

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**CÉLULAS T *NATURAL KILLER* (NKT) ESTIMULAM A  
ATIVIDADE MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS  
CONTRA *Encephalitozoon cuniculi***

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

**JÉSSICA FELICIANA CODECEIRA**

**São Paulo**

**2022**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**CÉLULAS T *NATURAL KILLER* (NKT) ESTIMULAM A  
ATIVIDADE MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS  
CONTRA *Encephalitozoon cuniculi***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo.

**JÉSSICA FELICIANA CODECEIRA**

**São Paulo**

**2022**

Codeceira, Jéssica Feliciano.

Células T Natural Killer (NKT) estimulam a atividade microbicida de macrófagos contra *Encephalitozoon cuniculi* / Jéssica Feliciano Codeceira. – 2022.

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

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Patologia integrada e translacional.

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

1. Macrófagos. 2. Atividade microbicida. 3. Linfócitos T. 4. CD1d. 5. Citotoxicidade. 6. Microsporidioses. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Título.

**JÉSSICA FELICIANA CODECEIRA**

**CÉLULAS T *NATURAL KILLER* (NKT) ESTIMULAM A  
ATIVIDADE MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS  
CONTRA *Encephalitozoon cuniculi***

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

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

**BANCA EXAMINADORA**

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

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

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Toshie de Camargo Konno  
Konno Consultoria Científica

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anuska Marcelino Alvares Saraiva  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Guilherme Xavier  
Universidade Paulista – UNIP

Este artigo será enviado para *Microbes and Infection*

**Células T *Natural Killer* (NKT) estimulam a atividade microbicida de macrófagos contra *Encephalitozoon cuniculi***

Jéssica Feliciano Codeceira<sup>1</sup>, Luciane Costa Dalboni<sup>1</sup>, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva<sup>1</sup>, José Guilherme Xavier<sup>1</sup>, Elizabeth Cristina Perez Hurtado<sup>1</sup>, Alexandre de Castro Keller<sup>2</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1</sup>.

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

<sup>2</sup>Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

## Resumo

*Encephalitozoon cuniculi* são patógenos intracelulares obrigatórios, que infectam grande número de mamíferos, reconhecidos como agentes oportunistas em pessoas com AIDS e imunossuprimidas. As células NKT constituem uma subpopulação de linfócitos T com grande capacidade imunorreguladora, pela secreção rápida de diversas citocinas pró e anti-inflamatórias, com seletividade por antígenos lipídicos apresentados pela molécula CD1d. Os macrófagos apresentam moléculas CD1d e fagocitam de forma eficiente os microsporídios. O objetivo desse trabalho foi investigar a participação das células NKT na infecção por *E. cuniculi*, tanto *in vitro*, após contato com macrófagos infectados, quanto *in vivo*, em animais infectados. Macrófagos infectados por *E. cuniculi*, foram cocultivados com esplenócitos totais de animais *Wildtype* (WT) ou deficientes em células NKT (CD1d<sup>-/-</sup> e J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>). Em camundongos infectados por *E. cuniculi*, tratados com  $\alpha$ -GalCer e/ou imunossuprimidos com ciclofosfamida (Cy), foram mensuradas citocinas no soro e analisados os achados histopatológicos. Macrófagos infectados tiveram maior atividade microbicida quando cocultivados com esplenócitos derivados de camundongos WT, se comparados com macrófagos infectados cocultivados com esplenócitos derivados de camundongos J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>. O mesmo foi observado em culturas de macrófagos CD1d<sup>-/-</sup>, propiciando maior atividade microbicida dos macrófagos de medula frente à microsporidiose. Os animais tratados com  $\alpha$ -Galcer, 24 horas após infecção, tiveram níveis altos de IFN- $\gamma$ . Após 7 dias, o mesmo grupo de animais apresentou predomínio de granulócitos, com aparentes perfis de resolução do processo infeccioso. Os animais tratados com  $\alpha$ -Galcer e Cy tiveram concentrações das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF e MCP-1 aumentadas em relação aos demais grupos, como também esplenomegalia com alterações do tecido esplênico, induzindo desarranjo tecidual. Os resultados indicam que as células NKT restritas a CD1d são importantes para a imunidade antifúngica, pois a resposta celular por iNKT montada contra *E. cuniculi* pode ser exacerbada com uso de  $\alpha$ -Galcer.

Palavras-Chave: Macrófagos. Atividade microbicida. Linfócitos T. CD1d. Citotoxicidade. Microsporidioses.

## Abstract

*Encephalitozoon cuniculi* are obligate intracellular pathogens that infect a large number of mammals, recognized as opportunistic agents in people with AIDS and immunosuppressed individuals. NKT cells constitute a subpopulation of T lymphocytes with great immunoregulatory capacity by the rapid secretion of several pro and anti-inflammatory cytokines, with selectivity for lipid antigens presented by the CD1d molecule. Macrophages present CD1d molecules and efficiently phagocytose microsporidia. The objective of this work was to investigate the role of NKT cells in *E. cuniculi* infection, both *in vitro*, after contact with infected macrophages, and *in vivo*, in experimentally infected animals. Macrophages infected by *E. cuniculi* were co-cultured with total splenocytes from wildtype (WT) or NKT cell-deficient (CD1d<sup>-/-</sup> and J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) animals. In mice infected with *E. cuniculi*, and treated with  $\alpha$ -GalCer and/or immunosuppressed with cyclophosphamide (Cy), serum cytokines were measured and histopathological findings were analyzed. Infected macrophages had higher microbicidal activity when co-cultured with splenocytes derived from WT mice, compared to infected macrophages co-cultured with splenocytes derived from J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> mice. The same was observed in cultures of CD1d<sup>-/-</sup> macrophages, which provided greater microbicidal activity of bone marrow macrophages against microsporidiosis. Animals treated with  $\alpha$ -Galcer, 24 hours after infection, had high levels of IFN- $\gamma$ . After 7 days, the same group of animals showed a predominance of granulocytes, with apparent profiles of resolution of the infectious process. The animals treated with  $\alpha$ -Galcer and Cy had increased concentrations of the pro-inflammatory cytokines IFN- $\gamma$ , TNF and MCP-1 in relation to the other groups, as well as splenomegaly with alterations in the splenic tissue, inducing tissue disarrangement. The results indicate that CD1d-restricted NKT cells are important for antifungal immunity, as the cellular response by iNKT mounted against *E. cuniculi* can be exacerbated with the use of  $\alpha$ -Galcer.

Keywords: Macrophages. Microbicidal activity. T lymphocytes. CD1d. Cytotoxicity. Microsporidiosis.

## 1. Introdução

Os microsporídios compõem um grupo amplo de patógenos pertencentes ao Filo Microsporidia, um clado irmão do reino Fungi [1]. Esses seres unicelulares possuem desenvolvimento intracelular obrigatório. Existem mais de 1400 espécies classificadas e distribuídas em mais de 200 gêneros [2,3], sendo descritos em hospedeiros de invertebrados e vertebrados [4]. São considerados agentes infecciosos de doença emergente, que acometem hospedeiros dos principais biomas do mundo, desde terrestres à aquáticos [1], tidos também como agentes oportunistas, acometendo pacientes imunossuprimidos pelo HIV ou portadores de neoplasias, imunocomprometidos, pessoas idosas e/ou crianças [5].

