

UNIVERSIDADE PAULISTA

**O papel das células B-1 na redução da suscetibilidade
à infecção oral pelo *Encephalitozoon cuniculi***

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

DENISE LANGANKE DOS SANTOS

SÃO PAULO
2016

UNIVERSIDADE PAULISTA

**O papel das células B-1 na redução da suscetibilidade
à infecção oral pelo *Encephalitozoon cuniculi***

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

Orientador: Prof.^a Dra. Maria Anete Lallo.

Coorientadora: Dra. Anuska Marcelino Alvares-Saraiva

DENISE LANGANKE DOS SANTOS

SÃO PAULO

2016

Santos, Denise Langanke dos.

O papel das células B-1 na redução da suscetibilidade à infecção oral
pelo *Encephalitozoon cuniculi* / Denise Langanke dos Santos. - 2016.
44 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Patologia Ambiental Experimental.

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

Coorientadora: Prof.^a Dra. Anuska Marcelino Alvares-Saraiva.

1. Camundongos XID. 2. Células B-1. 3. Encefalitozoonose.

4. *Interferon*. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Alvares-Saraiva,
Anuska Marcelino (coorientadora). III. Título.

DENISE LANGANKE DOS SANTOS

**O papel das células B-1 na redução da suscetibilidade
à infecção oral pelo *Encephalitozoon cuniculi***

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

Aprovado em: ____/____/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Maria Anete Lallo
Universidade Paulista - UNIP

Dra. Anuska Marcelino Alvares-Saraiva
Universidade Paulista - UNIP

Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha
Universidade Paulista - UNIP

Dra. Diva Denelle Spadacci-Morena
Instituto Butantan

Dr. Bruno Camolese Vivanco
UNIFESP

**O papel das células B-1 na redução da suscetibilidade à infecção oral pelo
*Encephalitozoon cuniculi***

Denise Langanke dos Santos¹, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva¹, José Guilherme Xavier¹, Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha¹, Elizabeth Christina Perez Hurtado¹, Diva Denelle Spadacci-Morena², 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

Microsporídios são patógenos intracelulares e oportunistas, causadores de graves doenças em indivíduos imunocomprometidos e em animais. Demonstramos recentemente que camundongos XID são mais suscetíveis à encefalitozoose causada pela infecção intraperitoneal por *E. cuniculi* e o papel de células B-1 na resistência à infecção foi evidenciado. Nesse contexto, este estudo tem como foco a elucidação dos mecanismos de resistência e suscetibilidade contra a infecção oral pelo *E. cuniculi*, incluindo o papel de células B-1, utilizando-se camundongos BALB/c e BALB/c XID. Para tanto, foi utilizada a citometria de fluxo para caracterizar as populações celulares na cavidade peritoneal, baço e placas de Peyer e, ainda, quantificar os níveis séricos de citocinas dos perfis *Th1*, *Th2*, *Th17*. A infecção foi avaliada pela carga parasitária no

intestino e pela análise histopatológica de fragmentos de intestinos, pulmões e fígado. Os animais infectados pela via oral não apresentaram sintomas aparentes da encefalitozoonose. Já a análise histopatológica revelou enterite crônica com infiltrado linfoplasmocítico discreto e com degeneração dos ápices das vilosidades nos intestinos desses animais. Foi observada maior carga parasitária em camundongos BALB/c XID. No baço, todos os animais infectados tiveram diminuição das populações de células B-2, T CD4⁺ e T CD8⁺. Células B-1 e B-2 diminuíram na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c XID e XID+B-1 infectados; a população de macrófagos estava aumentada apenas em camundongos BALB/c. As citocinas proinflamatórias aumentaram, principalmente, em camundongos XID+B-1. Em conjunto, esses resultados demonstram que camundongos BALB/c XID foram mais suscetíveis à encefalitozoonose, sugerindo o papel de células B-1 na regulação da resposta imune contra a infecção oral por *E. cuniculi*.

Palavras-chave: camundongos XID, células B-1, encefalitozoonose, interferon.

Abstract

Microsporidia are intracellular pathogens that cause severe disease in immunocompromised humans and animals. We recently demonstrated that XID mice are more susceptible to *Encephalitozoon cuniculi* infection by peritoneal route, evidencing the role of B-1 cells are important in the resistance against infection. The present study aimed to evaluate the mechanisms of resistance and susceptibility against *E. cuniculi* oral infection, including the role of B-1 cells, using BALB/c and BALB/c XID mice. Flow cytometry was used to characterize the immune cells in the peritoneal cavity, spleen and Peyer's patches and also to quantify the serum levels of *Th1*, *Th2* and *Th17* cytokines. Moreover, histopathology was performed in the intestines, lungs and

liver. No clinical symptoms were observed in infected animals but histopathological analysis revealed lymphoplasmocytic enteritis with degeneration of the apices of the villi in all infected groups. Higher parasite burden was observed in infected BALB/c XID mice. In the spleen, all infected mice showed a decrease of B-2, T CD4⁺ and T CD8⁺ cells. B-1 and B-2 cells decreased in the peritoneal cavity of infected BALB/c XID and XID+B-1 mice. Macrophages increased only in infected BALB/c mice. Pro-inflammatory cytokines increased mostly in infected XID+B-1 mice. Together, the present results demonstrated that BALB/c XID mice were more susceptible to encephalitozoonosis suggesting that B-1 cells play a role in the control of the immune response against *E. cuniculi* oral infection.

Keywords: B-1 cells, encephalitozoonosis, interferon, XID mice.

Introdução

O filo Microsporidia, constituído por mais de 1.200 espécies, pertence ao Reino Fungi e compreende patógenos intracelulares obrigatórios considerados emergentes nas áreas de saúde veterinária e humana (Santín e Fayer, 2011). São responsáveis por perdas econômicas ao atingir animais domésticos e selvagens, em especial os animais de produção e consumo (Scorza *et al.*, 2011; Jamshidi *et al.*, 2012). O potencial zoonótico foi identificado em 17 espécies, sendo que as espécies do gênero *Encephalitozoon* são responsáveis por grande parte das microsporidioses prevalentes em humanos e também em outros animais (Weber *et al.*, 2000; Didier *et al.*, 2004; Didier e Weiss, 2006). São patógenos oportunistas que acometem indivíduos imunossuprimidos pelo vírus HIV, por quimioterapia ou qualquer terapia imunossupressora, assim como acometem idosos

e crianças que também estão entre as populações mais suscetíveis. (Mathis *et al.*, 2005; Didier *et al.*, 2009; Reetz *et al.*, 2009)

A resistência aos microsporídios depende da interação entre o patógeno e os componentes da resposta imune do hospedeiro, (Didier *et al.*, 2004; Moretto *et al.*, 2007), sendo que nas infecções por *Encephalitozoon* sp existe uma cooperação entre a imunidade adaptativa e a inata. Inicialmente, a doença foi associada à deficiência de linfócitos T observada em pacientes com imunodeficiência adquirida pelo vírus HIV, os quais apresentavam doenças oportunistas ao atingir baixos níveis de linfócitos T CD4⁺ (Anane e Attouchi, 2010). No entanto, estudos experimentais mostraram que a base desta imunidade reside na atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺, uma vez que camundongos *knockout* para estas células morrem de encefalitozoonose (Moretto *et al.*, 2004). Contudo, as relações entre as células do sistema imune não são tão simples, sendo demonstrado que a ativação de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ depende da via de infecção (Braunfuchsová *et al.*, 2001). Na infecção por via intraperitoneal, a ativação de linfócitos T CD8⁺ é independente de células T CD4⁺, em contraste, a inoculação por via oral revelou que células T CD4⁺ têm função fundamental na aquisição da imunidade, atuando sinergicamente com os linfócitos T CD8⁺ (Moretto *et al.*, 2001).

Ainda é pouco esclarecida a relevância das células B nas microsporidioses, uma vez que se observa grande produção de anticorpos na doença crônica em coelhos (Leipig *et al.*, 2013) e raposas (Akerstedt, 2002; Akerstedt *et al.*, 2002). Em camundongos *nude* ou *SCID*, a transferência adotiva de linfócitos B não é capaz de garantir a proteção contra *E. cuniculi*, porém coelhos recém-nascidos são protegidos contra encefalitozoonose quando recebem anticorpos maternos específicos (Enriquez, Taren, *et al.*, 1998; Enriquez, Wagner, *et al.*, 1998). Assim são necessários novos

estudos para compreender melhor o papel das células B na imunidade contra os microsporídios.

Os linfócitos B podem ser divididos em células B-2, que são abundantes no baço, linfonodos e sangue periférico de camundongos e continuamente surgem de precursores de medula óssea, e células B-1, que surgem de progenitores fetal e neonatal no início da vida (Hayakawa *et al.*, 1986). São predominantes em cavidades peritoneais e pleurais de camundongos e podem ser distinguidos pela expressão de marcadores de superfície específicos, pela capacidade de auto-renovação e pela produção de anticorpos naturais (Berland e Wortis, 2002). Classicamente, as células B-1 são encontradas na cavidade peritoneal e em outras cavidades serosas e expressam altos níveis de IgM, baixos níveis de IgD e CD11b em sua superfície (Montecino-Rodriguez e Dorshkind, 2006). A produção de anticorpos IgM pelas células B-1 na resposta imune inata é apontada como elemento primário no desenvolvimento da imunidade adaptativa humoral e celular, fenômeno reconhecido em infecções por bactérias e por vírus, como da estomatite vesicular e influenza (Choi e Baumgarth, 2008). Estudo prévio do nosso grupo mostrou aspectos patogênicos e imunológicos em infecção experimental por *E. cuniculi* em camundongos BALB/c e BALB/c XID (animais com deficiência de células B-1) pela via intraperitoneal. Foi observada maior resistência à encefalitozoonose em camundongos BALB/c, sendo esta, atribuída às células B-1 (Da Costa *et al.*, 2016).

Pesquisas realizadas com outros patógenos inoculados por via oral (Chardès *et al.*, 1994) mostraram que a resposta imune da mucosa intestinal possui um papel crítico na proteção de hospedeiros infectados, o que foi também demonstrado para microsporídios em estudo realizado por Moretto e seus colaboradores (2004). Uma contribuição importante de células B-1 para respostas independentes de células T tem

sido sugerida e relacionada à produção de anticorpos (Majlessi *et al.*, 2008). As células B-1 da cavidade peritoneal também têm sido indicadas como significativamente para o agrupamento de células plasmáticas produtoras de IgA na lâmina própria do intestino (Kroese *et al.*, 1989; Haas *et al.*, 2005). Entretanto, o papel das células B-1 em infecções iniciadas pela via oral, não foi ainda bem estudado. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação das células B-1 na encefalitozoonose induzida pela inoculação oral de *E. cuniculi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos SPF (*specific pathogen free*), fêmeas, das linhagens BALB/c e BALB/c XID, com 08 (oito) semanas de idade, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Durante o período experimental, de 21 (vinte e um) dias, os animais foram divididos em 06 (seis) grupos com 05 (cinco) animais cada, e permaneceram no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista sob condições de temperatura e umidade controladas em microisoladores, em condições livres de patógenos, onde receberam ração *ad libitum* peletizada irradiada e água esterilizada por autoclavagem. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Paulista (Protocolos 138/2012 e 010/2016).

