

**Universidade Paulista**

**LUCIANE COSTA DALBONI**

***Encephalitozoon cuniculi* UTILIZA A EFEROCITOSE COMO  
MECANISMO DE EVASÃO DA IMUNIDADE**

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

Orientadora Prof. Dra. Maria Anete Lallo

**SÃO PAULO**

**2020**

Dalboni, Luciane Costa.

*Encephalitozoon cuniculi* utiliza a eferocitose como mecanismo de evasão da imunidade / Luciane Costa Dalboni. - 2020.  
64 f. : il. color.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Patogenia das Enfermidades Infecciosas e Parasitárias.

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

1. Células Jurkart. 2. Macrófagos medulares. 3. Fagocitose. 4. Apoptose. 5. *Encephalitozoon cuniculi*. 6. Microsporídios. I. Coutinho, Maria Anete Lallo (orientadora). II. Título.

LUCIANE COSTA DALBONI

***Encephalitozoon cuniculi* UTILIZA A EFEROCITOSE COMO  
MECANISMO DE EVASÃO DA IMUNIDADE**

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

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Prof.Dr<sup>a</sup>. Maria Anete Lallo  
Universidade Paulista

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Prof.Dr<sup>a</sup>. Diva Denelle Spadacci-Morena  
Instituto butantan

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Prof.Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado  
Universidade Paulista

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Prof.Dr<sup>o</sup>. José Guilherme Xavier  
Universidade Paulista

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Prof.Dr<sup>a</sup>. Anuska Marcelino Alvares Saraiva  
Universidade Cruzeiro do Sul

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À Deus por nunca me abandonar e por me fortalecer cada vez mais.

À minha mãe querida, pelo exemplo de coragem e simplicidade em suas metas, com muito amor me ensinou o caminho da justiça.

Aos meus filhos, Cleber e Beatriz pela compreensão das horas de ausência, amores da minha vida, me impulsionam a viver intensamente.

Aos meus irmãos, Wagner e Vivian que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus amigos, uma dádiva que ganhei de Deus, por me incentivarem a nunca desistir.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Maria Anete Lallo, por me aceitar como aluna e acreditar em mim, obrigada por me fazer sonhar, sentir melhor, crescer, rir, querer mudar, ir em frente, por todos ensinamentos prestados, sempre com muita dedicação.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP) pela bolsa de estudo. Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista (UNIP) pela oportunidade da concretização deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo, pela orientação prestada com muita dedicação e paciência, pela construção deste trabalho até a finalização.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alexandra Ivo de Medeiros da (UNESP) por contemplar um espaço para aprendizado e me ceder as células Jurkat da linhagem ATCC, por ajudar na construção do projeto. À Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina Guerta Salina da (UNESP) por me ensinar a trabalhar com as células Jurkat da linhagem ATCC.

À professora da Pós-graduação da UNIP, Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Perez Hurtado, pelo ensino em imunologia; pelo apoio na execução do projeto, pela ajuda com as referências bibliográficas.

À professora da (UNICSUL), Dr.<sup>a</sup> Anuska Marcelino Alvares Saraiva, pela construção deste trabalho até a finalização. Todos ensinamentos de imunologia e técnicas de laboratório.

À professora do Instituto Butantan, Dr.<sup>a</sup> Diva Denelle Spadacci-Morena, por realizar todas as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Confocal.

Ao professor da (UNIFESP), Dr. José Franco da Silva Filho, pela parceria em ceder o aparelho UVC-500 Ultraviolet Crosslinker por todo período experimental desse trabalho; À responsável técnica do laboratório de Parasitologia (UNIFESP), Dr.<sup>a</sup> Rafaela Andrade do Carmo, por me ensinar a trabalhar com o aparelho UVC-500.

Á amiga e aluna de pós-doutorado da (UNIFESP), Dr.<sup>a</sup> Fabiana Rodrigues Santana, por todos esses anos de amizade e por adquirir a parceria do equipamento de radiação UVC-500.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Molecular da UNIP, pelo apoio técnico e amizade: À Dr.<sup>a</sup> Fabiana Toshie de Camargo Konn, Suzana Bezerra, Cleide Santana e Osvaldo Martins Cordeiro.

Aos meus amigos e alunos da UNIP, especialmente a minha amiga Jéssica Feliciano Codeceira, pelo apoio técnico e amizade.

**Está tese é constituída por 2 capítulos:**

- 1. Introdução: Morte celular e Eferocitose -  
revisão de literatura**
- 2. Paper intitulado “*Encephalitozoon cuniculi*  
UTILIZA A EFEROCITOSE COMO MECANISMO  
DE EVASÃO DA IMUNIDADE” que será  
enviado para Cell Host & Microbe**

## **Capítulo 1.**

### **1.1 Introdução: Morte celular e Eferocitose - revisão de literatura**

A infecção por patógenos intracelulares pode levar à morte celular, sendo esta considerada um mecanismo desenvolvido para reduzir ou impedir a replicação e disseminação de patógenos (Stephenson et al., 2016). Para o hospedeiro, a morte desencadeada por patógenos podem proporcionar: (a) remoção do ambiente intracelular necessário para a sobrevivência e replicação; (b) efeitos antipatogênicos diretos dos componentes intracelulares liberados; (c) início de uma resposta inflamatória antimicrobiana pela apresentação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs); e (d) captação e apresentação de antígenos patogênicos pelas células apresentadoras de antígenos (Jorgensen et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na morte celular têm sido amplamente estudados nos últimos anos, provocando modificações na forma de entendimento do fenômeno de morte, que além das considerações tradicionais relativas à morfologia, observam os processos bioquímicos relacionados. Assim, a morte celular pode ser categorizada em necrose celular acidental (morte celular acidental) ou morte celular regulada, essa última incluindo várias formas de morte, como por exemplo apoptose (dependente ou independente de caspase), piroptose, partanatos e necroptose (Galluzzi et al., 2015).

A necrose ou morte celular acidental ocorre após um insulto físico ou químico grave, ruptura da membrana por extremos de pressão, temperatura, osmolaridade, pH ou exposição

a agentes como detergentes e toxinas bacterianas, e é insensível à manipulação farmacológica ou genética. Como a necrose resulta em liberação descontrolada do conteúdo celular, incluindo DAMPs, trata-se de um fenômeno altamente pró-inflamatório (Blander, 2017, Yatim et al., 2017).

A necroptose é uma forma regulada de necrose, na qual a célula se rompe e libera componentes intracelulares que podem desencadear uma resposta imune inata. Essa forma de necrose atua contra infecções mediadas por patógenos, caracterizadas morfológicamente por edema celular seguido pela ruptura da membrana plasmática (Brault, Oberst, 2017). É sabido que o envolvimento de receptores como Fas, TNF e TRAIL pode levar à morte celular através do recrutamento da caspase-8, levando ao início da via apoptótica extrínseca (Orzalli, Kagan, 2017). Ao contrário da natureza imunossupressora da apoptose, a necroptose é um processo altamente inflamatório e que não depende da atividade da caspase (Berghe, 2014, Wajant, 2019, Jinawong, 2020). A sinalização de necroptose é modulada pelas cinases RIPK1 e RIPK3 e a inibição dessas cinases confere resistência em vários modelos de doenças animais, sugerindo que a inflamação causada pela necroptose contribui para o dano tecidual e que inibidores dessas cinases podem ter potencial terapêutico (Newton, Manning, 2016; Orzalli, Kagan, 2017).

Partenatos é o termo utilizado para indicar um modo específico de morte celular envolvendo as enzimas responsivas a danos ao DNA, as polimerases (ADP-ribose, PARPs) e cromatólise, independente de caspases. Esse tipo de morte tem papel em vários cenários experimentais e fisiopatológicos, incluindo acidente vascular cerebral, diabetes, inflamação e neurodegeneração (David et al., 2009).

O termo piroptose foi utilizado para descrever uma morte peculiar de macrófagos infectados por *Salmonella typhimurium*, sendo posteriormente identificado para outras bactérias, incluindo *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis* e a toxina *Bacillus anthracis* (Elliott, Ravichandran, 2016). Posteriormente demonstrou-se que a piroptose não é um processo específico para macrófagos ou para infecções bacterianas, sendo que as células piroptóticas podem apresentar características morfológicas apoptóticas e/ou necróticas (Kepp et al., 2010, Man et al., 2017). Bioquimicamente, uma característica da piroptose é a ativação precoce da caspase-1 induzida através de inflamassoma, resultando na liberação de interleucina pirogênica-1b (IL-1b) e IL-18 (Hayward et al., 2018). A piroptose é uma morte celular programada altamente inflamatória, utilizada pela imunidade inata no combate a patógenos intracelulares (Bergsbaken et al, 2009).

Tradicionalmente, a apoptose foi reconhecida como uma morte celular programada e dependente de caspases, resultando em uma série de alterações morfológicas e moleculares com a fragmentação nuclear e celular e a formação de vesículas apoptóticas que expressam os sinais “find-me” e “eat-me”, atraindo fagócitos, levando ao *clearance* por eferocitose (Galluzzi et al., 2015). A apoptose é crucial para a homeostase normal do tecido e para a modulação da resposta imune e pode ser desencadeada por uma grande variedade de patógenos, incluindo bactérias intracelulares, parasitas e vírus (Shigekazu, 2018). A apoptose também pode ser iniciada por linfócitos T citotóxicos (CTLs) ou células natural killers (NK) que liberam granzimas, que ativam caspases apoptóticas. Após a conclusão da apoptose, o conteúdo celular é encapsulado dentro dos corpos apoptóticos ligados à membrana. Se esses

corpos não forem limpos, eles sofrerão necrose secundária (ruptura), liberando DAMPs no espaço extracelular (Jorgensen et al., 2017).

A indução de morte celular pode ser suficiente para reduzir e controlar a replicação de patógenos ou pode ser associada ou mediada por mecanismos eferocitários (Martin et al., 2014). Nesse sentido, estudos voltados para o reconhecimento dos mecanismos de morte celular envolvidos na patogênese de infecções têm sido desenvolvidos para entender se constituem ferramentas de evasão da resposta imune e perpetuação no hospedeiro. Vários patógenos intracelulares, incluindo microsporídios, desenvolveram meios para subverter mecanismos de apoptose para manter ou prolongar a infecção. O microsporídio *E. cuniculi* é capaz de suprimir a apoptose de células Vero e modular o ciclo celular (del Aguila et al., 2006). Microsporídios de insetos, como *Anncaliia algerae*, *Nosema bombycis* e *Nosema ceranae*, inibem a apoptose, respectivamente, de fibroblastos pulmonares humanos (Scanlon et al., 1999), de células ovarianas de *Bombix mori* (He et al., 2015) e de células do epitélio ventricular de *Apis mellifera* (Hige et al., 2007). O fungo *Cryptococcus neoformans*, vem sendo estudado devido a sua capacidade de resistir ao mecanismo de morte que os macrófagos alveolares produzem, sugerindo que um dos mecanismos seja devido a cápsula presente em volta desse fungo, necessitando de mais estudos para esclarecer a relevância desse patógeno no mecanismo “Cavalo de tróia” (Rodas, 2012).

Por outro lado, alguns patógenos podem usar mecanismos eferocitários para invadir o fagócito em uma manobra do tipo “cavalo de Tróia” e, assim, perpetuar ou melhorar a replicação e disseminação (Martin et al., 2014). No ambiente inflamatório observa-se inicialmente uma resposta proinflamatória aos patógenos com injúria tecidual. Posteriormente, a produção de lipídios e citocinas antiinflamatórias suprimem a inflamação e restauram a homeostasia tecidual. A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos é

crucial nos eventos tardios da inflamação. O processo de fagocitose de células apoptóticas, também denominado eferocitose, envolve a interação de um grande número de receptores e opsoninas com seus respectivos ligantes celulares expostos durante os vários estágios da morte celular programada. A eferocitose resulta na supressão da resposta imune pela liberação de mediadores antiinflamatórios como IL-10, TGF- $\alpha$ , prostaglandina E2 (PGE2), assim como inibição da síntese de mediadores proinflamatórios como TNF- $\gamma$ , GM-CSF, IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-18 e LTC<sub>4</sub> (Medeiros et al., 2009, Karaji, Sattentau, 2017).

O impacto da imunossupressão induzida pela fagocitose de células apoptóticas tem sido demonstrado em diferentes modelos de infecção e processos inflamatórios crônicos. A interação de linfócitos T apoptóticos com macrófagos infectados promove o crescimento de parasitas de forma dependente de prostaglandina (PGE2), TGF- $\alpha$  e síntese de poliaminas. A produção exacerbada de PGE2 tem sido associada a maior suscetibilidade a infecções bacterianas, além de induzir a produção de IL-10 (Strassmann et al., 1994), a PGE2 inibe muitos aspectos funcionais de macrófagos e neutrófilos atuando diretamente nos mecanismos de defesa antimicrobiana no pulmão (Behar et al., 2011). Desta forma, os estudos referentes aos receptores e sinais moleculares desencadeados por PGE2 na supressão da resposta imune induzida por células apoptóticas são de grande relevância para o entendimento da participação de eicosanóides como moduladores da resposta imune nas infecções. A inibição da atividade microbicida por PGE2 é mediada por EP2 e EP4 através da inibição da ativação de NADPHox e geração de ROI (*reactive oxygen intermediate*).

## Referências

- Behar, S.M., Martin, C.J., Booty, M.G., Nishimura, T., Zhao, X., Gan, H.X., Divangahi, M. and Remold, H.G. (2011). Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* 4(3), 279-87.
- Berghe, V.T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. 15, 135-147.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L. and Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 7, 99–109.
- Blander, J.M. (2017). The many ways tissue phagocytes respond to dying cells. *Immunol Rev.* 277(1), 158–173.
- Brault, M. and Oberst, A. (2017). Controlled detonation: evolution of necroptosis in pathogen defense. *Immunol Cell Biol.* 95(2), 131–136.
- Campana, L., Lewis, S.J.P., Pellicoro, A., Aucott, L.R., Man, J., O'Duibhir, E., Mok, E.S., Gonzalez, F.S., Livingstone, E., Greenhalgh, N.S., et al. (2018). The STAT3-IL10-IL-6 pathway is a novel regulator of macrophage efferocytosis and phenotypic conversion in sterile liver injury. *J Immunol.* 200, 1169-1187.
- David, K.K., Andrabi, S.A., Dawson, T.M. and Dawson, V.L. (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci.* 14, 1116–1128.
- del Aguila C., Izquierdo F., Granja A.G., Hurtado C., Fenoya S., Fresno M. and Revilla Y. (2006). *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *I J Parasitol.* 36, 869–876

- Elliott, M.R. and Ravichandran, K.S. (2016). The dynamics of apoptotic cell clearance. *Dev Cell*. 38 (2), 147–160.
- Galluzzi, L., Bravo-San, Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., et al. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD. *Cell Death Differ*. 22(1), 58–73.
- Hayward, A.J., Mathur, A., Ngo, C. and Si Ming, M. (2018). Cytosolic Recognition of Microbes and Pathogens: Inflammasomes in Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 82(4), 1–40.
- He, X., Fu, Z., Li, M., Liu, H., Cai, S., Man, N. and Lu, X. (2015). *Nosema bombycis* (Microsporidia) suppresses apoptosis in *BmN* cells (*Bombyx mori*). *Acta Bioch Bioph Sin*. 47(9), 696–702.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R. and Meana, A. (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol*. 94, 211–217
- Jinawong, K., Apaijai, N., Wongsuchai, S., Pratchayasakul, W., Chattipakorn, N. and Chattipakorn, C.S. (2020). Necrostatin-1 Mitigates Cognitive Dysfunction in Prediabetic Rats With no Alteration in Insulin Sensitivity. *Diabetes*. 19, 1128.
- Jorgensen, I., Rayamajhi, M. and Miao, E.A. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol* 17(3), 151–164.
- Karaji, N. and Sattentau, Q.J. (2017). Efferocytosis of pathogen-infected cells. *Front. Immunol*. 22.
- Kepp, O., Galluzzi, L., Zitvogel, L. and Kroemer, G. (2010). Pyroptosis – a cell death modality of its kind? *Eur J Immunol*. 40, 627–630.