Todos os microsporídios possuem características únicas como a presença de um filamento (túbulo) polar enrolado dentro dos esporos (forma infectante extracelular) e estágios vegetativos de multiplicação intracelular. O esporo típico maduro é ovalado ou alongado com medida de 1 a 12  $\mu\text{m}$ , as espécies mais comuns para os mamíferos são relativamente pequenas e medem de 1,0 a 4,0  $\mu\text{m}$ . No interior do hospedeiro, a partir do esporo, é evertido um túbulo polar, transferindo o esporoplasma infectante para a célula hospedeira. Dentro da célula, esse primitivo patógeno desprovido de mitocôndrias começa a desenvolver seus estágios proliferativos. Na primeira fase, denominada merogonia, ocorre multiplicação por fissão binária ou múltipla, formando os merontes. Na segunda fase, esporogonia, haverá a formação de esporontes, esporoblastos e finalmente os esporos. Os estágios multiplicativos ocorrem diretamente no citoplasma ou no núcleo, porém na maioria das espécies, a interface parasita-hospedeiro envolve a formação de um vacúolo parasitóforo (VP). A célula parasitada aumenta de tamanho e muda sua forma até que ocorra a ruptura com a liberação de novos esporos [3, 37].

A disseminação de *E. cuniculi* no hospedeiro ocorre, muitas vezes, devido a sua capacidade de evasão dos mecanismos de defesa da célula hospedeira, especialmente relacionadas às respostas inatas. Após a infecção, dependendo dos estímulos do microambiente, os macrófagos podem adquirir um perfil M1 com intensa atividade microbicida, apresentação de antígenos, produção de quimiocinas e citocinas associadas ao perfil Th1 [7,8,9,11]. Com base em observações *in vitro*, como



também em animais infectados experimentalmente, notou-se que o IFN- $\gamma$  desempenha um papel relevante na imunidade protetora contra a infecção por *E. cuniculi* [10,12,13].

Por outro lado, esporos internalizados por macrófagos com perfil M2, permanecem íntegros, proliferam-se, permitindo o transporte e a disseminação segura do patógeno, reconhecidos como “cavalos de troia”. Esses macrófagos são caracterizados por promoverem respostas de perfil Th2, classicamente anti-inflamatório destinado ao reparo tecidual [6, 14]. Achados recentes do grupo, demonstraram que macrófagos peritoneais provenientes de camundongos XID (deficientes em células B-1), infectados por *E. cuniculi*, podem ser polarizados para perfil M2, mantendo o ciclo proliferativo dos esporos [11].

Os dados reforçam a importância da imunidade inata para a indução da resposta imune adaptativa, fundamental para a resistência do hospedeiro frente *E. cuniculi*, sendo atribuído aos T CD8<sup>+</sup> o papel protetor importante durante a infecção [12]. Células T $\gamma\delta$  também foram descritas por desempenhar um papel protetor complementar durante a infecção por *E. cuniculi*. Devido à sua capacidade de produzir precocemente IFN- $\gamma$ , as células T $\gamma\delta$  podem ser importantes na indução de células T CD8<sup>+</sup> efetoras [15]. Moretto *et al.* [16] descreveram o aumento precoce e significativo desse subconjunto de células em camundongos imunocompetentes, alguns dias após a infecção por *E. cuniculi*. Também camundongos deficientes de células T $\gamma\delta$  desenvolveram respostas de células T CD8<sup>+</sup> abaixo do ideal, resultando maior suscetibilidade à infecção.

As células T Natural Killer (NKT), conhecidas como NKT do tipo invariante (iNKT), constituem uma subpopulação de linfócitos T com grande capacidade imunorreguladora, cujas principais características são: a secreção rápida de diversas citocinas pró e anti-inflamatórias; função efetora dependendo do subtipo para perfis Th-1, Th-2 e Th-17; seletividade por antígenos glicolipídicos apresentados pela molécula CD1d, presente sobretudo em células apresentadoras de antígeno (APCs), como células dendríticas, macrófagos e células B [17, 18]. Após estímulo, as células NKT maduras produzem IFN- $\gamma$  em grande quantidade, conferindo a essa subpopulação de células, função significativa durante as infecções [19]. Atualmente,

as células NKT se agrupam em dois principais grupos: células NKT tipo I ou do tipo invariante (iNKT) e células NKT tipo II [20,21].

Na infecção por *Cryptococcus neoformans*, as células NKT se acumulam nos pulmões na dependência da produção de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), cumprindo papel primordial no desenvolvimento da resposta Th1 com resistência do hospedeiro ao fungo [22]. Contudo, são inexistentes os estudos da função das células NKT na infecção por microsporídios. A compreensão do envolvimento das células NKT na encefalitozoonose se faz necessária para melhor entendimento da patogenia das microsporidioses, assim como viabilizar base científica para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em infecções oportunistas de relevância médica nos pacientes imunocomprometidos.

Neste estudo, avalia-se a atividade das células iNKT na resposta imune frente à infecção por *E. cuniculi*, tanto *in vitro* – em que foi verificada a capacidade microbida dos macrófagos, mediante cocultivo com esplenócitos totais (derivados de camundongos *WildType*, *CD1d<sup>-/-</sup>* e *Jα18<sup>-/-</sup>*), bem como *in vivo*.

## 2. Métodos

### 2.1 Cultura de *Encephalitozoon cuniculi*

Os esporos de *E. cuniculi*, genótipo I, obtidos do *Waterborne® Inc.*, foram cultivados em células de rim de coelho (RK 13 – *Rabbit Kidney*) no Laboratório de Culturas Celulares da Universidade Paulista. Para o desenvolvimento do patógeno, as células RK se mantiveram em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Streptomicina, denominado R10, em frascos com capacidade de 75 cm<sup>3</sup>. As culturas estiveram infectadas com esporos de *E. cuniculi* e incubadas com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Em intervalos de 7 dias, removeu-se o meio de cultura substituindo-o por novo. O sobrenadante recolhido seguiu para a centrifuga por 20 minutos a 1500 x g, e o sedimento contendo esporos armazenado a 4°C. Os esporos foram purificados com gradiente de *Percoll* [23] e

contabilizados em câmara de Neubauer. Posteriormente, diluiu-se o meio de cultura R10 nas proporções necessárias para cada experimento.

## 2.2 Animais

Camundongos isogênicos *specific pathogen free* (SPF), fêmeas da linhagem C57BL/6 e *knockout* para células NKT (CD1d<sup>-/-</sup> e J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>) com 8 semanas de idade, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME/UNIFESP), foram mantidos durante o período experimental no Laboratório de Experimentação Animal (SPF) da Universidade Paulista, em microisoladores com capacidade para cinco animais, cada gaiola, com controle de luminosidade em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 21°C, umidade relativa do ar de 45 a 55% e ventilação. Os animais alimentaram-se *ad libitum* de ração peletizada/irradiada e água esterilizada por autoclavagem. Os procedimentos realizados com os animais seguem os modelos preconizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Paulista (Protocolo número 36/18), de acordo com a diretiva da *European Commission Directive 86/609/ECC for animal experiments* e com o guia de procedimentos do NIH (*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*).