Patógeno

Os esporos de *Encephalitozoon cuniculi* - obtidos do Waterborne® Inc. (New Orleans, LA, USA) - foram originalmente cultivados em células RK-13 (*Rabbit Kidney*) no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Paulista. Para o desenvolvimento dos parasitas, as células RK foram mantidas em meio Eagle suplementado com soro fetal bovino a 10% 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 à temperatura de 37 °C. Em intervalos de 07 (sete) dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 30 minutos a 1500 rpm para obtenção dos esporos contidos no sedimento, os quais foram armazenados a 4°C. Para a contagem dos esporos de *E. cuniculi* foi empregada a câmara de Neubauer.

Transferência adotiva de células B-1

Para a cultura de células peritoneais aderentes (CPA) foi adaptado o protocolo descrito por Almeida e colaboradores (2001). Brevemente, as células peritoneais de camundongos BALB/c foram coletadas da cavidade peritoneal pelo lavado com 10 mL de RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO., USA) 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 contendo meio R10 (RPMI acrescido com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 0,1% betamercapto), nas mesmas condições de cultura por mais 05 (cinco) dias sem troca de meio. Após esse período, o sobrenadante enriquecido com células B-1 foi coletado, centrifugado e ressuspensido em tampão salina fosfato (PBS) para se obter uma concentração de 1x10⁶ células em

200 µL, que foram injetadas pela via intraperitoneal em camundongos BALB/c XID (grupo XID+B-1) 7 dias antes da realização da infecção experimental.

Infecção experimental

Os animais foram divididos em 03 (três) grupos experimentais: camundongos BALB/c; camundongos BALB/c XID; camundongos XID+B-1 (07 dias após a transferência de células B-1). Todos os camundongos foram inoculados pela via oral (gavagem) com 1×10^7 esporos de *E. cuniculi*. Foram utilizados, como controle, camundongos BALB/c, BALB/c XID e XID+B-1 não infectados, durante todo o período experimental, mantidos nas mesmas condições.

Necropsia e coleta de amostras

Aos 21 (vinte e um) dias pós-infecção (DPI) experimental, os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico com a utilização de mistura de quetamina (50 mg/mL), xilazina (20 mg/mL) e fentanil (0,05 mg/mL). A necropsia foi iniciada com a coleta de aproximadamente 01 (um) mL de sangue, por punção cardíaca. Posteriormente, foi realizado lavado peritoneal como supracitado. À metade do baço foi acrescido PBS+SFB 2% e realizada maceração em *cell strainer* (BD Biosciences, CA, USA). O intestino delgado foi separado e com auxílio de uma lâmina de bisturi, as placas de Peyer visíveis foram coletadas sob estereomicroscópio (Nykon, Tokio, Japão) e maceradas em *cell strainer*. Os sedimentos obtidos por estes processos foram utilizados para fenotipagem das células T CD8⁺, T CD4⁺, macrófagos, células dendríticas e as células B-1 e B-2. Fragmentos do baço, fígado, rins, pulmões, encéfalo e intestino delgado foram fixados em formol tamponado a 10% por 72 horas e, em

seguida transferidos para álcool 70%, para posterior processamento e análise histopatológica.

Microscopia de luz

Fragmentos teciduais foram rotineiramente preparados para a análise histológica, pela inclusão em parafina e cortados em fragmentos de 03 (três) µm de espessura. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro, corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (H-E) e foram examinados pela microscopia de luz (Nikon Eclipse E200, Tokio, Japão).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a MET, segmentos de íleo foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2) a 4°C durante 10 h, em seguida, ficaram durante a noite em acetato de uranila 5% a 4°C. Os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de etanol com óxido de propileno e embebidos em resina Epon. Os blocos foram submetidos a cortes semifinos, corados com Azul de Toluidina e fotografados em microscópio de luz. Os cortes ultrafinos foram duplamente corados com acetato de uranila aquoso e citrato de chumbo e, em então, observados em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109 operado a 80 kV.

Avaliação da infecção experimental pelo *E. cuniculi*

A determinação carga parasitária nos grupos experimentais foi quantificada pela contagem de aglomerados (*clusters*) de esporos de *E. cuniculi* presentes no íleo de camundongos infectados. Aleatoriamente, foram contados 10 (dez) campos

microscópicos com aumento de 400x e as médias obtidas foram representadas graficamente e analisadas estatisticamente.

Análise fenotípica dos componentes imunológicos

As células obtidas do baço, placas de Peyer e lavado peritoneal foram centrifugadas a 2000 rpm por 05 (cinco) minutos. O sobrenadante foi removido e acrescentado 02 (dois) mL de tampão hemolítico, até 02 vezes, a temperatura ambiente por 05 minutos, para eliminação das hemácias. A seguir, foi acrescido 10 (dez) mL de PBS 1x e novamente as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos. Foram separadas alíquotas das amostras para contagem em câmara de Neubauer. Então, cada amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2000 rpm e incubada por 20 minutos em banho de gelo com anticorpo anti-CD16/CD32 para bloqueio dos receptores Fc, em solução PBS acrescido com 1% de albumina sérica bovina (PBS-BSA 1%). Após este período, as células foram lavadas e, incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD19 de camundongo conjugado a *Peridinin Chlorophyll* - (PerCP) ou *Allophycocyanin*- (APC), anti-CD23 de camundongo conjugado a *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC), anti-CD4 de camundongo conjugado a PerCP, anti-CD8 de camundongo conjugado a FITC, anti-F4/80 de camundongo conjugado a APC e anti-CD11b de camundongo conjugado a *Pacific Blue* e CD11c de camundongos conjugado a APC-*Cyanine dye* (Cy) 7 (BD-Pharmingen, San Diego, CA), adequados para determinação do fenótipo de células CD4⁺ (CD19⁻/CD4⁺), CD8⁺ (CD19⁻/CD8⁺), macrófagos (CD19⁻CD11b⁺F4/80⁺), células dendríticas (CD19⁻CD11c⁺), B-1 (CD23⁻/CD19⁺) e B-2 (CD23⁺/CD19⁺). Após 20 minutos, sob refrigeração, as células foram lavadas e ressuspensas em 300 µL de PBS para aquisição de dados em citômetro de

fluxo. Os quadrantes para definição das populações celulares foram determinados com base nos padrões de tamanho e granulosidade. Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA), alocado na disciplina de Imunologia da UNIFESP e analisados utilizando-se o *software* FlowJo (FlowJo LLC, *Data Analysis Software*, Ashland, OR).

Quantificação das citocinas

O soro armazenado a -20°C foi obtido após processamento do sangue coletado de cada animal. Após o descongelamento os mesmos foram preparados 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, IFN- γ and TNF- α . Brevemente, 25 μ L de cada amostra foram incubados juntamente com as *beads* de captura, específicas para cada citocina, conjugadas a APC e com o anticorpo secundário conjugado a PE, por duas horas em temperatura ambiente protegidas da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas com *wash buffer*, centrifugadas e ressuspendidas 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 1.0.

Análise estatística

A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da variância entre os grupos foi verificada pelo teste de Levene. Quando necessário, os dados foram padronizados (*Z escore*) e/ou transformados (logaritmo natural) antes da análise estatística. Foi realizada Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com pós-teste de Tukey ou Dunnet. Para determinação dos intervalos de confiança de

95% da média, as análises foram realizadas utilizando-se a ferramenta *bootstrap* (Field, 2013). Em todos os casos, o nível de significância adotado foi $\alpha < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa “IBM SPSS Statistics” versão 21.0 para Windows® (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA). Os gráficos foram realizados no programa “GraphPad Prism” versão 5.0 para Windows ® (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

RESULTADOS

No presente estudo, a inoculação por via oral de *E. cuniculi* foi realizada para avaliar os componentes mais relevantes da resposta imune e a participação das células B-1 na infecção experimental pela rota naturalmente utilizada pelo patógeno, permitindo a comparação com os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo e propiciando melhor compreensão da relação das células B-1 na imunidade. Para tal, foram utilizados camundongos BALB/c, BALB/c XID (com deficiência de células B-1), e XID+B-1, os quais foram adotivamente transferidos com 1×10^6 células B-1 provenientes de camundongos BALB/c.

Avaliação clínica da infecção experimental

Os camundongos BALB/c e XID+B-1 infectados experimentalmente não demonstraram sinais clínicos ou sintomas aparentes de encefalitozoonose, assim como não foi observada nenhuma morte no período de observação. Discreta coleção de líquido peritoneal serosanguinolento foi eventualmente encontrada em camundongos BALB/c XID infectados (dados não mostrados), porém nenhuma morte foi registrada neste grupo também.

Achados histopatológicos e carga parasitária

Todos os animais infectados com *E. cuniculi* (BALB/c, BALB/c XID, XID+B-1) apresentaram enterite crônica com infiltrado linfoplasmocítico geralmente discreto, e com degeneração dos ápices das vilosidades, sendo mais frequente nos camundongos BALB/c XID (Figura 1A). Essas alterações morfológicas não foram observadas nos animais controles. Notadamente os animais infectados apresentavam placas de Peyer mais exuberantes na parede intestinal (Figura 1B). A análise histológica mostrou que o tecido linfoide das placas de Peyer tinha expansão difusa com marcada reação do centro germinativo (Figura 1C). Também, na proximidade das placas havia grande quantidade de vacúolos de microsporídios associados à distensão de vasos linfáticos (Figura 1C). No fígado, observou-se infiltrado inflamatório nodular com predominância de células mononucleares (Figura 1D) e presença esporádica de polimorfonucleares (Figura 1F), as vezes em localização periportal ou sinusoidal (Figura 1E), assim como junto à cápsula. Poucas áreas de necrose de liquefação e de calcificação distrófica foram identificadas, distribuídas difusamente no parênquima hepático, além da presença de flebólitos e megalócitos (Figura 1E). Adicionalmente, os camundongos BALB/c XID tinham áreas de degeneração hepatocelular mais marcantes, enquanto que os camundongos XID+B-1 apresentaram infiltrado inflamatório mais importante do que os outros grupos, que se expandia da zona 1 (periportal) para a zona 3 (junto à vênula hepática) e com a presença de esporos de *E. cuniculi* no parênquima hepático (Figura 1D). Todos os animais infectados apresentavam pneumonia intersticial crônica multifocal (Figura 1G) com reação estromal leiofibroblástica e infiltrado inflamatório peribronquiolar, alguns animais apresentavam pneumonia granulomatosa (Figura 1H).

