

UNIVERSIDADE PAULISTA

**DEFICIÊNCIA DE CÉLULAS B ASSOCIADA À
IMUNOSSUPRESSÃO PERMITE A COMPREENSÃO
DA RESPOSTA IMUNE NA ENCEFALITOZOONOSE**

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

CARLA RENATA SERANTONI MOYSÉS

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE PAULISTA

**DEFICIÊNCIA DE CÉLULAS B ASSOCIADA À
IMUNOSSUPRESSÃO PERMITE A COMPREENSÃO
DA RESPOSTA IMUNE NA ENCEFALITOZOONOSE**

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

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

CARLA RENATA SERANTONI MOYSÉS

São Paulo

2018

Moysés, Carla Renata Serantoni.

Deficiência de células B associada à imunossupressão permite a compreensão da resposta imune na encefalitozoonose / Carla Renata Serantoni Moysés – 2018.

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

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Patogenia das Enfermidades Infecciosas e Parasitárias.

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

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

1. Camundongos XID. 2. Células B-1. 3. Células B-2. 4. Ciclofosfamida. 5. Encefalitozoonose. 6. Linfócitos B. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Saraiva, Anuska Marcelino Alvares (coorientadora). III. Título.

*Dedico este trabalho aos camundongos sacrificados.
Em homenagem à sua importância para minha formação e para o conhecimento humano.*

*“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana” –
Charles Darwin*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, por ter-me concedido saúde, força e disposição. Sem ele, nada disso seria possível.

À pessoa mais importante, minha mãe guerreira, que desde sempre ensinou a importância de ler, estudar e buscar o seu espaço. Você é minha fonte de inspiração e força, meu símbolo de justiça e amor, amo você “Mãezinha Querida”.

Aos meus irmãos, Claudia e André, que mesmo com a distância se fizeram presentes, sempre me mimando e apoiando e, ao meu “pai” Enéas, sempre mais empolgado que eu e sempre me animando, obrigada pelo apoio. Vocês mesmo sem perceberem, me incentivaram de todas as maneiras a nunca desistir.

Ao meu marido Thiago, nessa jornada que foi muito mais do que 3 anos e 6 meses, sempre me apoiou, me incentivou, me amparou e acreditou veementemente que eu conseguiria, me proporcionou o melhor ambiente possível para que eu concluísse esse trabalho, cuidando da casa, dos nossos “filhos” peludos e de penas em todos os momentos que me ausentei. Amo você, e digo “sim” para o resto de nossas vidas.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Anete Lallo, que foi muito maior e além do que qualquer título, que teve muita paciência, além de me proporcionar um aprendizado inimaginável. Obrigada por me ensinar a “engatinhar” nesse Mundo de Conhecimento. Com todo o meu carinho será para sempre “**Divanete**”.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Anuska Marcelino Alvares-Saraiva, além de todo conhecimento e humildade sempre me deu muita força, me ensinou, contribuiu muito para o nosso trabalho e principalmente, que abraço maravilhoso você tem!

Ao Prof^o Dr^o José Guilherme Xavier, que prazer reencontrá-lo, obrigada por toda ajuda, não teria saído sem seu auxílio e principalmente paciência. Uma mistura de emoções passarão por mim, saudosismo/admiração/carinho, sempre que me lembrar do Senhor, obrigada.

Aos professores que conheci durante essa caminhada Prof^o Dr^o Paulo, Prof^a Dr^a Leoni, Prof^a Dr^a Diva obrigada por toda a contribuição para o trabalho e para minha vida.

Sou grata a cada professor, principalmente a Profª Drª Beth (pelos incentivos e contribuição durante o desenvolvimento do trabalho) e a Profª Selene (que em apenas 1 aula tirou de mim o nervosismo que carreguei a vida toda).

À Profª Drª Lidiana F V Costa e Profª Drª Raquel C Coutinho, que na graduação visualizaram um potencial em mim, diariamente instigando-me a ser uma profissional melhor e ao longo dessa jornada incentivando meus estudos, até com alguns puxões de orelha. Muito obrigada por tudo!

Aos amigos que ganhei Luciane, Jéssica, Suzana, Michele, obrigada pela recepção sempre muito alegre e aberta, vocês fizeram diferença, embora eu nunca tenha demonstrado.

Agradeço ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares – PROSUP/CAPES, pela Bolsa a mim conferida, possibilitando a dedicação e conclusão dos estudos.

Agradeço à Universidade Paulista - UNIP, por proporcionar-me um ambiente criativo e amigável para os estudos. Aos funcionários do laboratório, da limpeza, da recepção, segurança, biotério, esse ambiente só é possível graças ao trabalho de vocês, obrigada!

De coração, muito obrigada a todos que me ajudaram de alguma forma!

Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.

– Albert Einstein.

Este artigo será enviado para o periódico Immunobiology

Deficiência de células B associada à imunossupressão permite a compreensão da resposta imune na encefalitozoonose

Carla Renata Serantoni Moysés¹, Lidiana Flora Vidôto da Costa¹, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva¹, José Guilherme Xavier¹, Elizabeth Cristina Perez Hurtado¹, Diva Denelle Spadacci-Morena², Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha¹, Maria Anete Lallo¹.

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

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

Resumo

Encephalitozoon cuniculi é um patógeno intracelular que estabelece uma relação equilibrada com hospedeiros imunocompetentes, dependente da atividade de linfócitos T. Em indivíduos imunodeficientes, pelo HIV ou por fármacos, a encefalitozoonose é grave, disseminada e letal. Anteriormente, nós demonstramos maior suscetibilidade de camundongos com imunodeficiência ligada ao cromossomo X (XID) à encefalitozoonose, indicando a participação das células B-1. Nós hipotetizamos que as células B (B-1 e B-2) participam da resposta imune contra *E. cuniculi*. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a resposta imune de camundongos XID e Balb/c contra *Encephalitozoon cuniculi*, com foco na participação de células B (B-1 e B-2), utilizando a ciclofosfamida (Cy) como agente imunossupressor para potencializar a infecção. Para tal, camundongos Balb/c e XID foram imunossuprimidos com Cy e infectados com *E. cuniculi*. Após 14 e 21 dias de infecção e tratamento, avaliou-se a carga fúngica, as lesões teciduais, as citocinas do plasma e as populações de células T, B e macrófagos do peritônio e baço. Os camundongos XID apresentaram quadro clínico grave com ascite e letargia, tiveram aumento das populações peritoneais de linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ e de macrófagos e aumento de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6), contudo sem apresentar alteração de populações imunitárias do baço. Em camundongos Balb/c observou-se aumento da população de linfócitos T e de macrófagos no baço, indicando montagem da resposta imune contra *E. cuniculi* associada à ausência de quadro clínico da infecção. Pode-se concluir que a imunodeficiência de células B nos camundongos XID associada ao tratamento com Cy determinou um quadro de encefalitozoonose grave e disseminada, caracterizada por uma resposta imune esplênica incipiente e por resposta imune peritoneal aumentada, porém ineficaz, evidenciando assim a participação de células B-1 e B-2 da imunidade contra microsporídios.

Palavras-chave: camundongos XID, células B-1, células B-2, ciclofosfamida, encefalitozoonose, linfócitos B.

Abstract

Encephalitozoon cuniculi is an intracellular pathogen that establishes a balanced relationship with immunocompetent hosts, dependent on T lymphocyte activity. In immunodeficient individuals, by HIV or by drugs, encephalitozoonosis is severe, widespread and lethal. Previously, we demonstrated that mice with X-linked immunodeficiency (XID) were more susceptible to encephalitozoonosis, indicating the participation of B-1 cells. We hypothesized that B cells (B-1 and B-2) participate in the immune response against *E. cuniculi*. Thus, the objective of this study was to evaluate the immune response of XID and Balb/c mice against *Encephalitozoon cuniculi*, focusing on the participation of B cells (B-1 and B-2), using Cyclophosphamide (Cy) as an immunosuppressive agent. For this, XID and Balb/c mice were immunosuppressed with Cy and infected with *E. cuniculi*. After 14 and 21 days of infection and treatment, fungal burden, tissue lesions, plasma Cytokines, T and B cells and macrophages from peritoneum and spleen were evaluated. The XID mice presented severe clinical manifestations with ascites and lethargy, increased peritoneal populations of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes and macrophages, increased proinflammatory Cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-6), but the spleen immune populations did not change. In Balb/c mice, the T lymphocyte and macrophages population increased in the spleen, indicating the assembly of the immune response against *E. cuniculi*, which is associated with the absence of clinical manifestations of the infection. We conclude that B-cell immunodeficiency in XID mice associated with Cy treatment has determined a severe and widespread encephalitozoonosis characterized by an incipient splenic immune response and an increased but ineffective peritoneal immune response, thus evidencing the participation of B-1 and B-2 immunity against microsporidia.

Key words: Cyclophosphamide, B-1 cells, B-2 cells, encephalitozoonosis, B lymphocytes, XID mice.

Introdução

Microsporídios são patógenos intracelulares obrigatórios que pertencem ao Filo Microsporídia e Reino Fungi. Os representantes desse Filo infectam uma grande variedade de espécies de invertebrados e vertebrados (Anani, Attouchi, 2010). Foram descritas mais de 1.200 espécies de microsporídios, entre as quais se destacam *Encephalitozoon cuniculi*, *E. intestinalis* e *E. hellen*, sendo estas, importantes na infecção de mamíferos. Uma estrutura única e exclusiva deste filo é o túbulo polar, estrutura constituinte do esporo capaz de injetar o material infeccioso, denominado esporoplasma, nas células dos hospedeiros, iniciando o desenvolvimento do patógeno (Keeling, Fast, 2002).

Os microsporídios são considerados patógenos emergentes e oportunistas para indivíduos imunocomprometidos, tais como pacientes imunodeprimidos pelo HIV ou ainda imunossuprimidos por fármacos para evitar rejeição a transplantes ou tratamento do câncer, entre outros (Didier, Weiss, 2011, Kicia *et al.*, 2014). Com o comprometimento da resposta imune, o patógeno se prolifera e se dissemina, determinando a destruição das células hospedeiras (Valencakova, Halanova, 2012). Por sua vez, nos hospedeiros imunocompetentes, uma infecção latente é frequentemente estabelecida e permanece assintomática, com uma relação equilibrada entre a multiplicação do patógeno e a resposta imune do hospedeiro (Kotkova *et al.*, 2013). *E. cuniculi* determina doença sistêmica grave e letal em indivíduos imunocomprometidos e não existe tratamento eficaz contra este patógeno, assim a resposta imune possui papel fundamental no combate ao agente (Moretto *et al.*, 2001).

A imunidade celular é crítica para a sobrevivência de hospedeiros infectados por *E. cuniculi*, sendo as células T CD8⁺ as principais responsáveis pela resistência à infecção (Berland, Wortis, 2002). Na dependência de via de inoculação, os linfócitos TCD4⁺ possuem papel fundamental, como demonstrado por via oral (dos Santos *et al.*, 2018). Embora grande quantidade de anticorpos seja produzida nas infecções por *E. cuniculi*, o seu papel na defesa parece incipiente, um fenômeno aparentemente contraditório. Portanto, a participação das células B deve ser mais bem explorada.

Os linfócitos B podem ser divididos em células B-1, localizadas predominantemente na cavidade peritoneal e pleural, e que diferem dos linfócitos B-2, especialmente localizados nos folículos de linfonodos e zona marginal do baço (Baumgarth, 2011, Sindhava *et al.*, 2010, Suzuki *et al.*, 2010). Além da localização distinta, ressalta-se que as células B-1 também possuem expressão de marcadores de superfície, repertório de anticorpos, morfologia e

funções diferentes das células B-2 convencionais (Hayakawa *et al.*, 1986, Herzenberg, Kantor, 1993). Camundongos XID possuem falha na tirosina cinase de Bruton (Btk), o que determina deficiência de células B-1 e B-2, sendo utilizados como controle negativo da atividade desses linfócitos (Vetrie *et al.*, 1993, Mukhopadhyay *et al.*, 2002). Anteriormente, nosso grupo demonstrou que camundongos XID apresentam maior suscetibilidade à infecção por *E. cuniculi* com quadro de encefalitozoonose mais grave. Essa menor resistência foi associada à deficiência de células B-1 uma vez que a transferência adotiva dessas células para camundongos XID promoveu *up regulation* em populações de células imunitárias do peritônio e resultou em maior resistência (da Costa, *et al.* 2017).

A Cy é um agente quimioterapêutico amplamente utilizado na terapia do câncer e em algumas doenças autoimunes (Schiavoni *et al.*, 2017). É diferente da maioria dos outros agentes quimioterápicos na medida em que pode ser administrado repetidamente em doses muito elevadas sem a necessidade de resgate de células estaminais hematopoiéticas devido à falta de toxicidade para células-tronco (Radojcic *et al.*, 2010). Muitos estudos relataram que a Cy pode aumentar a eficácia dos regimes imunoterapêuticos pela remoção de células Treg supressoras induzidas por tumores (Proietti *et al.*, 1998; Santín, Fayer, 2011, Mitchell, 2003), induz a linfopenia transitória que está associada à proliferação das células T *in vivo* aumentada (Radojcic *et al.*, 2010) e expansão específica contra antígenos (Schiavoni *et al.*, 2017). Os efeitos de Cy na imunidade inata se manifestam pelos níveis aumentados de IFN- γ , por outras citocinas pró-inflamatórias em soro e pelo número elevado e estado de ativação de CD11b⁺ e células mielóides *in vivo* (Radojcic *et al.*, 2010). Nosso grupo demonstrou que o uso de Cy torna camundongos Balb/c mais suscetíveis a encefalitozoonose, desenvolvendo a doença na forma sistêmica, crônica e letal (Lallo, Bondan, 2002, Lallo, Hirschfeld, 2012). Desta forma, o uso da Cy possibilita um quadro de encefalitozoonose murina mais grave e mais semelhante com as condições de imunocomprometimento observada em indivíduos mais suscetíveis à doença, sendo uma ferramenta apropriada para entender o comportamento da resposta imune nestas situações. O presente estudo teve por objetivo avaliar a resposta imune, com foco na participação de células B (B-1 e B-2), em camundongos Balb/c e XID infectados com *Encephalitozoon cuniculi* e tratados com Cy.

Materiais e Métodos

Animais. Foram utilizados camundongos isogênicos, fêmeas, das linhagens Balb/c e Balb/c XID, com 06 (seis) a 08 (oito) semanas de idade, SPF (specific pathogen free), obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Durante o período experimental, os animais foram divididos em grupos e permaneceram em microisoladores no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista sob condições controladas de temperatura entre 22 – 24°C e umidade, onde receberam ração *ad libitum* peletizada e esterilizada por irradiação e água esterilizada por autoclavagem, sob ciclo de claro/escuro de 12/12h. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Paulista (CEUA138/12, 385/15).