## 2.3 Cultura de fibroblastos L929

Linhagens L929 de fibroblastos procederam cultivados para futura diferenciação de macrófagos de medula. As células permaneceram com meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% de Penicilina/Streptomomicina, 1% de L-Glutamina e 1% de HEPES, nomeado meio de cultivo para células L929. As células L929 tiveram incubação com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C em frascos com capacidade de 75 cm<sup>3</sup>.

Após expansão das culturas, removeram-se os meios de cultura e acrescentaram-se 20 mL de meio novo por frasco. As células ficaram sete dias em

estufa, e então, os sobrenadantes dos frascos passaram por coleta e congelamento. Adicionaram-se novos meios de cultura aos frascos e novamente as células permaneceram 7 dias em estufa. O procedimento foi repetido, após esse período, efetuando novas coletas dos sobrenadantes. Por conseguinte, foram utilizados os sobrenadantes armazenados para preparo do meio de cultura, visando a diferenciação de macrófagos de medula.

#### **2.4 Obtenção de macrófagos a partir de precursores da medula óssea (MO)**

Camundongos C57BL/6 e CD1d<sup>-/-</sup> procederam pela etapa de eutanásia via aprofundamento anestésico com cetamina (100 mg/mL), xilazina (20 mg/mL) e fentanil (0,05 mg/mL). Fêmures e tíbias dos camundongos foram coletados de modo asséptico. Desse modo, a coleta da medula óssea seguiu por infusão de 10 mL de PBS, aplicado com uma seringa. Os agregados celulares foram rompidos com cuidadosa homogeneização por pipetagem e eliminaram-se os detritos celulares por tampão hemolítico *Amoniumchloride/Tris Buffer* (ACT), com concentração (160mM NH<sub>4</sub>CL, 170mM TRIS-base). Após lavagem com RPMI, as suspensões de células foram mantidas em meio RPMI suplementado com 10% SFB, 1% de Penicilina/Estreptomicina (R10), com adição de sobrenadante de células L929 para estimular a diferenciação de macrófagos, distribuídas em placas e cultivadas a 37°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por sete dias. Adiante, houve a coleta com *cell scraper* dos macrófagos em meio RPMI, após quinze minutos em superfície de gelo. Em seguida, foram contabilizados os macrófagos em 2x10<sup>5</sup> células por poço em placas de 24 poços com R10.

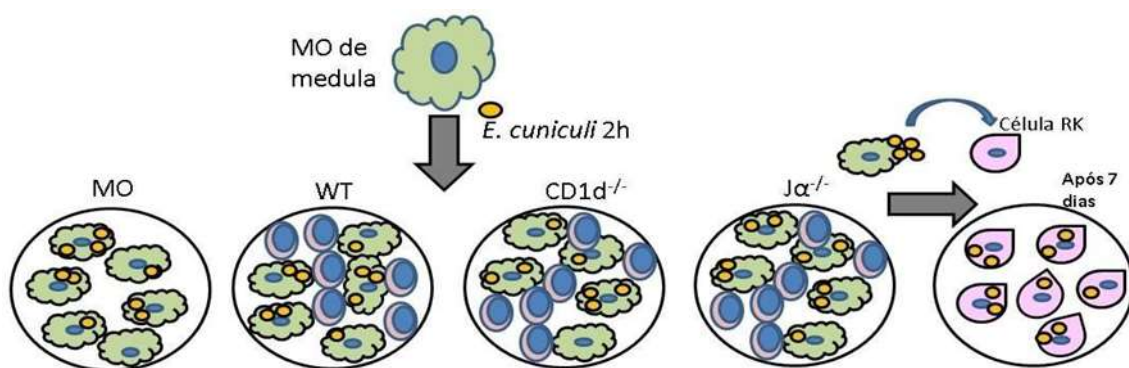
#### **2.5 Obtenção de esplenócitos totais**

Baços de camundongos C57BL/6 selvagens ou *knockout* para células NKT (CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>) foram retirados de maneira cirúrgica perante condições de esterilidade, transportados sob refrigeração em meio R10. Logo depois, houve a dissociação mecânica dos baços em PBS suplementado com 2% de SFB e, a partir

disso, foram peneirados utilizando *cell strainer* de 70  $\mu\text{m}$ . As células foram colhidas para centrifugá-las, e sedimento adquirido foi incubado no gelo com 1 mL de tampão de hemólise. Após um minuto, foram adicionados 5 mL de PBS, com posterior centrifugação. O sedimento correspondente aos esplenócitos totais livres de hemácias, foi lavado novamente em PBS + 2% SFB e suspenso no meio R10 para utilização em ensaios de cocultura.

## 2.6 Delineamento experimental para avaliação *in vitro* da resposta de macrófagos aos microsporídios *E. cuniculi*, mediante cocultivo com células NKT.

Macrófagos de medula óssea (MO) foram cultivados *overnight* e acrescidos com esporos de *E. cuniculi* na porção de 0,25 esporo: 2 macrófagos. Após 2 horas de incubação, coletaram-se os sobrenadantes para remoção dos esporos não internalizados e acrescentaram-se os esplenócitos de camundongos C57/BL6 ou de camundongos deficientes em células NKT ( $\text{CD1d}^{-/-}$  e  $\text{J}\alpha^{-/-}$ ), sob a proporção determinada de 5 esplenócitos para cada macrófago. Seguidas 6 horas de incubação, coletaram-se novamente os sobrenadantes com esporos não internalizados, caso houvessem. Ao longo de 24 horas de incubação, as células e seus respectivos sobrenadantes passaram por coleta para posteriores ensaios de atividade microbicida, dosagem de nitritos, análise da viabilidade em células RK.



**Figura 1.** Delineamento experimental para avaliação *in vitro* da resposta dos macrófagos (MO) ao *E. cuniculi* mediante cocultivo com esplenócitos totais (WT),  $\text{CD1d}^{-/-}$  e  $\text{J}\alpha^{-/-}$  por 24 horas e posterior análise de proliferação em células RK.

### **2.6.1 Contagem dos esporos para análise de atividade microbicida**

Para estimar a atividade fungicida/fungistática de macrófagos mediante sua interação com esplenócitos provenientes de camundongos *Wildtype* (WT), *CD1d<sup>-/-</sup>* e *Jα18<sup>-/-</sup>*, a viabilidade dos esporos foi mensurada pela sua capacidade proliferativa em células RK. Os esporos recuperados nas coculturas de macrófagos e esplenócitos foram contados e infectados em células RK, como descrito a seguir.

Após 24 horas de incubação, o sobrenadante das coculturas de macrófagos e esplenócitos coletado foi armazenado para futura contagem de esporos no meio extracelular. Para liberar os macrófagos, foram adicionados 500 µL de RPMI gelado, mantidos por 15 minutos em superfície de gelo, e mecanicamente liberados com *cell scraper*. Em seguida, adicionou-se *Tween 20* a 1% para efetuar 20 sessões de choques térmicos sucessivos de quente e frio, cada sessão de 20 segundos de duração, para promover o rompimento das células. O conteúdo de cada poço seguiu para tubos de 1,5 mL, juntamente com os respectivos sobrenadantes para ser centrifugado a 4000 rpm (rotação por minuto) por 10 segundos, com a finalidade de sedimentarem os detritos celulares, e transferir o sobrenadante para outro tubo com o acréscimo de 500 µL de PBS estéril gelado. Em conjunto, uma alíquota de 40 µL de cada tubo foi separada para a contagem dos esporos provenientes do interior das células.