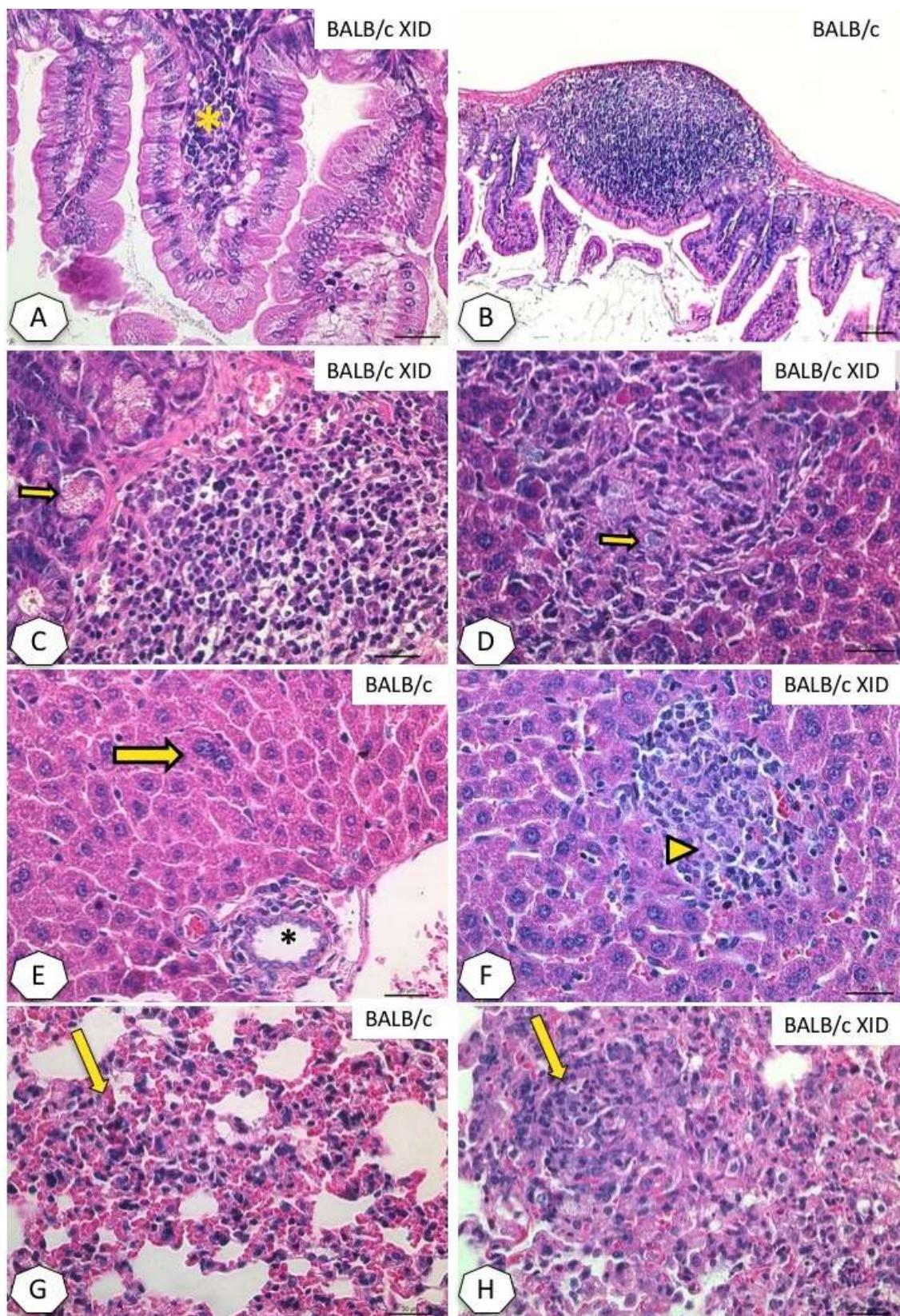


FIGURA 1. Fotomicrografias dos achados histopatológicos relacionados à infecção pelo *E. cuniculi* corados pelo H-E. Infiltrado inflamatório (*) em intestino delgado (A). Placas de Peyer com expansão linfoide (B) e presença de *clusters* (seta) de esporos (B, C). Fígado mostrando

infiltrado inflamatório nodular mononuclear no parênquima hepático (D) com presença de *clusters* de esporos (seta em D) ou em localização periportal hepática ou sinusoidal (E*) e presença de megalócitos (seta em E). Infiltrado inflamatório hepático com polimorfonucleares (cabeça de seta em F). Pulmão evidenciando pneumonia intersticial multifocal (G) e granulomatosa (H).

Observou-se a presença de *clusters* extracelulares de esporos do patógeno na região de transição de vilosidade e mais abundantemente em região glandular do intestino delgado (Figura 2A, 2B). A carga parasitária de *E. cuniculi* os animais do grupo BALB/c XID foi maior que nos animais do grupo BALB/c e XID+B-1 (Figura 2C), demonstrando que este grupo foi suscetível à encefalitozoonose. Entre os camundongos BALB/c e XID+B-1 não houve diferença na carga parasitária, o que reforça a participação das células B-1 no controle da infecção.

Pela microscopia eletrônica de transmissão observou-se a presença de esporos próximos ou aderidos à borda em escova dos enterócitos (Figura 2D, 2E) circundados com parede de material fibrilar. O formato dos esporos extra-celulares foi bastante variável com aspecto ovalado, redondo ou piriforme, medindo 2,5–3,0 µm de comprimento e 1,6–1,8 µm de largura. Na maioria das situações foram observados que os esporos estavam em processo de aproximação com a borda em escova, local onde a membrana celular se modificava para envolver o esporo, em processo aparente de fagocitose (Figura 2E). Nestas regiões havia um evidente aumento da eletrodensidade do citoplasma e perda das microvilosidades.

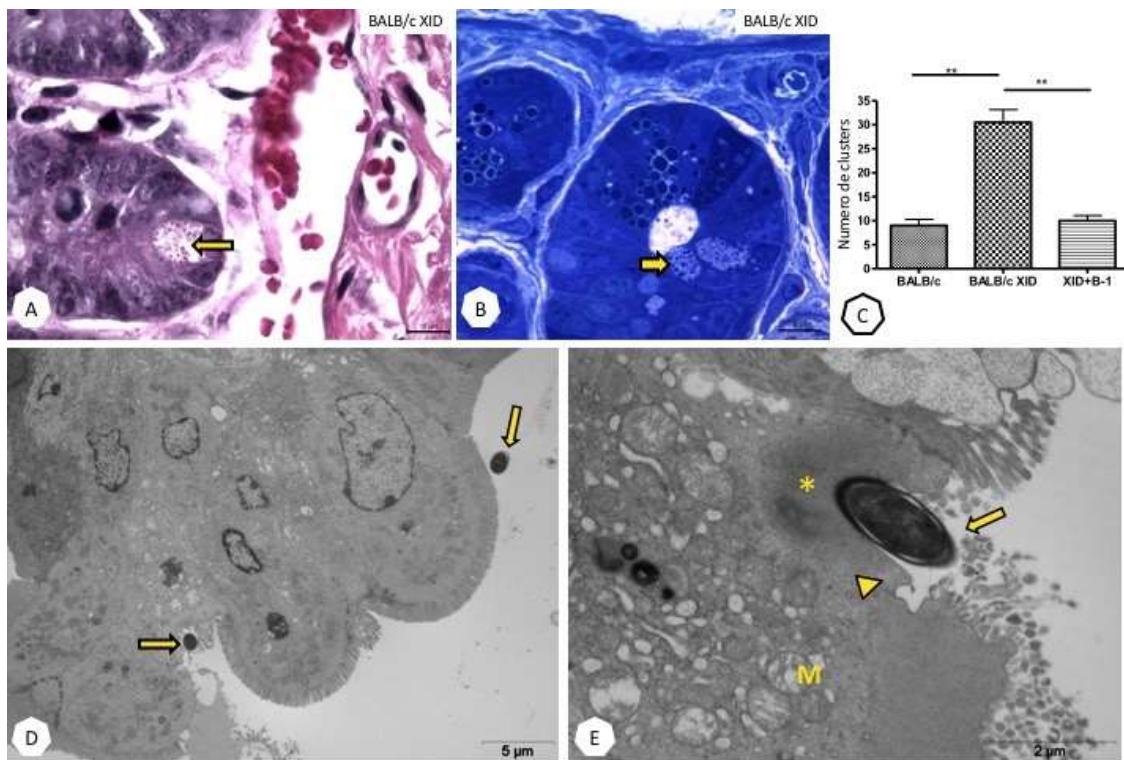


FIGURA 2. A, B) Fotomicrografia de intestino delgado evidenciando a presença de esporos de *E. cuniculi* (seta) em localização extracelular e próxima a região glandular, configurando vacúolos parasitários (A- coloração de HE; B- coloração de Azul de Toluidina). C) Carga parasitária de camundongos infectados BALB/c, BALB/c XID e XID+B-1. Análise de variância (ANOVA) de uma via apresentando ** $p < 0.01$. D, E) Eletromicrografias de intestino delgado de camundongos BALB/c XID mostrando a presença de esporos de *E. cuniculi* (seta) aderido à borda em escova de enterócitos em processo de aproximação para invasão, com destruição das microvilosidades. Observa-se modificação da membrana celular e aumento do eletrodensidade do citoplasma (*) celular e acúmulo de mitocôndrias (M) próximo ao local de entrada do esporo.

Componentes imunitários peritoneais

A análise fenotípica das populações celulares no peritônio incluiu a quantificação de macrófagos, células B-1 e B-2, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e revelou alterações quantitativas significantes na comparação entre os grupos experimentais avaliados e seus respectivos controles, no período de observação.

Houve diminuição significante nas células B-1 e B-2 mensuradas no peritônio nos animais dos grupos BALB/c XID e XID+B-1 em relação aos respectivos grupos controles não infectados (Figura 3A, 3B, 3C). O grupo BALB/c infectado apresentou aumento significante na população de macrófagos, em relação ao controle não infectado (Figura 3D).