- Man, S.M., Karki, R. and Kanneganti, T.D. (2017). Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev.* 277(1), 61–75.
- Martin, C.J., Peters, K.N. and Behar, S.M. (2014). Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. *Curr Opin Microbiol.* 17, 17–23.
- Medeiros, A.I., Serezani, C.H., Lee, S.P. and Peters-Golden, M. (2009). Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling. *J Exp Med.* 206, 61-68.
- Newton, K. and Manning, G. (2016). Necroptosis and inflammation. *Ann Rev Bioch.* 85, 743-763.
- Orzalli, M.H. and Kagan, J.C. (2017). Apoptosis and necroptosis as host defense strategies to prevent viral infection. *Trends Cell Biol.* 27(11), 800–809.
- Rodas, G.R., and Zaragoza, O. (2012). Catch me if you can: phagocytosis and killing avoidance by *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 64, 147-161.
- Santoni, G., Morelli, B.M., Amantini, C., Santoni, M., Nabissi, M., Marinelli, O. and Santoni, A. (2018). Immuno-transient Receptor Potential Ion channels: The Role in Monocyte-and Macrophage Mediated Inflammatory Responses. *Immunol.* 9, 1-7.
- Scanlon, M., Leitch, G.J., Shaw, A.P., Moura, H. and Visvesvara, G.S. (1999). Susceptibility to apoptosis is reduced in the Microsporidia-infected host cell. *J Eukaryot Microbiol.* 46, 34S–35S
- Shigekazu, N. (2018) Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Ann Rev Immunol.* 36, 489-517.
- Stephenson, H.N., Herzig, A. and Zychlinsky, A. (2016). Beyond the grave: when is cell death critical for immunity to infection? *Curr Opin Immunol.* 38, 59–66.
- Wajant, H., and Siegmund, D. (2019). TNFR1 and TNFR2 in the control of the life and death

balance of macrophages. *Front Cell Dev Biol.* 7, 91.

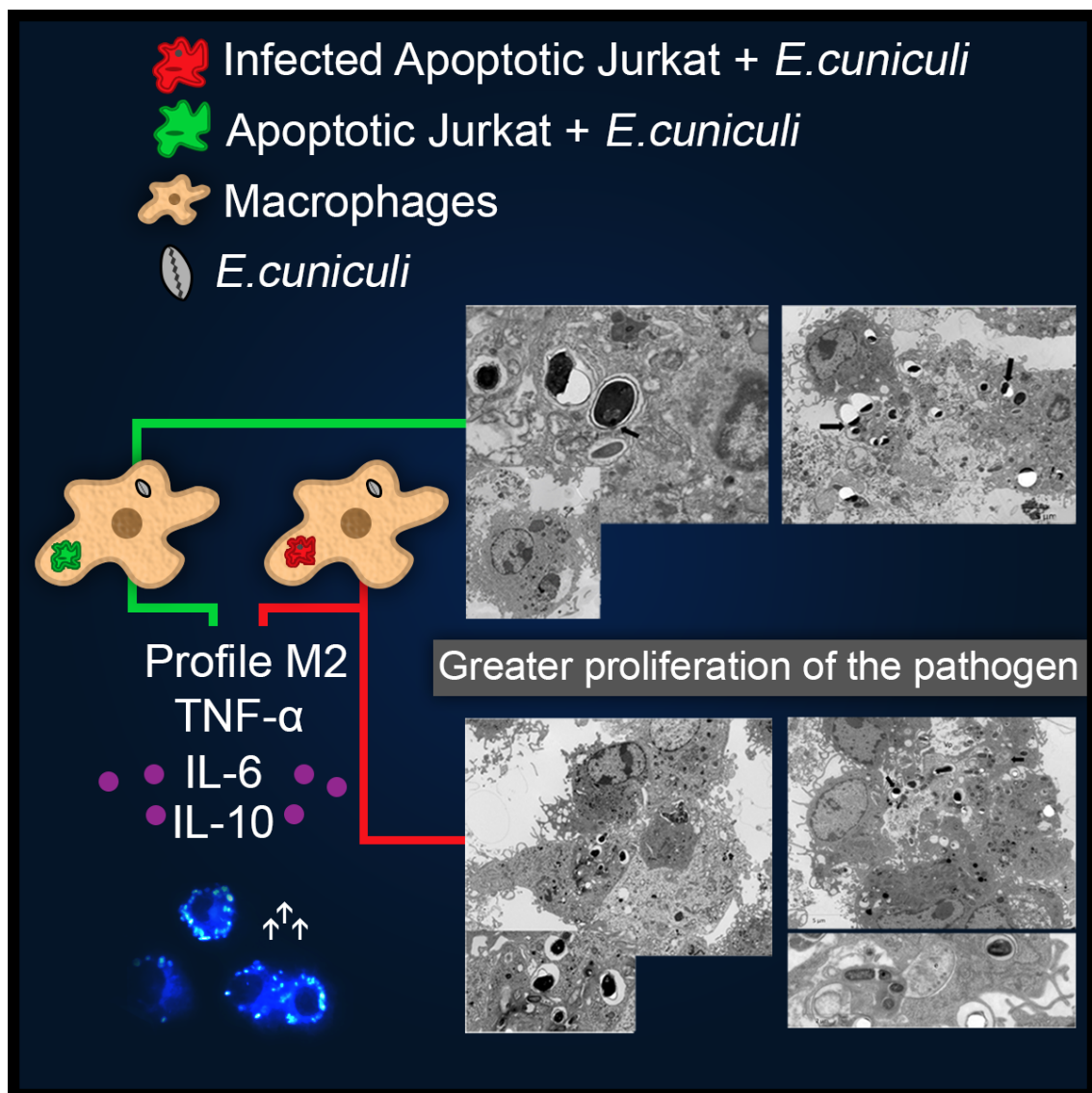
Xin, Z. and Siuyuan, M. (2018). Anti-lipopolysaccharide egg yolk antibodies enhance the phagocytosis of mammalian phagocytes. *Biology Open.* 7, 1-8.

Yatim, N., Cullen, S. and Albert, M.L. (2017). Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol.* 17(4), 262–75.

## 2. Paper que será enviado para Cell

### Host & Microbe

#### Graphical Abstract



***Encephalitozoon cuniculi* UTILIZA A EFEROCTOSE COMO MECANISMO DE  
EVASÃO DA IMUNIDADE**

***Encephalitozoon cuniculi* TAKES ADVANTAGE OF EFFEROCTOSIS TO EVADE  
THE IMMUNE SYSTEM.**

Luciane Costa Dalboni<sup>1</sup>, Anuska Marcelino Alvares Saraiva<sup>2-3</sup>, Fabiana Toshie de Camargo Konno<sup>1</sup>, Elizabeth Cristina Perez<sup>1</sup>, Jéssica Feliciano Codeceira<sup>1</sup>, Ana Carolina Guerta Salina<sup>4</sup>, Diva Denelle Spadacci-Morena<sup>3</sup>, Alexandra Ivo de Medeiros<sup>4</sup>, Rafaela Andrade do Carmo<sup>5</sup>, José Franco da Silva Filho<sup>5</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista

<sup>2</sup>Mestrado e Doutorado Interdisciplinar em Ciências da Saúde da Universidade Cruzeiro do Sul

<sup>3</sup>Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan

<sup>4</sup>Universidade Estadual Paulista-Araraquara

<sup>5</sup>Universidade Federal de São Paulo

## RESUMO

Os microsporídios são reconhecidos como patógenos oportunistas em indivíduos com imunodeficiências, especialmente de células T. Estudos têm demonstrado participação importante de macrófagos no início da infecção, embora a atividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> seja primordial para eliminação desses patógenos, macrófagos e outras células da imunidade inata apresentam um papel crítico na ativação da imunidade adquirida. Após a morte programada, fragmentos celulares ou corpos apoptóticos são depurados por células fagocíticas, fenômeno denominado eferocitose e que tem sido reconhecido como forma de evasão da imunidade por patógenos intracelulares. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto da eferocitose de células apoptóticas infectadas ou não em macrófagos desafiados com o microsporídio *Encephalitozoon cuniculi*. Para tal, macrófagos, obtidos a partir de monócitos de medula óssea de camundongos C57BL, foram pré-incubados com células Jurkat apoptótica (ACs) e então desafiados com esporos de *E. cuniculi*. Os mesmos procedimentos foram realizados para experimentos utilizando células Jurkat previamente infectadas (IACs) com esporos de *E. cuniculi* antes da pré-incubação de macrófagos. Foram contabilizados os macrófagos em fagocitose e o número médio de esporos internalizados pelos mesmos pela técnica de Calcoflúor. A expressão de CD40, CD206, CD80, CD86 e MHCII foram mensuradas por citometria de fluxo, assim como as citocinas liberadas nos sobrenadantes das culturas. O estudo ultraestrutural foi realizado para análise das formas de multiplicação do patógeno. Macrófagos pré-incubados com ACs desafiados com *E. cuniculi* apresentaram maior porcentagem de fagocitose e média de esporos internalizados e presença de estágios de multiplicação do patógeno no interior dos macrófagos, particularmente após a eferocitose de corpos apoptóticos infectados. Adicionalmente, a pré-incubação com ACs ou IACs e/ou o desafio com o patógeno diminuiu a viabilidade dos macrófagos, marcada por altas porcentagens de apoptose. Embora com expressão aumentada de CD40 e liberação de citocinas próinflamatórias, foi a expressão acentuada de CD206 e a liberação de grandes quantidades de IL-10 e IL-6 que indicou a polarização dos macrófagos para um perfil M2, compatível com eferocitose e a permissividade ao desenvolvimento do patógeno. Nós concluímos que o patógeno se favoreceu com a eferocitose e polarizou os macrófagos para um perfil M2, o que permitiu a sobrevivência e multiplicação do *E. cuniculi* no interior de

macrófagos, fato que pode explicar a possibilidade de macrófagos atuarem como cavalos de Tróia nas microsporidioses.

**Palavras-Chave:** Células jurkart, macrófagos medulares, fagocitose, apoptose, *Encephalitozoon cuniculi*, microsporídios.

## ABSTRACT

Microsporidia are recognized as opportunistic pathogens in individuals with immunodeficiencies, especially T cells. Studies have shown an important participation of macrophages in the beginning of the infection, although the activity of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes is essential to eliminate these pathogens, macrophages and other innate immunity cells. play a critical role in activating acquired immunity. After programmed death, cell fragments or apoptotic bodies are cleared by phagocytic cells, a phenomenon called efferocytosis and which has been recognized as a way of evading immunity by intracellular pathogens. In view of the above, the objective of the present study was to evaluate the impact of the efferocytosis of apoptotic cells infected or not on macrophages challenged with the *Encephalitozoon cuniculi* microsporidia. For this purpose, macrophages, obtained from bone marrow monocytes from C57BL mice, were pre-incubated with apoptotic Jurkat cells (ACs) and then challenged with *E. cuniculi* spores. The same procedures were performed for experiments using previously infected Jurkat cells (IACs) with *E. cuniculi* spores before macrophage pre-incubation. Macrophages in phagocytosis and the average number of spores internalized by the Calcofluor technique were counted. The expression of CD40, CD206, CD80, CD86 and MHCII were measured by flow cytometry, as well as the cytokines released in the culture supernatants. The ultrastructural study was carried out to analyze the forms of multiplication of the pathogen. Macrophages pre-incubated with CAs challenged with *E. cuniculi* showed a higher percentage of phagocytosis and an average number of internalized spores and the presence of stages of multiplication of the pathogen inside the macrophages, particularly after the efferocytosis of infected apoptotic bodies. Additionally, pre-incubation with ACs or IACs and/or the challenge with the pathogen decreased the viability of macrophages, marked by high percentages of apoptosis. Although with increased expression of CD40 and release of proinflammatory cytokines, it was the marked expression of CD206 and the release of large amounts of IL-10 and IL-6 that indicated the polarization of macrophages to an M2 profile, compatible with efferocytosis and permissiveness to pathogen development. We concluded that the pathogen favored efferocytosis and polarized the macrophages to an M2 profile, which allowed the survival and multiplication of *E. cuniculi* inside macrophages, a fact that may explain the possibility of macrophages acting as Trojan horses in microsporidiosis.

**Key words:** Jurkart cells, medullary macrophages, phagocytosis, apoptosis, *Encephalitozoon cuniculi*, microsporidia

## SUMÁRIO

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Morte celular e Eferocitose.....	7
--------------------------------------	---

### 2. PAPER

<i>Encephalitozoon cuniculi</i> utiliza a eferocitose como mecanismo e evasão da imunidade” que será enviado para Cell Host & Microbe.....	16
---	----

### 3. INTRODUÇÃO .....23

### 4. MATERIAL E MÉTODOS .....28

4.1 Cultura de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....	28
--	----

4.2 Camundongos doadores de medula.....	28
---	----

4.3 Obtenção de macrófagos a partir de precursores da medula óssea.....	29
---	----

4.4 Viabilidade e fenótipo de macrófagos obtidos da medula.....	29
---	----

4.5 Cultura de células Jurkat.....	30
------------------------------------	----

4.6 Apoptose induzida pela radiação ultravioleta (UV) de células Jurkat.....	31
--	----

4.7 Infecção e apoptose de células Jurkat .....	31
---	----

4.8 Delineamento experimental.....	31
------------------------------------	----

4.9 Quantificação da fagocitose de esporos de <i>E. cuniculi</i> por macrófagos.....	32
--	----

4.10 Determinação de citocinas no sobrenadante de culturas.....	32
---	----

4.11 Quantificação da fagocitose de células Jurkat apoptóticas por macrófagos.....	32
---	----

4.12 Viabilidade e fenótipo celular de macrófagos pré-incubados com células Jurkat e infectados.....	34
---	----

4.13 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	34
---	----

4.14 Análise da internalização de esporos por células Jurkat.....	35
---	----

4.15 Análise estatística.....	36
-------------------------------	----

### 5. RESULTADOS.....36

5.1 Apoptose de células Jurkat pela irradiação com luz UV.....	36
--	----

5.2 Multiplicação de <i>E. cuniculi</i> em macrófagos pré-incubados com células apoptóticas.....	37
---	----

5.3 Perfil de macrófagos M2 com produção de IL-10 associado à eferocitose e desafio com <i>E. cuniculi</i> .....	46
---	----

### 6. DISCUSSÃO.....51

### 7. REFERÊNCIAS.....57

### APÊNDICES

Figura Suplementar 1.....	63
---------------------------	----

### ANEXOS

Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	64
--	----

### 3.INTRODUÇÃO

O filo Microsporídia compreende um grupo diversificado de patógenos unicelulares, intracelulares obrigatórios, formadores de esporos, amplamente distribuídos na natureza desde sua identificação há mais de 150 anos, como agente etiológico da pebrina em bicho da seda (Vávra, 2014, Cali et al., 2017). São descritos mais de 200 gêneros e 1.400 espécies de microsporídios, sendo filogeneticamente relacionados como um clado irmão do reino Fungi (Capella-Gutiérrez et al., 2012). Os microsporídios estão entre os agentes intracelulares mais eficientes e desenvolvidos para o parasitismo de invertebrados e vertebrados. Nos mamíferos, na infecção típica ocorre uma relação balanceada entre hospedeiro e patógeno que resulta em doença clínica branda em indivíduos com imunidade íntegra, porém infecções disseminadas graves podem ser letais para indivíduos imunossuprimidos. Portanto, por serem agentes oportunistas, a importância para a saúde humana e animal surgiu quando o advento da AIDS se tornou uma pandemia (Didier, 2011). Hoje se sabe que os microsporídios também acometem indivíduos imunossuprimidos por neoplasias, por quimioterapia ou por tratamento antitransplante, acometem também crianças e idosos (Anane, 2010, Didier, 2005, Didier, 2011; Karimi et al., 2020).