Patógeno e Infecção Experimental. Os esporos de *Encephalitozoon cuniculi*, genótipo 1 (obtidos do Waterborne® Inc. New Orleans, LA, USA) foram originalmente cultivados em células Rabbit Kidney (RK-13) no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Paulista. Para o desenvolvimento do patógeno, as células RK foram mantidas em meio Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY, EUA), 10% de aminoácidos não essenciais e 1% de piruvato, e com o antibiótico gentamicina (20 mg/mL) em frascos com área de 75 cm². As culturas de *E. cuniculi* foram incubadas com 5% de CO₂ a 37°C. Em intervalos de 07 dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 20 minutos a 500g para obtenção dos esporos contidos no sedimento, os quais foram armazenados a 4°C. A contagem dos esporos de *E. cuniculi* foi realizada em câmara de Neubauer de acordo com Cantwell (1970). Os camundongos dos grupos infectados receberam 1x10⁷ esporos de *E. cuniculi* por via intraperitoneal.

Transferência Adotiva de Linfócitos B-2. Os camundongos XID foram transferidos adotivamente com células B-2 obtidas da seguinte forma: o baço de camundongos Balb/c foi dissociado mecanicamente e as hemácias removidas com tampão hemolítico. O sedimento contendo as células brancas foi submetido à marcação das moléculas da superfície. Primeiro, as células foram incubadas com anti-CD16/32 para bloqueio dos receptores Fc, por 15 minutos a 4°C. Em seguida foram lavadas com Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma, St Louis, MO, EUA) contendo 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma, St Louis, MO, EUA) (PBS-BSA 1%) e as células foram incubadas com anti-CD19 Phycoerythrin (PE) Cy7 (Cyanin 7) e anti-CD23 PE por 20 minutos à 4°C para a marcação de células com fenótipo B-2. As células foram então lavadas com PBS – BSA 1%, filtradas com *cell-strainer* (70 µm),

ressuspensas em PBS e separadas em citômetro de fluxo “cell sorter” FACSAria II. A população de linfócitos foi selecionada segundo os parâmetros de forward scatter FSC versus side scatter SSC e a população de linfócitos B-2 selecionada segundo o fenótipo CD19⁺CD23⁺. Após esse período, o sobrenadante enriquecido com células B-2 foi coletado, centrifugado e ressuspensado em PBS para se obter uma concentração de 1×10^6 células em 200 μ L. Sete dias antes da realização da infecção experimental, a suspensão de células B-2 foi injetada pela via intraperitoneal em camundongos XID para formar o grupo XID+B-2.

Transferência Adotiva de Linfócitos B-1. Os camundongos XID foram transferidos adotivamente com células B-1 da seguinte forma: o protocolo de obtenção de células B-1, foi adaptado de Almeida *et al.* (2001). Brevemente, as células peritoneais de camundongos Balb/c foram coletadas pelo lavado com 10 mL de RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO. USA) da cavidade peritoneal e, então, foram cultivadas e mantidas em estufa com 5% de CO₂ à temperatura de 37°C por 40 minutos. Em seguida, o sobrenadante de cultura foi aspirado e descartado (fração celular não aderida) e a porção aderida foi lavada com RPMI e reincubada com meio RPMI acrescido com 10% de SFB (R10) nas mesmas condições de cultura por mais 05 dias sem troca de meio. Após esse período, o sobrenadante enriquecido com células B-1 foi coletado, centrifugado e ressuspensado em PBS para se obter uma concentração de 1×10^6 células em 200 μ L. Camundongos XID receberam por via intraperitoneal a suspensão de células B-1, 7 dias antes da realização da infecção experimental, para constituir assim o grupo XID+B-1.

Tratamento com Cy. Todos os animais foram tratados com Cy (100 mg/kg, duas vezes por semana), que se iniciou no dia da infecção experimental e durou todo o período experimental, sendo divididos em grupos infectados e não-infectados.

Necropsia e coleta de amostras. Os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico com a utilização de mistura de quetamina (100 mg/mL), xilazina (20 mg/mL) e fentanil (0,05 mg/mL) aos 14 e 21 dias pós-infecção (DPI). Foi realizada a necropsia, iniciando-se com a coleta de sangue (para avaliar o perfil de citocinas no soro), lavado peritoneal e baço (análise das populações imunitárias), e posteriormente coleta de amostras de tecido para a análise histopatológica.

Análise histológica e morfométrica. Amostras de pulmões, fígado, rins, baço e intestinos foram fixadas em solução de formol a 10% tamponada (pH 7,2-7,4). Os fragmentos de tecidos foram, então, rotineiramente preparados para análise histológica, embebidos em parafina e

corados com hematoxilina-eosina (H-E). Os infiltrados inflamatórios do fígado foram mensurados por análise morfométrica com MetaMorph Software (Molecular Devices, Califórnia, EUA). Aleatoriamente 10 lesões de cada animal foram mensuradas em pixels, e as médias das áreas de cada grupo experimental foram utilizadas para análise estatística.

Carga fúngica. A carga fúngica foi determinada pela contagem do número de esporos livres no lavado peritoneal de cada animal infectado. A média de cada grupo foi calculada em esporos/mL e analisada estatisticamente.

Avaliação ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão. Para a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), fragmentos com 1 mm de diâmetro de fígado, baço, pulmões e rins de um camundongo XID foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2) a 4°C durante 10h, pós-fixados em OsO₄ a 1% tamponado durante 2h e rotineiramente processados, sendo embebidos em resina Epon. Cortes semifinos foram corados com Azul de Toluidina e cortes ultrafinos foram duplamente corados com acetato de uranila aquoso e citrato de chumbo e, em seguida, observados sob um microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109 operado a 80 kV.

Imunohistoquímica. A pesquisa de expressão de ceratinas nos granulomas foi realizada em cortes de hepáticos corados com anticorpo anti-pan-ceratina AE1/AE3 (Laboratórios Zymed), na diluição de 1:400. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário e o complexo estreptavidina-peroxidase (LSAB, DAKO). Para a revelação foi empregada solução contendo cromógeno diaminobenzidina. A imunomarcagem seguiu a metodologia descrita por Hsu *et al* (1981), sendo o tecido hepático íntegro utilizado como controle-positivo.

Fenotipagem das células do peritônio e do baço. As células peritoneais foram obtidas por sucessivas lavagens da cavidade peritoneal com um total de 10 mL de solução de PBS contendo 2% de SFB. O baço foi dissociado mecanicamente e filtrado em *cell strainer* (70µm) e as hemácias foram removidas com tampão hemolítico. Após centrifugação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 100 µL de PBS – BSA 1%. Cada amostra foi incubada a 4°C por 20 min com anti-CD16/CD32. Após incubação, as células foram divididas em duas alíquotas e ressuspensas em PBS-BSA 1%; em seguida, cada amostra foi incubada com os anticorpos monoclonais: anti-CD19 de camundongo conjugado a Allophycocyanin- (APC), anti-CD23 de camundongo conjugado a Fluorescein Isothiocyanate (FITC) ou conjugado a PE, anti-CD4 de camundongo conjugado a Peridinin Chlorophyll

Protein Complex (PerCP), anti-CD8 de camundongo conjugado a FITC, anti-F4/80 de camundongo conjugado a PE e anti-CD11b de camundongo conjugado a Pacific Blue ou conjugado a APC-Cy 7 (BD-Pharmingen, San Diego, CA). Após 20 minutos, as amostras foram lavadas com PBS-BSA 1%, diluídas em 300µL de PBS e analisadas em um citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA). As células foram caracterizadas de acordo com seus marcadores de superfície, conforme indicado na tabela 1, e analisados utilizando-se o software FlowJo (FlowJo LLC, Data Analysis Software, Ashland, OR).

Quadro 1. Painel de marcadores usados neste estudo para imunofenotipagem de superfície peritoneal e células do baço.

Fenótipo	Marcadores
Células B-1	CD23 ⁻ CD19 ⁺
Células B-2	CD23 ⁺ CD19 ⁺
Células TCD4 ⁺	CD19 ⁻ CD4 ⁺
Células TCD8 ⁺	CD19 ⁻ CD8 ⁺
Macrófagos	CD19 ⁻ CD11b ⁺ F4/80 ⁺

Quantificação de citocinas. Sangue total foi coletado de cada camundongo e submetido à centrifugação para separação do soro, que foi armazenado a -20°C. As citocinas foram medidas a partir do soro, utilizando o Kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, utilizou-se 25 µL de um composto de *beads* contendo os anticorpos de captura, 25 µL de anticorpos de detecção conjugados ao fluorocromo PE, adjunto de 25 µL do sobrenadante das culturas. As amostras foram incubadas durante 2h à temperatura ambiente no escuro. Posteriormente, foram lavadas com *wash buffer*, centrifugadas e ressuspensas no mesmo tampão para análise de 2 cores por citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences,

Mountain View, CA, USA). As análises foram realizadas usando o software de análise FCAP Array 3.0.

Análise estatística. As comparações estatísticas foram feitas pelo Teste t ou por análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) e pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Todos os valores foram relatados como a média $\pm$ erro padrão com nível de significância $\alpha=0,05$ ($p<0,05$). Os gráficos foram feitos no programa “GraphPad Prism” versão 5.0 para Windows® (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

Resultados

Camundongos XID apresentaram encefalitozoonose mais severa. Os camundongos XID infectados apresentaram manifestações graves da inoculação de *E. cuniculi* caracterizadas por pelame arrepiado, dificuldade de locomoção, presença de líquido sero-sanguinolento no abdome - ascite (Fig 1A), hepato- e esplenomegalia e dilatação das alças intestinais. Por outro lado, os camundongos Balb/c infectados não apresentaram sintomas. Para avaliar o papel das células B-1 e B-2 na encefalitozoonose, camundongos transferidos adotivamente com células B-1 e B-2 foram infectados. Estes grupos mostraram poucos sinais clínicos e presença de discreta coleção de líquido peritoneal (Fig 1B). A carga fúngica determinada no lavado peritoneal foi semelhante entre os grupos de camundongos (Fig.1B).

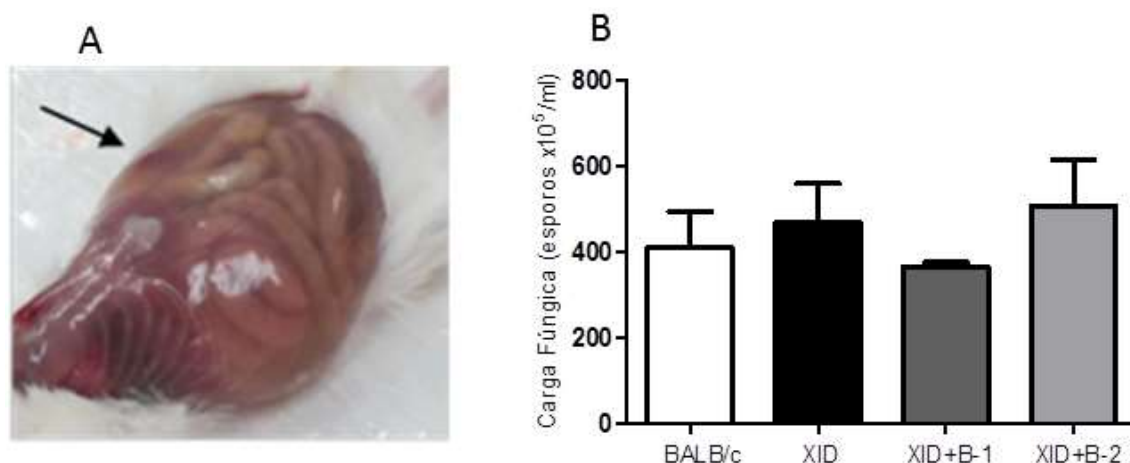


Figura 1. Análise da carga fúngica. A) Coleção de líquido ascítico em camundongo XID infectado com *E. cuniculi*. B) Avaliação da carga fúngica do lavado peritoneal em camundongos Balb/c, XID, XID+B-1 (transferidos adotivamente com células B-1) e XID+B-2 (transferidos adotivamente com células B-2) infectados. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste de Bonferroni.

Microscopicamente, as lesões causadas por *E. cuniculi* estavam concentradas no fígado, pulmões, baço e intestino delgado. No fígado observou-se infiltrado inflamatório mononuclear (Fig. 2A) difuso e multifocal com dimensões variáveis, tanto em camundongos Balb/c quanto em XID, porém as dimensões das lesões foram maiores em Balb/c aos 14 DPI (Fig. 2B). Embora o padrão inflamatório observado em XID tenha sido menor, havia neste grupo uma marcada presença de lesões degenerativas caracterizadas por vacuolização e presença de núcleos picnóticos, e a presença expressiva de esporos do patógeno. A área de lesão diminuiu de forma significativa com a transferência adotiva de células B-2 (XID+B-2), ao passo que aumentou com a transferência de células B-1 (XID+B-1) (Fig. 2B). Frequentemente, o infiltrado inflamatório estava associado à região periportal, indicando uma possível via de disseminação hematogêna a partir da infecção intraperitoneal (Fig. 2A). Porém observou-se também infiltrado inflamatório subcapsular com muitos esporos associados, fato que denota uma possível disseminação via cápsula hepática (dados não mostrados). Na marcação de Imunohistoquímica foi possível a visualização de processo inflamatório com alteração de parênquima e presença de macrófagos (Fig. 3E e F), porém não houve marcação de citoqueratina, indicando a ausência de células epitelióides.