Por sua vez, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ estavam reduzidos nos animais XID+B-1 infectados com *E. cuniculi* quando comparado aos seus controles não-infectados (Figura 4A e 4B). Deve-se ressaltar que os camundongos não-infectados BALB/c XID apresentavam显著mente menor número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que camundongos BALB/c (Figura Suplementar 1A e 1B). Curiosamente, camundongos XID+B-1 apresentaram maior número desses linfócitos quando comparados a camundongos BALB/c XID, evidenciando uma relação estreita entre a presença de células B-1 e de linfócitos T. A comparação realizada entre os animais infectados mostrou que a quantidade de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em animais BALB/c XID e XID+B-1 era menor que a observada em camundongos BALB/c (Figura Suplementar 1A e 1 B).

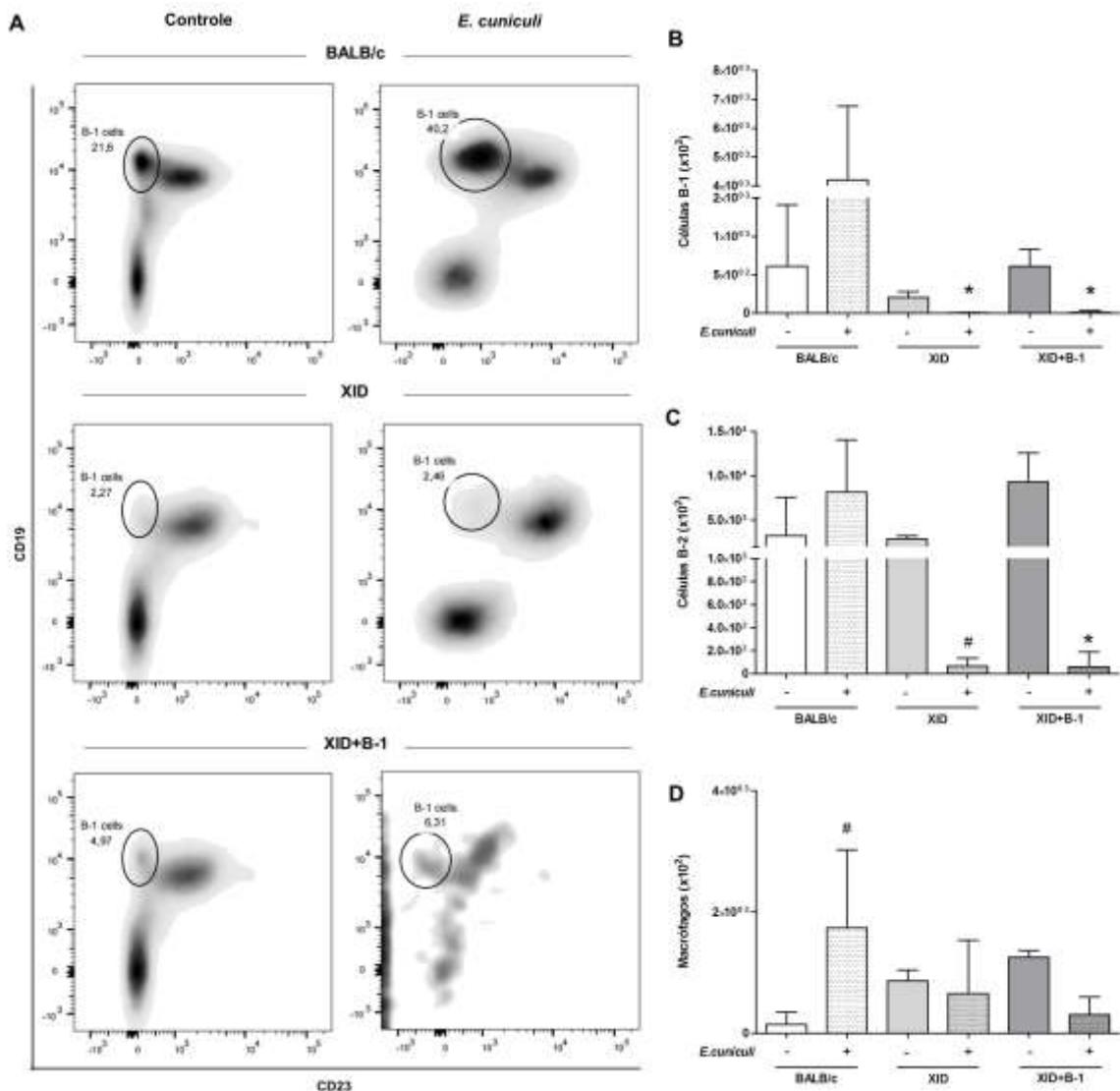


FIGURA 3. Avaliação das populações celulares presentes na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, BALB/c XID e XID+B-1 (adotivamente transferidos com 10^6 células B-1 provenientes de camundongos BALB/c), inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) Density plots representativos das populações de células B-1 CD23⁺CD19⁺ (círculo) presentes na cavidade peritoneal de camundongos infectados com *E. cuniculi* ou seus controles saudáveis. B) Número de células B-1 CD23⁺CD19⁺. C) Número de células B-2 CD23⁺CD19⁺. Os dados foram transformados para análise estatística, a análise de variância de duas vias ANOVA com pós teste Tukey revelou $p < 0,05^*$. D) Número de macrófagos CD19⁺F4/80⁺CD11b⁺. # diferenças significantes versus controles (-), com base nos intervalos de confiança de 95% para a média. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

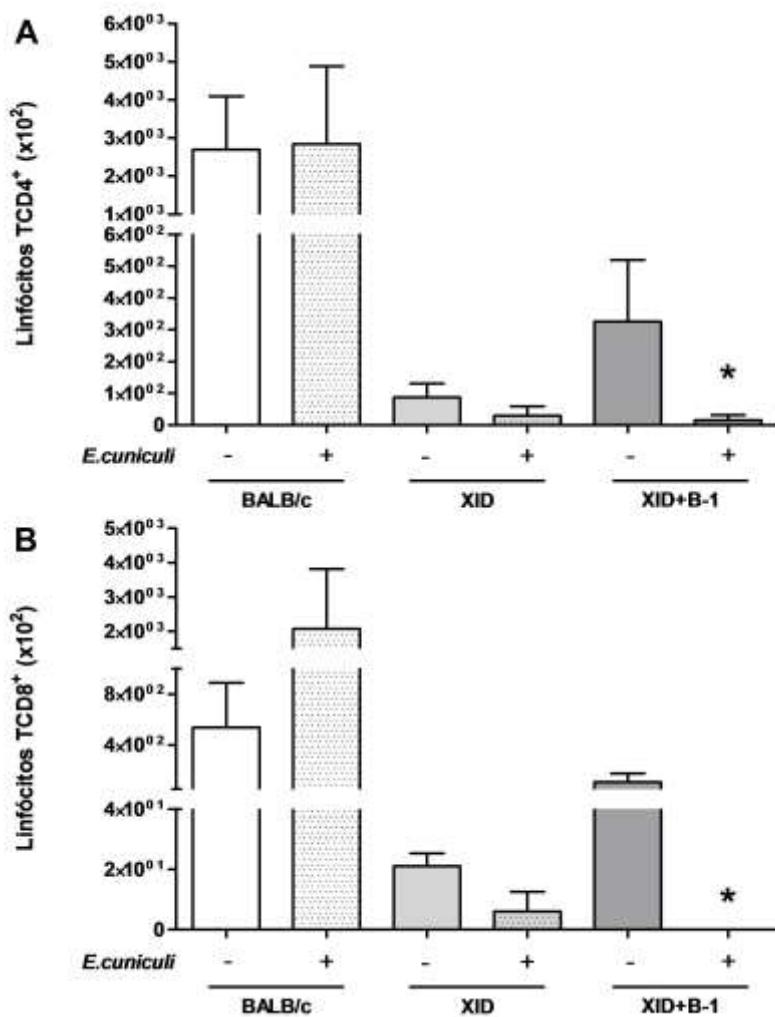


FIGURA 4. Avaliação das populações celulares presentes na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, BALB/c XID e XID+B-1 (adotivamente transferidos com 10^6 células B-1 provenientes de camundongos BALB/c), inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) Número de linfócitos T CD4 CD19⁻CD8⁻CD4+. B) Número de linfócitos TCD8 CD19⁻CD4⁻CD8⁺. Os dados foram transformados para análise estatística, a análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste Tukey revelou $p<0,05^*(A)$ e $p<0,001^*(B)$. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Populações celulares no baço

Observa-se redução significante na frequência de células B-2 nos grupos infectados com *E. cuniculi* em relação aos controles não-infectados, notadamente no grupo XID+B-1 (Figura 5A). Em relação à população de linfócitos T CD4⁺, foi

observada uma acentuada redução no percentual dessas células em todos os animais infectados, quando comparados a seus controles (Figura 5B). Também houve diminuição no percentual de linfócitos TCD8⁺ em camundongos BALB/c e XID+B-1 infectados pelo *E. cuniculi* (Figura 5C).

