu. Rev. Immunol. 39, 103-129. doi: 10.1146/annurev-immunol-042718-041238.
- Bretones, M.L., Sampaio, S.C., Barbeiro, D.F., Ariga, S.K.K., Soriano, F.G., 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.
- Camargo Konno, F.T., Xavier, J.G., Alvares-Saraiva, A.M., Pérez, E.C., Spadacci-Morena D.D., Lallo, M.A. 2023. Down-regulation of the microbicidal profile of M1 macrophages by *Encephalitozoon cuniculi*. J. Comp. Pathol. Suppl, in press
- Cardoso, D.F., Mota, I. 1997. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. Toxicon. 35(4), 607-12. doi: 10.1016/s0041-0101(96)00134-1.
- da Costa, L.F., Alvares-Saraiva, A.M., Dell'Armeline Rocha, P.R., Spadacci-Morena, D.D., Perez, E.C., Mariano, M., Lallo, M.A. 2017. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. Immunobiol. 222(2), 218-227. doi: 10.1016/j.imbio.2016.09.018
- da Silva, N.G.; Sampaio, S.C.; Gonçalves, L.R., 2013. Inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom on chronic edema induced by injection of bacillus Calmette-Guérin into the footpad of mice. Toxicon. 63, 98-103. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.12.003.
- Dalboni, L.C., Alvares Saraiva, A.M., Konno, F.T.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
- de Moura, M.L.C., Alvares-Saraiva, A.M., Pérez, E.C., Xavier, J.G., Spadacci-Morena, D.D., Moysés, C.R.S., Rocha, P.R.D., Lallo, M.A., 2019. Cyclophosphamide treatment mimics sub-lethal infections with *Encephalitozoon intestinalis* in immunocompromised individuals. Front. Microbiol. 10, 2205. doi: 10.3389/fmicb.2019.02205.
- dos Santos, D.L., Alvares-Saraiva, A.M., Xavier, J.G, Spadacci-Morena, D.D., Peres, G.B., Rocha, P.R.D., Perez, E.C., Lallo, M.A, 2018. B-1 cells upregulate CD8 T lymphocytes and increase proinflammatory cytokines serum levels in oral encephalitozoonosis. Microbes and

- Infection. 20, 196-204. doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.004
- Farias, L.H., Rodrigues, A.P.D., Coêlho, E.C., Santa, M.F.;Silva, E.O. 2017.Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during *Leishmania amazonensis* infection. Parasitol. 144, 1458-1467. doi:10.1017/S0031182017000944
- Favoretto, B.C., Ricardi, R., Silva, S.R., Jacysyn, J.F., Fernandes, I., Takehara, H.A., Faquim Mauro, E.L. 2011. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. Toxicon. 57(4), 600-607. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.12.023
- Figuerêdo Moreira, I., Alvares-Saraiva, A.M., Pérez, C.E., Xavier, G.J., Spadacci-Morena, D.D., Silva de Araújo, R., Rocha, P.R.D.A, Lallo, M.A. 2022. Opportunistic pneumonia caused by *E. cuniculi* in mice immunosuppressed with cyclophosphamide. Immunobiol. 227(3), 152194. doi: 10.1016/j.imbio.2022.152194
- Francisco Neto, A., Dell'Armelina Rocha, P.R., Perez, E.C., Xavier, J.G., Peres, G.B., Spadacci-Morena, D.D., Alvares-Saraiva, A.M., Lallo, M.A. 2017. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. PloSOne. 1, e0186954. doi: 10.1371/journal.pone.0186954
- Fu, J., Wu, H. 2023. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation. Annu. Rev. Immunol. 41, 301-316. doi: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207
- Girard, B.M., Cheppudira, B.P., Malley, S.E., Schutz, K.C., May, V., Vizzard, M.A. 2011. Increased expression of interleukin-6 family members and receptors in urinary bladder with cyclophosphamide-induced bladder inflammation in female rats. Front Neurosci. 5, 20. doi: 10.3389/fnins.2011.00020.
- Griffin, D.O., Rothstein, T.L. 2012. Human "orchestrator" CD11b+ B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. Mol Med. 18(1), 1003-8. doi: 10.2119/molmed.2012.00203.
- Han, B., Moretto, M., Weiss, L. 2019. *Encephalitozoon*: Tissue culture, cryopreservation, and murine infection. Curr. Protoc. Microbiol. 52(1), e72. http://doi: 10.1002/cpmc.72.
- Han, B., Weiss, L. 2017. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. Microbiology Spectrum. 5, 10. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0018-2016
- 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. http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01468
- Hornitzky, M. 2008. Nosema disease literature review and three-year survey of beekeepers.