### **2.6.2 Análise da viabilidade dos esporos recuperados de macrófagos cocultivados com esplenócitos**

Os esporos recuperados do experimento com macrófagos e previamente contados foram cultivados em células RK, para analisar a viabilidade através da capacidade proliferativa. Após 6 horas de incubação, o sobrenadante contendo os esporos não internalizados foi coletado e os esporos contabilizados, sendo considerados inviáveis. Os esporos internalizados iniciaram sua proliferação, mediante sua viabilidade, sendo considerado esse número como valor basal de esporos e tempo 0 (T0). Novo meio foi adicionado às culturas e após 7 dias, os

sobrenadantes contendo esporos foram coletados, para adição posterior com os esporos liberados das células RK (T7). Essas foram liberadas da placa com auxílio de *Tripsina versene* (ATV) preparada previamente (0,2% Tripsina, 0,02% EDTA, meio RPMI) e rompidas (ciclos de calor e frio). Ao final, a atividade microbicida dos macrófagos foi demonstrada pela Razão de Proliferação (Razão de proliferação = Esporos Viáveis T7/ Esporos Viáveis T0) obtida entre Esporos Viáveis T7 pelos Esporos Viáveis T0 (Esporos coletado de MMO – Esporos Mortos não internalizados em RK).

### **2.6.3 Avaliação de necrose e apoptose de macrófagos desafiados com *E. cuniculi***

Após a cocultura por 2 horas, os macrófagos infectados em diferentes proporções (0,5 esporo: 1 macrófago e 0,25 esporo: 2 macrófagos) ou não, liberados com *cell scraper*, foram centrifugados e lavados com PBS. Foram adicionados 100 µl do tampão do Kit 7AAD/ Anexina com 1 µl de 7AAD e 1 µl de Anexina em cada amostra. Seguindo as recomendações especificadas pelo fabricante, incubou-se por 15 minutos protegido da luz à temperatura ambiente, Em seguida, acrescentou-se 100 µl do tampão em cada amostra e seguiu-se a leitura em citômetro imediatamente após a marcação.

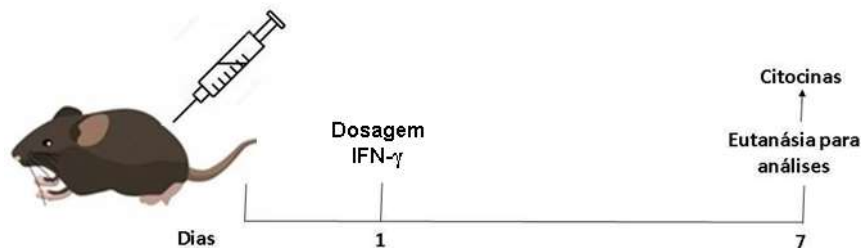
### **2.6.4 Dosagem de nitritos e nitratos**

A produção de óxido nítrico foi dosada, a partir da quantidade de nitritos e nitratos presentes no sobrenadante das culturas celulares pelo método colorimétrico baseado na reação de *Griess*. Em uma placa de 96 poços introduziu-se 100 µl de reagente de *Griess* (0,2% N-1 naftiletilenediamina, 2% sulfanilamida em 5% de ácido acético), o mesmo volume de sobrenadante proveniente das culturas. Posterior à incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorbância foi estabelecida em espectrofotômetro com filtro de ~540 nm. Então, as concentrações de NO foram medidas mediante curva padrão utilizando nitrito de sódio (140 mg,

SIGMA + 10 mL de água destilada), demonstrando os resultados em  $\mu\text{mols}$  de nitrito para  $3 \times 10^5$  macrófagos.

## 2.7 Avaliação *in vivo* da atividade de células iNKT na infecção experimental em camundongos por microsporídios *E. cuniculi*.

Camundongos isogênicos ( $n=40$ ) das linhagens C57BL/6, fêmeas ou machos com 8 semanas de idade, foram divididos em seis grupos experimentais (constituídos de 5 animais em cada), denominados de acordo com: infecção ou não por *E. cuniculi* (Infectado e Não infectado); tratamento com  $2 \mu\text{g}$  de  $\alpha$ -Galactosilceramida ( $\alpha$ -Galcer) e tratamento com  $100 \text{ mg/Kg}$  de Ciclofosfamida (Cy). Após 24 horas, houve a dosagem de  $\text{IFN-}\gamma$  dos animais e no fim do período de 7 dias, houve a sua eutanásia, visando a análise de citocinas no soro, como também a coleta dos órgãos. A imunossupressão com Cy constitui modelo de suscetibilidade à infecção por *E. cuniculi*, conforme já descrito [24].



**Figura 2.** Delineamento experimental para avaliação *in vivo* de camundongos infectados ou não com *E. cuniculi*, tratados ou não com  $\alpha$ -Galcer e imunossuprimidos com Ciclofosfamida (Cy), para análises com 24 horas de infecção ( $\text{IFN-}\gamma$ ) e necropsias após 7 dias (mensuração de citocinas).

### 2.7.1 Infecção experimental em camundongos

Os animais foram infectados com  $1 \times 10^7$  esporos de *E. cuniculi*, por via intraperitoneal (IP) e os demais receberam solução salina estéril a 0,9%, pela mesma via. Os animais tratados com  $\alpha$ -Galactosilceramida ( $\alpha$ -Galcer) (KRN7000; Cayman



Chemical, EUA), receberam a dose de 2 µg intraperitonealmente. Para a imunossupressão, foi utilizado o agente quimioterápico Cy por via IP na dose 100 mg/Kg por duas semanas, sendo a primeira dose uma semana antes da infecção, enquanto a segunda foi administrada na data de inoculação de *E. cuniculi* [24]. As quantificações de citocinas se sucederam após 7 dias de infecção.

### **2.7.2 Quantificação de IFN-γ**

IFN-γ foi dosado a partir do soro coletado de todos animais após 24h do inóculo de *E. cuniculi*, pelo kit *Mouse IFN gamma Uncoated ELISA* (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

## **2.8 Análise histopatológica**

Com o auxílio do aprofundamento anestésico subsidiados da mistura de quetamina (100 mg/mL), xilazina (20 mg/mL) e fentanil (0,05 mg/mL), os animais sofreram eutanásia, passando pela retirada de amostras de fígado, rins, pulmões e baço, e fixadas em formalina tamponada a 10% por 72h, processadas rotineiramente para histopatologia e coradas com hematoxilina-eosina (HE).

## **2.9 Determinação de citocinas por citometria de fluxo**

Inicialmente, as citocinas foram quantificadas após 7 dias de infecção, realizando-se a coleta do soro para armazenagem a -80°C, em vista da posterior análise de perfil Th1, Th2 e Th17 (TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-10 e IL-17), bem como para adquirir o perfil de inflamação, via detecção das citocinas IL-12 p70, TNF, IFN-γ, MCP-1, IL-10, IL-6 por citometria de fluxo pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA). Em segundo, cerca de 25 µl de amostra (tanto de curva padrão quanto amostras para exames futuros) foram incubados com 25 µl de uma mistura de *beads*

de captura e anticorpo secundário conjugado ao fluoróculo PE (*Phycoerythrin*). Em terceiro, tais amostras permaneceram incubadas por 2 horas sob temperatura ambiente no escuro. Por último, depois da lavagem, o levantamento dos dados se realizou com o citômetro FACS Accuri (BD Bioscience, recentemente obtido com recursos próprios pela Universidade Paulista, juntamente de análises, utilizando o software FCAP array (BD Bioscience), constatando um total de 1500 eventos (correspondendo a 300 *beads* por analito a ser investigado).