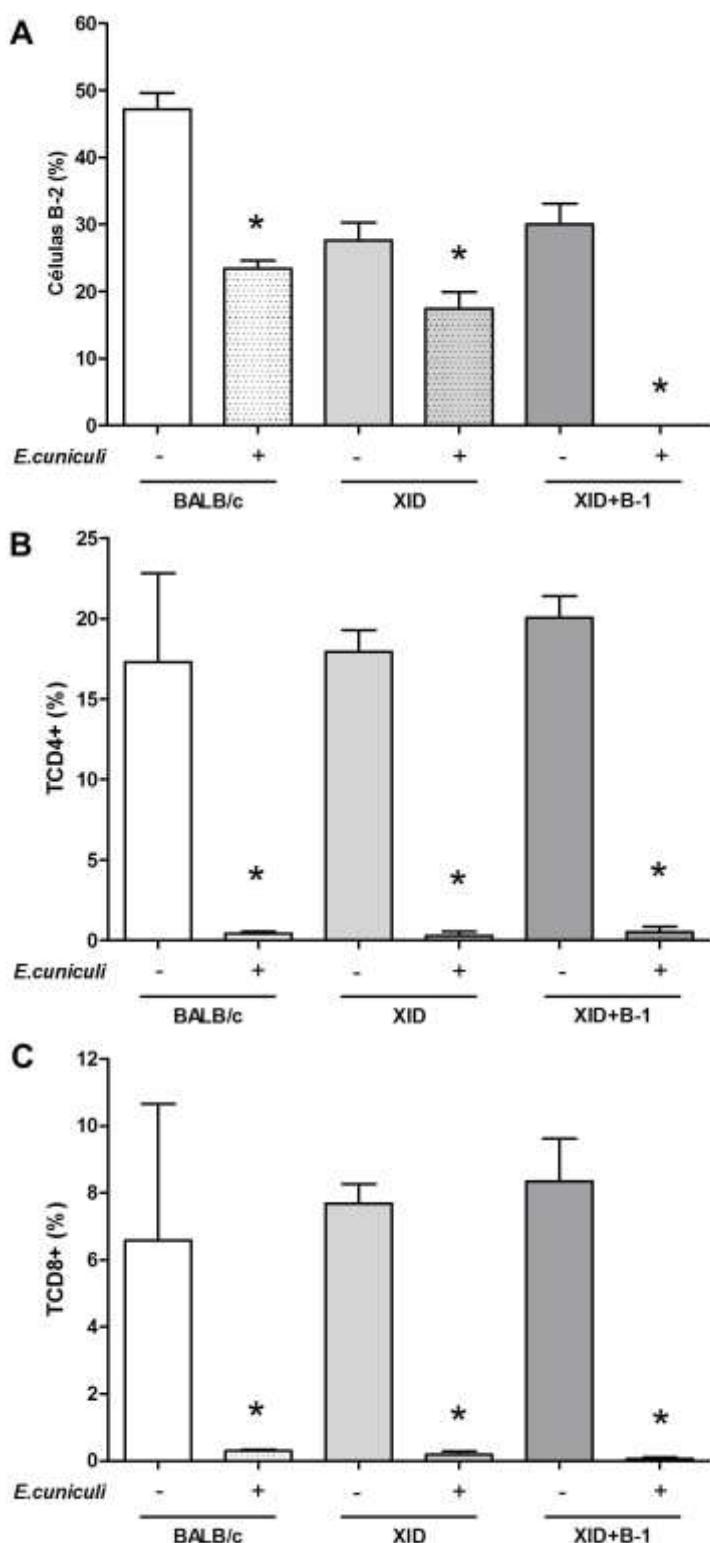


FIGURA 5. Frequência das populações celulares presentes no baço de camundongos BALB/c, BALB/c XID e XID+B-1 (adotivamente transferidos com 10^6 células B-1 provenientes de camundongos BALB/c), inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) Percentual de células B-2 CD23⁺CD19⁺. B) Percentual de linfócitos TCD4 CD19⁻CD8⁻CD4⁺. C) Percentual de linfócitos TCD8 CD19⁻CD4⁻CD8⁺. Os dados foram transformados para análise estatística, a análise de variância de duas vias ANOVA com pós-teste Dunnet revelou $p < 0,05^*(A)$ e análise de variância de duas vias ANOVA com pós teste Tukey revelou $p < 0,001^*(B)$ e $p < 0,05^*(C)$. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Células dendríticas das placas de Peyer

A identificação fenotípica de células dendríticas das placas de Peyer revelou menor percentual dessa população no grupo XID+B-1, tanto em animais não-infectados como nos infectados por *E. cuniculi*, quando comparados com o grupo BALB/c ou BALB/c XID (Figura 6A). Ainda, na análise da média de fluorescência da molécula de MHC de classe II presente em células dendríticas CD11c⁺ observou-se menor expressão dessa, somente em animais BALB/c XID e XID+B-1 infectados, comparado ao observado em BALB/c (Figura 6B).

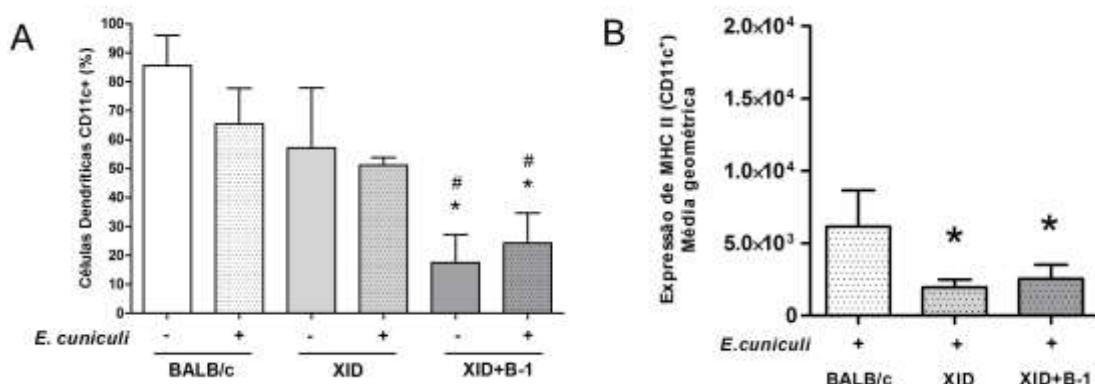


FIGURA 6. Avaliação de células dendríticas presentes nas Placas de Peyer de camundongos BALB/c, BALB/c XID e XID+B-1 (adotivamente transferidos com 10^6 células B-1 provenientes de camundongos BALB/c), inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) Percentual de células dendríticas CD11c⁺. B) Média geométrica da intensidade de fluorescência da molécula de MHC II em células dendríticas CD11c⁺. A análise de variância de duas vias ANOVA com pós-teste Tukey revelou # diferenças estatisticamente significantes e $p < 0,05^*$, versus BALB XID e versus XID+B-1, respectivamente (A). Os dados foram transformados para análise estatística, a análise de variância de duas vias ANOVA com pós teste Tukey revelou $p < 0,05^*$ versus BALB/c.

Perfil de citocinas no soro após a infecção por *E. cuniculi*

Os níveis de IFN- γ aumentaram após infecção por via oral em camundongos BALB/c e XID+B-1, com evidência estatística neste último. O mesmo não foi

observado para camundongos BALB/c XID (Figura 7), sendo que estes apresentaram níveis de IFN- γ significativamente menores que os demais grupos infectados. Os animais BALB/c e BALB/c XID mostraram menores níveis séricos de TNF- α após a infecção pelo *E. cuniculi* em comparação aos seus respectivos controles não-infectados. Já o grupo XID+B-1 apresentou uma quantidade desta citocina 2 (duas) vezes maior que o observado em seu controle não-infectado. Na análise comparativa entre os animais infectados dos 3 grupos observou-se que a quantidade de TNF- α nos animais XID+B-1 foi significativamente maior (3 a 4 vezes) que a observada tanto em BALB/c quanto em BALB/c XID. Também, maiores níveis de IL-6 foram detectados em camundongos BALB/c XID e XID+B-1 infectados quando comparados com seus respectivos controles ou ao grupo BALB/c (infectados ou não). As citocinas IL-2 e IL-17A estavam elevadas em camundongos XID+B-1 quando comparadas ao grupo BALB/c XID (Figura 7). Não houve diferenças significantes nos níveis de IL-4 detectados nos grupos experimentais ou seus controles e não foram detectados níveis de IL-10 no soro dos camundongos avaliados (dados não mostrados).

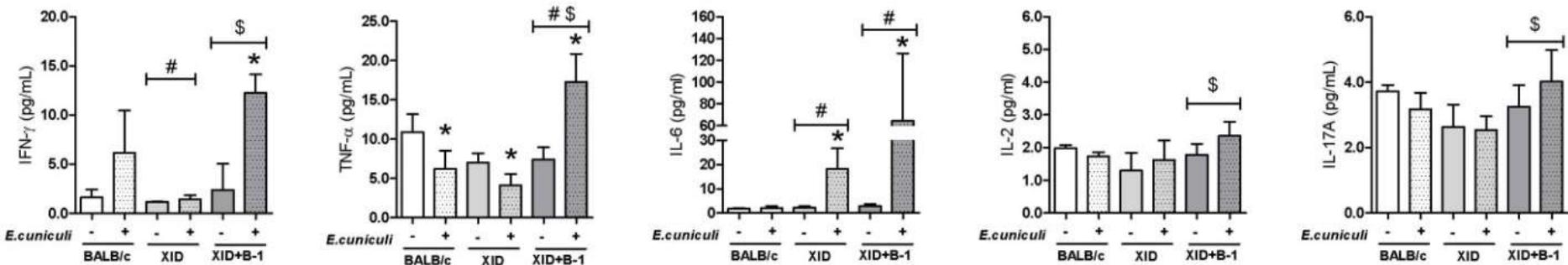


FIGURA 7. Níveis de citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-17A detectados no soro de camundongos BALB/c, BALB/c XID e XID+B-1 (adotivamente transferidos com 10^6 células B-1 provenientes de camundongos BALB/c), inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Os dados foram transformados para análise estatística (IFN- γ , IL-6, IL-17A), a análise de variância de duas vias ANOVA com pós teste Tukey revelou #: diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05$ versus BALB e versus XID, respectivamente; $p < 0,05^*$ versus controle (-).

DISCUSSÃO

As células B, com duas populações principais referidas como células B-1 e B-2, são as principais células efetoras da imunidade humoral. Autores tem demonstrado altas titulações de anticorpos das classes IgM e IgG em animais infectados com *E. cuniculi* (Sak e Ditrich, 2005). No entanto, a falta dessas imunoglobulinas parece não afetar de forma definitiva a resposta imune contra esse patógeno (Kotkova *et al.*, 2013), o que pode parecer contraditório frente às altas titulações de anticorpos observadas. Assim os aspectos da relação das células B na resposta contra microsporídios são ainda discutíveis.

As células B-1, alvo deste estudo, são consideradas como a principal população de células responsáveis pela produção de anticorpos naturais, em especial IgM (Herzenberg *et al.*, 1986; De-Gennaro *et al.*, 2009). As células B-1 são mais comumente encontradas nas cavidades peritoneal e pleural e são auto-renováveis (Montecino-Rodriguez e Dorshkind, 2006). No intestino, porta de entrada para a maioria dos agentes infecciosos, as células B estão presentes em folículos solitários ou provem de estruturas linfoïdes mais complexas como as placas de Peyer, de linfonodos mesentéricos e até mesmo do baço. Sob a influência de vários fatores celulares e moleculares, tais como células T e citocinas, por exemplo, as células B mudam seu perfil de secreção de anticorpos de IgM para IgA (Murakami e Honjo, 1995; Stoel *et al.*, 2005), sendo esta uma das suas principais funções na mucosa intestinal. Evidências mostram a contribuição de células B-1 para o compartimento de células B intestinais (Kroese e Bos, 1999; Haas *et al.*, 2005; Hastings *et al.*, 2006). A principal função das células B-1 no trato gastrointestinal é produzir imunoglobulinas contra patógenos comensais e invasores (Macpherson *et al.*, 2000).