*Encephalitozoon cuniculi*, o primeiro microsporídio cultivado com sucesso *in vitro* (Shadduck, 1969), causa infecção de células epiteliais, endoteliais, fibroblastos e macrófagos de uma grande variedade de mamíferos e é experimentalmente utilizado para compreender os diferentes aspectos da patogenia das microsporidioses (Anane, 2010). Os microsporídios entram nas células hospedeiras pela extrusão do túbulo polar dos esporos ou pela fagocitose/endocitose dos esporos por macrófagos e outros fagócitos. Dentro da célula do hospedeiro, desenvolve seus estágios proliferativos, por esquizogonia/merogonia e

esporogonia, no interior de um vacúolo parasitóforo para formar esporos infectantes e rompe a membrana celular, causando a morte da célula hospedeira (Han et al., 2020). Os macrófagos locais, em especial do tubo digestivo, rapidamente reconhecem os microsporídios por meio de várias classes de receptores, incluindo receptores de reconhecimento padrão (PRR). Cogita-se a possibilidade de que sejam *Toll-like receptor 2* (TLR2) e TLR4, os quais ativam NF- $\kappa$ B (fator nuclear Kappa B) e aumentam a secreção de quimiocinas, recrutando mais macrófagos a partir de monócitos. Adicionalmente, o reconhecimento dos microsporídios por macrófagos também pode resultar na produção de um grande número de outros mediadores de defesa, incluindo citocinas, e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Didier, 1995, Texier et al., 2010). Não é raro observar que os microsporídios evadem dessa resposta protetora, e então, os macrófagos se tornam verdadeiros cavalos de Tróia, carreando esses patógenos pelo corpo e infectando novas células, porém os mecanismos envolvidos neste tipo de resposta ainda são desconhecidos e podem ser decisivos para o curso da infecção (Mathews et al., 2009).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> possuem função importante na defesa contra patógenos intracelulares como os microsporídios (Khan et al., 1999, Ghosh, 2012). Após reconhecer antígenos específicos, as células T CD8<sup>+</sup> possuem 3 mecanismos para matar células infectadas. O primeiro inclui a produção de citocinas, em especial IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais tem atividade de interferir na replicação de microrganismos e antitumoral, induzindo a apoptose. Em segundo lugar, produção e secreção de grânulos citotóxicos com granzimas e perforinas (Chávez-Galán et al., 2009). As perforinas formam poros na membrana das células-alvo, por onde as granzimas penetram, iniciando a apoptose da célula infectada via caspase 8. O terceiro mecanismo de morte celular envolve a via Fas/FasL. A célula T CD8 ativada expressa FasL na sua superfície, que se liga ao receptor Fas da célula alvo, determinando uma modificação molecular que ativa a cascata das caspases e a apoptose (Chávez-Galán et al.,

2009). Contra os microsporídios, morte de células infectadas mediada por perforinas e granzimas tem suporte em estudos que mostram a morte de camundongos KO para perforinas na infecção experimental por *E. cuniculi* (Khan et al., 1999) de forma semelhante ao que ocorre com camundongos CD8<sup>-/-</sup> tratados com albendazol sobreviveram a toda duração experimental, frente a enorme carga de microsporídios, apesar da presença de mecanismos imunológicos e tratamentos atualmente considerados eficazes, os linfócitos T CD8 representam um mecanismo efetivo principal, mas não único, que controla a microsporidiose (Sak et al., 2017).

A morte celular programada desempenha um papel importante na imunidade inata e adquirida como uma maneira eficaz de eliminar as células infectadas e controlar a infecção (Galimbert et al., 2019). Por outro lado, alguns patógenos bloqueiam ou atrasam a morte das células hospedeiras para promover sua replicação intracelular no início da infecção, a fuga e a disseminação podem eventualmente exigir lise das células hospedeiras, como por exemplo fazem os microsporídios. Por exemplo, *Anncaliia algerae* inibe a apoptose induzida em fibroblastos pulmonares humanos (Scanlon et al., 1999), *E. cuniculi* suprime a apoptose induzida nas células Vero e modula o ciclo celular através da inibição do fator supressor de tumor p53 (del Aguila et al., 2006), e *Nosema bombycis* suprime a apoptose de células ovarianas de *Bombix mori* (He et al., 2015). Em alguns casos, as vias de morte celular são cooptadas pelos patógenos como estratégia de patogênese. Além disso, ao induzir a morte das células hospedeiras, os patógenos podem eliminar as principais células de defesa e, conseqüentemente, evitar as defesas do hospedeiro. Assim, a morte da célula infectada possui papel relevante no curso da infecção e da resposta imune, sendo a inflamação subsequente um fenômeno determinante para a resolução ou permissividade da infecção, esse fenômeno é conhecido como eferocitose (Martin et al., 2014).

A fagocitose de polimorfonucleares apoptóticos com patógeno internalizados pode levar à morte do patógeno ou o neutrófilo pode atuar como um veículo de transporte, permitindo a transferência do patógeno ingerido para o macrófago, como observado em patógenos intracelulares, como *Leishmania major* (van Zandbergen et al., 2004), *Chlamydia pneumoniae* (van Zandbergen et al., 2004) e *Burkholderia pseudomallei* (Krakauer, 2018).

Inicialmente a eferocitose foi definida como fagocitose de corpos apoptóticos infectados ou não por fagócitos (Grabiec, 2016), mais recentemente, esse conceito foi ampliado e a eferocitose envolve também a fagocitose de outras células mortas por necrose programada, com papel crucial nos eventos tardios da inflamação. O processo de eferocitose envolve a interação de um grande número de receptores e opsoninas com seus respectivos ligantes celulares expostos durante os vários estágios da morte celular programada. A eferocitose resulta na supressão da resposta imune pela liberação de mediadores antiinflamatórios como IL-10, TGF- $\beta$ , prostaglandina E2 (PGE2), assim como inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-18 e LTC<sub>4</sub> (Kim et al., 2012; Medeiros et al., 2009).

Com essas particularidades específicas, a eferocitose tem sido investigada como um mecanismo de evasão da resposta imunológica por agentes infecciosos. Entretanto, para *M. tuberculosis* (Mtb), a eferocitose de macrófagos infectados apoptóticos por macrófagos determinou maior atividade microbicida (Briken et al., 2012, Martin et al., 2012., 2014), enquanto que Mtb é liberado por macrófagos que sofrem necrose programada e pode infectar e proliferar em outros macrófagos, propiciando a disseminação da doença (Dallenga et al., 2017), sendo a necrose o tipo de morte que favorece este patógeno (Upadhyay et al., 2018). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto da eferocitose de células

apoptóticas infectadas ou não em macrófagos desafiados com o microsporídio *Encephalitozoon cuniculi*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultura de *Encephalitozoon cuniculi*

Os esporos de *E. cuniculi* obtidos do Waterborne® Inc. foram cultivados em células RK-13 (*Rabbit Kidney*) no Laboratório de Culturas Celulares da Universidade Paulista. Para o desenvolvimento do patógeno, as células RK foram mantidas em 10 ml de meio RPMI 1640-suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e (0,1%) gentamicina, em frascos com capacidade de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Semanalmente, o meio de cultura foi coletado e centrifugado (por 20 minutos a 1500xg) para obtenção dos esporos, e novo meio foi adicionado às culturas. A contagem dos esporos de *E. cuniculi* foi feita em câmara de Neubauer. Antes da infecção das culturas, os esporos foram lavados em PBS e purificados em gradiente de Percoll, após a concentração foi ajustada para 2 esporos por célula de cultura (2:1).

### 4.2 Camundongos doadores de medula

Os camundongos isogênicos *Specific Pathogen Free (SPF)* da linhagem C57BL/6 fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (Cedeme/UNIFESP). Os animais foram mantidos durante o período experimental no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista, em microisoladores com capacidade para cinco animais, com controle de luminosidade em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 23°C, umidade relativa do ar de 45 a 55% e ventilação controlada, recebendo *ad libitum* ração peletizada irradiada e

água esterilizada por autoclavagem. Todos os procedimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (Protocolo número 010/17).

#### **4.3 Obtenção de macrófagos a partir de precursores da medula óssea**

Realizou-se eutanásia dos animais com aprofundamento anestésico por quetamina (100 mg/ml), xilazina (20 mg/ml) e fentanil (0,05 mg/ml). Os fêmures e tíbias dos camundongos C57BL/6 foram coletados assepticamente, e então, as medulas ósseas foram extraídas pela infusão de 10 ml de PBS. Os agregados celulares rompidos por cuidadosa homogeneização e os debris celulares foram eliminados por tampão hemolítico Amoniumchloride/Tris Buffer (ACT), com concentração (160mM NH<sub>4</sub>CL, 170mM TRIS-base). Após a lavagem com RPMI, as suspensões de células foram cultivadas em R10 (RPMI + 10% SFB + 1% Gentamicina) com adição de sobrenadante de células L929 para estimular a diferenciação de macrófagos, mantendo-se as culturas a 37°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por 5 a 7 dias, sendo adicionados mais 8 ml desse meio no 4º dia. No 7º dia, os macrófagos foram desaderidos em RPMI após permanecerem por 15 minutos em cama de gelo, com auxílio de cell scraper. Em seguida, os macrófagos foram contados e cultivados na concentração de 2x10<sup>5</sup> células por poço em placas de 24 poços, sendo empregado azul de Trypan para verificar a viabilidade, que foi de pelo menos 90%.

#### **4.4 Viabilidade e fenótipo de macrófagos obtidos da medula**

A viabilidade foi analisada após o cultivo com Kit 7AAD/Anexina (BD Pharmingen), de acordo com as recomendações do fabricante. Sucintamente, as células foram centrifugadas e ressuspendidas no tampão do Kit, em seguida foram adicionados 1 µl de Anexina e 1 µl de 7AAD. Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente e protegido da luz, adicionou-

se tampão do kit e foi feita a quantificação de apoptose em citômetro de fluxo Accuri™C6 (BD Biosciences, Mountain View, CA), coletando-se 30 segundos de cada tubo. Para a fenotipagem dos macrófagos em perfil M1 ou M2, após a desadesão, o bloqueio dos receptores Fc inespecíficos foi feito com a incubação com anticorpos anti-CD16/32 por 15 minutos. Após lavar com tampão Macs (0,5% BSA e 0,075% EDTA), os macrófagos foram marcados com o anticorpo monoclonal anti-F4/80 de camundongo conjugado a *phycoerythrin* (PE), anticorpo monoclonal anti-MHC II de camundongo conjugado a *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC), anticorpo monoclonal anti-CD80 e anti-CD86 de camundongo conjugado a (FITC), anticorpo monoclonal anti-CD40 camundongo conjugado a *PECy5* e anticorpo monoclonal anti-CD206 de camundongo conjugado a *Alexa Fluor®* 647 por 30 minutos a 4°C. Mais uma vez foi realizada a lavagem com tampão Macs e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS para a leitura em citômetro de fluxo Accuri™C6, para viabilidade e fenotipagem coletou-se 200.000 eventos por 30 segundos em cada amostra.

#### **4.5 Cultura de células Jurkat**

As células Jurkat da linhagem ATCC foram gentilmente doadas pela Profa. Alexandra Ivo de Medeiros. Departamento de Ciências Biológicas, laboratório de Imunologia Básica da UNESP de Araraquara e mantidas em freezer -80°C. Para cada experimento, as células foram descongeladas, centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, homogeneizadas e ressuspensas em 10 ml de meio R10. Em seguida, as células foram cultivadas em garrafas pequenas e incubadas em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Com a multiplicação celular as células eram transferidas para garrafas médias com R10, até a obtenção de número satisfatório para os experimentos, ou seja, 10 células Jurkat para cada macrófago (10:1).

#### **4.6 Apoptose induzida pela radiação ultravioleta (UV) de células Jurkat**

As células Jurkat (ACs) foram centrifugadas por 5 minutos em 1500 rpm e resuspendidas em 5 ml em R10, homogeneizadas e contadas para obtenção de número suficiente para o experimento. Para a indução de apoptose, usamos emissão de radiação UV - de 100 joules, empregando-se o aparelho UVC-500 Ultraviolet Crosslinker (Amersham, Biosciences USA), em parceria com o departamento de Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp). Foram empregadas  $2 \times 10^5$  células por tubo. Após 4 horas de incubação, a quantificação de apoptose foi realizada com Kit 7AAD/Anexina (BD Pharmingen), de acordo com as recomendações do fabricante e como descrito anteriormente.

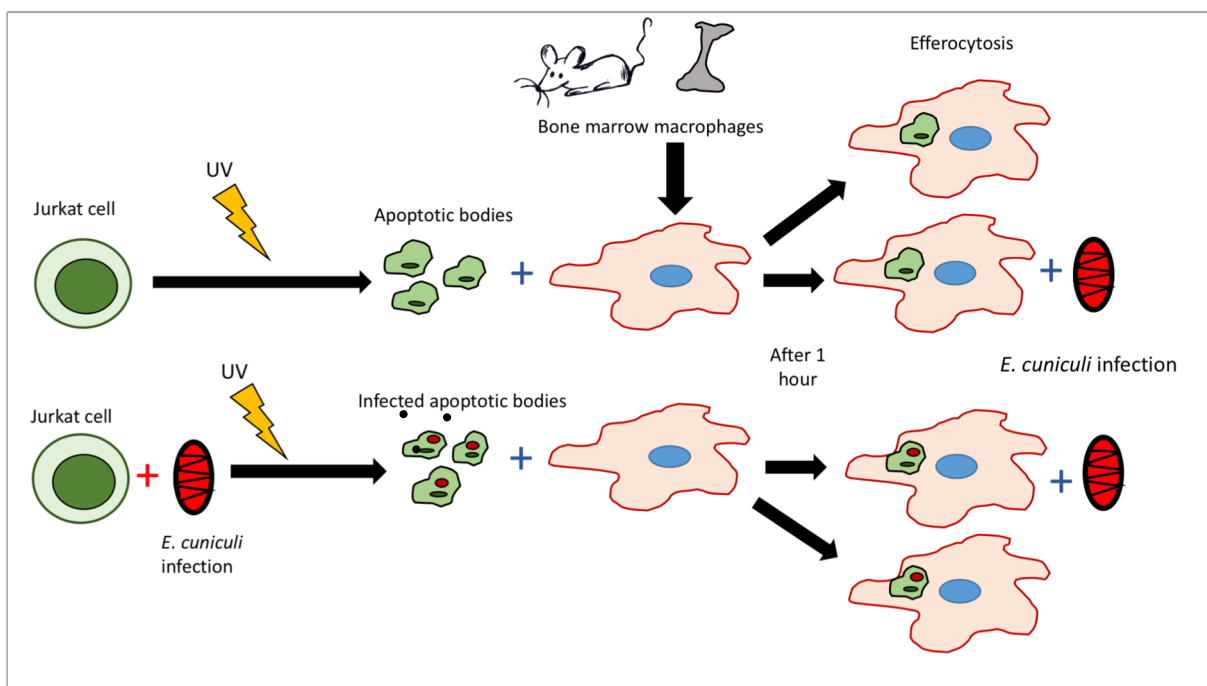
#### **4.7 Infecção e apoptose de células Jurkat**

As células Jurkat foram infectadas (IACs) com esporos de *E. cuniculi* na proporção de 2 esporos por célula. Após 1h e 30 minutos de incubação, as células foram centrifugadas por 1500 rpm 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com 10 ml de meio. Foram colocadas  $2 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$  ou  $6 \times 10^6$  de células por placa de petri e ajustadas para 10 ml de meio para cada placa, em seguida foi realizada a radiação de 100 joules com a tampa aberta dentro do aparelho de UV, em seguida completou-se com mais 10 ml de meio, sendo incubada por 4 horas para ocorrer a apoptose. Para todos os experimentos, verificou-se a porcentagem de apoptose com o Kit 7AAD/Anexina, conforme descrito anteriormente.

#### **4.8 Delineamento experimental**

Aos macrófagos cultivados nas placas de cultura celular de 24 poços, foram acrescentadas  $6 \times 10^6$  células Jurkat previamente infectadas com *E. cuniculi* ou não por poço, foram mantidos nas condições de incubação por 1 hora para ocorrer a eferocitose. Após esse período, o

sobrenadante foi descartado e novo meio com  $4 \times 10^5$  esporos de *E. cuniculi* por poço foi acrescido e incubado. Após uma hora, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com PBS, em seguida acrescentou-se 1000 µl de R10 por poço, sendo mantidos por 1 hora, 12 e 24 horas para observação dos eventos decorrentes da eferocitose (Figura 1).



**Figura 1.** Delineamento experimental mostrando que macrófagos foram pré-incubados com células Jurkat apoptóticas, previamente infectadas ou não com *E. cuniculi*, e posteriormente, após a eferocitose, foram desafiados com infecção pelo *E. cuniculi* totalizando 4 grupos: Macrófago com *E. cuniculi*; Macrófago com ACs; Macrófago com ACs e *E. cuniculi*; Macrófago com IACs e *E. cuniculi*.