Rural industries research and development corporation. Part 2. N° 08/006.

Lamkanfi, M., Dixit, V.M. 2011. Modulation of inflammasome pathways by bacterial and viral pathogens. *J Immunol.* 187(2), 597-602. doi: 10.4049/jimmunol.1100229

Lamkanfi, M., Dixit, V.M. 2014. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 157(5), 1013-1022. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.007

Jorgensen, I., Miao, E.A. 2015. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol Rev.* 265(1), 130-142. doi: 10.1111/imr.12287

Khurshid, Q., Dar, A. J., Mirza, M. A.; et al. 2020. Rituximab and cyclophosphamide based regimens for treatment of Waldenstrom Macroglobulemia, lessons from clinical literature: a systemic review. *Blood.* 136 (Supplement 1), 10–11. doi:10.1182/blood-2020-138964.

Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peiretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., Alaoui, H.E., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J & Vivarés, C. P. 2001. Genome sequence and compaction of the eukarote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* 414, s450–453. doi.org/10.1038/35106579

Kumar, H.; Kumagai, Y., Tsuchida, T., Koenig, P.A., Satoh, T., Guo, Z., Jang, M.H., Saitoh, T., Akira, S., Kawai, T. 2009. Involvement of the NLRP3 inflammasome in innate and humoral adaptive immune responses to fungal beta-glucan. *J. Immunol.* 183(12), 8061-8067. doi: 10.4049/jimmunol.0902477

Lallo, M.A., Hirschfeld, M.P.M. 2012. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. *Exp. Parasitol.* 131(3), 339-343. doi: 10.1016/j.exppara.2012.04.019

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

Mahrous, G.R., Elkholy, N.S., Safwat, G., Shafaa, M.W. 2022. Enhanced cytotoxic activity of beta carotene conjugated liposomes towards breast cancer cell line: comparative studies with cyclophosphamide. *Anti-Cancer Drugs.* 33(1), e462–e476. doi: 10.1097/CAD.0000000000001245.

Mills, C.D. 2012. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol.* 32(6), 463-88. doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10.

Moschella, F.; Valentini, M.; Aricò, E.; et al., 2011. Unraveling cancer chemoimmunotherapy mechanisms by gene and protein expression profiling of responses to cyclophosphamide. *Cancer Res.* 71(10), 3528–3539. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4523

Moysés, C.R.S., Alves-Saraiva, A.M., Perez, E.C., Spadacci-Morena, D.D., da Costa, L.F.V.,

- Xavier, J.G., Lallo, M.A. 2022. Mice with genetic and induced B-cell deficiency as a model for disseminated encephalitozoonosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 81, 101742. Doi: 10.1016/j.cimid.2021.101742
- Nascimento, C.G. 2023. 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.
- Nunes, F.P., Sampaio, S.C., Santoro, M.L., Sousa-e-Silva, M.C. 2007. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon.* 49(8), 1090-1098. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.01.017
- 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), 1100-1106. 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
- Popi, A. F., Longo-Maugéri, I.M., Mariano, M. 2016. An overview of B-1 cells as antigen presenting cells. *Front. Immunol.* 7, 138. doi: 10.3389/fimmu.2016.00138
- 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(6), 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
- 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
- Seatamanoach, N., Kongdachalert, S., Sunantaraporn, S., Siriyasatien, P., Brownnell, N. 2022. Microsporidia, a highly adaptive organism and its host expansion to humans. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 1. doi.org/10.3389/fcimb.2022.924007

- Shirani, K., Hassani, F.V., Razavi-Azarkhiavi, K., Heidari, S., Zanjani, B.R., Karimi, G. 2015. Phytotrap of cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Environ Toxicol Pharmacol.* 39(3), 1262-1275. doi: 10.1016/j.etap.2015.04.012
- Smith, F.L., Baumgarth, N., 2019. B-1 cell responses to infections. *Curr. Opin. Immunol.* 57, 23-31. doi: 10.1016/j.coi.2018.12.001
- Zambelli, V.O., Sampaio, S.C., Sudo-Hayashi, L.S., Greco, K., Britto, L.R., Alves, A.S., Zychar, B.C., Gonçalves, L.R., 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 lipoxygenase-derived mediators. *Toxicon.* 51(8), 1357-67. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.03.004
- Zitvogel, L., Kepp, O., Galluzzi, L., Kroemer, G. 2012. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol.* 13(4), 343-51. doi: 10.1038/ni.2224
- Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C., Chen, X. 2021. Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 6(1), 128. doi: 10.1038/s41392-021-00507-5.