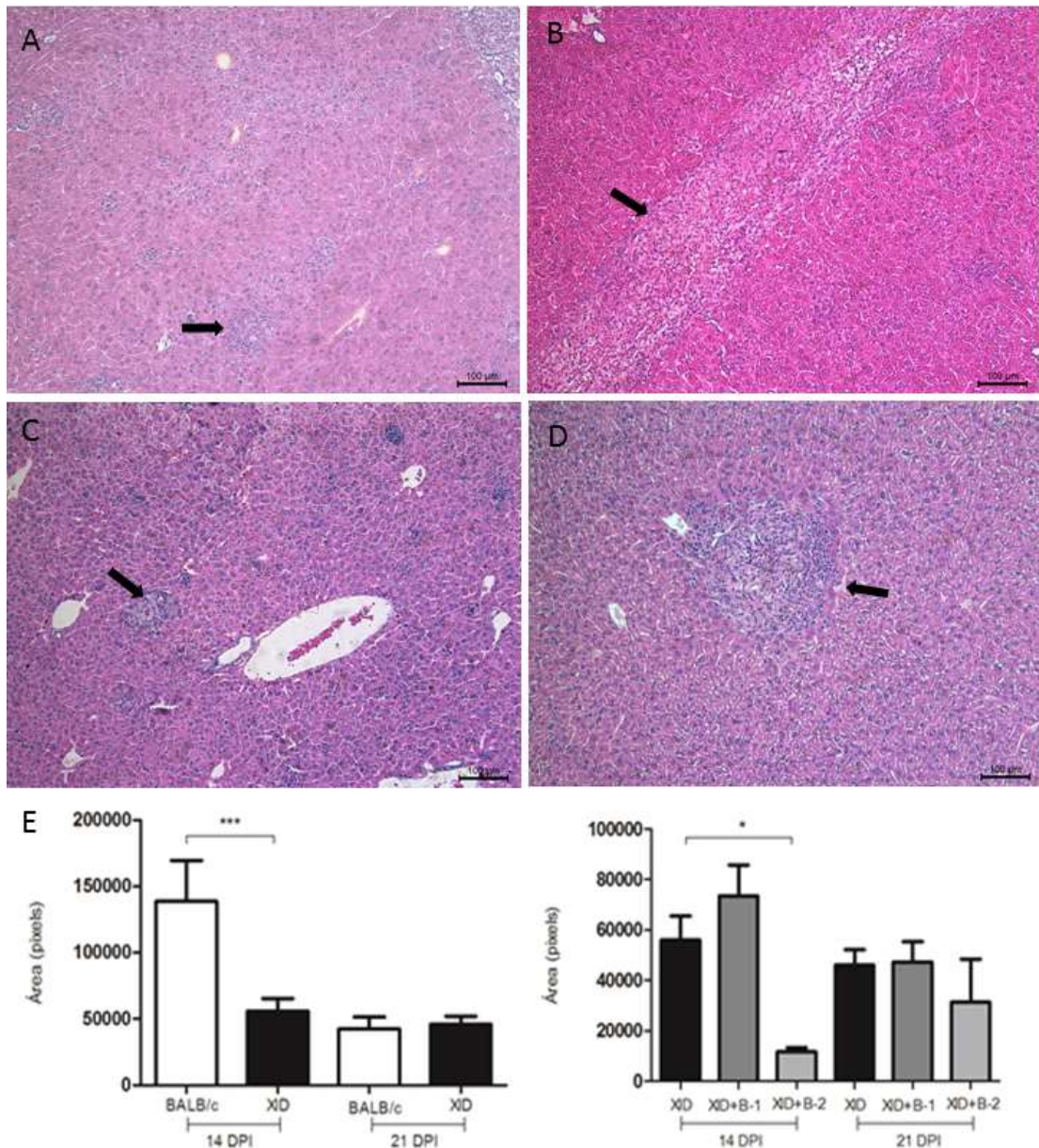


Figura 2. Fotomicrografia de fígado de camundongos infectados com *E. cuniculi* e a análise morfométrica da área lesional. Distribuição de difusa a multifocal de infiltrado inflamatório mononuclear em camundongos Balb/c (A), XID (B), XID+B-1 (C) e XID+B-2 (D). Coloração de HE. (E) Comparação das médias das áreas das lesões nos fígados de BALB/c, XID, XID+B-1 e XID+B-2, em pixels mensurados por morfometria. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni com * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$.

Grandes quantidades de esporos do patógeno estavam associadas aos infiltrados inflamatórios (Fig. 3). Eventualmente, os esporos foram vistos sem associação com células inflamatórias em todos os animais infectados (dados não mostrados), indicando que o patógeno estava se desenvolvendo sem elicitar a resposta inflamatória.

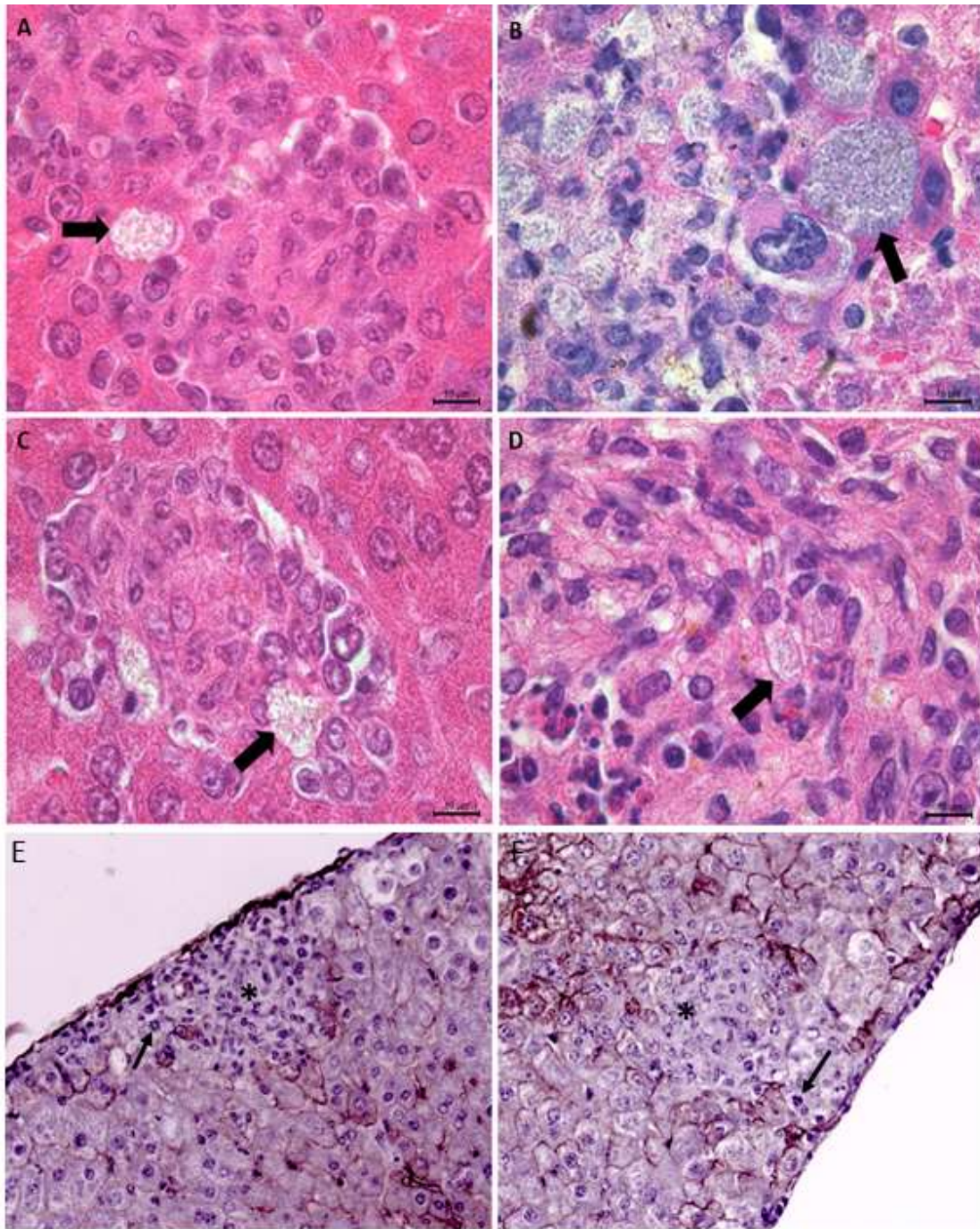


Figura 3. Fotomicrografia de lesões hepáticas de camundongos infectados com *E. cuniculi*. Observar a presença de esporos (seta) associados a infiltrados inflamatórios em camundongos Balb/c (A), XID (B), XID+B-1 (C) e XID+B-2 (D). Coloração HE. (E e F) Imunohistoquímica negativa para citoqueratinas em camundongo XID. Observar a diferença de parênquima causada pelo infiltrado inflamatório (*) e a presença de macrófagos (seta fina) associados ou não a mitose.

Pela MET confirmou-se a natureza do infiltrado inflamatório com a presença marcada de macrófagos, esporos em lise e vacúolos parasitóforos (Fig. 4A e B). Observa-se presença de colágeno indicativo reparo tecidual (Fig. 4B). Foram visualizadas diferentes formas de desenvolvimento do patógeno dentro da célula infectada em vacúolos parasitóforos (Fig. 4C). Na região periférica dos vacúolos parasitóforos dentro da células hospedeira, observou-se merontes e em direção ao centro formas como esporoblastos e esporos (Fig. 4C). Esporos íntegros foram observados no tecido hepático, com evidência do túbulo polar (Fig. 4D), evidenciando o desenvolvimento do patógeno no tecido apesar a presença de células imunitárias.

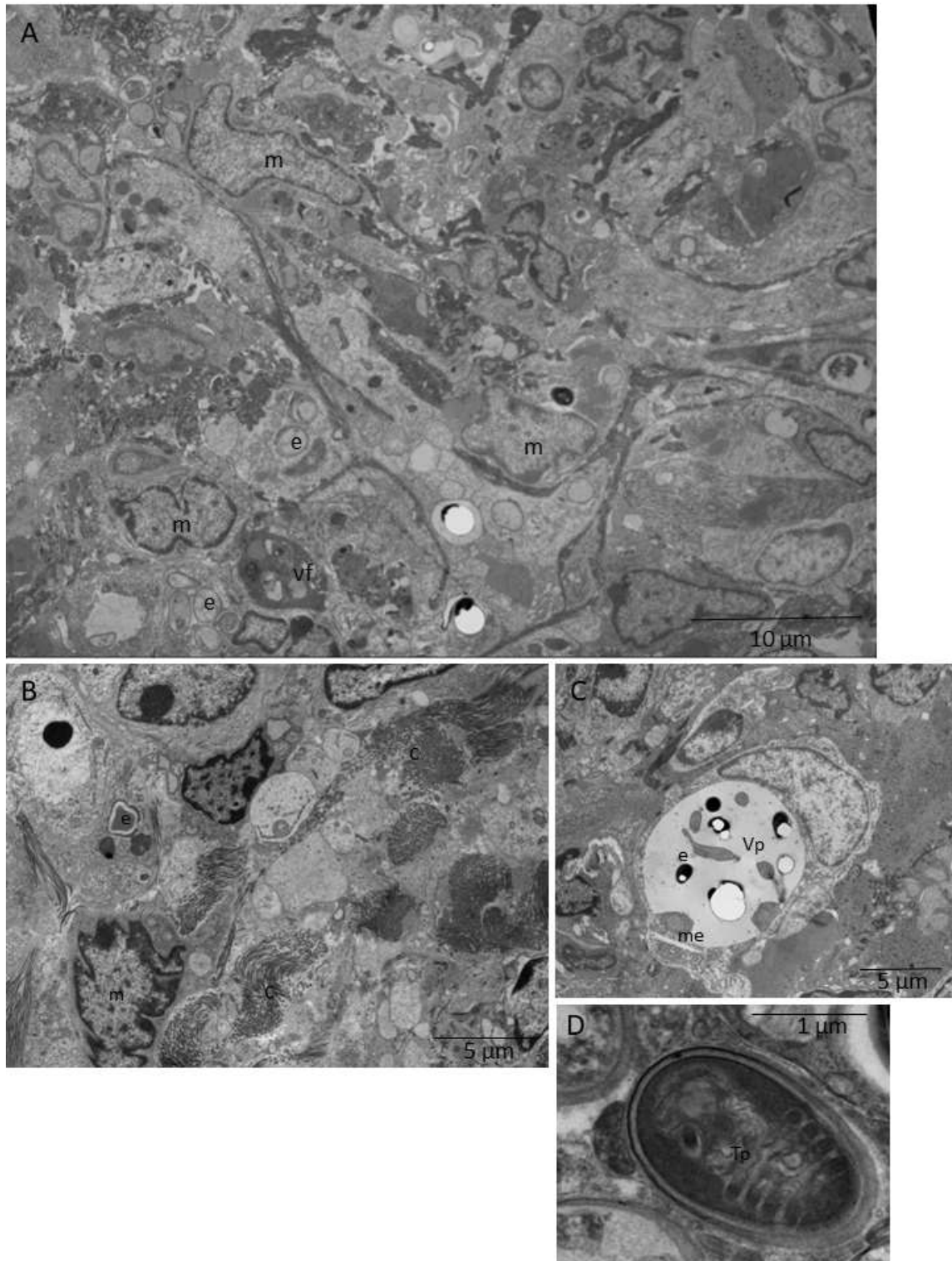


Figura 4. Ultramicrografia de fígado de camundongo XID tratado com ciclofosfamida e infectado com *E. cuniculi*. (A) Infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos (m) com vacúolos fagocíticos (vf) contendo restos de esporos ou esporos íntegros (e). (B) Infiltrado inflamatório com deposição de colágeno (c), esporos (e) e macrófagos (m). (C) Vacúolo parasitóforo (Vp) contendo forma proliferativas meronte (me) e espora (e). (D) Detalhe de um espora íntegro livre no tecido, notar o túbulo polar (tp).

Nos pulmões de todos os animais infectados notou-se pneumonia intersticial multifocal, evidenciando espessamento de paredes alveolares associado à infiltração leucocitária linfoplasmocítica e colapso alveolar, compondo quadro de pneumonia intersticial crônica (Fig. 5). Poucos esporos foram observados nos pulmões nos grupos infectados (dados não apresentados). Enterite linfoplasmocítica discreta foi observada em todos os grupos infectados (Fig. 6) e a presença de esporos foi pouco notada, a exemplo do que foi demonstrado em XID (Fig. 6B).

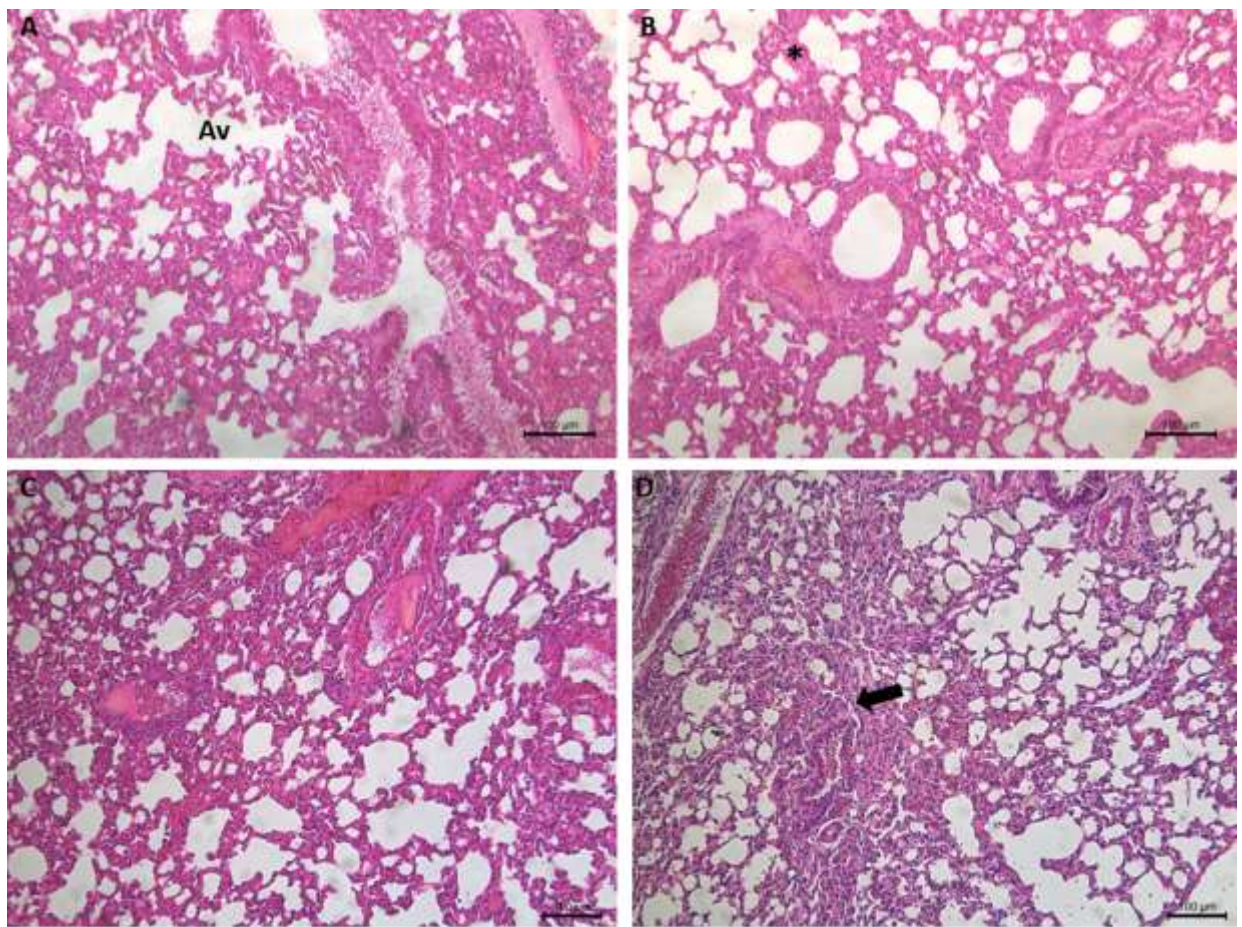


Figura 5. Fotomicrografias de pulmões de camundongos infectados evidenciando espessamento de paredes alveolares associado à infiltração leucocitária linfoplasmocítica, compondo quadro de pneumonia intersticial crônica, ao redor de alvéolos (Av), com septos interalveolares espessados (*) e áreas de colapso alveolar (seta) em Balb/c (A), XID (B), XID+B-1 (C) e XID+B-2 (D). Coloração HE.