#### 4.9 Quantificação da fagocitose de esporos de *E. cuniculi* por macrófagos

Após 1 e 24 horas de incubação, as lamínulas foram coradas com calcoflúor e os esporos internalizados por 100 macrófagos foram contados a partir de imagens capturadas por câmera digital (Eye-Câmera, DINO-EYE® - AM7023, China) acoplada a microscópio de fluorescência (Olimpus-BX60 Tokyo, Japão). A porcentagem de macrófagos que fagocitaram esporos de *E.*

*cuniculi* e o número médio de esporos internalizados por macrófago foram obtidos e analisados estatisticamente.

#### **4.10 Determinação de citocinas no sobrenadante de culturas**

A liberação de citocinas por macrófagos pré-incubados com células apoptóticas foi realizada com o sobrenadante das culturas desafiadas com *E. cuniculi* nos tempos de uma hora, 12 e 24 horas. Utilizou-se o *Kit inflammation* (BD Biosciences, CA, USA) para detecção de MCP-1, IL-12p70, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Brevemente, 25  $\mu$ L de cada amostra foram incubados juntamente com as *beads* de captura, específicas para cada citocina, conjugadas a APC e com o anticorpo de detecção 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 BD Accuri<sup>TM</sup>C6 (BD Biosciences, Mountain View, CA). As análises foram realizadas usando o *software* de análise FCAP Array 3.0.

#### **4.11 Quantificação da fagocitose de células Jurkat apoptóticas por macrófagos**

Para mensurar a quantificação de fagocitose de células Jurkat infectadas ou não pelos macrófagos, as células Jurkat foram marcadas com *Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidy* BD-Horizon (CFSE). Brevemente, o (CFSE) foi diluído em 1  $\mu$ L de CFSE para 5.000  $\mu$ L de PBS para concentração de 5 mM e acrescentado 1 ml dessa solução em até  $30 \times 10^6$  de células Jurkat, por 10 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com 10 mL de PBS e ressuspendidas em R10 e irradiadas com um pulso de energia de 100 joules de luz UV. Após 4 horas de incubação, as células foram centrifugadas e cocultivadas com macrófagos por uma hora. Os macrófagos foram desaderidos, conforme descrito previamente na obtenção de

macrófagos a partir de precursores da medula óssea, e após bloqueio dos receptores Fc inespecíficos, foram marcados com o anticorpo monoclonal anti-F4/80 de camundongo conjugado a *Allophycocyanin* (APC) para a leitura em citômetro de fluxo Accuri™C6, coletando-se 200.000 eventos por 30 segundos em cada amostra. Foram excluídas as células apoptóticas que não foram fagocitadas e os dados obtidos foram analisados com auxílio do programa Prisma.

#### **4.12 Viabilidade e fenótipo celular de macrófagos pré-incubados com células Jurkat e infectados**

Análise do fenótipo celular e da viabilidade dos macrófagos foi realizada no tempo de 1 hora e 24 horas, após incubação na presença ou ausência de *E. cuniculi*, para macrófagos pré-incubados ou não com células Jurkat apoptóticas (*Infected Jurkat* ou *Uninfected Jurkat*). Após esse tempo, as células foram desaderidas das placas de cultura e transferidas para tubos. A viabilidade foi mensurada com o kit 7 AAD/Anexina, já descrito. Os macrófagos foram fenotipados para os perfis M1 e M2 de acordo com a descrição anterior. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo Accuri™C6 (BD Biosciences, Mountain View, CA), coletando-se 200.000 eventos por 30 segundos em cada amostra. As análises dos dados foram obtidas através do programa Prisma.

#### **4.13 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Os macrófagos diferenciados foram cultivados em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> para constituir os seguintes grupos: Macrófago com *E. cuniculi*; Macrófago com ACs; Macrófago com ACs e *E. cuniculi*; Macrófago com IACs e *E. cuniculi*. Manteve-se as culturas por 24 horas após a infecção com *Encephalitozoon cuniculi*. Após esse tempo, procedeu-se desadesão das células com cell

scraper em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2). O sedimento foi mantido a 4°C durante 10 h, pós-fixados em OsO<sub>4</sub> a 1% tamponado durante 2h a 4°C. As amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol e embebidas em resina EMBed-812. Foram realizados cortes semifinos, corados com Azul de Toluidina e observados e fotografados em microscópio de luz DM LS (Leica), com captador de imagem DFC 420 (Leica) e programa de imagem Leica Application Suite versão 3.1.0. Os cortes ultrafinos foram duplamente corados com acetato de uranila aquoso e citrato de chumbo e, em seguida, observado sob examinados no microscópio eletrônico LEO EM 906E, a 80kV.

#### **4.14 Análise da internalização de esporos por células Jurkat**

As células Jurkat foram previamente cultivadas e marcadas com o corante fluorescente PKH-26 (Sigma Aldrich, St Luis, MO, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante descartado para acrescentamos 2 µl do corante PKH 26 em 500 µl do diluente C (kit PKH). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, foram feitas 3 lavagens com RPMI. Paralelamente, os esporos de *E. cuniculi* foram marcados com 0,1 µL de CFSE em 1.000 µL de PBS com a concentração de 10 mM, sendo incubado por 37°C por 10 minutos protegido da luz. Após lavar com PBS, os esporos foram inoculados nas garrafas com as células Jurkat marcadas pelo PKH, na proporção de 2 esporos por célula. O tempo de infecção foi de 1 hora e 30 minutos e então centrifugamos os sobrenadantes e o pellet de células foram colocadas em lâminas silanizadas e fixadas com PFA 4% para a preservação celular, após foi acrescentado o Dapi (Fluoroshield sigma St Luis, MO, USA) para coloração do núcleo. A observação e registro das imagens foi realizada em microscópio confocal Leica TCS SP8 com o programa LAS X.

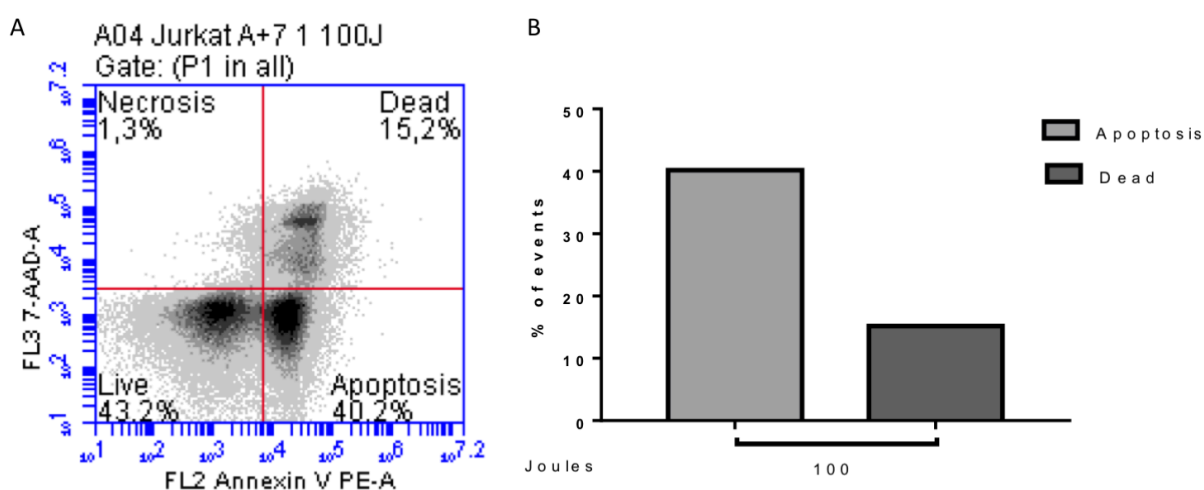
#### 4.15 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 7 utilizando-se a análise de variância ANOVA em uma ou duas vias para comparação entre os grupos. Os valores foram apresentados como média das replicatas experimentais  $\pm$  o erro padrão. Os valores de  $p < 0,05$  indicarão significância estatística, com intervalo de confiança de 95%.

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 Apoptose de células Jurkat pela irradiação com luz UV

Para promover apoptose e induzir a eferocitose utilizamos 1 pulso de intensidade de energia de 100 joules de radiação UV sobre as células Jurkat (Roduit, R., Schorderet 2008). Foi selecionada para esse estudo a intensidade de 100 joules de luz UV, com o qual mostrou-se porcentagens de apoptose em média de 40% e com cerca de 15% de células mortas (Figura 2).

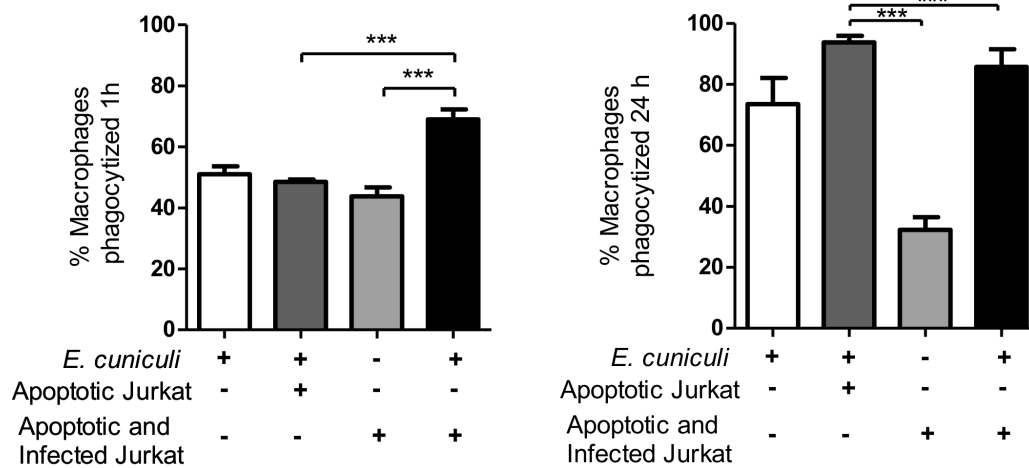
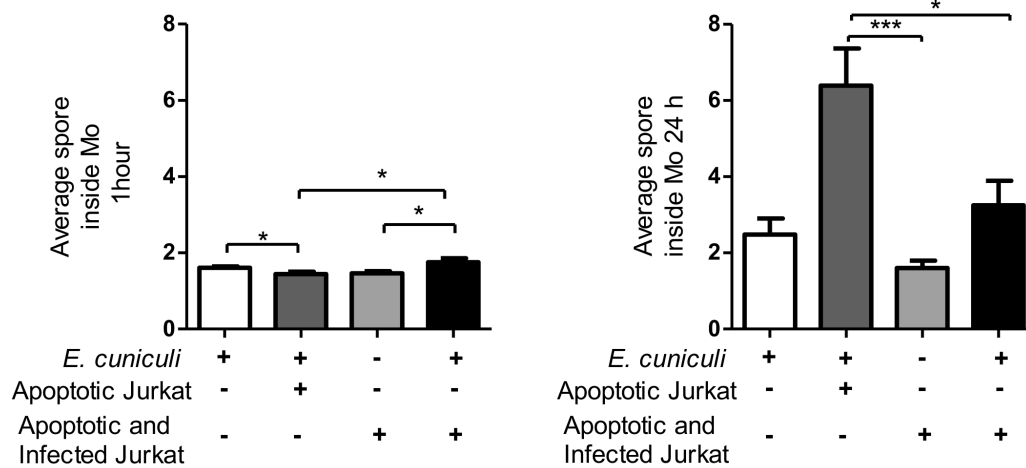
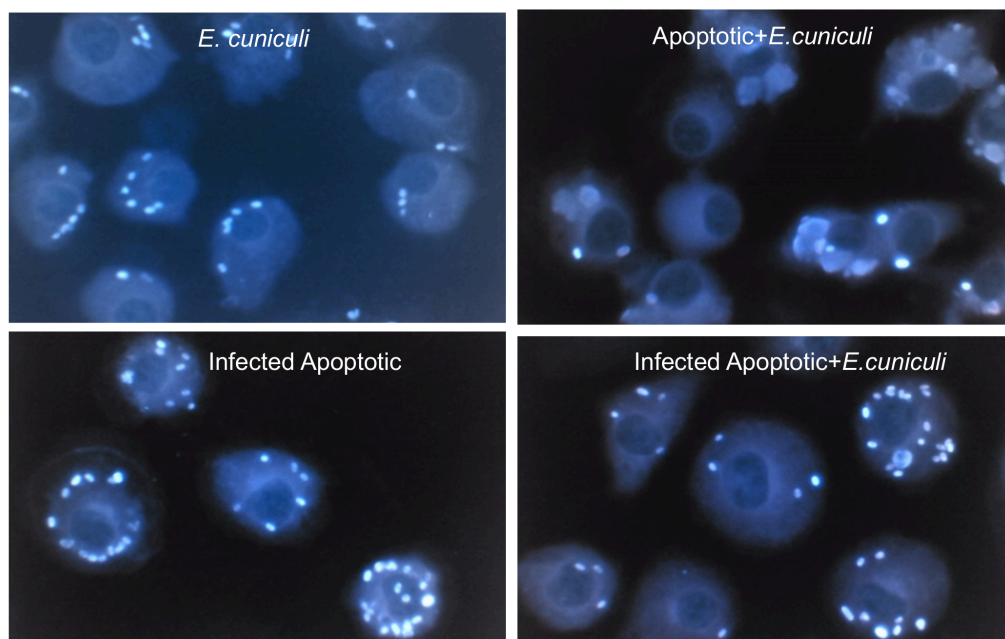


**Figura 2.** Avaliação de apoptose induzida por 100 joules de irradiação UV. (A) Dotplot mostrando as porcentagens obtidas de células vivas (7AAD<sup>-</sup>Annexin<sup>-</sup>), necróticas (7AAD<sup>-</sup>Annexin<sup>-</sup>), apoptóticas (7AAD<sup>-</sup>Annexin<sup>+</sup>) ou em apoptose tardia (7AAD<sup>+</sup>Annexin<sup>-</sup>), (B) Porcentagens obtidas de apoptose (Apoptosis) e apoptose tardia (Death) mediante a 1 pulso de intensidade de energia de 100 joules.