Já foi relatado que células B-1 residem na lâmina própria do intestino e lá, são ineficientes em gerar anticorpos IgM de alta afinidade e contra componentes antigenicos da microbiota comensal (Montecino-Rodriguez e Dorshkind, 2012). Em situações de infecções, células B-1 podem produzir e secretar altos níveis de IgA, no lúmen intestinal, de maneira independente de células T (Baumgarth *et al.*, 2005). Também já foi observado o aumento de células B-1 no intestino de camundongos infectados com esporos de *B. anthracis* pela via oral e na lâmina própria de pacientes humanos com doença intestinal (Defendenti *et al.*, 2011).

Para avaliar o papel das células B-1, foi utilizada a linhagem de camundongos XID, os quais possuem deficiência na tirosina cinase de Bruton (Btk) que leva a redução drástica das células B-1 (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Kotkova *et al.*, 2013), que são essenciais para imunidade inata e adquirida (Wardemann *et al.*, 2002). Previamente, nosso grupo demonstrou maior suscetibilidade de camundongos BALB/c XID à encefalitozoonose induzida pela via intraperitoneal (Da Costa *et al.*, 2016). No presente estudo, usando a via oral para a inoculação de *E. cuniculi*, nós observamos pela avaliação da carga parasitária, das alterações clínicas e pelas lesões histopatológicas encontradas nos animais inoculados, que os camundongos BALB/c XID foram mais suscetíveis à encefalitozoonose do que os camundongos BALB/c, demonstrando mais uma vez que as células B-1 contribuem com a resistência ao patógeno, independentemente da via de inoculação.

Tem sido demonstrado que as células B-1 têm capacidade fagocítica e microbicida (Parra *et al.*, 2012). Ainda, células B-1 possuem um papel importante na defesa do hospedeiro contra a *Coxiella burnetti*, pela sua habilidade de secretar anticorpos, citocinas e promover fagocitose (Schoenlaub *et al.*, 2015). Os camundongos

da linhagem CBA/XID foram mais suscetíveis ao *Cryptococcus neoformans*, apresentando infecção disseminada (Szymczak *et al.*, 2013), assim como o observado em nosso estudo.

Aqui, observamos menor carga parasitária, ausência de sintomas da infecção e poucas lesões nos animais que receberam transferência adotiva de células B-1 (XID+B-1) comparado aos BALB/c XID, indicando que a presença das células B-1 contribui para a menor patogenicidade. Em contraste, autores relataram que células B-1 ajudam a atenuar as respostas potencialmente prejudiciais durante a infecção com *Schistosoma mansoni* (Mangan *et al.*, 2004) e *Brugia pahangi* (Gillan *et al.*, 2005).

Por outro lado, análises fenotípicas das populações celulares mostram diminuição de células B-1 e B-2 no peritônio dos animais BALB/c XID e XID+B-1 em relação aos seus controles não-infectados. Recentes esforços têm tentado elucidar a extensão da resposta das células B-1 contra vários patógenos *in vivo* (Choi e Baumgarth, 2008). Frente às infecções, as células B-1 respondem de diferentes formas, uma delas é a produção de grandes quantidades de IgM em linfonodos regionais como foi demonstrada na influenza (Choi e Baumgarth, 2008). Em outras situações as células B-1 migram do peritônio para o baço (Martin *et al.*, 2001) ou para mucosas (Nisitani *et al.*, 1995) onde se diferenciam em células secretoras de IgM e IgA, respectivamente. Foi também demonstrado que as células B-1 migram para sítios sistêmicos em situações de inflamação (Moon *et al.*, 2012). As células B-1 proliferam vigorosamente frente a sinais mitogênicos e migram a partir da cavidade peritoneal parcialmente na dependência de receptores *Toll-like 4* (Ha *et al.*, 2006). Nós especulamos que as células B-1 transferidas adotivamente para os camundongos XID+B-1 devam ter migrado para o intestino, local da inoculação e da presença mais evidente do patógeno.

Também não pode ser negligenciada a possibilidade das células B-1 terem se diferenciado em plasmócitos e migrado para a medula óssea, local onde poderiam contribuir com a produção de anticorpos. Como já comentado, em infecção natural ou experimental por microsporídios, ocorre produção de anticorpos expressiva (Braunfuchsová *et al.*, 2001; Valencakova e Halanova, 2012). Foi demonstrada a presença de células B-1 na medula óssea com sua diferenciação em células plasmáticas e com consequente produção de grandes quantidades de anticorpos (Choi *et al.*, 2012). Adicionalmente, sugerimos que o mesmo ocorreu com as células B-2, já que reduziram significantemente no peritônio e no baço de BALB/c XID e XID+B-1. Nosso laboratório tem interesse em investigar essa hipótese e estudos futuros deverão ser realizados para tal.

Existem muitos estudos de encefalitozoonoses, descrevendo a patogenia e a resposta imune, conduzidos com o emprego da inoculação por via intraperitoneal (Schmidt e Shadduck, 1983). Na maioria das infecções naturais causadas pelos microsporídios, a doença ocorre pela ingestão ou inalação dos esporos (Didier *et al.*, 2004). A patogenicidade determinada por *E. cuniculi* depende da relação estabelecida entre a multiplicação do patógeno e a resposta imune do hospedeiro, sendo necessário ressaltar a importância da imunidade relativa ao intestino delgado e à sua complexidade, quando a infecção se dá pela rota oral. Pesquisas realizadas com outros patógenos inoculados por via oral (Chardès *et al.*, 1994) mostram que a resposta imune da mucosa intestinal possui um papel crítico na proteção de hospedeiros infectados, o que foi também demonstrado para microsporídios em estudo realizado por (Moretto *et al.*, 2004). Em nosso estudo, foi observado um quadro assintomático na maioria dos animais e menor disseminação da infecção para outros órgãos, como pulmões e fígado, com exceção de camundongos BALB/c XID que tiveram manifestações leves da infecção.

Também, houve grande mudança no perfil das populações de células B-1, B-2, macrófagos, células T CD4⁺, T CD8⁺ encontradas no peritônio e no baço, após a infecção. Esses dados diferem dos observados em estudo prévio, quando utilizamos a via intraperitoneal para infecção (Da Costa *et al.*, 2016), reforçando o importante papel da resposta imune no intestino e o papel de células B-1 na resistência à encefalitozoonose.

Estudos prévios mostram que a resposta imune protetora contra a encefalitozoonose é mediada por linfócitos T CD8⁺ (Braunfuchsová *et al.*, 2001) e sua ativação é independente de linfócitos T CD4⁺ (Khan *et al.*, 1999; Moretto *et al.*, 2001). Estes estudos relataram o desenvolvimento da resposta imune mediante inoculação de *E. cuniculi* por via intraperitoneal, contudo quando se utiliza a rota natural de infecção – via oral, o agente patogênico se depara com os elementos celulares da imunidade da mucosa intestinal, os quais se manifestam de forma rápida e precoce com aumento da população de linfócitos intraepiteliais, esta população inclui linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺.

Nós observamos que as populações de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ mensuradas no baço de camundongos BALB/c diminuiu nos animais infectados, o mesmo foi encontrado em camundongos XID+B-1. Se essas células migram para o intestino e participam na resolução da infecção local, ainda não foi esclarecido. Camundongos BALB/c XID foram mais suscetíveis à encefalitozoonose, fenômeno que pode estar associado potencialmente a menor mobilização destas células. Os resultados aqui demonstrados são opostos aos observados por nosso grupo com a utilização da via intraperitoneal, evidentemente houve aumento nas populações de linfócitos T CD4⁺ no peritônio de todos os grupos infectados (BALB/c, BALB/c XID e XID+B-1) e os

linfócitos T CD8⁺ aumentaram em BALB/c e XID+B-1, já que o local primário de multiplicação do patógeno era exatamente o peritônio (Da Costa *et al.*, 2016). A produção de anticorpos contra microsporídios contribui com a resistência e facilita a opsonização, neutralização e fixação de complemento, os quais habilitam a fagocitose de esporos, contribuindo com a eficiência da resposta imune (Weidner *et al.*, 1994). Assim, as células B-1 devem contribuir com a imunidade contra os microsporídios já que são produtoras de IgM, uma imunoglobulina pentamérica com 10 sítios de ligação antigênica, fator que favorece a opsonização, fagocitose, apresentação antigênica e, consequentemente, a atividade de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺.

Nós identificamos menor percentual de células dendríticas nas placas de Peyer de camundongos XID+B-1, infectados ou não com *E. cuniculi*. Embora a proteção contra os microsporídios seja predominantemente realizada por células T, as células dendríticas possuem papel importante e crítico na estimulação das células T via receptores de reconhecimento padrão (PRR) expressos por esses patógenos, fenômeno que envolve os receptores *Toll-like* (TLR-4 e TLR-2). Diferentemente da infecção por via intraperitoneal que mobilizada essencialmente linfócitos T CD8⁺, a infecção por via oral também envolve a participação efetiva de células CD4⁺ além de CD8⁺ (Moretto *et al.*, 2004). Assim a menor apresentação antigênica realizada por células dendríticas pode ser uma das prováveis causas que justifique o fato dos camundongos XID+B-1 não terem encefalitozoonose tão branda quanto à observada nos camundongos BALB/c. Ainda reforça esta hipótese a menor expressão de moléculas de MHC de classe II presentes em células dendríticas CD11c⁺ de camundongos BALB/c XID e XID+B-1 infectados identificadas nesse estudo, fato que corrobora a existência de falhas na apresentação antigênica.

De forma geral, os macrófagos reconhecem patógenos e respondem secretando quimiocinas e citocinas que recrutam novas células de defesa, incluindo monócitos, para resolver infecções (Mathews *et al.*, 2009). Em estudo anterior (Da Costa *et al.*, 2016) nós observamos que nos camundongos BALB/c inoculados com *E. cuniculi* por via intraperitoneal ocorre um aumento de macrófagos no peritônio, assim como observamos nesse estudo. Mais uma vez, evidencia-se que o aumento da população macrofágica peritoneal pode estar relacionado com evolução favorável para o hospedeiro.

Nós observamos que os esporos de *E. cuniculi* foram fagocitados por células epiteliais, sendo identificada uma nuvem mais eletrodensa ao redor desses esporos e um agregado de mitocôndrias. Descreve-se que células epiteliais especializadas, semelhantes aos enterócitos do intestino delgado, podem ser alvo primário de *E. cuniculi*, sendo provável que exista um mecanismo de defesa gerado por estes tipos de células (Cohen e Denkers, 2015b; a). Fagócitos são descritos por terem habilidade de internalizar esporos de microsporídios em processo mediado por actina, menos eficiente que os macrófagos (Weidner *et al.*, 1994). Porém pela MET não foi possível fazer tal diferenciação.