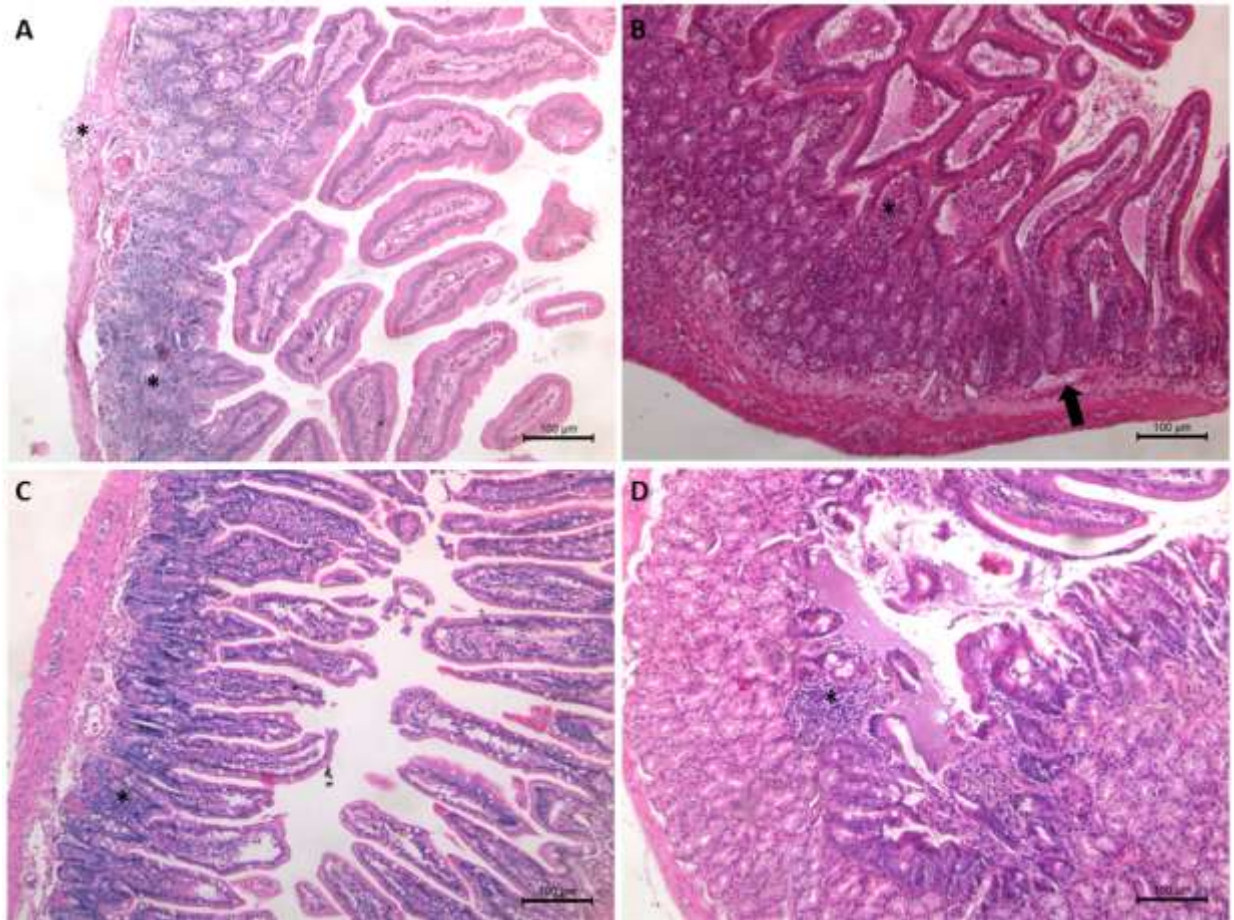


Figura 6. Fotomicrografia de intestino delgado de camundongos infectados evidenciando enterite linfoplasmocítica, apresentando preservação das vilosidades e infiltrado inflamatório (*) em lâmina própria, com maior concentração em cercanias criptais em Balb/c (A), XID (B), XID+B-1 (C) e XID+B-2 (D). Esporos (seta) de *E. cuniculi* em XID (B). Coloração HE.

Nos baços observou-se rarefação linfoide em polpa branca provavelmente relacionada ao uso da Cy nos camundongos Balb/c, XID e XID+B-1 (Fig. 7A, B e C). O baço de camundongos XID+B-2 apresentou infiltrado linfocítico expressivo, diferentemente dos demais grupos, provavelmente relacionada à transferência adotiva de células B-2 (Fig. 7D). A análise ultraestrutural evidenciou vacúolos parasitóforos em células esplênicas com as diferentes formas de desenvolvimento do *E. cuniculi*, merontes em fissão binária ou não, esporoblastos (Fig. 8A e B) e esporontes (Fig. 8C), reforçando que o desenvolvimento do patógeno ocorreu em sítios de resposta imune.

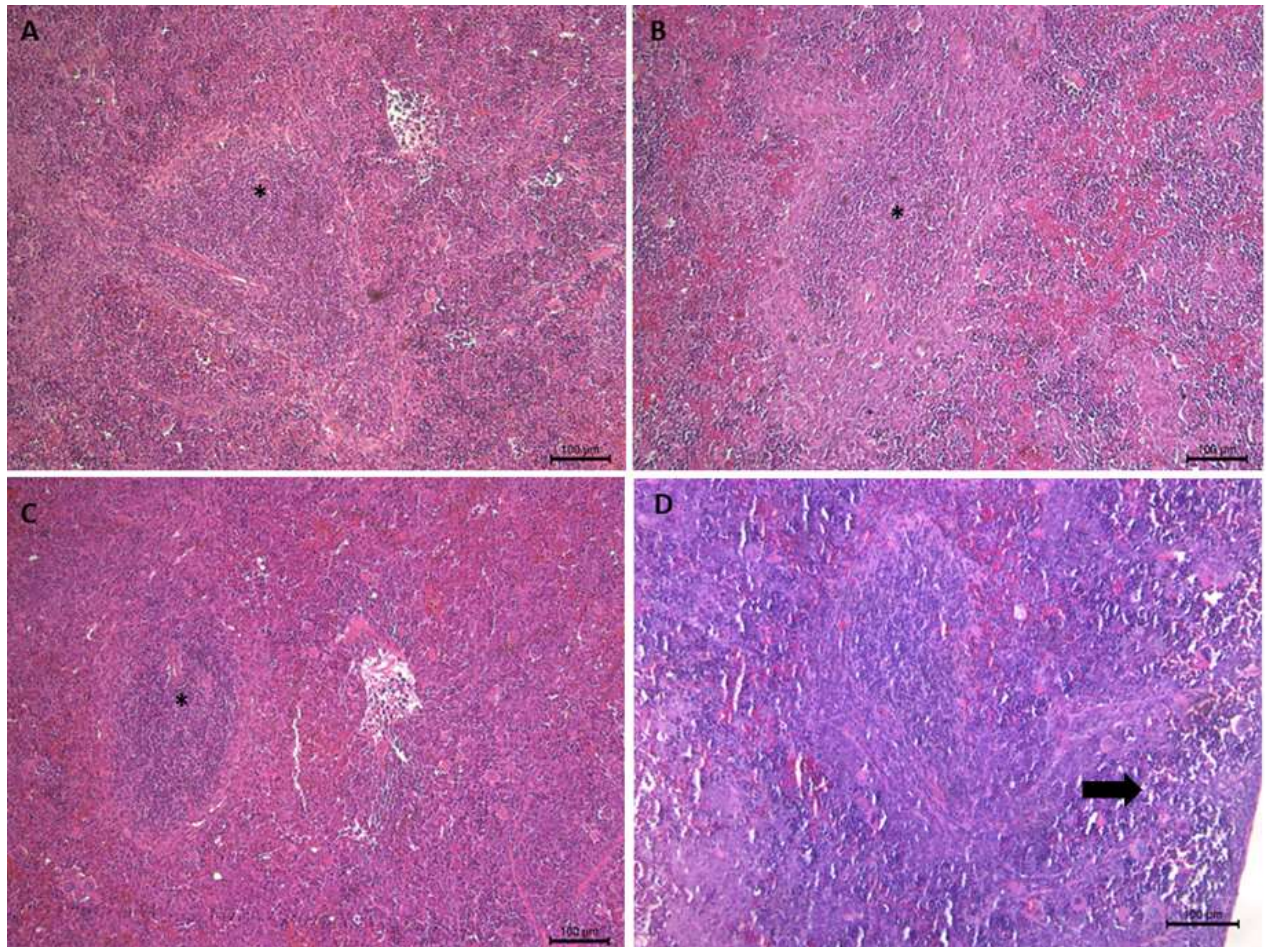


Figura 7. Fotomicrografia de baço de camundongos infectados. Rarefação linfóide em polpa branca (*) em Balb/c (A), XID (B) e XID+B-1 (C). Infiltração linfocitária (seta) em região de polpa vermelha em XID+B-2 (D). Coloração HE.

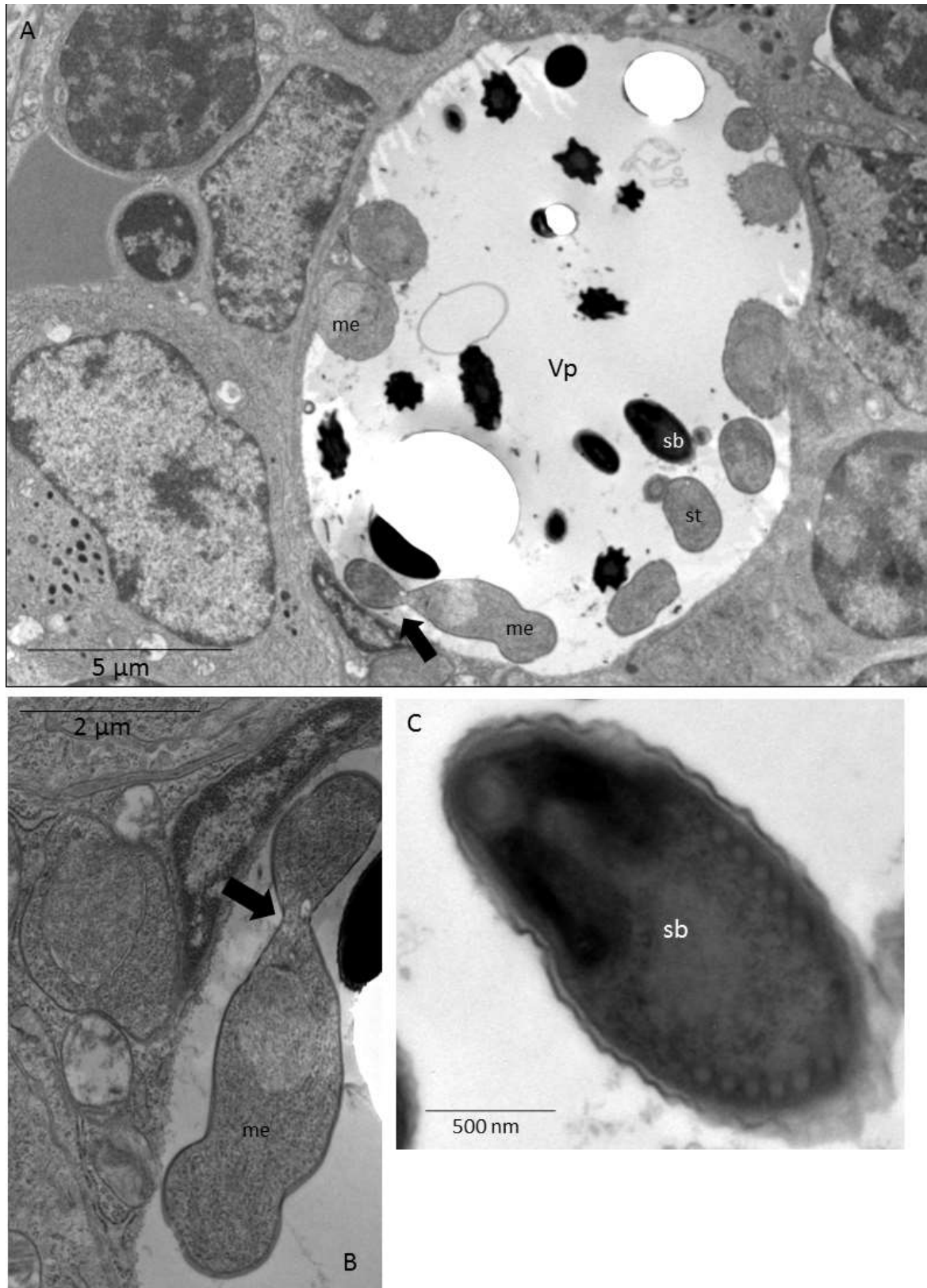


Figura 8. Ultramicrografia de baço de camundongo XID tratado com ciclofosfamida e infectado com *E. cuniculi*. (A) Vacúolo parasitóforo (Vp) com merontes (me) na periferia, em fissão binária (seta) ou não, esporoblastos (sb) e esporonte (st). (B) Detalhe da fissão binária de meronte. (C) Detalhe de esporoblasto.