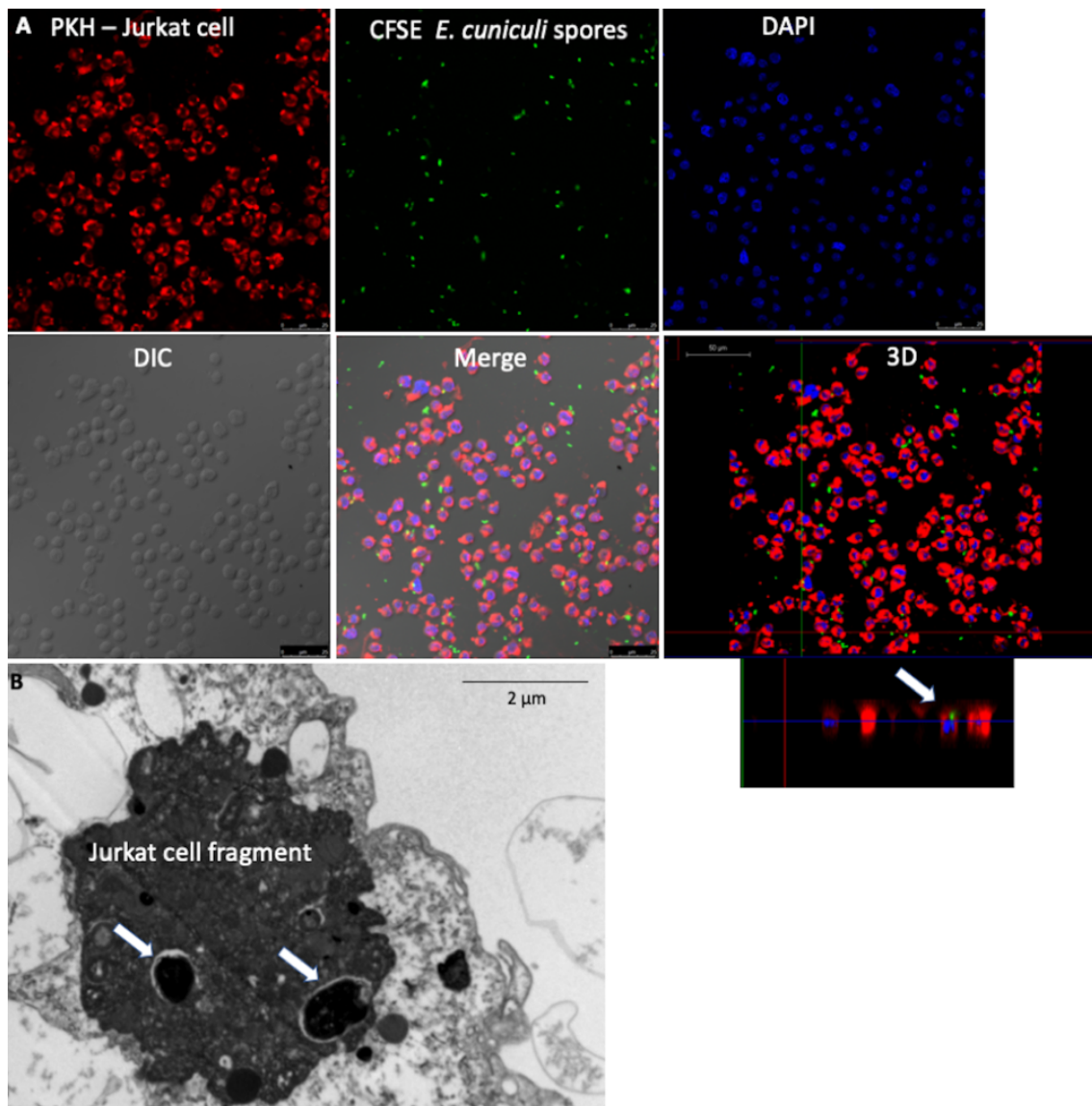
## 5.2 Multiplicação de *E. cuniculi* em macrófagos pré-incubados com células apoptóticas

Os macrófagos foram incubados com células apoptóticas (ACs) e, então, desafiados com esporos de *E. cuniculi* para avaliar se a eferocitose modifica a atividade de macrófagos na microsporidiose. Após uma hora do desafio, cerca de 50% dos macrófagos tinham internalizado em média menos de 2 esporos, já em 24h, foi observada 80% de macrófagos em fagocitose com média de 2 esporos no interior dos macrófagos (Figura 3), sugerindo a multiplicação do patógeno ou morte de macrófagos. A apoptose de células infectadas é comum nas enfermidades causadas por patógenos intracelulares cuja resolução é dependente da atividade citotóxica de linfócitos T CD8, sendo possível a fagocitose de corpos apoptóticos infectados. Aqui, nós avaliamos se a eferocitose de células Jurkat infectadas poderiam modular a atividade de macrófagos. Demonstrou-se que a infecção de células Jurkat pela presença de esporos de *E. cuniculi* em seu citoplasma, indicando que o patógeno foi internalizado por esses linfócitos (Figura 4). A porcentagem de apoptose de células Jurkat infectadas foi semelhante ao grupo não infectado, assim a infecção por um tempo limitado não modificou a suscetibilidade desses linfócitos à apoptose. Pela microscopia eletrônica de transmissão após 24 horas, observou-se esporos íntegros no interior de macrófagos em fagossomos e material amorfo em vacúolos fagossômicos sugerindo lise dos esporos (Figura 4), inclusive com a formação de megassomos (Figura 5 C). Nenhuma forma de desenvolvimento do patógeno foi reconhecida, portanto, não foi confirmada a multiplicação do patógeno no interior desses macrófagos.

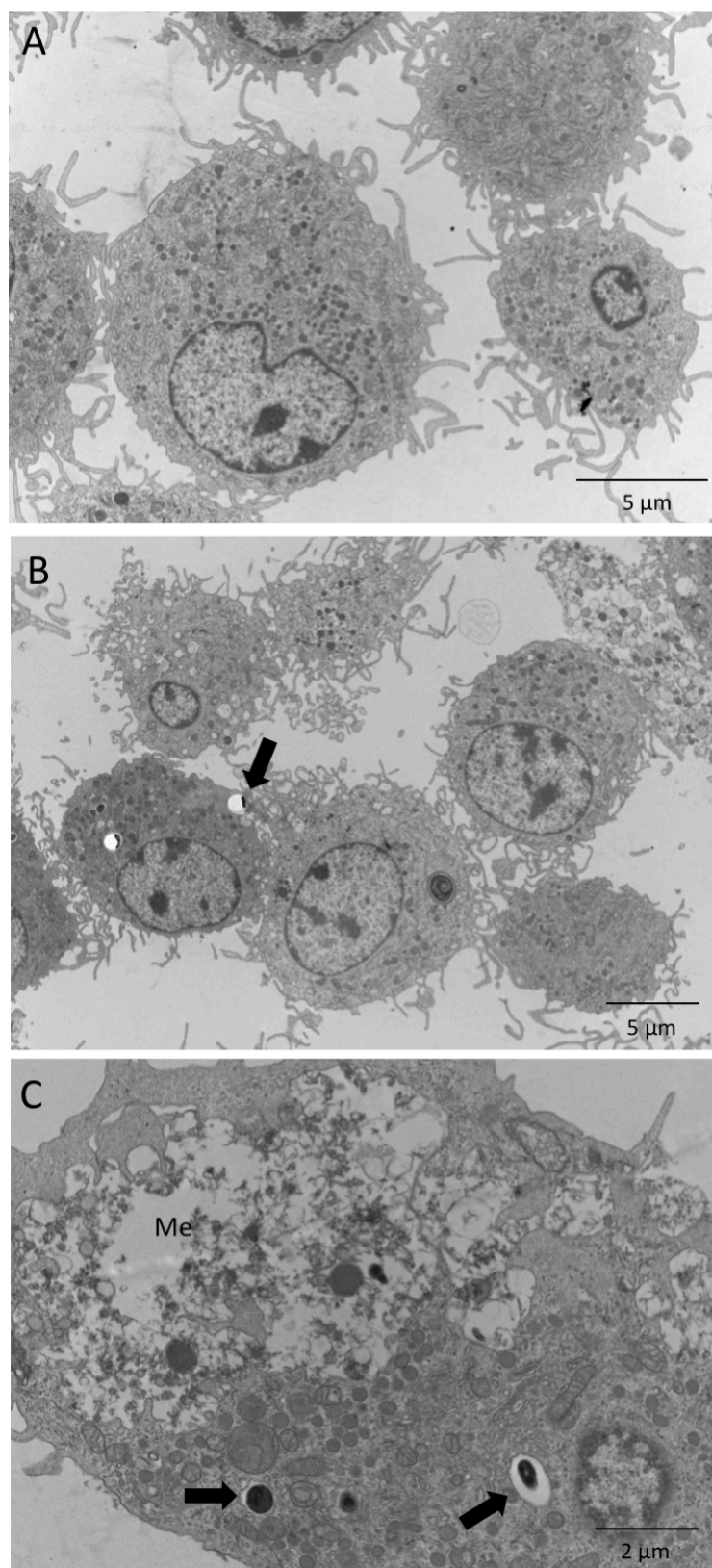
A pré-incubação de macrófagos com ACs determinou a fagocitose de corpos apoptóticos, demonstrando a ocorrência de eferocitose (Figura 6 A, B; Figura Suplementar 1). Adicionalmente, foram observadas células em necrose, caracterizada pela ruptura da membrana celular (Figura 6 C).

**A****B****C**

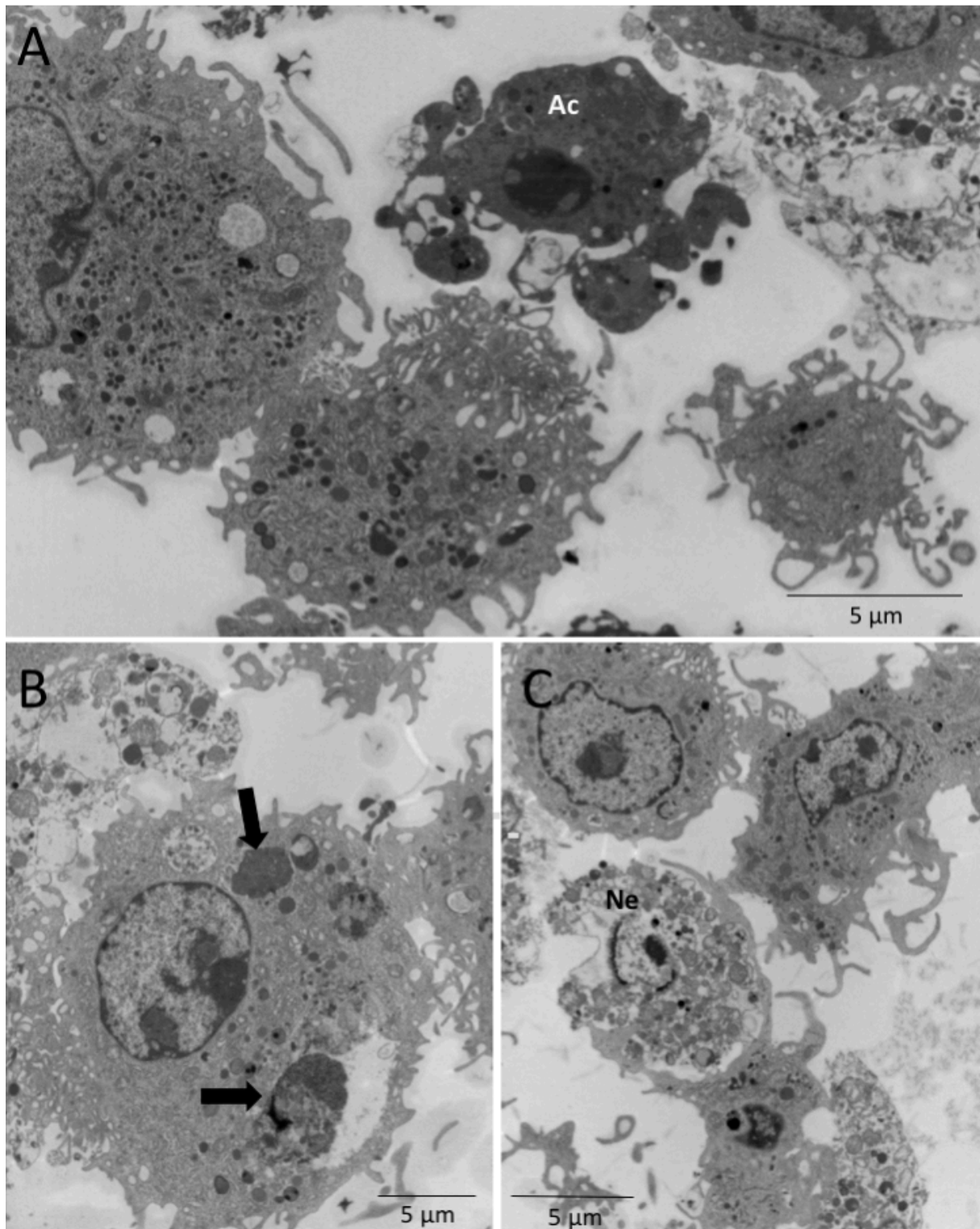
**Figura 3.** Avaliação da atividade fagocítica de macrófagos pré-incubados (+) ou não (-) com células apoptóticas (ACs) ou células infectadas apoptóticas (IACs) e desafiados com *E. cuniculi*. (A) Porcentagem de macrófagos fagocitando esporos em uma hora e 24 horas de incubação. (B) Média de esporos no interior de macrófagos em uma hora e 24 horas de incubação. (C) Fotomicrografia de macrófagos com esporos de *Encephalitozoon cuniculi* corados pelo Calcofluor após pré-incubação com ACs ou IACs. A análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Tukey revelou, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  com significância entre os grupos.



**Figura 4.** Infecção de células Jurkat (ACs) por *E. cuniculi*, antes da indução de apoptose. (A) Células Jurkat (ACs) coradas com PKH. Esporos de *E. cuniculi* marcados com CFSE. Fluorescência do núcleo corado com DAPI. Culturas em contraste de fase - DIC. Sobreposição das imagens evidenciando esporos internalizados e íntegros dentro das células Jurkat, confirmados na imagem 3D (seta). (Fotomicrografias) (B) Ultramicrografia de fragmento de célula Jurkat infectada com *E. cuniculi* (seta).



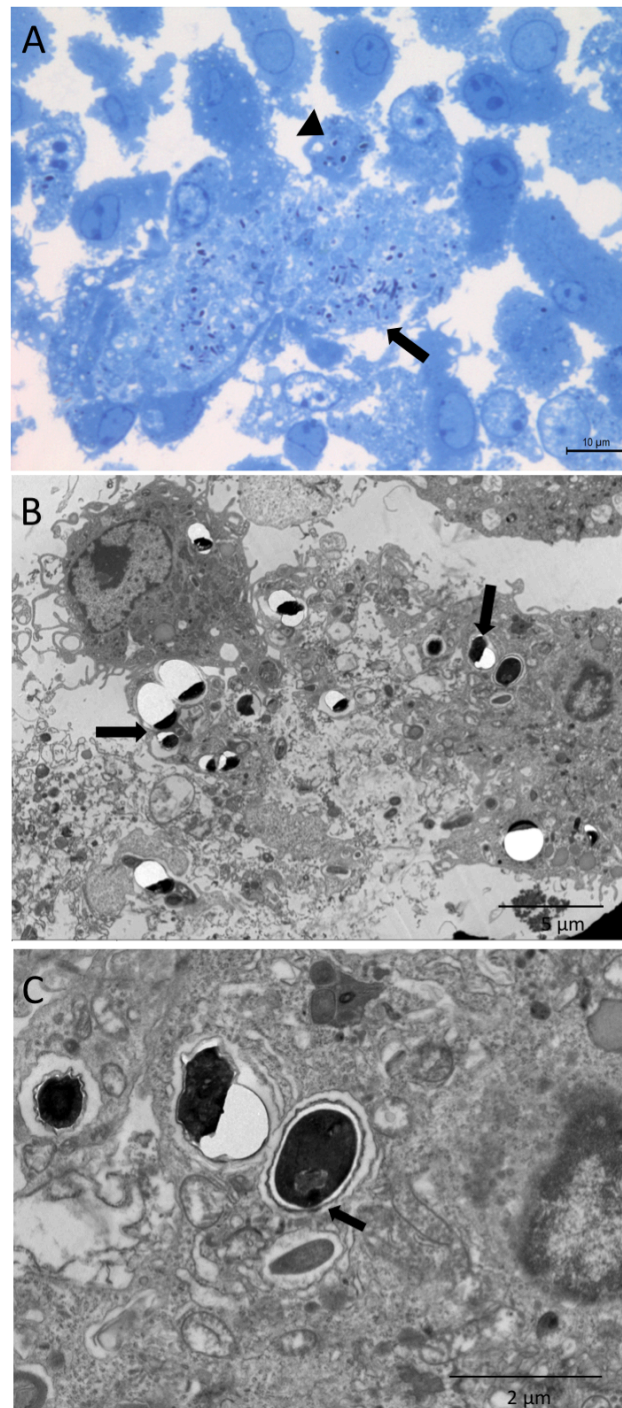
**Figura 5.** Ultramicrografia de macrófagos infectados pelo *E. cuniculi*. (A) Macrófagos controles. (B) Macrófagos desafiados com esporos de *E. cuniculi* mostram esporos internalizados em fagossomos no citoplasma (seta). (C) Macrófago com esporos de *E. cuniculi* internalizados em fagossomos no citoplasma (seta) e com megassomo (Me).