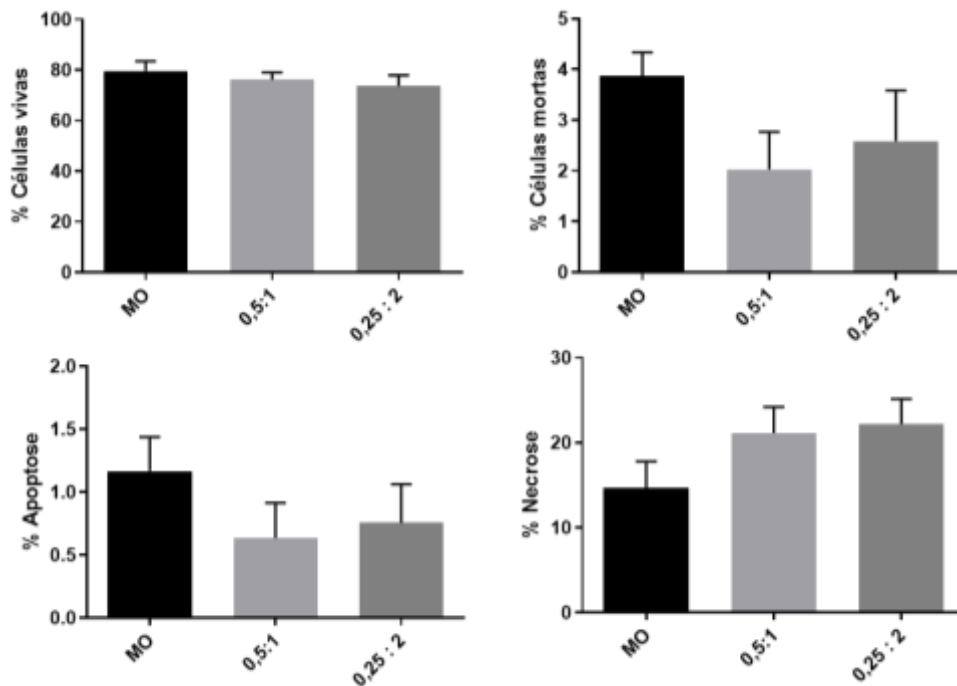
## **2.10 Análise estatística**

O programa *GraphPad Prism* sustentou a análise estatística baseada no exame 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  $p \leq 0,005$  indicaram significância estatística, com intervalos de confiança de 95%.

## **3. Resultados**

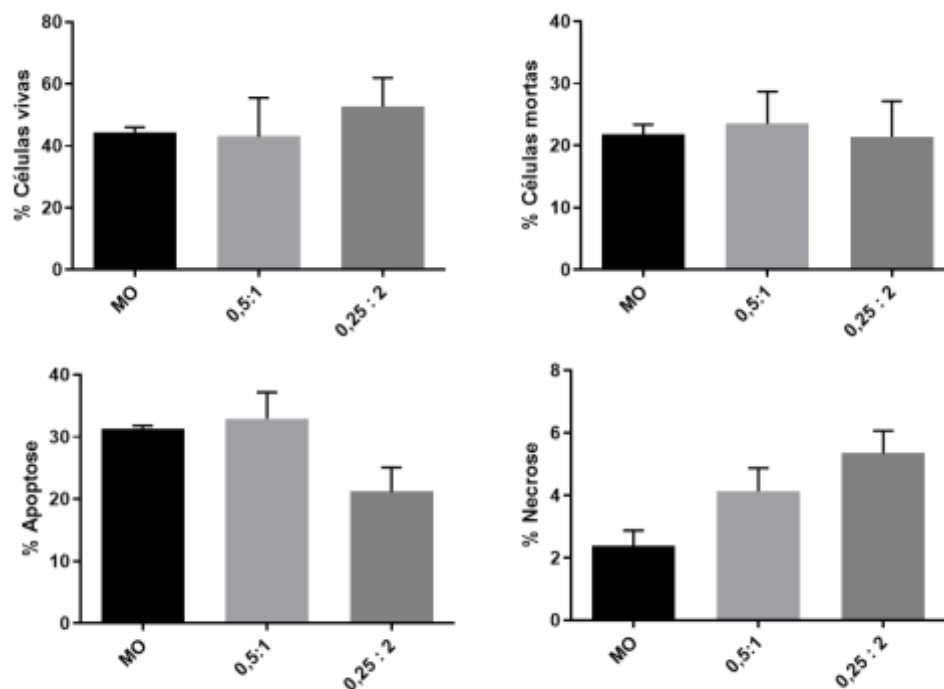
### **3.1 Viabilidade dos macrófagos e padronização na concentração de esporos**

A observação de grande quantidade de macrófagos mortos em 24 após a infecção, em 2 esporos para cada macrófago, indicou a necessidade de readequar o número de esporos utilizados nos ensaios de cocultivo com células NKT. Os resultados, após 24 horas de infecção, mostraram percentuais de células vivas acima de 75%, em ambos grupos experimentais (Fig. 3), sendo 80% representando o grupo controle, composto de células não infectadas.



**Figura 3. Viabilidade de macrófagos desafiados com *E. cuniculi*.** Porcentagens das populações de macrófagos derivados de medula óssea composto de células vivas, mortas, em estágio de apoptose e necrose. Macrófagos derivados de medula, oriundos de camundongos C57BL/6 (WT) desafiados ou não por *E. cuniculi*, nas proporções de 0,5 esporo:1 MO e 0,25 esporo:2 MOs, após 24 horas. Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey, sem significância estatística.

Entretanto, após 48 horas, o grupo cuja proporção 0,5:1, atingiu maior número de células mortas, diferentemente do grupo de concentração 0,25:2, atingiu acima de 50% de células vivas, percentual maior que o alcançado pelo grupo controle, com cerca de 58% de viabilidade celular e menores percentuais de morte celular natural (Fig. 4). Com esses resultados, a concentração 0,25:2 foi escolhida para os experimentos posteriores.