Camundongos XID mostraram expressivo aumento das populações de células da resposta imunitárias do peritônio. A análise da população de células peritoneais revelou aumento de linfócitos TCD8⁺, TCD4⁺ e de macrófagos em animais XID infectados em relação ao seu respectivo controle não infectado (Fig. 9). Em camundongos Balb/c infectados aos 14 DPI notou-se um aumento da população peritoneal de macrófagos em relação aos controle não infectados, porém aos 21 DPI esta população diminuiu (Fig. 9). Igualmente se observou redução da população de células B-2 em camundongos Balb/c infectados. Na análise separada de camundongos infectados Balb/c e XID, nos dois períodos de observação, as populações peritoneais de linfócitos TCD8⁺, TCD4⁺, B-2 e macrófagos foram maiores em camundongos XID do que em Balb/c (Fig. 9).

Entre os camundongos XID (XID, XID+B-1, XID+B-2) observou-se diminuição nas populações de linfócitos TCD8⁺, TCD4⁺ e células B-2 em camundongos XID+B-2 em relação aos camundongos XID (Fig. 10). Por sua vez, as populações de células B-2 e macrófagos foram maiores em XID+B-1 em relação ao XID (Fig.10).

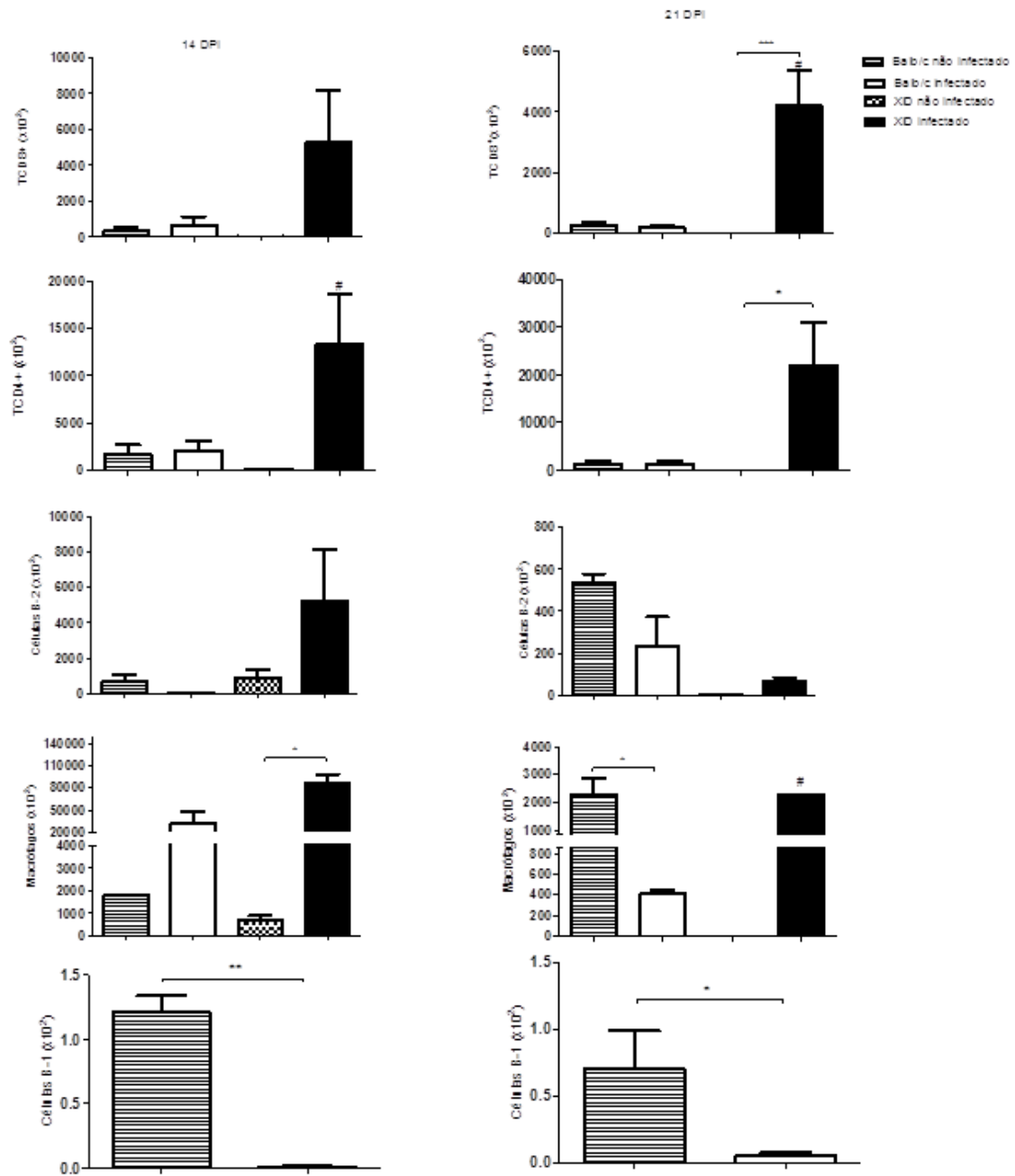


Figura 9. Avaliação das populações peritoneais de células TCD8⁺, TCD4⁺, B-2 e macrófagos de camundongos Balb/c e Balb/c XID imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados ou não com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni *p < 0,5; ***p < 0,001. Para células B-1 análise teste t não pareado. *p < 0,5; **p < 0,01. Test t não pareado. # p<0,5 em comparação com Balb/c infectado.

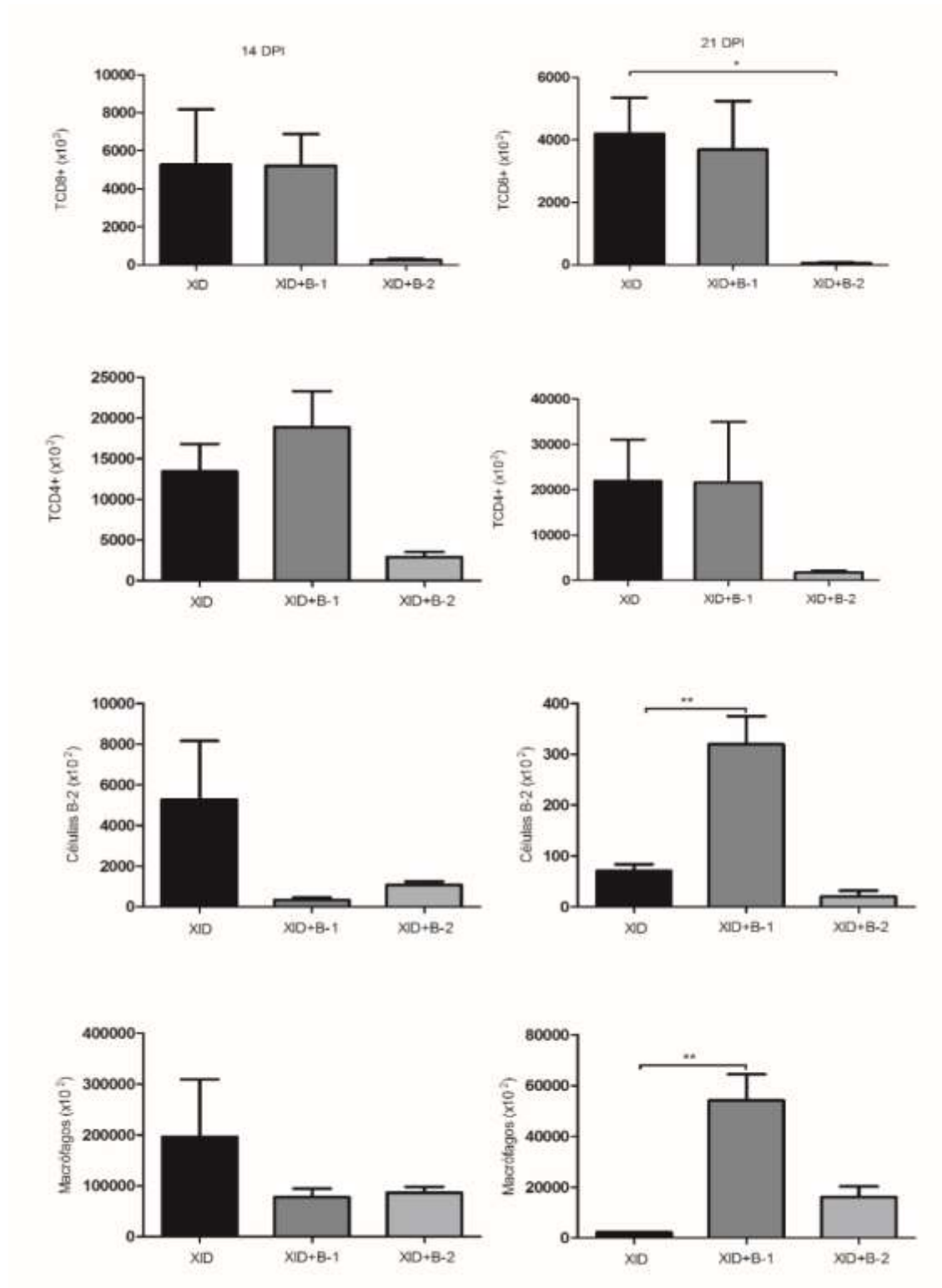


Figura 10. Avaliação da presença de população de células TCD8⁺, TCD4⁺, células B-1, B-2 e macrófagos no peritônio de camundongos XID, XID+B-1 e XID+B-2 imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni. *p < 0,5; **p < 0,01.

Recrutamento das populações de células imunitárias do baço de camundongos Balb/c e ausência em XID. No baço de camundongos Balb/c infectados observou-se aumento da população de linfócitos TCD8⁺, TCD4⁺ e macrófagos em relação ao controle não infectado (Fig. 11), resposta que indica a montagem da reposta imune contra *E. cuniculi* nestes animais. Em camundongos XID não houve alteração nas populações de células da resposta imune (TCD8⁺, TCD4⁺ e macrófagos) do baço em relação aos controle não infectados, com exceção de linfócitos B-2 que reduziram em XID aos 14 DPI (Fig. 11). Portanto, estes resultados apontam para uma ausência de montagem da resposta imune a partir do baço de camundongos XID, sugerindo uma resposta tardia ou atrasada ao patógeno. Entre os camundongos XID (XID, XID+B-1 e XID+B-2) foi evidenciada menor porcentagem de macrófagos nos baços de camundongos XID+B-2, porém estes animais tinham maiores populações de células TCD4⁺ e B-2 (Fig. 12).

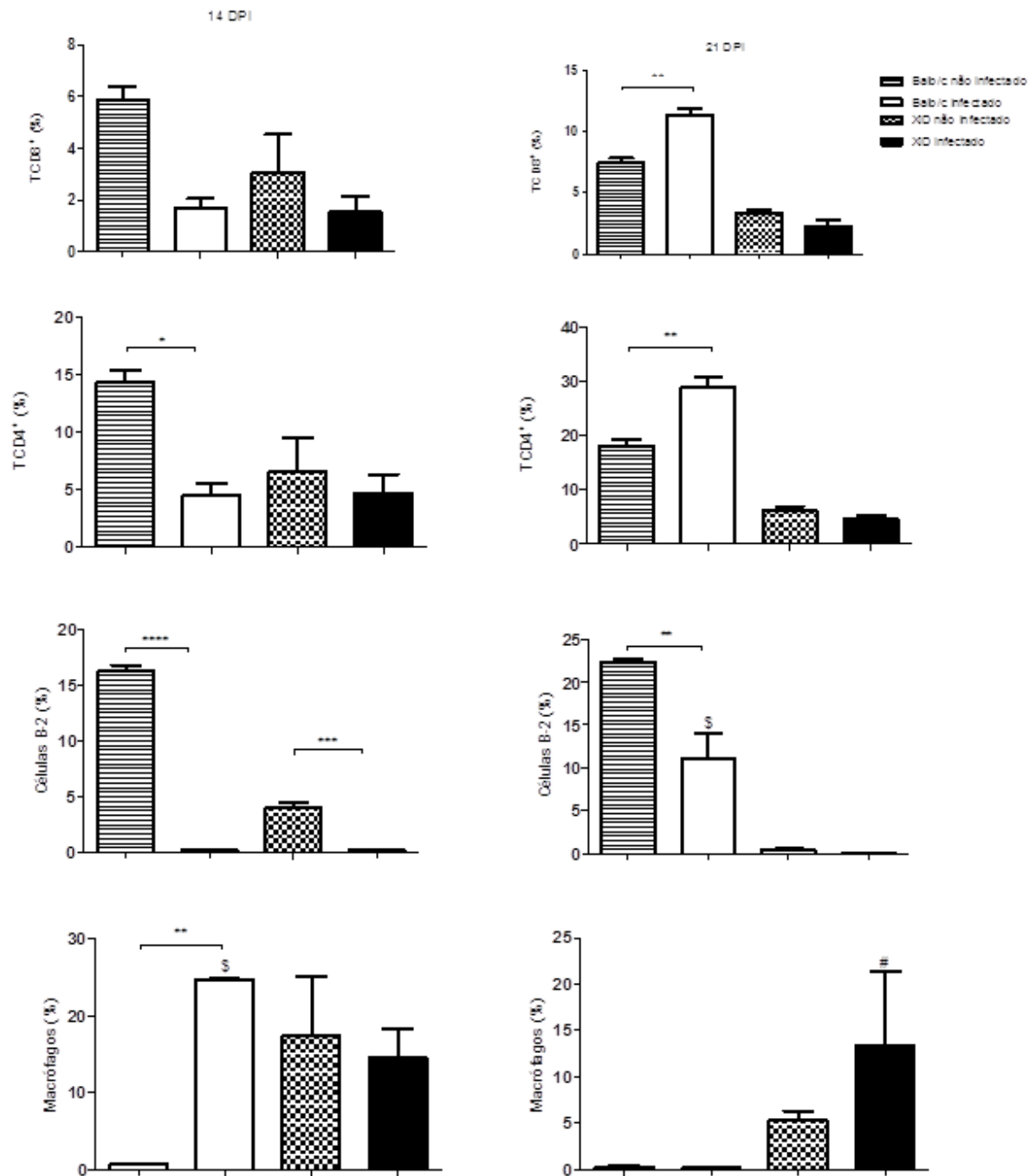


Figura 11. Avaliação das populações esplênicas de células TCD8⁺, TCD4⁺, B-2 e macrófagos de camundongos Balb/c e Balb/c XID imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados ou não com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. A análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni, *p < 0,5; **p < 0,01; ****p < 0,0001. Teste t não pareado \$ p < 0,01 em comparação com XID infectado, # p < 0,0001 em comparação com Balb/c.