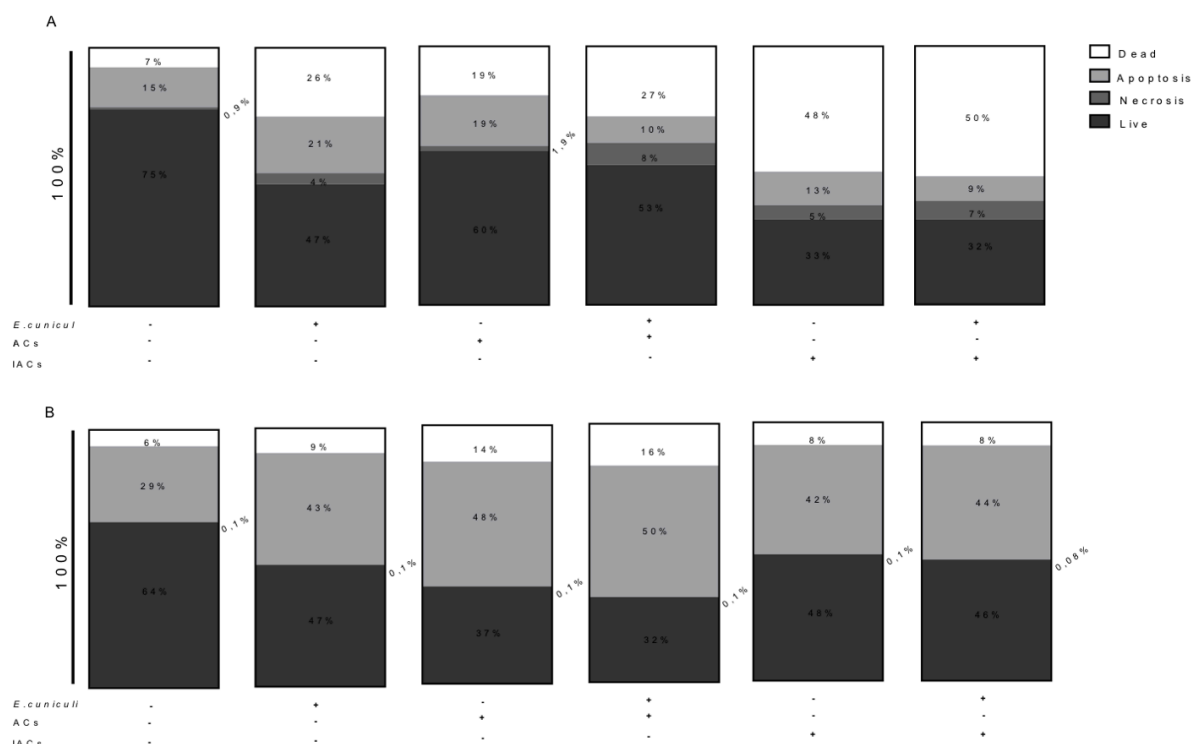
**Figura 6.** Ultramicrografia de macrófagos pré-incubados com células apoptóticas. (A) Macrófagos ao redor de célula apoptótica (Ac). (B) Corpos apoptóticos (seta) fagocitados por macrófago. (C) Macrófago emitindo pseudópodes envolvendo conteúdo de células necróticas (Ne).

Quando macrófagos pré-incubados com ACs foram desafiados com *E. cuniculi* observou-se aglomerados de esporos íntegros em áreas sugestivas de vacúolos parasitóforos rompido (Figura 7 A, B), assim como se identificou esporo iniciando a extrusão do túbulo polar (Figura 7 C). Esses achados sugerem multiplicação do patógeno no interior de macrófagos, fato que foi sugerido pela maior porcentagem de fagocitose e média de esporos nos macrófagos em comparação aos demais grupos avaliados em 24 horas (Figura 3).

Adicionalmente, a pré-incubação com ACs e/ou o desafio com o patógeno diminuiu a viabilidade celular de macrófagos no tempo de uma hora de infecção (Figura 8 A), marcadamente, o padrão de morte predominante foi apoptose, com porcentagens variando de 48 a 50% em 24h em relação ao controle (Figura 8 B). Quando os macrófagos foram pré-incubados com IACs sua viabilidade diminuiu ainda mais, com cerca de 50% de morte, especialmente em uma hora de desafio, sendo a apoptose majoritariamente o tipo de morte observado (Figura 8 B).

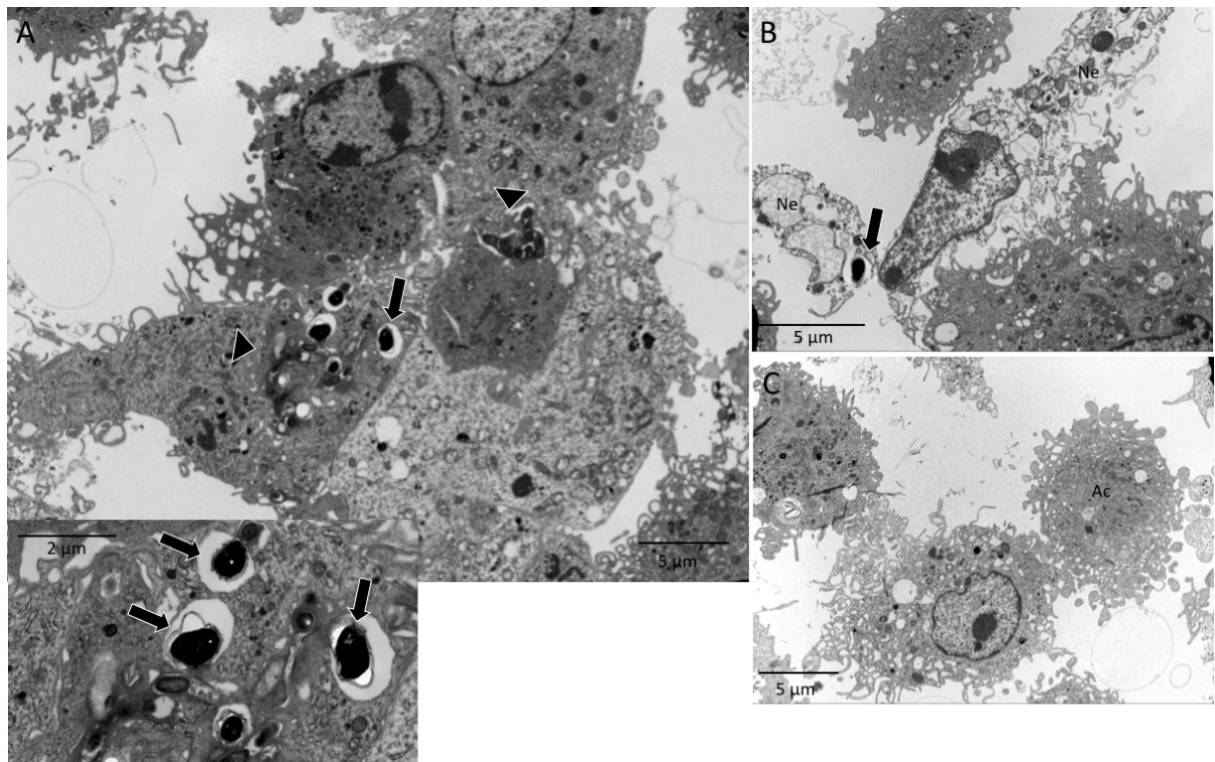


**Figura 7.** Macrófagos pré-incubados com células apoptóticas e desafiados pelo *E. cuniculi*. (A) Fotomicrografia mostrando aglomerados de esporos de *E. cuniculi* em área mais clara do citoplasma, sugerindo vacúolo parasitóforo (seta). Esporos no interior de macrófago com características preservadas (cabeça de seta). Azul de toluidina. (B) Ultramicrografia mostrando aglomerados de esporos de *E. cuniculi* no citoplasma de macrófago com ruptura da membrana celular, posterior à multiplicação do patógeno (seta). (C) Ultramicrografia de esporos de *E. cuniculi* no citoplasma de macrófago apresentando sinais de extrusão do túbulo polar (seta), como sinal de viabilidade do mesmo. Notar o rompimento da resina junto aos esporos, achado característico para microsporídios.



**Figura 8.** Análise da viabilidade de macrófagos pré-incubados (+) ou não (-) com células apoptóticas (ACs) ou células apoptóticas infectadas (IACs) e desafiados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*, após uma hora ou 24 horas de observação. (A) Porcentagem de células mortas (dead), apoptóticas (apoptosis), necróticas (necrosis) e vivas (live), após uma hora de infecção com *E. cuniculi*. (B) Porcentagem de células mortas, apoptóticas, necróticas e vivas, após 24 horas de infecção com *E. cuniculi*.

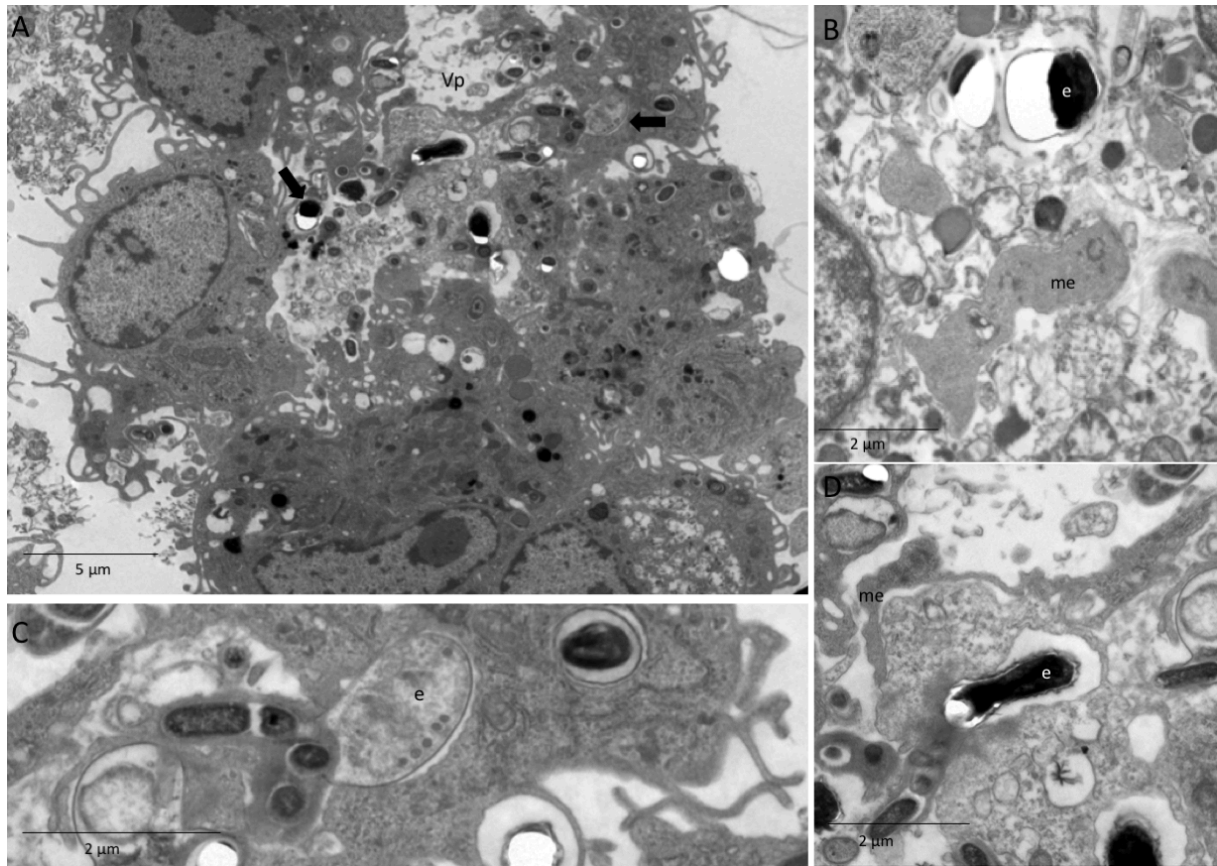
Macrófagos foram então pré-incubados com células Jurkat infectadas apoptóticas (IACs) e a análise ultraestrutural demonstrou a presença de corpos apoptóticos contendo esporos de *E. cuniculi* íntegros no citoplasma de macrófagos (Figura 9). Nesse grupo também foi observado esporos junto a fragmento de macrófago em necrose (Figura 10 B) e apoptose de macrófago (Figura 10 C). Na análise em uma hora, esse grupo também tinha cerca de 50% dos macrófagos com uma média 2 esporos internalizados, provavelmente fagocitados junto com os corpos apoptóticos, já que não foram desafiados (Figura 3). Em 24h, tanto a fagocitose como a média dos esporos no interior dos macrófagos diminuíram em relação aos demais grupos pré-incubados com ACs (Figura 3).



**Figura 9.** Ultramicrografia de macrófagos pré-incubados com células infectadas por *E. cuniculi* e apoptóticas. (A) Corpos apoptóticos fagocitados (cabeça de seta) por macrófagos contendo esporos de *E. cuniculi* íntegros em seu interior (inserto). (B) Células necróticas (Ne) com espora do patógeno próximo a macrófago. (C) Macrófago em apoptose (Ac).

Para avaliar a influência da eferocitose de células ou corpos apoptóticos infectados, os macrófagos foram pré-incubados com IACs e depois desafiados com esporos de *E. cuniculi*. Nesse grupo observou-se a presença de vacúolos parasitóforos contendo formas de multiplicação de *E. cuniculi*, como merontes e esporos imaturos, além de aglomerados de esporos maduros, achados que mostram claramente a multiplicação do patógeno nos macrófagos (Figura 10).

Cerca de 80% dos macrófagos realizaram fagocitose de esporos após uma hora e esse número aumentou em 24h. A média de esporos internalizados (2 esporos por macrófago) foi semelhante aos demais grupos desafiados após uma hora, e em 24 horas subiu para 3 esporos por macrófago, sendo apenas inferior à média do grupo exposto a ACs e desafiado (Figura 3).



**Figura 10.** Ultramicrografia de pré-incubação de macrófagos com células Jurkat infectada e apoptótica após desafio com *E. cuniculi*. (A) Vacúolo parasitífero (Vp) com esporos de *E. cuniculi* (seta) e outras formas de desenvolvimento. (B) Detalhe de meronte (me) e esporos (e) com ruptura de resina característica de microsporídios. (C) Detalhe de esporos (e) imaturo evidenciando túbulo polar enovelado. (D) Detalhe de esporos (e) com ruptura de resina característica de microsporídios e de meronte (me) junto à membrana de vacúolo parasitífero.

### 5.3 Perfil de macrófagos M2 com produção de IL-10 associado à eferocitose e desafio com *E. cuniculi*

Uma hora após o desafio, em todos os grupos de macrófagos que foram pré-incubados ou não com ACs não houve alterações na mediana de fluorescência (MFI) para as moléculas CD40 e CD206, assim como na expressão das moléculas MHCII, CD80 e CD86 (Figura 11 A, B). Contudo, 24h após do desafio com *E. cuniculi*, os macrófagos dos grupos infectados apresentaram maior MFI para CD40 e CD206 em relação aos seus respectivos controles não infectados. Por sua

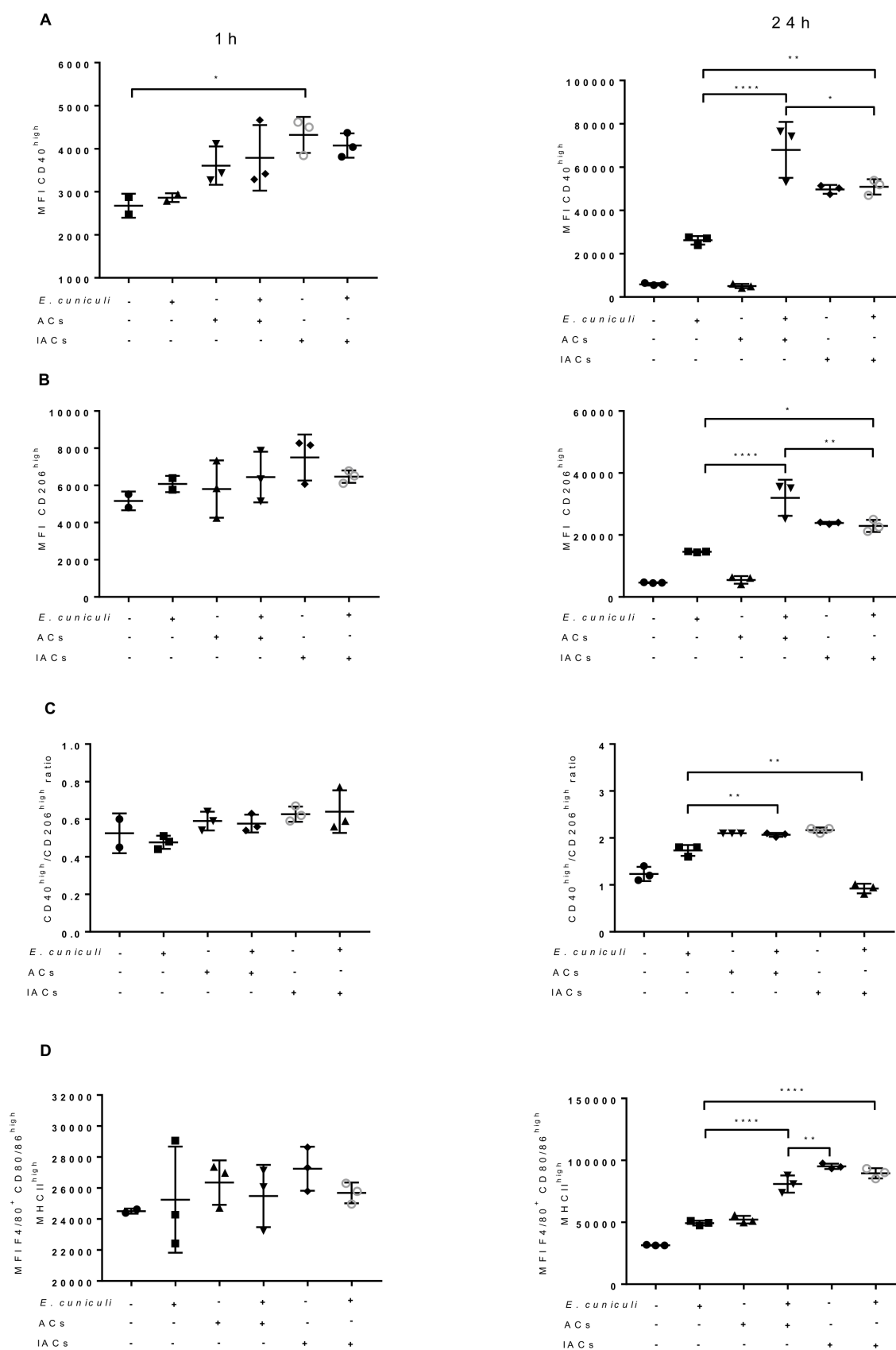
vez, entre os macrófagos desafiados com *E. cuniculi*, os pré-incubados com ACs tiveram maior expressão das moléculas de CD40, CD206, MHCII, CD80 e CD86 em comparação ao grupo não pré-incubados.