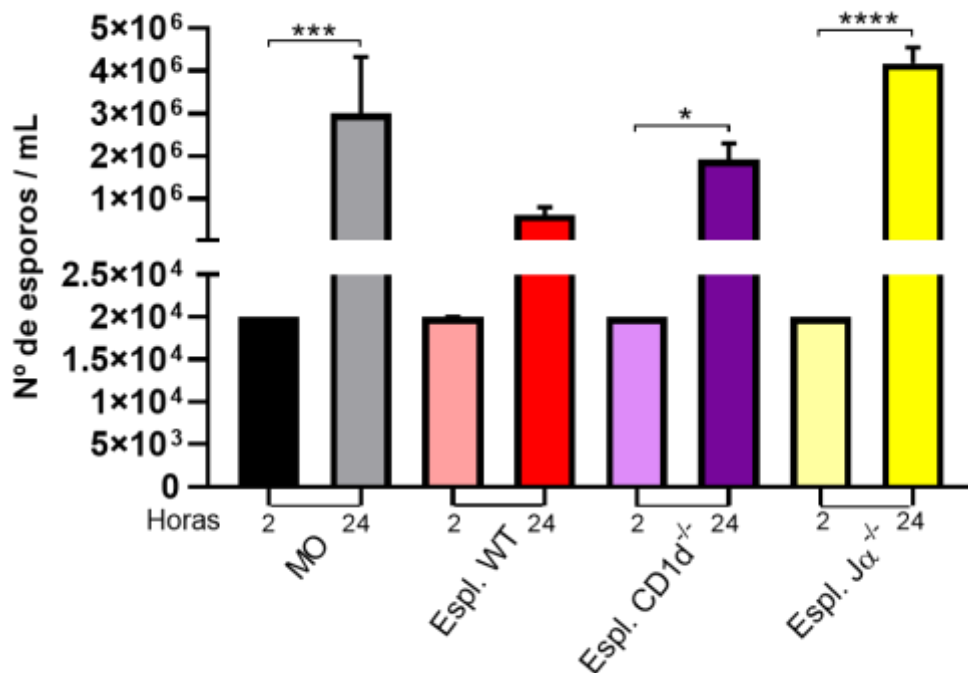
**Figura 4. Porcentagens das populações de macrófagos derivados de medula óssea composto de células vivas, mortas, em estágio de apoptose e necrose.** Macrófagos derivados de medula, oriundos de camundongos C57BL/6 (WT) desafiados ou não por *E. cuniculi*, nas proporções de 0,5 esporo:1 MO e 0,25 esporo:2 MOs, após 48 horas. Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey, sem significância estatística.

### 3.2 Ausência de iNKT permitiu maior proliferação de esporos

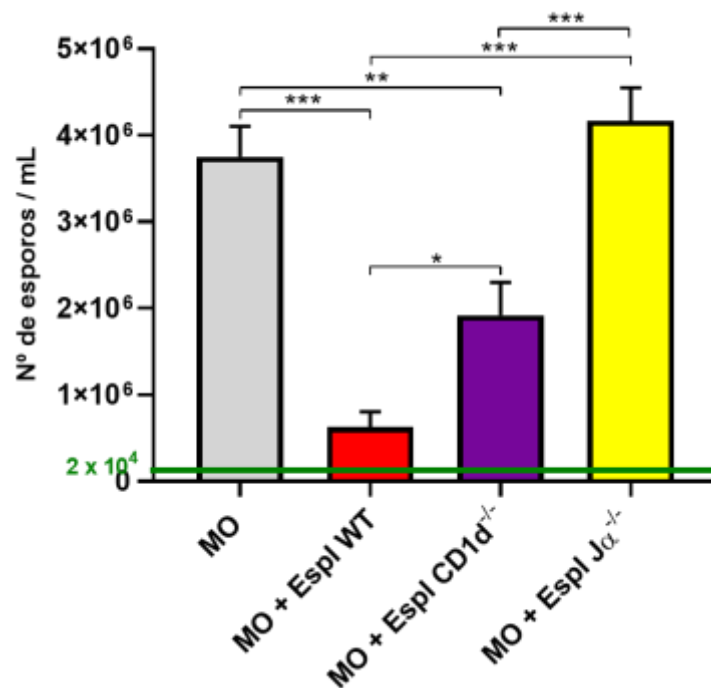
Para avaliar o papel das células NKT na microsporidiose, macrófagos infectados com *E. cuniculi* foram cocultivados com esplenócitos totais derivados dos baços de camundongos WT, contendo diversas linhagens de linfócitos; esplenócitos de camundongos *knockout* para a molécula CD1d<sup>-/-</sup>, principal via de ativação de células NKT, e esplenócitos obtidos de camundongos Jα18<sup>-/-</sup>, com ausência de células iNKT.

Após duas horas da infecção de macrófagos com *E. cuniculi*, demonstrou-se a capacidade de internalização total dos microsporídios inoculados nas culturas (Fig. 5). Após 24 horas da incubação com os esplenócitos, foram contabilizados os esporos dentro e fora das células. Os esporos se multiplicaram sob todas as condições experimentais, considerando que os valores de esporos foram superiores aos valores

basais. Porém, no grupo  $J\alpha^{-/-}$  o número de esporos superou todos os demais grupos, sendo o resultado atribuído à ausência de células iNKT. Nesse primeiro momento, observou-se uma menor quantidade de esporos no grupo  $CD1d^{-/-}$ , se comparado com o grupo de macrófagos cocultivados com esplenócitos  $J\alpha^{-/-}$ , sugerindo a participação de outras linhagens celulares não dependentes da via  $CD1d$ . O grupo composto por esplenócitos WT, obteve menor número de esporos recuperados dos macrófagos após 24 horas, sugerindo a citotoxicidade induzida por esplenócitos (Fig. 6). Embora o grupo de macrófagos cocultivados com esplenócitos WT, tenha apresentado neste momento, certa quantidade de esporos após 24 horas de infecção, foi evidenciado que houveram mortes dos microsporídios, ao se analisar os gráficos 7 e 8.

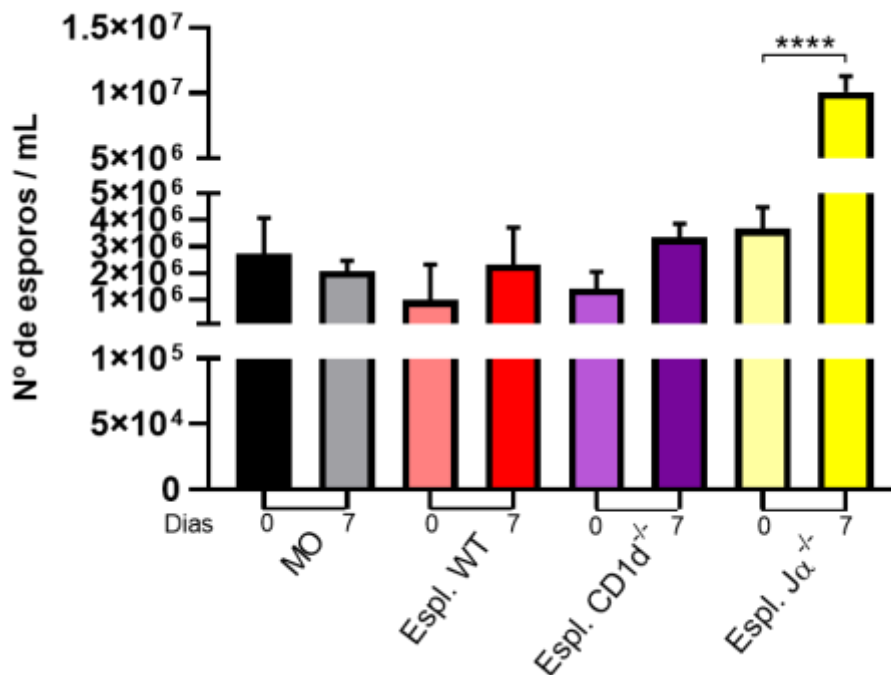


**Figura 5. Internalização de *E. cuniculi* em MOs no período de 2 horas e citotoxicidade de MOs após 24 horas.** Macrófagos derivados de medula infectados por *E. cuniculi*, cocultivados com esplenócitos de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout*  $CD1d^{-/-}$  e  $J\alpha^{-/-}$ . As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média  $\pm$  erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).