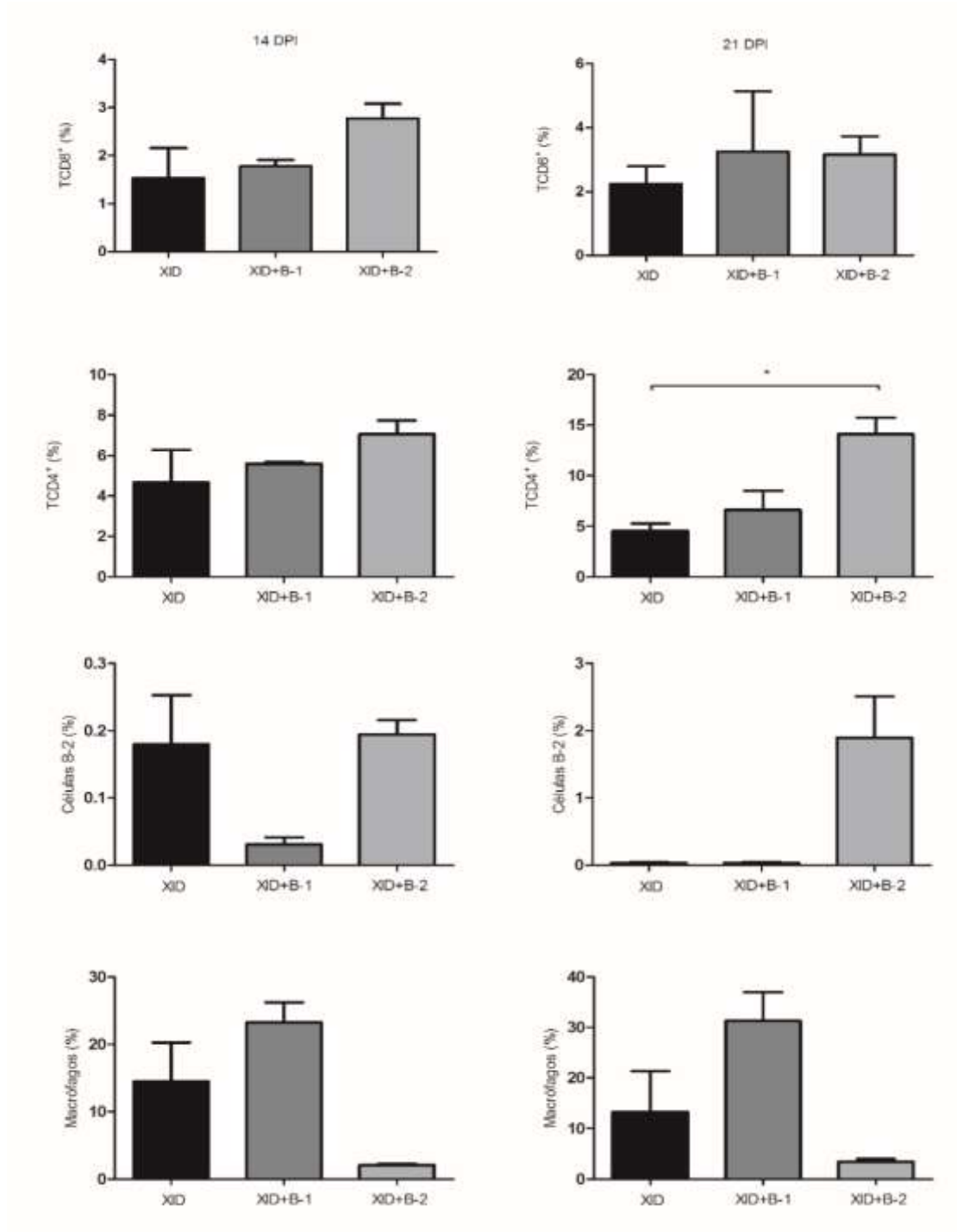


Figura 12. Avaliação das populações de células TCD8⁺, TCD4⁺, células B-1, B-2 e macrófagos no baço de camundongos XID, XID+B-1 e XID+B-2 imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni *p < 0,5.

Infecção por *E. cuniculi* aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias em XID. A dosagem de citocinas no soro permitiu a detecção de aumentos expressivos nos níveis de citocinas pró-inflamatórias interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina – 6 (IL-6) nos camundongos XID infectados em relação aos seus controles não infectados e aos Balb/c (Fig. 13). Embora IL-4 tenha sido identificada, os níveis séricos detectados foram muito baixos e não variaram em relação à infecção. As citocinas IL-2, IL-10 e IL-17 não foram detectadas. Adicionalmente, os camundongos XID tiveram maiores níveis destas citocinas do que os camundongos que receberam transferência adotiva das células B-1 e B-2 (Fig. 14).

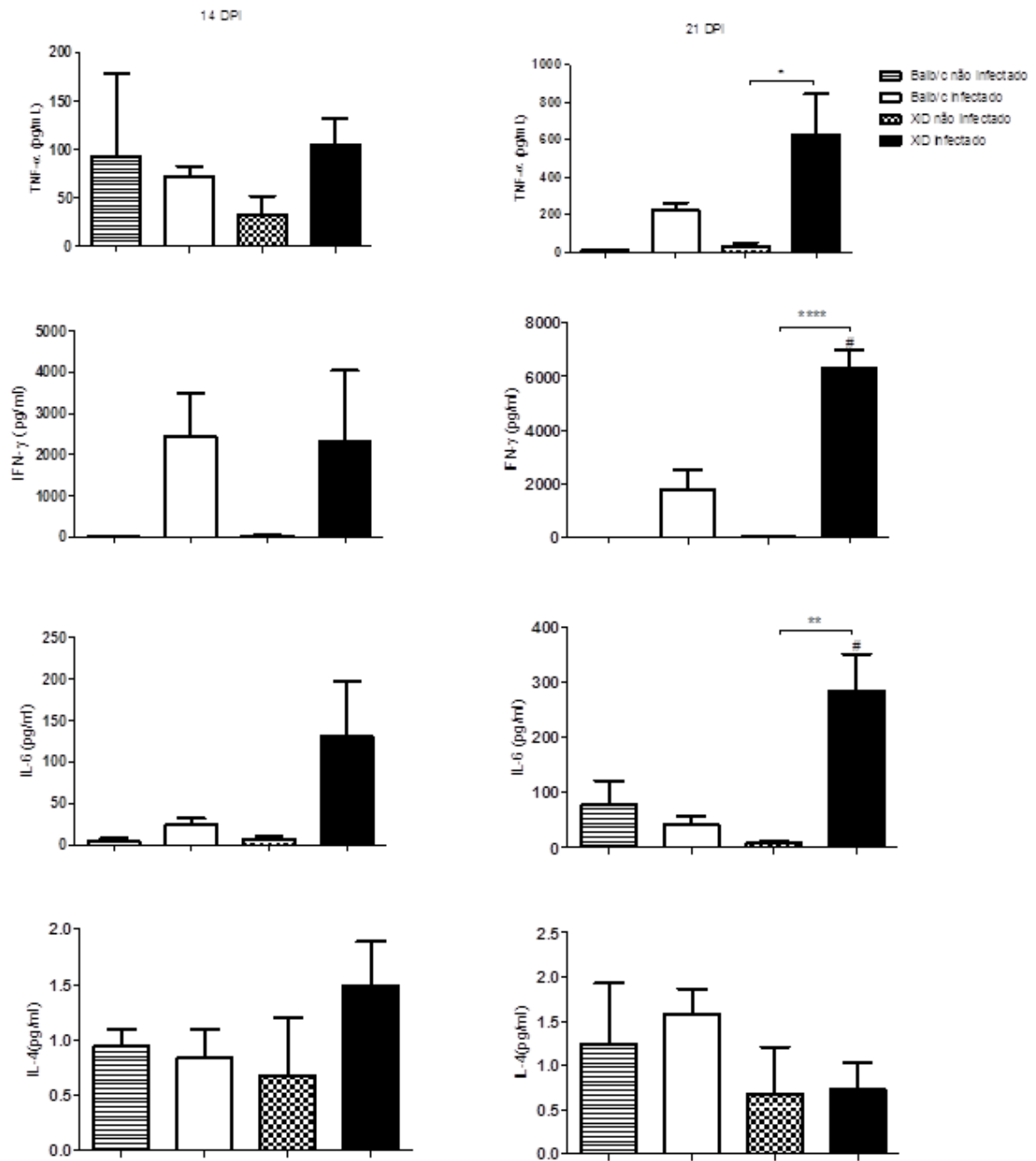


Figura 13. Avaliação de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-4 no soro de camundongos Balb/c e XID imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados ou não com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,000$. Teste t não pareado # $p < 0,01$ na comparação de Balb/c.

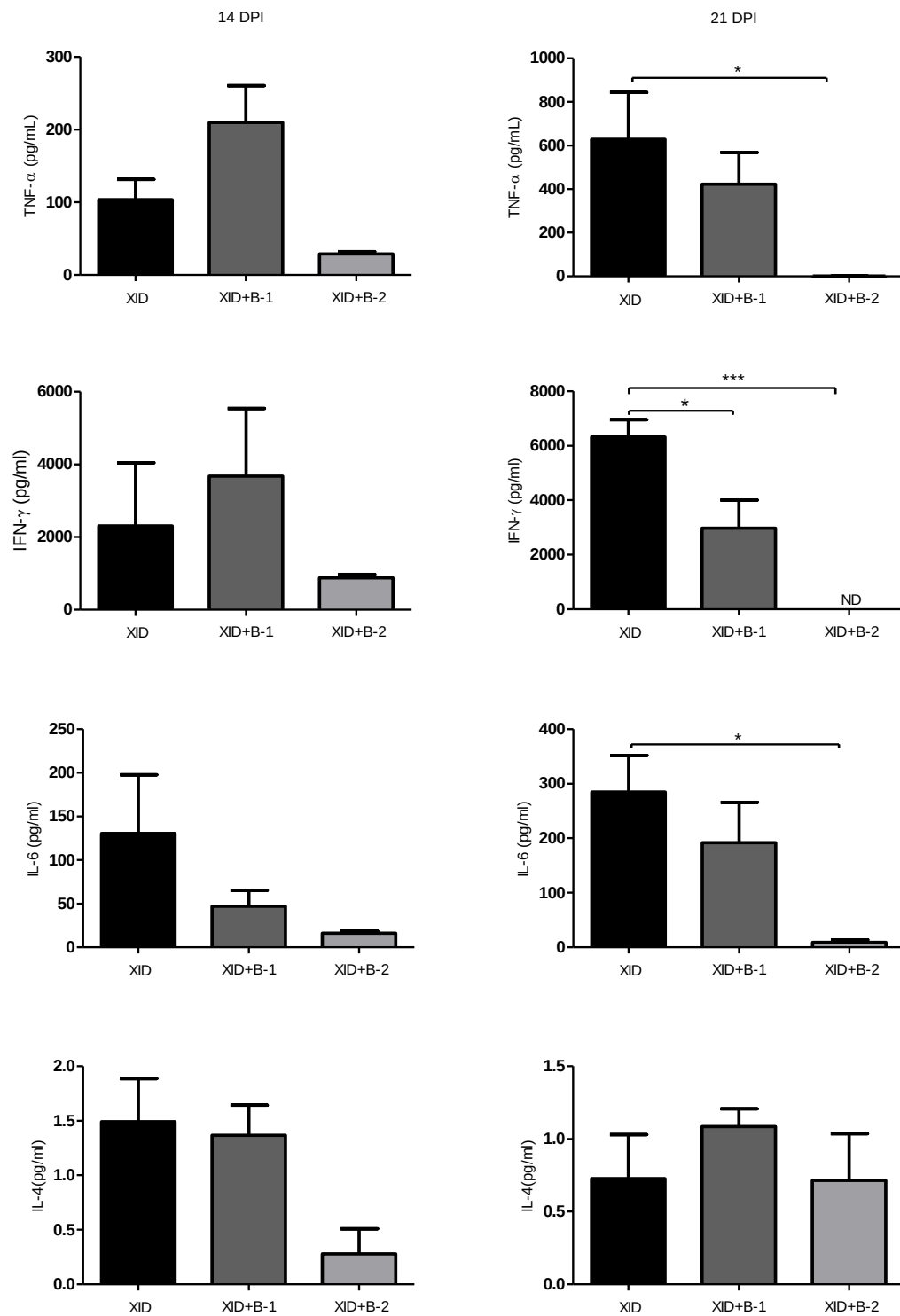


Figura 14. Avaliação de citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-4 no soro de camundongos XID, XID+B-1e XID+B-2 imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni *p < 0,5; *** p < 0,001.

Discussão

Para a manutenção da integridade do organismo aos desafios constantes provocados pelos patógenos, o sistema imune é dotado de uma variedade de tipos celulares. As células B exercem papel importante na resposta inata e adaptativa. Dependendo do patógeno e da porta de entrada, os diferentes subtipos de células B, folicular ou inata, desenvolvem um programa de diferenciação específico, dependente ou independente de células T. As células B foliculares são especializadas na resposta adaptativa e, principalmente, reconhecem proteínas. Por sua vez, as células B da zona marginal e as células B-1 dão suporte à resposta imune inata para antígenos não proteicos. As células B foliculares, localizadas em órgãos linfoides secundários, expressam receptores não específicos (BRC), os quais interagem com antígenos e ativam linfócitos TCD4⁺, iniciando uma resposta T dependente (Vinuesa, Chang, 2013). As células B da zona marginal e as B-1 expressam BCR poliespecíficos e possivelmente autoreativos combinados com diferentes receptores inatos, os quais coordenam os sinais para as células B. Uma vez ativados, diferenciam-se rapidamente em plasmócitos extrafoliculares (de vida curta) com a ajuda de vários tipos de células inatas (Magri *et al.*, 2014).

No presente estudo, nós demonstramos que a deficiência de células B (B-1 e B-2) em camundongos XID em associação com ao tratamento com Cy determinou encefalitozoonose mais grave e disseminada, à semelhança do que foi observado em camundongos SCID e nude (Niederkorn, 1981), portanto, este modelo permite a melhor compreensão dos aspectos da resposta imune envolvidos na encefalitozoonose. As células B-1 peritoneais têm capacidade fagocítica e microbicida (Parra *et al.*, 2012), sendo consideradas muito importantes na defesa do hospedeiro contra a *Coxiella burnetti*, pela sua habilidade de secretar anticorpos, citocinas e promover fagocitose (Schoenlaub *et al.*, 2015). Também foi relatado que camundongos da linhagem CBA/XID são mais suscetíveis ao *Cryptococcus neoformans*, apresentando infecção disseminada (Szymcak *et al.*, 2013), da mesma forma como havia sido observado por nós em estudos anteriores realizados em camundongos XID não imunossuprimidos com Cy, evidenciando menor resistência desses animais à infecção por *E. cuniculi* por via intraperitoneal (da Costa *et al.*, 2017) ou por via oral (dos Santos *et al.*, 2018). Embora a infecção por *E. cuniculi* estimule a produção de altos níveis de anticorpos e uma reação inflamatória em coelhos (Leipig *et al.*, 2013) e raposas (Akerstedt *et al.*, 2002), a transferência adotiva de linfócitos B para camundongos BALB/c nude ou SCID não foi suficiente para impedir da morte de animais infectados por *E. cuniculi* (Enriquez *et al.*, 1998). Contudo a transferência de anticorpos maternos pode proteger coelhos neonatos contra a infecção por

microsporídios (Enriquez *et al.*, 1998), sugerindo que os anticorpos possuem papel secundário da imunidade contra microsporídios. Como camundongos com imunodeficiência ligada ao cromossomo X também possuem deficiência de células B-2, nós realizamos a transferência adotiva de células B-2 para camundongos XID (dados não publicados) e observamos que a mesma determinou *down regulation* nas populações de células imunitárias do peritônio (figuras em anexos) e o resultado foi maior resistência à infecção, com a presença de poucas alterações clínicas e histológicas relativas à encefalitozoonose.