Ao avaliar a razão obtida entre as medianas de fluorescência de CD40<sup>high</sup> por CD206<sup>high</sup>, houve predomínio de fluorescência do CD40<sup>high</sup> mediante a infecção indicando um perfil M1, quando comparado com o controle. Porém, macrófagos pré-incubados com ACs não desafiados mostraram razão maior em relação ao controle, sugerindo polarização para M1.

Em consonância com estes achados, a infecção pelo *E. cuniculi* determinou a liberação de citocinas mistas TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e IL-10 em comparação com o grupo de ACs não desafiados com *E. cuniculi*, que apresentaram citocinas próinflamatórias sem a liberação da citocina IL-10 apresentando um perfil M1. Essa liberação de citocinas mistas foi potencializada pela eferocitose, como foi observado nos grupos pré-incubados com ACs e desafiados, em especial nos períodos mais tardios com 12 e 24h. Notou-se também que a presença exclusiva do fungo, assim como a eferocitose associada ao desafio determinaram maior liberação de IL-10, uma citocina antiinflamatória (Figura 12).

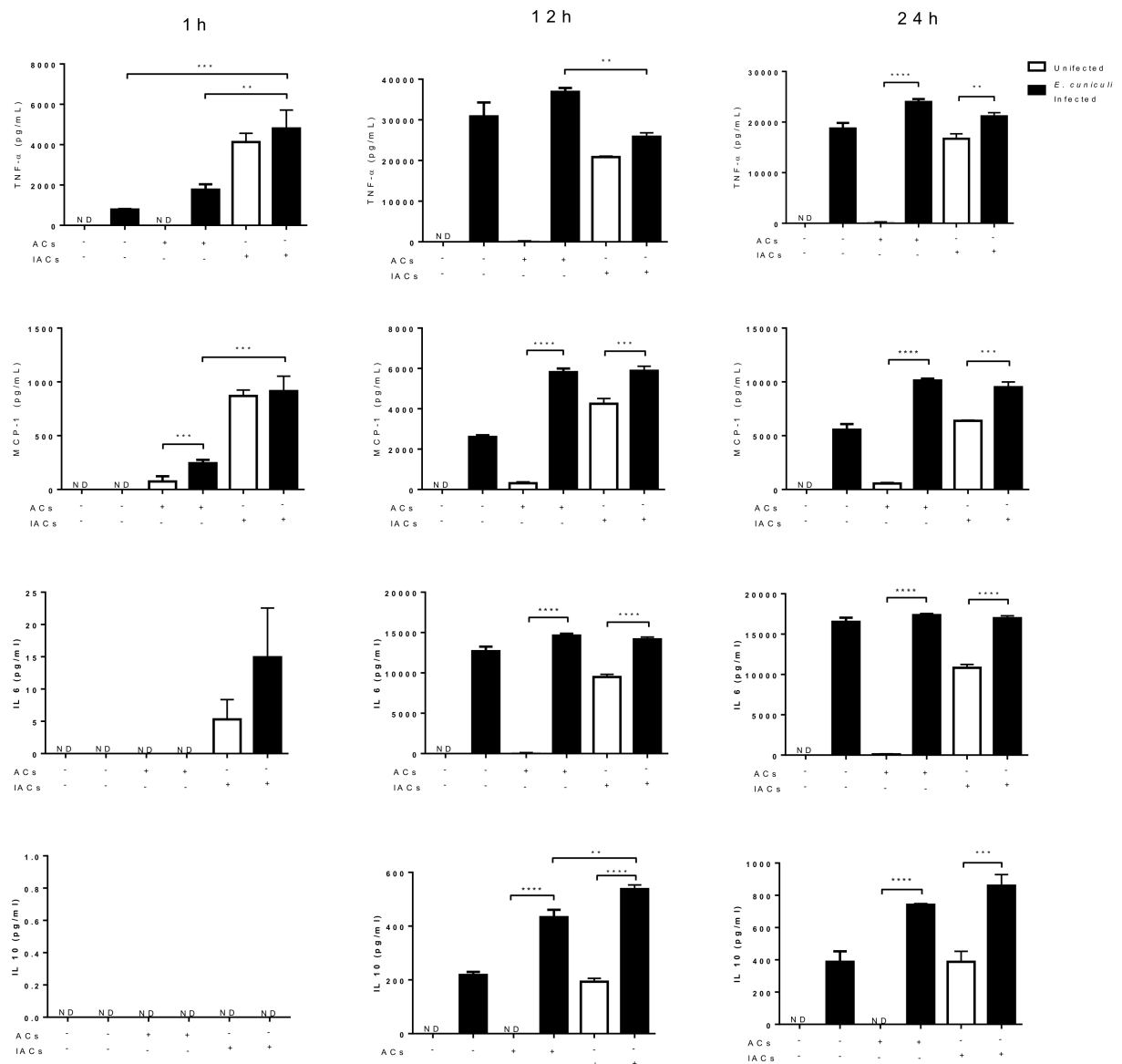
A pré-incubação com IACs determinou maior expressão das moléculas CD40 na superfície de macrófagos em uma hora, contudo, em 24 horas, todos os macrófagos que tiveram contato com o patógeno, pelo desafio ou pela fagocitose IACs, mostraram aumento da MFI para as moléculas CD40, CD206, MHCII, CD80, CD86 na comparação com macrófagos não desafiados com *E. cuniculi*, ressalta-se contudo, que na pré-incubação com IACs tem uma tendência em modular esses macrófagos para um perfil M2, porém fica evidente o perfil misto de macrófagos em relação aos outros grupos (Figura 12). As medianas de fluorescência de CD40<sup>high</sup> por CD206<sup>high</sup>, foi inferior aos outros grupos e semelhante ao controle (Figura 11). Esses dados sugerem o perfil duplo de M1 e M2.

Os macrófagos pré-incubados com IACs determinou aumento da liberação das citocinas TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6 e IL-10 que se intensificou nos demais tempos de observação, sendo similar ao que se observou com os macrófagos desafiados pelo *E. cuniculi*. Em relação à interleucina IL-10 houve um aumento da liberação a partir de 12 horas, nos grupos pré-incubados com IACs, destaca-se liberação significativamente maior no grupo com eferocitose e desafiado com o patógeno (Figura 12). A liberação de citocinas mistas corroborou com o perfil duplo de macrófagos mencionado acima.



**Figura 11.** Expressão de marcadores de superfície de polarização e ativação em macrófagos pré-incubados (+) ou não (-) com células apoptóticas (ACs) ou células apoptóticas infectadas (IACs) e

desafiados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*, após uma hora ou 24 horas de observação. (A) Mediana de fluorescência (MFI) para CD40 em macrófagos. (B) MFI para CD206 em macrófagos. (C) Razão entre as MFI CD40/ MFI CD206. (D) MFI para CD80/86 e MHC II em macrófagos. A análise de variância de uma via (ANOVA) com pós-teste de Tukey revelou \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  com significância entre os grupos.



**Figura 12.** Quantificação de citocinas inflamatórias (TNF-α, MCP-1 e IL-6) e antiinflamatória (IL-10) liberadas macrófagos pré-incubados (+) ou não (-) com células apoptóticas (ACs) ou células apoptóticas infectadas (IACs) e desafiados (*E. cuniculi* infectado) ou não (infectado) em uma hora, 12 e 24 horas de observação. A análise de variância de uma via (ANOVA) com pós teste de Tukey revelou \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , com significância entre os grupos.

## 6. DISCUSSÃO

A infecção por patógenos intracelulares pode levar à morte celular, sendo considerada um mecanismo desenvolvido para reduzir ou impedir a replicação e disseminação de patógenos (Stephenson et al., 2016). Para o hospedeiro, a morte desencadeada por patógenos podem proporcionar: (a) remoção do ambiente intracelular necessário para a sobrevivência e replicação do patógeno; (b) efeitos microbicidas diretos dos componentes intracelulares liberados; (c) início de uma resposta inflamatória antimicrobiana pela apresentação de *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs) e *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), e (d) captação e apresentação de antígenos patogênicos pelas células apresentadoras de antígenos (Martin et al., 2014). Secundariamente à morte celular, a eferocitose pode ocorrer como um fenômeno que envolve a fagocitose de células em apoptose, necrose não programada, necroptose e piroptose. A eferocitose promove então um ambiente favorável a resolução da inflamação pela *downregulation* da expressão de citocinas próinflamatórias, inibição de óxido nítrico-sintase induzida e aumento de fatores de crescimento angiogênicos, os quais podem ser cruciais para sobrevivência de patógenos. Em muitos casos, a eferocitose é um mecanismo para eliminar patógenos e células infectadas por patógenos; no entanto, alguns patógenos subverteram esse processo e usam mecanismos eferocitários para evitar a detecção imune inata e auxiliar a infecção de fagócitos, os quais podem atuar como “cavalos de Tróia” (Martin et al., 2014, Behar, Briken, 2019).

Nesse contexto, nós observamos que os macrófagos pré-incubados com ACs ou com IACs realizaram mais fagocitose e internalizaram maior número de esporos de *E. cuniculi*, assim como demonstraram formas de desenvolvimento do patógeno em seus citoplasmas dentro de vacúolos parasitóforos, sendo permissivos à sobrevivência e replicação de *E.*

*cuniculi*. Corroborando nossos resultados, macrófagos alveolares pré-incubados com células Jurkat apoptóticas e, posteriormente, desafiados com *streptococcus pneumoniae* (Salinas et al., 2017) também tiveram multiplicação do patógeno. Da mesma forma, os macrófagos pré-incubados com neutrófilos infectados com *Leishmania major* apoptóticos possibilitaram a sobrevivência do protozoário, o que demonstra a baixa atividade parasiticida na presença de ACs (van Zandbergen et al., 2004). Por outro lado, macrófagos que realizaram eferocitose de macrófagos infectados com Mtb apoptóticos tiveram eliminação total do patógeno (Martin et al, 2012., 2014), com diminuição da viabilidade do patógeno e aumento da apresentação antigênica para resposta imune adaptativa (Schaible et al., 2003). Por sua vez, Mtb é liberado por macrófagos que sofrem necrose e pode infectar e proliferar em outros macrófagos, propiciando a disseminação da doença, sendo a necrose o tipo de morte que favorece este patógeno. Desta forma, as vias de morte celular que são desencadeadas e as suas consequências provavelmente são específicas para cada contexto, sendo o Mtb um dos exemplos de patógenos que podem modular essas vias para sua vantagem (Moraco, Kornfeld, 2014).

Os microsporídios têm sido reconhecidos como patógenos supressores de apoptose como demonstrado para *E. cuniculi* em células Vero (del Aguila et al., 2006), *Anncaliia algerae* em fibroblastos pulmonares humanos (Scanlon et al., 1999), *Nosema bombycis* em células ovarianas de *Bombix mori* (He et al., 2015) e *Nosema ceranae* em células do epitélio ventricular de *Apis mellifera* (Hige et al., 2007). Em oposição a esses achados anteriores, o presente estudo demonstrou altos percentuais de apoptose em macrófagos infectados com *E. cuniculi*, em especial mediante a pré-incubação com ACs ou IACs. Nós hipotetizamos que a ocorrência de apoptose pode estar associada à liberação de grandes quantidades de TNF- $\alpha$ , uma citocina que determina a apoptose pela via extrínseca, ligando-se a receptores nos

macrófagos, essa citocina ativa a apoptose via caspase 8 (Behar et al., 2011). Por outro lado, Penteado (2017) refere que células apoptóticas acumuladas podem induzir morte em células dendríticas por piroptose ou necrose, fato que poderia justificar as mortes observadas. Experimentos em camundongos mostraram que a fagocitose de linfócitos apoptóticos infectados com *Trypanosma cruzi* resultaram no estabelecimento de uma resposta antiinflamatória mediada por TGF- $\beta$  e prostaglandina PGE2, com a persistência da infecção e da doença (Freire de Lima et al., 2000). No entanto, o tratamento dos camundongos infectados com *T. cruzi* com inibidores de apoptose reverteram o perfil antiinflamatório e reduziram a replicação *ex vivo* do parasita, corroborando que a indução de apoptose e eferocitose podem ser benéficas para os microsporídios (Cabral-Piccin et al, 2016).

Os macrófagos e outros fagócitos constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos e, frequentemente, são alvos de patógenos intracelulares que evitam a atividade microbicida após internalização, usando células apresentadoras de antígenos como nicho para sobrevivência e replicação (Plumlee et al., 2009). Os macrófagos, com seus diferentes perfis, expressam um conjunto definido de genes que determinam padrões funcionais distintos. Os macrófagos M1 regulam positivamente a expressão daqueles genes que são importantes nas respostas antimicrobianas e podem inibir a eferocitose em parte por causa do TNF e/ou mediadores oxidativos (Michlewska et al, 2009). Os macrófagos M2 aumentam seus níveis de arginase e citocinas antiinflamatórias enquanto diminuem a produção de citocinas proinflamatórias e de reativos de oxigênio e nitrogênio, geralmente este perfil aumenta na eferocitose dando suporte para a resolução da inflamação (Rayamajhi et al., 2010).