O INF- γ está envolvido na resposta Th1 que controla o desenvolvimento e disseminação de parasitos, bactérias e vírus intracelulares por um mecanismo citotóxico (Salát *et al.*, 2008). A importância desta citocina na imunidade protetora está relacionada com a produção de óxido nítrico (Didier, 1995). O desenvolvimento de *E. cuniculi* foi inibido pela produção de INF- γ por macrófagos peritoneais murinos, mas o papel de NO não foi confirmado (Didier, 1995; Khan e Moretto, 1999). Em estudos realizados com a inoculação oral com *E. cuniculi*, verificou-se que a população de linfócitos intraepiteliais (IEL) CD8 $^{+}$ $\alpha\beta$ prolifera-se e libera grandes quantidades de

INF- γ , exibindo propriedades citolíticas que impedem a proliferação do patógeno (Moretto *et al.*, 2004).

No presente estudo foi demonstrado que camundongos BALB/c XID infectados apresentaram níveis significantemente reduzidos de INF- γ e, também, foi o grupo mais suscetível a encefalitozoonose. Após a transferência adotiva de células B-1, observamos maiores níveis dessas citocinas, configurando que a menor resposta das citocinas pró-inflamatórias na infecção por via oral poderia estar correlacionada à deficiência de células B-1, em camundongos BALB/c XID. A infecção pelo *E. cuniculi* induz a produção de INF- γ pelas células T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ de forma local e sistêmica (Moretto *et al.*, 2004). Esta citocina foi detectada no soro e no sobrenadante de células T CD4 $^{+}$ e T CD8 $^{+}$ de baço aos 14 DPI, data que corresponde ao pico de resposta efetora das células T CD8 $^{+}$ (Khan *et al.*, 1999). Possui papel essencial para uma resposta robusta de linfócitos T CD8 $^{+}$, uma vez que a transferência adotiva desses linfócitos provenientes de camundongos deficientes em INF- γ não é capaz de proteger animais contra a infecção pelo *E. cuniculi* (Moretto *et al.*, 2001). Neste estudo foi observada simultaneamente a baixa quantidade de INF- γ e a menor população de células T CD8 $^{+}$ em camundongos BALB/c XID, caracterizados como mais suscetíveis à encefalitozoonose, confirmado a sua importância na resposta imune.

Também (Moretto *et al.*, 2007) sugeriram forte vínculo entre as células dendríticas e a produção do INF- γ como gatilhos na resposta dos IELs frente à infecção pelo *E. cuniculi*, *in vitro*. Contrariamente, nossos resultados mostraram que apesar da redução de células dendríticas nas placas de Peyer encontrada nos camundongos XID+B-1, houve aumento significante na produção de INF- γ em animais infectados, indicando que a produção de INF- γ nestes animais poderia estar sob a responsabilidade

de outras células. A quantificação de TNF- α também foi superior nesse grupo, em comparação BALB/c XID, sugerindo que a transferência adotiva das células B-1 incrementa a secreção dessas citocinas pró-inflamatórias.

Sabe-se que a IL-17 é essencial para as células T CD4+, bem como atua de forma sinérgica com o TNF- α durante a resposta inflamatória, conforme visto por (Kelly *et al.*, 2005; Chiricozzi *et al.*, 2011; Moretto e Khan, 2016). Além disso, autores já demonstraram que células B-1 podem favorecer a diferenciação de células T *naïve* em células T do tipo Th17 produtoras de IL-17 (Wang e Rothstein, 2012). Intrigantemente, IL-17, bem como as outras citocinas avaliadas, estavam aumentadas nos camundongos que receberam transferência adotiva das células B-1, reforçando o papel da B-1 no aumento das citocinas pró-inflamatórias.

Em conjunto, os resultados aqui apresentados mostram que mudanças tanto nos perfis celulares como nos níveis de citocinas identificados em camundongos que receberam as células B-1 indicam que estas células possuem papel importante na regulação da resposta imune contra estes patógenos. Assim, podemos concluir que a transferência de células B-1 confere resistência à encefalitozoonose experimental induzida por via oral nos camundongos BALB/c XID.

REFERÊNCIAS

- AKERSTEDT, J. An indirect ELISA for detection of Encephalitozoon cuniculi infection in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). **Acta Vet Scand**, v. 43, n. 4, p. 211-20, 2002. ISSN 0044-605X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12831174>>.
- AKERSTEDT, J. et al. 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**, v. 49, n. 8, p. 400-5, Oct 2002. ISSN 0931-1793. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12449250>>.
- ALMEIDA, S. R. et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **Int Immunol**, v. 13, n. 9, p. 1193-201, Sep 2001. ISSN 0953-8178. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11526100>>.
- ANANE, S.; ATTOUCHI, H. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. **Gastroenterol Clin Biol**, v. 34, n. 8-9, p. 450-64, Sep 2010. ISSN 0399-8320. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702053>>.
- BAUMGARTH, N.; TUNG, J. W.; HERZENBERG, L. A. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. **Springer Semin Immunopathol**, v. 26, n. 4, p. 347-62, Mar 2005. ISSN 0344-4325. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15633017>>.
- BERLAND, R.; WORTIS, H. H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. **Annu Rev Immunol**, v. 20, p. 253-300, 2002. ISSN 0732-0582. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861604>>.
- BRAUNFUCHSOVÁ, P. et al. Cytokine response to infection with the microsporidian, Encephalitozoon cuniculi. **Folia Parasitol (Praha)**, v. 46, n. 2, p. 91-5, 1999. ISSN 0015-5683. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10425742>>.
- BRAUNFUCHSOVÁ, P.; SALÁT, J.; KOPECKÝ, J. CD8+ T lymphocytes protect SCID mice against Encephalitozoon cuniculi infection. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 7, p. 681-6, May 2001. ISSN 0020-7519. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336749>>.
- CHARDÈS, T. et al. Toxoplasma gondii oral infection induces specific cytotoxic CD8 alpha/beta+ Thy-1+ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. **J Immunol**, v. 153, n. 10, p. 4596-603, Nov 1994. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7963532>>.
- CHIRICOZZI, A. et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. **J Invest Dermatol**, v. 131, n. 3, p. 677-87, Mar 2011. ISSN 1523-1747. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085185>>.

CHOI, Y. S.; BAUMGARTH, N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. **J Exp Med**, v. 205, n. 13, p. 3053-64, Dec 2008. ISSN 1540-9538. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19075288>>.

CHOI, Y. S. et al. B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 1, p. 120-9, Jan 2012. ISSN 1521-4141. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22009734>>.

COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Impact of Toxoplasma gondii on Dendritic Cell Subset Function in the Intestinal Mucosa. **J Immunol**, v. 195, n. 6, p. 2754-62, Sep 2015a. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26283477>>.

_____. The gut mucosal immune response to Toxoplasma gondii. **Parasite Immunol**, v. 37, n. 3, p. 108-17, Mar 2015b. ISSN 1365-3024. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418610>>.

DA COSTA, L. F. et al. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. **Immunobiology**, Sep 2016. ISSN 1878-3279. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27707513>>.

DE-GENNARO, L. A. et al. B-1 cells modulate oral tolerance in mice. **Immunol Lett**, v. 124, n. 2, p. 63-9, Jun 2009. ISSN 1879-0542. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389426>>.

DEFENDENTI, C. et al. B lymphocyte intestinal homing in inflammatory bowel disease. **BMC Immunol**, v. 12, p. 71, Dec 2011. ISSN 1471-2172. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22208453>>.

DIDIER, E. S. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of Encephalitozoon cuniculi (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. **Parasite Immunol**, v. 17, n. 8, p. 405-12, Aug 1995. ISSN 0141-9838. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7501421>>.

DIDIER, E. S. et al. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. **Vet Parasitol**, v. 126, n. 1-2, p. 145-66, Dec 2004. ISSN 0304-4017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15567583>>.

DIDIER, E. S.; WEISS, L. M. Microsporidiosis: current status. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n. 5, p. 485-92, Oct 2006. ISSN 0951-7375. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940873>>.

DIDIER, E. S. et al. Overview of the presentations on microsporidia and free-living amebae at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists. **Eukaryot Cell**, v. 8, n. 4, p. 441-5, Apr 2009. ISSN 1535-9786. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168752>>.

ENRIQUEZ, F. J. et al. Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. **Clin Infect Dis**, v. 26, n. 5, p. 1227-9, May 1998. ISSN 1058-4838. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597258>>.

_____. Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development in vitro. **Parasitology**, v. 117 (Pt 6), p. 515-20, Dec 1998. ISSN 0031-1820. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9881374>>.

FIELD, A. **Discovering statistics using IBM SPSS Statistics.** 4Th. London: SAGE Publications Ltd, 2013. ISBN ISBN-13: 978-1446249185.

GILLAN, V.; LAWRENCE, R. A.; DEVANEY, E. B cells play a regulatory role in mice infected with the L3 of Brugia pahangi. **Int Immunol**, v. 17, n. 4, p. 373-82, Apr 2005. ISSN 0953-8178. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15724063> >.

HA, S. A. et al. Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. **J Exp Med**, v. 203, n. 11, p. 2541-50, Oct 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060475> >.

HAAS, K. M. et al. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. **Immunity**, v. 23, n. 1, p. 7-18, Jul 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16039575> >.

HASTINGS, W. D. et al. Peritoneal B-2 cells comprise a distinct B-2 cell population with B-1b-like characteristics. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 5, p. 1114-23, May 2006. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16609926> >.

HAYAKAWA, K. et al. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. **Eur J Immunol**, v. 16, n. 10, p. 1313-6, Oct 1986. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3095127> >.

HERZENBERG, L. A. et al. The Ly-1 B cell lineage. **Immunol Rev**, v. 93, p. 81-102, Oct 1986. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096879> >.

JAMSHIDI, S. et al. Microsporidia in household dogs and cats in Iran; a zoonotic concern. **Vet Parasitol**, v. 185, n. 2-4, p. 121-3, Apr 2012. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035849> >.

KELLY, M. N. et al. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 1, p. 617-21, Jan 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618203> >.

KHAN, I. A.; MORETTO, M. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine Encephalitozoon cuniculi infection. **Infect Immun**, v. 67, n. 4, p. 1887-93, Apr 1999. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10085032> >.

KHAN, I. A. et al. CD8+ CTLs are essential for protective immunity against Encephalitozoon cuniculi infection. **J Immunol**, v. 162, n. 10, p. 6086-91, May 1999. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229850> >.

KOTKOVA, M. et al. 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**, v. 8, n. 4, p. e60941, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23593356> >.