As células TCD8⁺ são críticas para a sobrevivência do hospedeiro infectado por *E. cuniculi*, uma vez que camundongos TCD8^{-/-} morrem após a inoculação do patógeno, manifestando doença grave e disseminada caracterizada por letargia, ascite, hepatite, pneumonia e lesões no baço (Braunfuchsová *et al.*, 2001, Khan *et al.*, 2001; Valencakova e Halanova, 2012). Corroborando com estes autores, no presente estudo os camundongos XID imunossuprimidos tiveram letargia, ascite, hepatite, pneumonia e lesões no baço, porém as populações de linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ no peritônio foram maiores do que em camundongos Balb/c, os quais tiveram uma doença mais branda. Dada a importância dos linfócitos T na resolução da encefalitozoonose, nós hipotetizamos que a maior suscetibilidade de XID à infecção sugere uma ineficiente função dos linfócitos T. Estes resultados corroboram os achados anteriores evidenciando que a deficiência de células B-1 modifica a relação parasita-hospedeiro, pois altera a relação entre células imunitárias e suas funções como demonstrado por outros autores. Russo e Mariano (2010) mostraram que as células B-1 interferem na composição do granuloma pulmonar induzido pelo BCG em camundongos. Nogueira-Martins e Mariano (2010) associaram a maior infiltração de linfócitos T CD8⁺ induzida com células B-1 em enxertos. Margry *et al.* (2013) sugerem que células B-1 peritoneais também possam influenciar na resposta imune ativando células T, sem necessariamente migrar até o órgão linfóide responsável por produzir uma resposta. Desta forma, nós especulamos que a ausência das células B-1 influenciou na capacidade citotóxica destes linfócitos, fenômeno que está sendo estudado por nosso grupo.

Deve-se considerar, no entanto, que o comportamento de linfócitos peritoneais ainda não foi completamente explorado. Camundongos XID, embora com *background* de camundongos Balb/c, apresentam um perfil de resposta Th1 semelhante aos camundongos C57BL/6, assim macrófagos peritoneais ativados por IFN- γ consomem arginina e suprimem a resposta de células T peritoneais (Composto *et al.*, 2011). Este fenômeno poderia explicar a resposta observada em camundongos XID no presente experimento, embora a presença do

patógeno possa promover a proliferação de linfócitos TCD8⁺, justificando o incremento em seu número como observado, a função destas células pode estar suprimida, pela presença de macrófagos e altos níveis de IFN- γ . Ao contrário, os camundongos Balb/c com perfil Th2 e baixa produção de IFN- γ apresentam a ativação de células T peritoneais (Composto *et al.*, 2011), hipótese que pode justificar a ocorrência de menor população peritoneal de linfócitos TCD8⁺ em Balb/c associada à infecção mais branda. Adicionalmente, foi evidenciado aumento da população de células TCD4⁺ e TCD8⁺ no baço de camundongos Balb/c, sugerindo que a população mais efetiva desses linfócitos possa se originar do baço. Este mesmo perfil de reposta dos linfócitos T no peritônio foi identificado em XID+B-1, corroborando os indícios da supressão da atividade dos linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺ em XID. Por outro lado, a transferência adotiva de células B-2 determinou um perfil de população peritoneal semelhante ao Balb/c, aumento expressivo em linfócitos TCD4⁺ e B-2 no baço.

Os microsporídios estão entre os agentes intracelulares mais eficientes e desenvolvidos para o parasitismo. Após a inoculação de *E. cuniculi*, muitos mamíferos têm infecção crônica relacionada com títulos de anticorpos elevados, persistentes e um contínuo processo inflamatório (Shadduck, 1971). Porém, existem linhagens de camundongos, tais como C57BL/6, mais sensíveis e outras mais resistentes à infecção por *E. cuniculi* (Nieder Korn, 1981), corroborando os resultados encontrados neste estudo no grupo XID. Estudo realizado com a linhagem C57BL/6 mostrou que estes camundongos possuem uma alteração genética que compromete a função de linfócitos B, assim anticorpos produzidos por estes animais poderiam possuir baixa eficiência (Mahajan *et al.*, 2016). Em camundongos C57BL/6, níveis elevados de anticorpos foram identificados após 14 dias de infecção experimental com *E. cuniculi*, porém estes animais manifestaram lesões importantes em fígado e encéfalo associadas à presença de esporos do patógeno (Gannon, 1980). Ressalta-se também que esta linhagem de camundongo produz citocina mais tardiamente que camundongos Balb/c, com nítido atraso na mobilização da resposta imune (Liu *et al.*, 1989).

Adicionalmente, os animais XID mostraram níveis de citocinas pró-inflamatórias com perfil Th1 mais elevadas que camundongos Balb/c, o que pode explicar em parte o estado doentio mais grave desses animais e corrobora a ideia de um perfil semelhante aos camundongos C57BL/6. Entre essas citocinas observou-se aumento expressivo de IFN- γ , TNF- α e IL-6 as mesmas citocinas identificadas em estudos anteriores em camundongos não tratados com Cy (Salát *et al.*, 2006, Jelinek *et al.*, 2007). O papel das citocinas na resposta imunitária às infecções por microsporídios foi examinado em vários modelos animais e em

estudos *in vitro* (Salát *et al.*, 2004, Jelinek *et al.*, 2007). As citocinas Th-1 (principalmente IFN- γ) desempenham um papel importante durante as infecções por microsporídios em camundongos imunodeficientes (Salát *et al.*, 2006). Francisco Neto *et al.* (2017) demonstraram que o tratamento de camundongos diabéticos e infectados com Cy promoveu o aumento na produção de IFN- γ , pois animais diabéticos infectados não tratados tinham baixa produção desta citocina, sugerindo um papel imunomodulador de Cy. Os resultados aqui apresentados mostram que o efeito conjunto da infecção e o tratamento com Cy determinaram alta produção de IFN- γ , dados também observados em Balb/c. Ressalta-se que a Cy está associada ao aumento de IFN- γ e outras citocinas pró-inflamatórias em soro *in vivo* (Radojcic *et al.*, 2010).

Em relação aos macrófagos, os camundongos XID infectados também apresentaram aumento desta população no peritônio. Pereira *et al.* (Dados não publicados) demonstraram *in vitro* que os macrófagos de lavado peritoneal de camundongos XID possuem predomínio de macrófagos com perfil M2, alta atividade fagocítica e baixa atividade microbicida, um fenômeno que poderia explicar a gravidade da doença em XID, já que macrófagos M2 podem favorecer a disseminação do patógeno atuando como cavalo de Tróia. Nos camundongos Balb/c, as áreas lesionais no fígado decorrentes de infiltração mononuclear predominante foram significativamente maiores do que em XID, sugerindo que esta resposta inflamatória conteve parcialmente o desenvolvimento do patógeno.

A Cy é um fármaco conhecido por modular a imunidade adaptativa e inata, sendo empregada com objetivo de determinar imunossupressão e tornar camundongos mais suscetíveis às doenças oportunistas, tais como a encefalitozoonose (Lallo, Hirschfeld, 2012), mimetizando condições clínicas observadas em pacientes que recebem quimioterapia para tratamento de câncer ou de doenças autoimunes. A Cy é um alquilante citotóxico que se liga ao DNA e causa apoptose, assim atrasa e suprime a resposta de células T e B, causa mielossupressão e afeta neutrófilos, linfócitos, hemácias e plaquetas (Brodsky, 2010). Sugere-se que o tratamento com Cy tem efeito diferencial em compartimentos de linfócitos, podendo rapidamente esgotar as células B e T, sendo seguido pela recuperação, proliferação e mobilização extensiva da medula óssea (Brode, Cooke, 2008, Emadi *et al.*, 2009, Schiavoni *et al.*, 2017). No presente estudo, empregando Cy, nós demonstramos que os camundongos XID infectados tiveram quadro clínico de encefalitozoonose mais grave do que em camundongos Balb/c. Apesar da atividade imunossupressora deste fármaco, as populações peritoneais de linfócitos T, de macrófagos e de citocinas pró-inflamatórias em XID infectados aumentaram,

embora as populações esplênicas tenham se mantido semelhantes aos controles não infectados. Por outro lado, em camundongos Balb/c, nós observamos que as populações esplênicas de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos aumentaram, indicando recrutamento da resposta imune frente ao microsporídio apesar da imunossupressão. Assim, a inoculação de *E. cuniculi* resultou em aumento de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos, fato que poderia ser explicado por este efeito rebote e pela estimulação produzida pelo patógeno, porém estas populações eram muito menores que as observadas em animais não tratados, que justifica sua maior suscetibilidade à encefalitozoonose.

Em conclusão, os nossos resultados indicaram que camundongos XID imunossuprimidos com Cy apresentaram encefalitozoonose grave e disseminada à semelhança do que se observa em camundongos *nude* ou *SCID*. Na resposta imune destes animais demonstrou-se aumento de populações peritoneais de TCD8⁺, TCD4⁺ e macrófagos, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento da resposta esplênica incipiente, indicando que o tratamento com Cy evidencia ainda mais a participação de células B-1 e B-2 da imunidade contra microsporídios.

Referências

- Almeida, L., Aroeira, S., Frymuller, E., Dias, M.A., Bogsan, C.S., Lopes, J.D., Mariano, M., 2001. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int. Immunol.* 13, 1193-1201.
- Anane, S., Attouchi, H., 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34, 450-464.
- Akerstedt, J., Nordstoga, K., Mathis, A., Smeds, E., Deplazes, P., 2002. Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 49, 400-485.
- Baumgarth, N., 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nature Rev. Immunol.* 11(1), 34-46.
- Berland, R., Wortis, H. H., 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 253-300.
- Braunfuchsová, P., Salát, J., Kopecký, J., 2001. CD8⁺ T-lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Int. J. Parasitol.* 15, 681-686.
- Brode, S., Cooke, A., 2008. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit. Rev. Immunol.* 28,109-126.
- Brodsky R.A., 2010. High-dose cyclophosphamide for autoimmunity and alloimmunity. *Immunol. Res.* 47,179–184.
- Cantwell, GE, 1970. Standard methods for counting *Nosema* spores. *Am. Bee J* 110: 222- 223.
- Composto, G., Gonzalez, D., Bucknum, A., Silberman, D., Taylor, J., Kozlowski, M., 2011. Peritoneal T lymphocyte regulation by macrophages. *Immunobiol.* 216(1-2), 256-264.
- 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.

dos Santos DL, Alvares-Saraiva AM, Xavier JG, Spadacci-Morena DD, Peres, GB, Rocha PRD, Perez EC, Lallo MA. 2018. B-1 cells upregulate CD8 T lymphocytes and increase proinflammatory cytokines serum levels in oral encephalitozoonosis. *Micr. Infec.* 20(3) 196-204.

Didier, E.S., Weiss, L.M., 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24,490-495.

Didier, E.S., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M., Millichamp, N.J., Murphey-Corb, M. *et al.*, 1994. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol.* 41:1-11.

Emadi, A.I., Jones, R.J., Brodsky, R.A., 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6, 638–647.

Enriquez, F.J., Wagner, G., Fragoso, M., Ditrich, O., 1998. Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development *in vitro*. *Parasitol.* 117, 515-520.

Francisco Neto, A., Dell'Armeline Rocha, P.R., Perez, E.C., Xavier, J.G., Peres, G.B., Spadacci-Morena, D.D. *et al.* 2017. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *PlosOne.* 1 (12), e0186954.

Gannon, J. 1980. The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab Anim.* 14:189-192.

Hayakawa, K., Hardy, R.R., Stall, A.M., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., 1986. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur. J. Immunol.* 16(10), 1313-1316.

Herzenberg, L.A., Kantor, A.B., 1993. B-cell lineages exist in the mouse. *Immunol. Today*, 14, 79–83.

Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 29: 577-80.

Jelinek, J., Salat, J., Sak, B., Kopecký, J., 2007. Effects of interferon gamma and specific polyclonal antibody on the infection of murine peritoneal macrophages and murine macrophage cell line PMJ2-R with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol.* 54,172-176.

Keeling, P.J., Fast, M.N. 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 93-116.

Khan, I.A., Moretto, M., Weiss, L.M., 2001. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect.* 3, 401–405.

Kicia, M., Wesolowska, M., Jakuszko, K., Kopacz, Z., Sak, B., Květonova, D., Krajewka, M., Kváč, M. 2014. Concurrent infection of the urinary tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 52,1780-1782.

Kotkova, M., Sak, B., Kvetonova, D., Kavc, M., 2013. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS One*, 8(4), e60941.

Koudela, B., Vítovec, J., Kucerová, Z., Ditrich, O., Tránicek, J. 1994. The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol.* 40:279-286.

Lallo, M.A., Hirschfeld, M.P.M., 2012. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. *Exp. Parasitol.* 131, 339-343.

Lallo, M.A., Bondan, E.F., 2005. Experimental meningoencephalomyelitis by *Encephalitozoon cuniculi* in Cyclophosphamide-immunosuppressed mice. *Arq. Neuro-Psiq.* 63, 246-251.

Leipig, M., Matiassek, K., Rinder, H., Janik, D., Emrich, D., Baiker, K., Hermanns, W., 2013. Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 16-26.

Mahajan VS, Demissie E, Mattoo H, Viswanadham V, Varki A, Morris R, Pillai S, 2016. Striking immune phenotypes in gene-targeted mice are driven by a copy-number variant originating from a commercially available C57BL/6 strain. *Cell Report* 15, 1901–1909.

Magri, G., Miyajima, M., Bascones, S., Mortha, A., Puga, I., Cassis, L., *et al.* 2014. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol.* 15(4):354-364.

Margry, B., Wieland, W.H., van Kooten, P.J., van Eden, W., Broere, F. 2013. Peritoneal cavity B-1a cells promote peripheral CD4⁺ T-cell activation. *Eur. J. Immunol.* 43(9), 2317-2326.

Moretto, M., Durell, B., Schwartzman, J.D., Khan, I., 2001. Gamma delta T cell-deficient mice have a down-regulated CD8⁺ T cell immune response against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol*, v. 166, n. 12, p. 7389-97.

Mukhopadhyay, S., Mohanty, M., Mangla, A., George, A., Bal, V., Rath, S., *et al.*, 2002. Macrophage effector functions controlled by Bruton's tyrosine kinase are more crucial than the Cytokine balance of T cell responses for microfilarial clearance. *J. Immunol.* 168, 2914-2921.

Nierderkorn, J.Y., Shadduck, J.A., Schmidt, E.C. 1981. Susceptibility of selected inbred strains of mice to *Encephalitozoon cuniculi*. *J Infec Dis.* 144, 249-253.

Nogueira-Martins, M.F., Mariano, M., 2010. B-1 cell participation in T-cell-mediated alloimmune response. *Immunobiol.* 215, 264-274.

Parra, D., Rieger, A.M., Li, J., Zhang, Y-A., Randall, L.M., Hunter, C.A., *et al.*, 2012. Pivotal Advance: Peritoneal cavity B-1 B cells have phagoCytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4⁺ T cells. *J. Leuk. Biol.* 91, 525-536.

Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie Springer Verlag.* 38(6), 558-565.

Proietti, E., Greco, G., Garrone, B., Baccarini, S., Mauri, C., Venditti, M., *et al.*, 1998. Importance of Cyclophosphamide-induced bystander effect on T cells for a successful tumor eradication in response to adoptive immunotherapy in mice. *J. Clin. Invest.* 101(2), 429-441.

Radojcic, V., Bezak, K.B., Skarica, M., Pletneva, M.A., Yoshimura, K., Schulick, R.D., *et al.*, 2010. Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances

antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination. *Cancer Immunol. Immunother.* 59(1), 137–148.

Russo, R.T., Mariano, M., 2010. B-1 cell protective role in murine primary *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection. *Immunobiol.* 215, 1005-1014.

Santín, M., Fayer, R., 2011. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Res. Vet. Sci.* 90 (3), 363-371.

Salát, J., Horká, H., Sak, B., Kopecký, J., 2006. Pure CD4⁺ T-lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol. Res.* 99, 682–686.

Schmidt, E.C., Shadduck, J.A. 1983. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of chronic infection. *Infect Immun.* 40:936-2.

Shadduck, J.A., Pakes, S.P., 1971. Spontaneous diseases of laboratory animals which interfere with biomedical research encephalitozoonosis and toxoplasmosis. *Am. J. Pathol.* 64, 657-674.

Schiavoni, G., Mattei, F., di Puccio, T., Santini, S.M., Bracci, L., Belardelli, F. *et al.*, 2000. Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44^{hi} T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer. *Blood*, 95(6), 2024-2030.

Sindhava, V., Woodman, M.E., Stevenson, B., Bondada, S. 2010. Interleukin-10 mediated autoregulation of murine B-1 B-cells and its role in *Borrelia hermsii* infection. *Plos One.* 5(7), e11445.

Snowden, K.F., Didier, E.S., Orenstein, J.M., Shadduck, J.A. 1998. Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci.* 48:589-595.

Suzuki, K., Maruya, M., Kawamoto, S., Fagarasan, S., 2010. Roles of B-1 and B-2 cells in innate and acquired IgA-mediated immunity. *Immunol Rev.* 237(1),180-190.

Szymczak, W.A., Davis, M.J., Lundy, S.K., Dufaud, C., Olszewski, M., Pirofski, L.A., 2013. X-linked immunodeficient mice exhibit enhanced susceptibility to *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio.* 2:e00265-13. doi: 10.1128/mBio.00265-13.

Valencakova, A., Halanova, M., 2012. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 35, 1-7.

Vetrie, D., Vorechovský, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., *et al.*, 1993. The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, 361, 226-233.

Vinuesa, C.G., Chang, P.P. 2013. Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses. *Nat Immunol.* 14(2):119–126.

Anexo

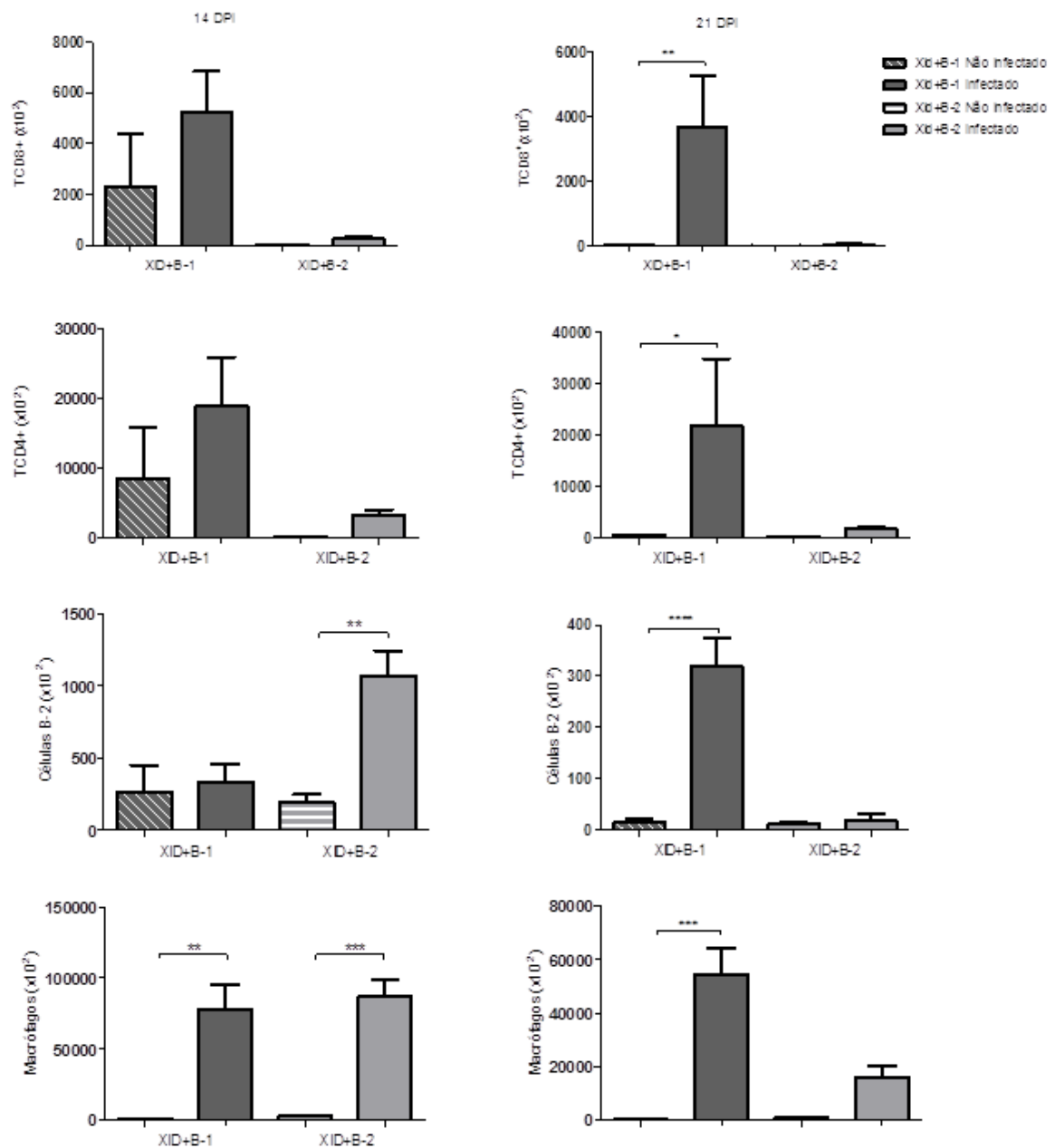


Figura 15. Avaliação das populações de células TCD8⁺, TCD4⁺, B-2 e macrófagos no peritônio de camundongos XID+B-1 e XID+B-2 imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados ou não com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni * p < 0,5; **p<0,001; *** p < 0,001; ****p<0,0001.

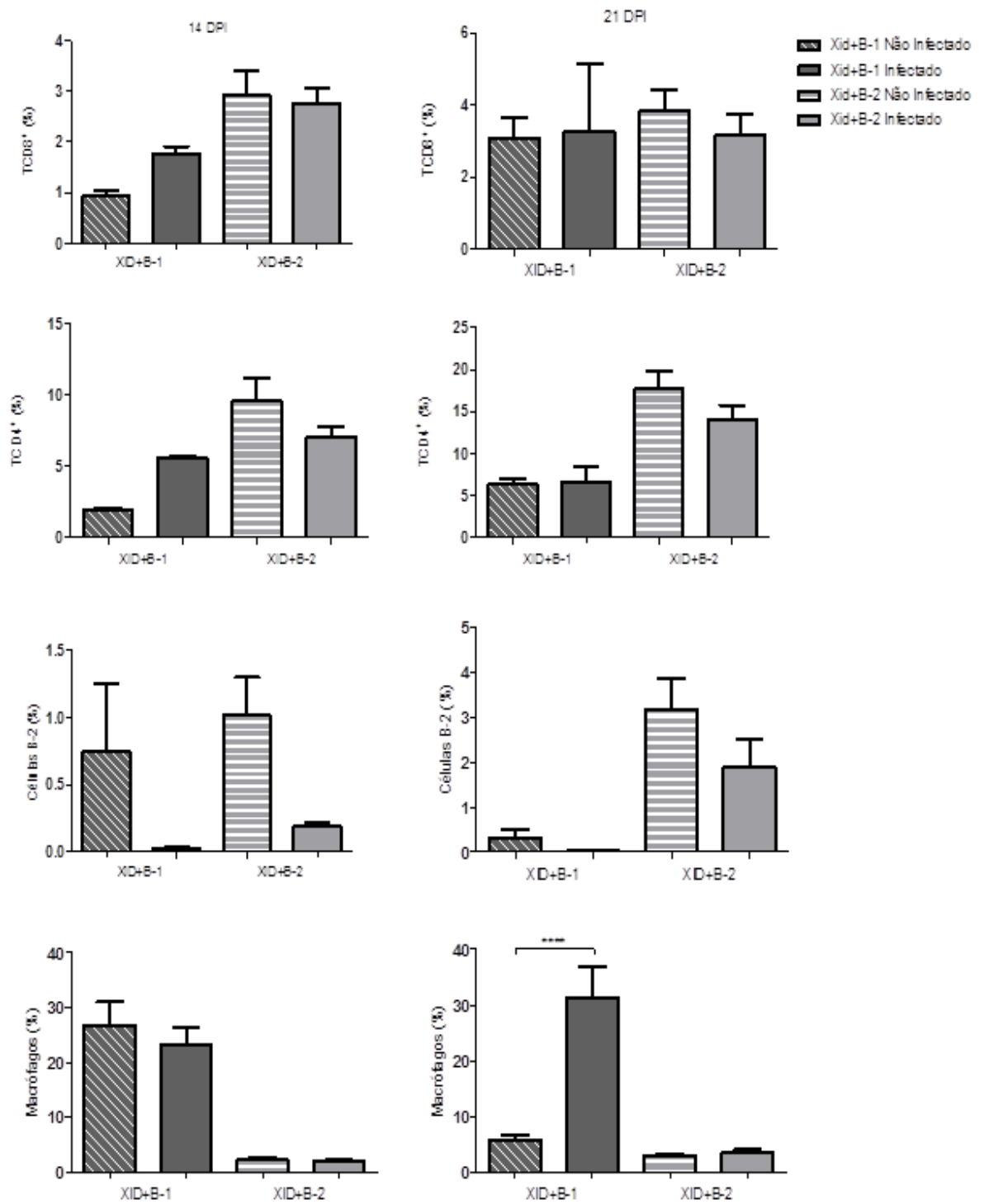


Figura 16. Avaliação das populações de células TCD8⁺, TCD4⁺, B-2 e macrófagos no baço de camundongos XID+B-1 e XID+B-2 imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados ou não com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni ****p < 0,0001.

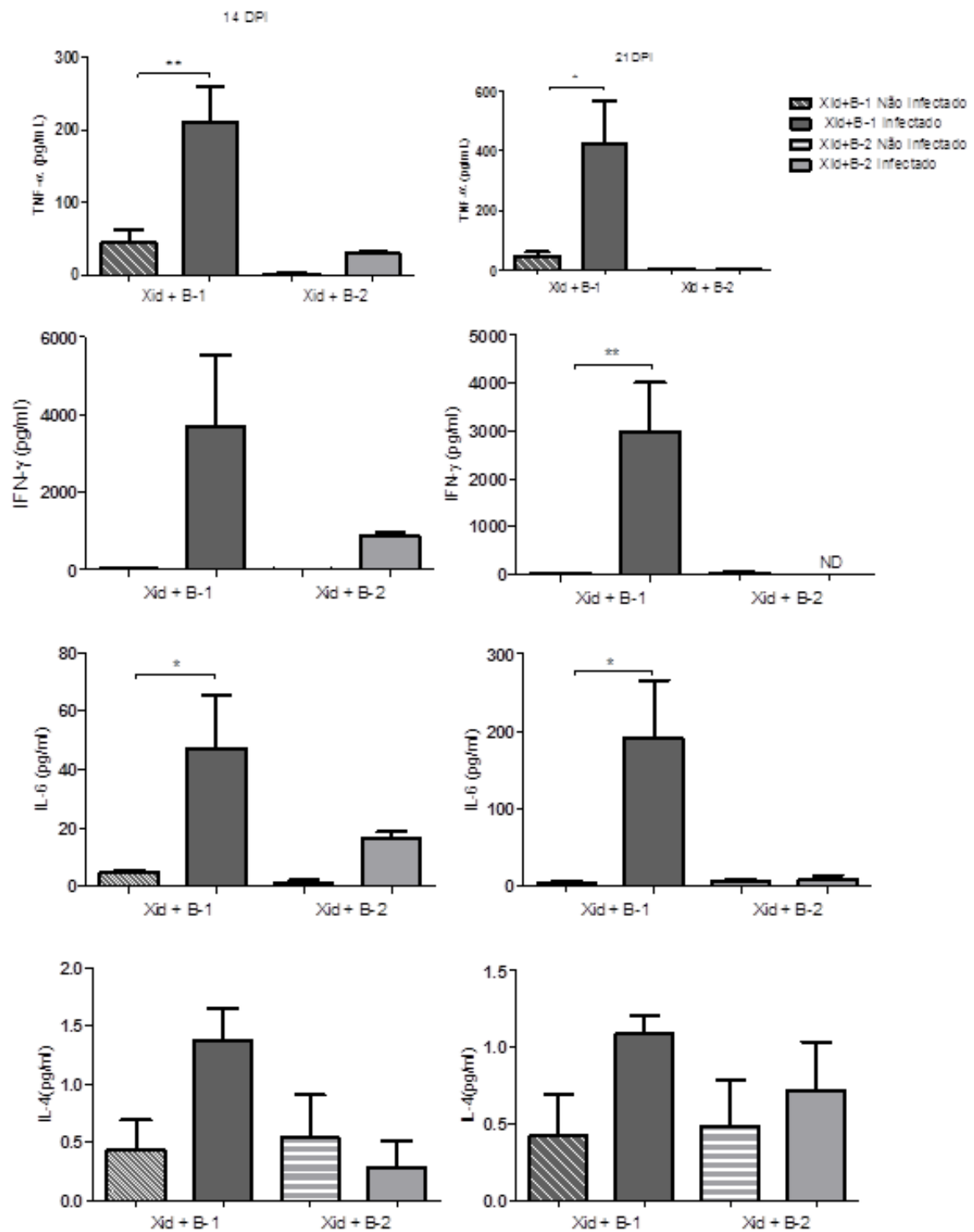


Figura 17. Avaliação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-4 no soro de camundongos Xid+B-1 e Xid+B-2 imunossuprimidos com ciclofosfamida e infectados ou não com *E. cuniculi*, aos 14 e 21 DPI. Análise de variância ANOVA de uma via com comparações múltiplas e pós-teste Bonferroni * $p < 0,5$; ** $p < 0,001$.