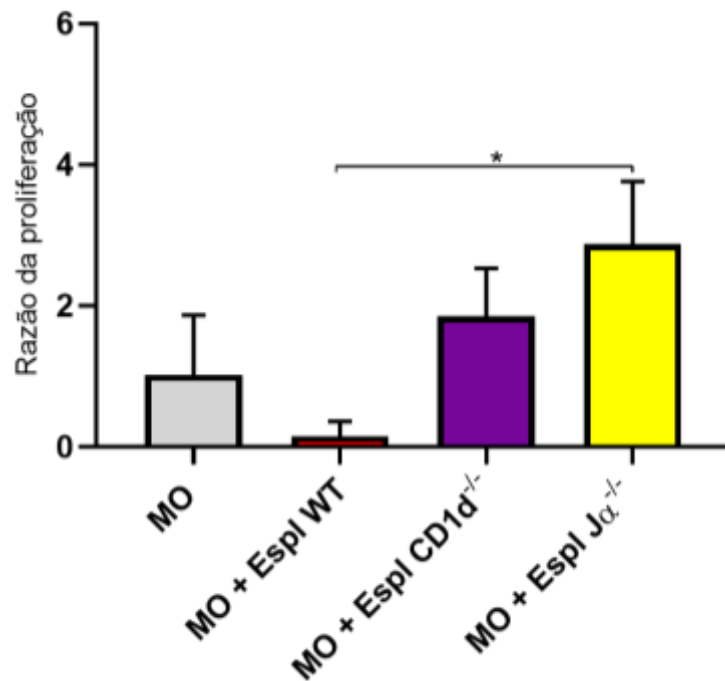
**Figura 6. Citotoxicidade de MOs após 24 horas de infecção por *E. cuniculi*.** Macrófagos derivados de medula infectados por *E. cuniculi*, cocultivados com esplenócitos de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>. As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média ± erro padrão da média, com significância para valores menores que p ≤ 0,05 (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

A viabilidade dos esporos recuperados dos ensaios com cocultivo de macrófagos e esplenócitos foi avaliada em células RK, uma linhagem utilizada para a multiplicação e manutenção de *E. cuniculi*. Esporos viáveis e com atividade proliferativa foram observados nos grupos cocultivados com esplenócitos CD1d<sup>-/-</sup> e Jα<sup>-/-</sup>, porém maior proliferação de esporos foi encontrada no grupo Jα<sup>-/-</sup>, corroborando com os achados indicados no experimento de atividade microbicida anterior (Fig. 7).



**Figura 7. Avaliação e comparação da citotoxicidade de MOs após 24 horas de infecção por *E. cuniculi*, constituindo o Tempo 0; com a quantidade de esporos recuperados e cultivados por 7 dias em células RK.** Macrófagos derivados de medula obtidos de camundongos C57BL/6 (WT), infectados por *E. cuniculi* e acrescidos ou não com esplenócitos derivados de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>. Análise de variância de uma via ANOVA com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média ± erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

A atividade microbicida dos macrófagos mediante cocultivo com esplenócitos foi mensurada pela capacidade proliferativa dos esporos em células RK denominada razão da proliferação. Ao observar a razão da proliferação obtida, percebe-se que após 7 dias, os esporos se proliferaram em maiores quantidades nas culturas sem a participação de células iNKTs e esplenócitos restritos à molécula CD1d (Jα<sup>-/-</sup> e CD1d<sup>-/-</sup>, respectivamente), ao comparar com o grupo de macrófagos infectados acrescidos de esplenócitos totais, demonstrando maior atividade supressora no desenvolvimento e proliferação dos esporos (Fig. 8).



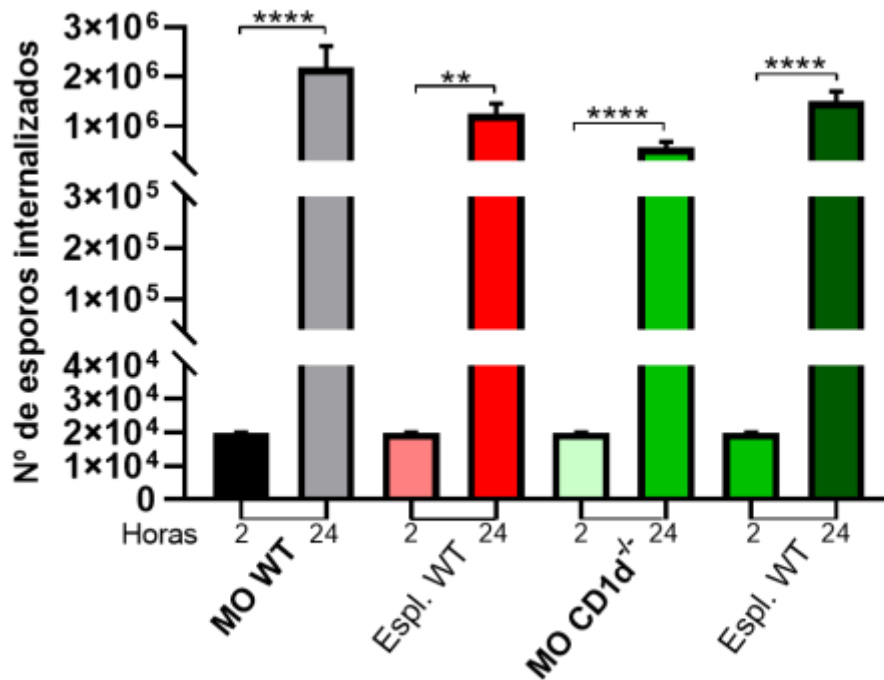
**Figura 8. Razão da proliferação de esporos, obtida pela divisão entre o número de esporos recuperados em 7 dias das células RK pelo número obtido no Tempo 0.** Macrófagos derivados de medula obtidos de camundongos C57BL/6 (WT), infectados por *E. cuniculi* e acrescidos ou não com esplenócitos derivados de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>. Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média ± erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

### 3.3 Células NKT utilizam via diversa de CD1d para estimular macrófagos infectados

Para testar a hipótese de que a inibição do desenvolvimento dos microsporídios pode ser dependente de células NKT restritas ao mecanismo de ativação via CD1d, expresso por macrófagos, foram utilizadas duas linhagens de MO, advindas de camundongos distintos. O primeiro grupo, composto por macrófagos deficientes em moléculas CD1d (MO CD1d<sup>-/-</sup>) e o outro com macrófagos oriundos de camundongos do tipo selvagem (*WildType* - MO WT), que expressam as moléculas CD1d. Houve internalização quase 100% dos esporos, após 2 horas do inóculo dos esporos, e