KROESE, F. G.; BOS, N. A. Peritoneal B-1 cells switch in vivo to IgA and these IgA antibodies can bind to bacteria of the normal intestinal microflora. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 246, p. 343-9; discussion 350, 1999. ISSN 0070-217X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10396074>>.

KROESE, F. G. et al. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. **Int Immunol**, v. 1, n. 1, p. 75-84, 1989. ISSN 0953-8178. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2487677>>.

LEIPIG, M. et al. Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. **J Vet Diagn Invest**, v. 25, n. 1, p. 16-26, Jan 2013. ISSN 1943-4936. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23166180>>.

MACPHERSON, A. J. et al. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**, v. 288, n. 5474, p. 2222-6, Jun 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10864873>>.

MAJLESSI, L.; LO-MAN, R.; LECLERC, C. Regulatory B and T cells in infections. **Microbes Infect**, v. 10, n. 9, p. 1030-5, Jul 2008. ISSN 1286-4579. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18672084>>.

MANGAN, N. E. et al. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. **J Immunol**, v. 173, n. 10, p. 6346-56, Nov 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528374>>.

MARTIN, F.; OLIVER, A. M.; KEARNEY, J. F. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. **Immunity**, v. 14, n. 5, p. 617-29, May 2001. ISSN 1074-7613. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371363>>.

MATHEWS, A.; HOTARD, A.; HALE-DONZE, H. Innate immune responses to Encephalitozoon species infections. **Microbes Infect**, v. 11, n. 12, p. 905-11, Oct 2009. ISSN 1769-714X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19573618>>.

MATHIS, A.; WEBER, R.; DEPLAZES, P. Zoonotic potential of the microsporidia. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 3, p. 423-45, Jul 2005. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020683>>.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; DORSHKIND, K. New perspectives in B-1 B cell development and function. **Trends Immunol**, v. 27, n. 9, p. 428-33, Sep 2006. ISSN 1471-4906. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16861037>>.

_____. B-1 B cell development in the fetus and adult. **Immunity**, v. 36, n. 1, p. 13-21, Jan 2012. ISSN 1097-4180. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22284417>>.

MOON, H. et al. LPS-induced migration of peritoneal B-1 cells is associated with upregulation of CXCR4 and increased migratory sensitivity to CXCL12. **J Korean Med Sci**, v. 27, n. 1, p. 27-35, Jan 2012. ISSN 1598-6357. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22219610> >.

MORETTO, M. et al. 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, Jun 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390490> >.

MORETTO, M.; WEISS, L. M.; KHAN, I. A. Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral Encephalitozoon cuniculi infection. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4402-9, Apr 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034055> >.

MORETTO, M. M.; KHAN, I. A. IL-21 Is Important for Induction of KLRG1+ Effector CD8 T Cells during Acute Intracellular Infection. **J Immunol**, v. 196, n. 1, p. 375-84, Jan 2016. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597007> >.

MORETTO, M. M. et al. IFN-gamma-producing dendritic cells are important for priming of gut intraepithelial lymphocyte response against intracellular parasitic infection. **J Immunol**, v. 179, n. 4, p. 2485-92, Aug 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675510> >.

MUKHOPADHYAY, S. et al. 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**, v. 168, n. 6, p. 2914-21, Mar 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884462> >.

MURAKAMI, M.; HONJO, T. Involvement of B-1 cells in mucosal immunity and autoimmunity. **Immunol Today**, v. 16, n. 11, p. 534-9, Nov 1995. ISSN 0167-5699. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7495491> >.

NISITANI, S. et al. Administration of interleukin-5 or -10 activates peritoneal B-1 cells and induces autoimmune hemolytic anemia in anti-erythrocyte antibody-transgenic mice. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 11, p. 3047-52, Nov 1995. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489742> >.

PARRA, D. et al. Pivotal advance: peritoneal cavity B-1 B cells have phagocytic and microbicidal capacities and present phagocytosed antigen to CD4+ T cells. **J Leukoc Biol**, v. 91, n. 4, p. 525-36, Apr 2012. ISSN 1938-3673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22058420> >.

REETZ, J. et al. Identification of Encephalitozoon cuniculi genotype III and two novel genotypes of Enterocytozoon bieneusi in swine. **Parasitol Int**, v. 58, n. 3, p. 285-92, Sep 2009. ISSN 1873-0329. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318131> >.

SAK, B.; DITRICH, O. Humoral intestinal immunity against Encephalitozoon cuniculi (Microsporidia) infection in mice. **Folia Parasitol (Praha)**, v. 52, n. 1-2, p. 158-62, May 2005. ISSN 0015-5683. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16004375> >.

- SALÁT, J. et al. Efficacy of gamma interferon and specific antibody for treatment of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 6, p. 2169-74, Jun 2008. ISSN 1098-6596. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347109>>.
- SANTÍN, M.; FAYER, R. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. **Res Vet Sci**, v. 90, n. 3, p. 363-71, Jun 2011. ISSN 1532-2661. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699192>>.
- SCHMIDT, E. C.; SHADDUCK, J. A. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. **Infect Immun**, v. 40, n. 3, p. 936-42, Jun 1983. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6406368>>.
- SCHOENLAUB, L. et al. Role of B cells in host defense against primary *Coxiella burnetii* infection. **Infect Immun**, v. 83, n. 12, p. 4826-36, Dec 2015. ISSN 1098-5522. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26438792>>.
- SCORZA, A. V. et al. Prevalence of selected zoonotic and vector-borne agents in dogs and cats in Costa Rica. **Vet Parasitol**, v. 183, n. 1-2, p. 178-83, Dec 2011. ISSN 1873-2550. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846585>>.
- STOEL, M. et al. Restricted IgA repertoire in both B-1 and B-2 cell-derived gut plasmablasts. **J Immunol**, v. 174, n. 2, p. 1046-54, Jan 2005. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634929>>.
- SZYMCZAK, W. A. et al. X-linked immunodeficient mice exhibit enhanced susceptibility to *Cryptococcus neoformans* Infection. **MBio**, v. 4, n. 4, Jul 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820392>>.
- VALENCAKOVA, A.; HALANOVA, M. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 35, n. 1, p. 1-7, Jan 2012. ISSN 1878-1667. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22172576>>.
- WANG, Y.; ROTHSTEIN, T. L. Induction of Th17 cell differentiation by B-1 cells. **Front Immunol**, v. 3, p. 281, 2012. ISSN 1664-3224. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22973276>>.
- WARDEMANN, H. et al. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. **J Exp Med**, v. 195, n. 6, p. 771-80, Mar 2002. ISSN 0022-1007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11901202>>.
- WEBER, R.; DEPLAZES, P.; SCHWARTZ, D. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. **Contrib Microbiol**, v. 6, p. 166-92, 2000. ISSN 1420-9519. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10943512>>.
- WEIDNER, E. et al. Microsporidian spore invasion tubes as revealed by fluorescent probes. **Biol Bull**, v. 187, n. 2, p. 255-6, Oct 1994. ISSN 0006-3185. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7811808>>.

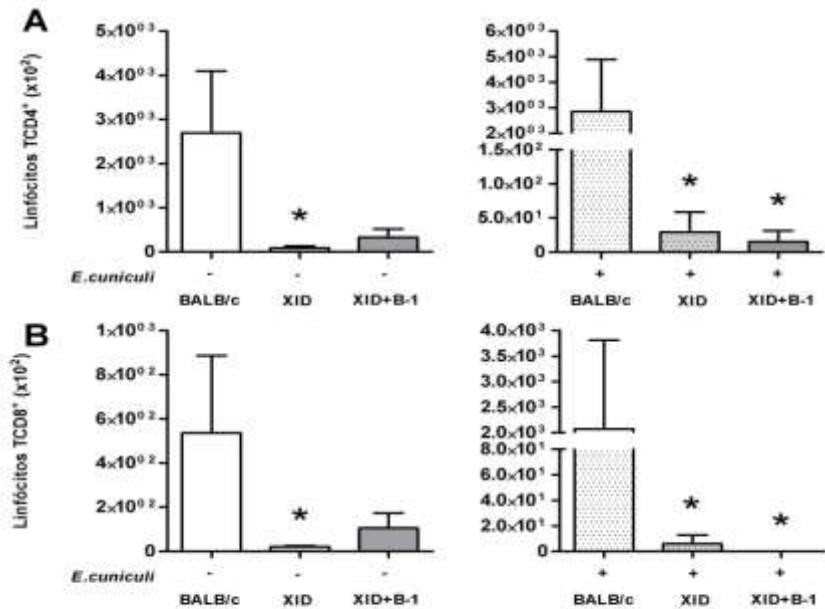


Figura Suplementar 1. Análise comparativa das populações celulares peritoneais entre camundongos BALB/c, BALB/c XID e BALB/c XID transferidas intraperitonealmente com 10^6 células B-1 provenientes de camundongos BALB/c (XID+B-1), inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) Número de linfócitos TCD4 CD19⁻CD8⁻CD4⁺ e B) Número de linfócitos TCD8 CD19⁻CD4⁻CD8⁺. Os dados foram transformados para análise estatística, a análise de variância de duas vias ANOVA com pós teste Tukey revelou $p < 0,05^*$. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

ANEXOS



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 138/12 CEUA/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado "O Papel das células B-1 na infecção experimental pelo Encephalitozoon cuniculi em camundongos, "Espécie utilizada: camundongo " "Número de animais utilizados: 60 " sob a responsabilidade de " MARIA ANETE LALLO e LIDIANA FLORA VIDOTO DA COSTA" , está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Federal nº 11.794/08 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 04 dias do mês de março de 2013.

A handwritten signature in cursive script, which appears to read "Juliana Guizi".

Juliana Guizi
Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade Paulista – UNIP

Campus: INDIANÓPOLIS
Rua: Doutor Bacelar, 1212 – Vila Clementino – São Paulo – SP – CEP: 04026-000
Fone: (11) 5586-4091 – Fax: (11) 5586-4073
E-mail: ceua@unip.br – <http://www.unip.br>



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 010/16 CEUA/UNIP, sobre o projeto de pesquisa intitulado "SUSCETIBILIDADE DE CAMUNDONGOS BALB-C XID À INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO ENCEPHALITOZOON CUNICULI, "Espécie utilizada: CAMUNDONGO " "Número de animais utilizados:30 " sob a responsabilidade de " DENISE LANGANKE DOS SANTOS" , está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei Federal nº 11.794/08 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

Universidade Paulista, em São Paulo-SP, aos 16 dias do mês março de 2016.

A handwritten signature in cursive script, which appears to read "Juliana Guizi".

Juliana Guizi
Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade Paulista – UNIP