Nesse estudo, os macrófagos pré-incubados com ACs mostraram razão maior entre a expressão de CD40<sup>high</sup>/CD206<sup>high</sup> em relação ao controle, sugerindo maior polarização para o

perfil M1. Entretanto, a infecção pelo *E. cuniculi* direcionou o perfil dos macrófagos para M1 com produção de citocinas Th1 ou pró-inflamatórias quando comparado com o controle, embora a expressão de CD206 e produção de IL-10 também aumentaram de forma significativa, revelando que macrófagos com perfil M2 estavam presentes nas culturas, sugerindo que o patógeno se beneficia com o perfil duplo de macrófagos para sua sobrevivência. Adicionalmente, os macrófagos pré-incubados com IACs apresentaram maior expressão de CD206 associada à liberação de grandes quantidades de IL-10, indicando um perfil M2 mais permissivo à multiplicação de *E. cuniculi*, com achado de formas de multiplicação do patógeno no interior dos mesmos, e com potencial para atuar como cavalo de Tróia. Esses resultados aparentemente ambíguos, marcados pela presença dos perfis M1 e M2, podem retratar o que naturalmente ocorre *in vivo*, uma vez que a eferocitose de células infectadas apoptóticas determina 2 sinais simultâneos e conflitantes: a apresentação de PAMPs que levam a inflamação e os ligantes de células apoptóticas que engatilham um programa anti-inflamatório (Blander, J., Medzhitov, 2006). Em camundongos, *Chlamydia pneumoniae* (Rupp et al., 2009) e *Yersinia pestis* (Spinner et al., 2014) inicialmente são fagocitadas por neutrófilos no sítio da inoculação, dentro dos quais as bactérias sobrevivem e, no caso de *Y. pestis*, se multiplica. Esses neutrófilos em apoptose são fagocitados por macrófagos e dentro desses ocorre a replicação das bactérias, contudo estimulam a liberação de citocinas anti-inflamatórias, que potencialmente limitam a atividade bactericida, corroborando os resultados observados em nosso estudo com exceção da atividade microbicida que não realizamos. Por sua vez, macrófagos não incubados com ACs mostraram atividade microbicida maior caracterizada pela presença de megassomos, com perfil M1, como havia sido demonstrado pelo nosso grupo na infecção de macrófagos peritoneais por *E.*

*cuniculi* (Pereira et al, 2019), sendo esse achado similar ao observado nas infecções por *Helicobacter pylori* (Allen et al., 2000) e *Chlamydia trachomatis* (Van Ooij et al., 1998).

Sabe-se que a eferocitose de macrófagos peritoneais ou alveolares resulta na supressão da resposta imune através da liberação de mediadores antiinflamatórios como IL-10, NO, TGF- $\beta$ , PGE2, assim como a inibição da síntese de mediadores proinflamatórios como TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-18 e LTC4 (Kim et al., 2012; Medeiros et al., 2009). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que pode mediar várias funções, incluindo a regulação do sistema imune pela produção de citocinas pro- e antiinflamatórias (Schett, 2018). Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou *in vitro* e *in vivo* que macrófagos peritoneais obtidos de camundongos XID e infectados em *E. cuniculi* mostraram um perfil de macrófagos M2 com morte predominante por necrose já os macrófagos de camundongos BALB revelou uma polarização de macrófagos M1 e morte por apoptose, liberaram altos níveis de citocinas IL-6 e IL-10 (Pereira et al., 2019), fato que sugeriu efeito antiinflamatório, corroborando esse comportamento pleiotrópico. Nesse estudo, a produção de citocinas proinflamatórias (TNF e MCP1) associada presença de macrófagos M1 e a liberação de citocinas antiinflamatórias (IL-10 e IL-6) com presença de macrófagos M2 reforçam a coexistência e a comutação dos 2 perfis de macrófagos no ambiente quando ocorre a eferocitose de IACs. Avaliando esses dados sugerimos que os perfis duplos de macrófagos ocorrem *in vivo* e *in vitro* como visto no nosso estudo *in vitro* no grupo de IACs e altos níveis de morte de macrófagos por apoptose, contribuindo para a multiplicação e sobrevida do patógeno.

Todas essas vias de morte celular contribuem para a defesa do hospedeiro contra infecções microbianas. A eferocitose, como consequência da morte celular, pode ser um mecanismo de subversão da resposta imune via “cavalo de Tróia” ou engatilhando programas antiinflamatórios que contribuem com a evasão da resposta imune e persistência do

patógeno. Em conclusão, nossos resultados mostraram que a eferocitose de células apoptóticas infectadas ou não teve efeito supressor na atividade macrofágica, caracterizada pela presença de estágios de multiplicação de *E. cuniculi* no interior dos macrófagos, ao mesmo tempo que direcionaram os macrófagos para um perfil M2 com produção de grandes quantidades de IL-10 e IL-6. Esses dados sugerem que *E. cuniculi* pode explorar a eferocitose para entrar na célula hospedeira, se multiplicar e se disseminar, assim como pode modular para um ambiente menos inflamado, constituindo mecanismo de evasão da imunidade

## 7. REFERÊNCIAS

- Allen, L.H., Schleisinger, L.S., Kang, B. (2000) Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages. *J. Exp. Med.* 191, 115–128.
- Anane, S., and Attouchi, H. (2010) Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol* 34, 450-464.
- Behar, S.M., Briken, V. (2019) Apoptosis inhibition by intracellular bacteria and its consequence on host immunity. *Curr Op Immunol.* 60, 103–110
- Behar, S.M., Martin, C.J., Booty, M.G., et al. (2011) Apoptosis is an innate defense function of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Mucosal Immunol.* 4, 279-287.
- Blander, J., Medzhitov, R. (2006) Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature.* 440, 808–812
- Briken V. (2012) “With a Little Help from My Friends”: Efferocytosis as an Antimicrobial Mechanism. *Cell Host & Microbe* 12.
- Cabral-Piccin, M.P., Guillermo, L.V., Vellozo, N.S., et al. (2016) Apoptotic CD8 T-lymphocytes disable macrophage-mediated immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Death Dis.* 7, e2232.
- Cali, A., Becnel, J. J., and Takvorian, P. M. (2017) “Microsporidia,” in *Handbook of the Protists Ebook*, eds J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, C. H. Slamovits, L. Margulis, M. Melkonian, D. J. Chapman, et al. Berlin: Springer International Publishing
- Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., and Gabaldón, T. (2012) Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol.* 10, 1.
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chávez, R., Lascurain, R. (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol.* 6, 5–25.

- Dallenga, T., Repnik, U., Corleis, B., et al. (2017) *M. tuberculosis*-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages. *Cell Host & Microbe* 22, 519–530.
- del Aguila C., Izquierdo F., Granja A.G., Hurtado C., Fenoya S., Fresno M., Revilla Y. (2006). *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *I J Parasitol.* 36, 869–876
- Didier, E.S. (1995) Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum Microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol.* 17, 405–412.
- Didier, E.S. (2005) Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in human and animals. *Acta Trop* 94, 61-76.
- Didier, E.S., and Weiss, L.M. (2011) Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis* 24, 490-495.
- Freire-de-Lima, C.G., Nascimento, D.O., Soares, M.B., et al. (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*, 403, 199–203.
- Fernandez, R.S., Autonell, P.I., Brioso, F., Barrull, P.D., Sarabia, C.M., Jimeno, G.S., Villalba, A., Sanchez, A., Aguilera, E., Vazquez, F., et al. (2018) Phosphatidylserine- Liposomes Promote Tolerogenic Features on Dendritic Cells in Human Type 1 Diabetes by Apoptotic Mimicry. *Frontiers in Immunology.* 9, 253-263.
- Galimberti, V. E., Rothlin, C. V., Ghosh, S. (2019). Funerals and Feasts: The Immunological Rites of Cell Death. *Y J Biol Med.* 92(4), 663–674.
- Grabiec, M.A., and Hussell, T. (2016) The role airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. *Semin Immunopathol* 38, 409-423.

- Ghosh, K., and Weiss, M.L. (2012) T cell response and persistence of the microsporidia. *FEMS Microbiol* 36, 748-760.
- Han, B., Takvorian, P.M., and Weiss, L.M. (2020) Invasion of Host Cells by Microsporidia. *Front. Microbiol.* 11, 172.
- He X., Fu Z., Li M., Liu H., Cai S, Man N., Lu X. (2015). *Nosema bombycis* (Microsporidia) suppresses apoptosis in *BmN* cells (*Bombyx mori*). *Acta Bioch Bioph Sin.* 47(9), 696–702.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R. and Meana, A. (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol.* 94, 211-217
- Hinze, C., and Boucrot, E. (2018) Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. *Journal of Cell Science.* 131, 1-10.
- Karimi, K., Mirjalali, H., Niyayati, M., Haghighi, A., Pourhoseingholi, M.A., Sharifdini, M., Naderi, N., Zali, M.R. (2020) Molecular epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* sp., among immunocompromised and immunocompetent subjects in Iran. *Microb Pathog.* 21, 141
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H., Moretto, M. (1999) CD8<sup>+</sup>CTLs are essential for protective against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol.*, 162:6086-6091.
- Kim, K.H., An, D.R., Song, J. et al. (2012) *Mycobacterium tuberculosis* Eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7. *P Natl Acad Sci USA.* 109, 7729-7734.
- Krakauer, T. (2018) Living dangerously: *Burkholderia pseudomallei* modulates phagocyte cell death to survive. *Medical Hypotheses* 121, 64–69.
- Lumbroso, D., Soboh, S., Maimon, A., Schiff-Zuck, S., Ariel, A., and Burstyn-Cohen, T. (2018) Macrophage-Derived Protein S Facilitates Apoptotic Polymorphonuclear Cell Clearance by

Resolution Phase Macrophages and Supports Their Reprogramming. *Frontiers in Immunology*. 9, 358-368.

Martin, C.J., Booty, M.G., Rosebrock, T.R., et al. (2012) Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. *Cell Host Microbe*. 12, 289-300.

Martin, C.J., Peters, K.N., and Behar, S.M. (2014). Macrophages Clean up: Efferocytosis and Microbial Control. *Curr Opin Microbiol* 0, 17-23.

Mathews, A., Hotard, A., Hale-Donze, H. (2009) Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes Infect*. 11, 905-911.

Medeiros, A.I., Serezani, C.H., Lee, S.P., et al. (2009) Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE<sub>2</sub>/EP2 signaling. *J Exp Med*. 206, 61–68

Michlewska, S., Dransfield, I., Megson, I. L., and Rossi, A. G. (2009) Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF- $\alpha$ . *FASEB J*. 23, 844–854.

Moraco, A.H., Kornfeld, H. (2014) Cell death and autophagy in tuberculosis. *Semin Immunol*. 26, 497–511.

Pereira, A., Alvares-Saraiva, A.M. Konno, F.T.C., et al., (2019) B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile ameliorates microbicidal functions and disrupt the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLOS Negl Trop Dis*.13(9): e0007674.

Plumlee, C.R., Lee, C., Beg, A.A., et al. (2009) Interferons direct an effective innate response to *Legionella pneumophila* infection. *J Biol Chem*. 284, 30058 - 30066.

Penteado, de.A.L., Naiara Naiana Dejani, N.N., Verdan, F.F., Orlando, B.A., Ninõ, V., Dias, N.D.F., Salina, G.C.A., Medeiros, I.A. (2017) Distinctive role of efferocytosis in dendritic cell maturation and migration in sterile or infectious conditions. *Immunology*. 151, 304-313.

- Rayamajhi, M., Humann, J., Kearney, S., et al. (2010) Antagonistic crosstalk between type I and II interferons and increased host susceptibility to bacterial infections. *Virulence*. 1, 421–425.
- Rupp, J., Pfeleiderer, L., Jugert, C., et al. (2009) *Chlamydia pneumoniae* hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages. *PLoS One* 4, e6020.
- Roduit, R., Schorderet, F.D. (2008) MAP kinase pathways in UV-induced apoptosis of retinal pigment epithelium ARPE19 cells. *Apoptosis*. 13,343-353.
- Sak, B., Kotková, M., Hláková, L., Kvác, M. (2017) Limited effect of adaptive immune response to control encephalitozoonosis. *Parasite Immunol*. 39, 12.
- Salina, A.C., Souza, T.P., Serezani, C.H., et al. (2017). Efferocytosis-induced prostaglandin E2 production impairs alveolar macrophage effector functions during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Innate Immunity* 23, 219-227.
- Scanlon M., Leitch GJ, Shaw AP, Moura H, Visvesvara GS. (1999). Susceptibility to apoptosis is reduced in the Microsporidia-infected host cell. *J Eukaryot Microbiol*. 46, 34S–35S
- Schaible, U.E., Winau, F., Sieling, P.A., et al. (2003) Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat Med* 9, 1039–46.
- Schett, G. (2018) Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatology*; 57: 43-50.
- Shadduck, J.A. (1969). *Nosema cuniculi*: *in vitro* isolation. *Science* 166, 516-7.
- Spinner JL, Winfree S, Starr T, et al. (2014) *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J Leukoc Biol*. 95, 389-98.
- Stephenson, H.N., Herzig, A., Zychlinsky, A. (2016) Beyond the grave: when is cell death critical for immunity to infection? *Curr Opin Immunol*, 38, 59-66.
- Texier, C., Vidau, C., Vignes, B., et al. (2010) Microsporidia: a model for minimal parasite-host

interactions. *Cur Opin Microbiol.* 13, 443-449.

Upadhyay, S., Mittal, E., Philips, J.A. (2018) Tuberculosis and the art of macrophage manipulation. *Pathog Dis.* 76, 4.

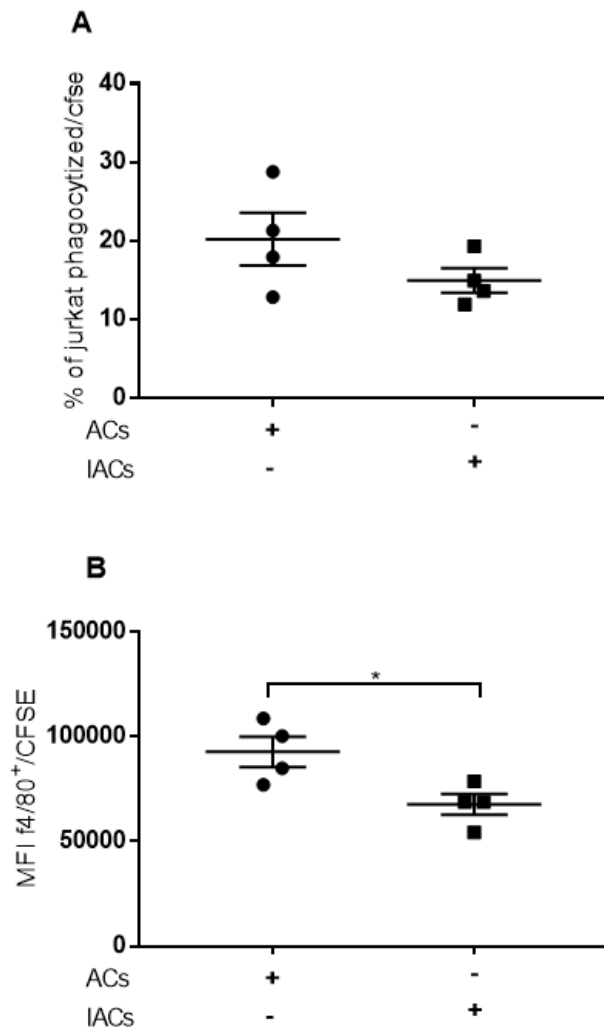
Van Ooij, C., Homola, E., Kincaid, E., et al. (1998). Fusion of *Chlamydia trachomatis*-containing inclusions is inhibited at low temperatures and requires bacterial protein synthesis. *Infect. Immun.* 66, 5364–5371.

van Zandbergen, G. Gieffers, J., Kothe, H. (2004) *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J. Immunol.* 172, 1768-1776.

van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., et al., (2004) Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173, 6521-6525.

Vávra, J., Ronny, Larsson, J.I., Weiss, L.M., and Becnel, J.J. (2014). Structure of microsporidia. (Eds) *Microsporidia – Pathogens of opportunity*. Wiley Blackwell: Oxford 1-70.

## APÊNDICES



**Figura Suplementar 1.** Análise da fagocitose de células apoptóticas (ACs) ou células infectadas apoptóticas (IACs) marcadas com CFSE pelos macrófagos. (A) Porcentagem de fagocitose de ACs e IACs. (B) Mediana de fluorescência de CFSE em macrófagos. Teste t revelou \* $p < 0,05$  com significância entre os grupos.

## ANEXO



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

## C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada " MICROSPORIDIOSE MURINA-O PAPAEL DE MACRÓFAGOS m1 E m2, FAGÓCITOS DERIVADOS DE CÉLULAS B -1 E EFEROCTOSE "MARIA ANETE LALLO e LUCIANE COSTA DALBONI" que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal ( CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais ( CEUA) da UNIP, em reunião de 19 /04 /2017.

Finalidade	Ensino ( )	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização	15.04.2015 A 15.04.2017	
Espécie / linhagem/ raça	CAMUNDONGO BALBAC E C57BL6 E XID	
Nº de animais	75	
Peso / idade	20 GRAMAS/6 A 8 SEMANAS	
Sexo		
Origem		

Juliana Guizi

Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Universidade Paulista – UNIP