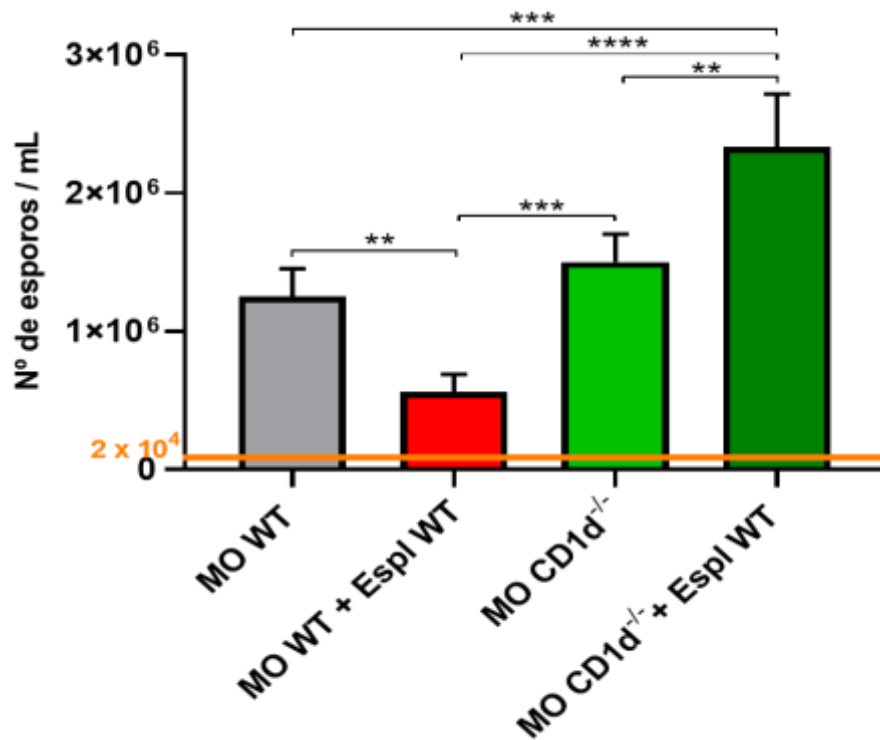


menores taxas de proliferação no interior de macrófagos CD1d<sup>-/-</sup>, se comparado com os outros grupos (Fig. 9).



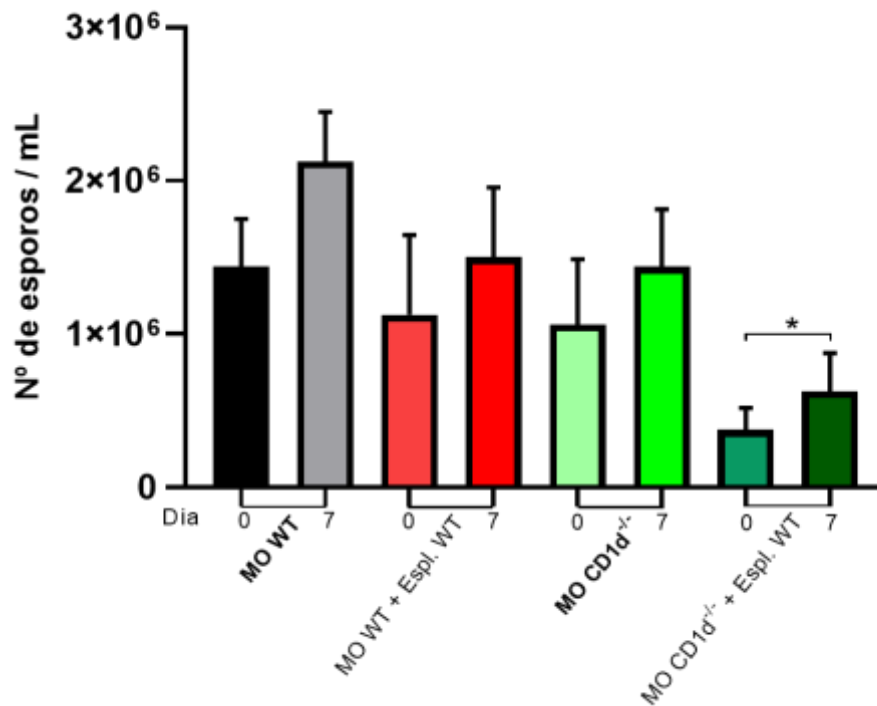
**Figura 9. Internalização de *E. cuniculi* em MOs no período de 2 horas e citotoxicidade de MOs CD1d<sup>-/-</sup> após 24 horas.** Macrófagos derivados de medula infectados por *E. cuniculi*, obtidos de camundongos *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> ou WT cocultivados com esplenócitos de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e  $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>. As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média  $\pm$  erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Após 24 horas, houve maior proliferação de esporos em macrófagos CD1d<sup>-/-</sup> com adição de esplenócitos WT, se comparada com a quantidade de esporos recuperados em macrófagos WT com esplenócitos totais WT, demonstrando maior atividade microbicida neste grupo (Fig. 10).



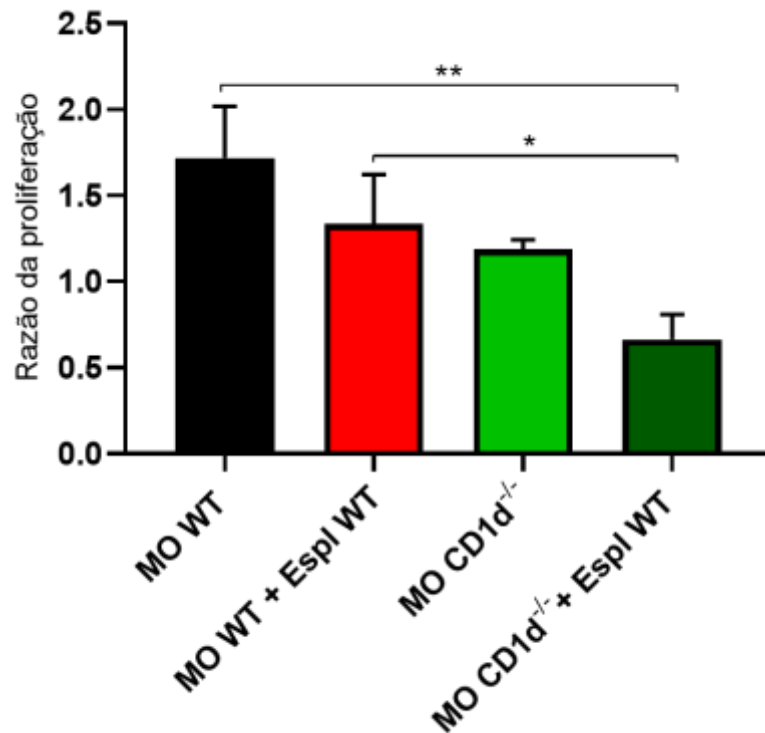
**Figura 10. Citotoxicidade de MOs CD1d<sup>-/-</sup> após 24 horas de infecção por *E. cuniculi*.** Macrófagos derivados de medula infectados por *E. cuniculi*, obtidos de camundongos *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> ou WT, cocultivados com esplenócitos de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>. As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média ± erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Contudo, ao analisar a viabilidade e proliferação dos esporos em culturas de células RK e comparar o número basal de esporos (Tempo 0) com o recuperado após 7 dias, torna-se evidente a maior capacidade microbicida nos macrófagos CD1d<sup>-/-</sup> em conjunto com esplenócitos WT (Fig. 11).



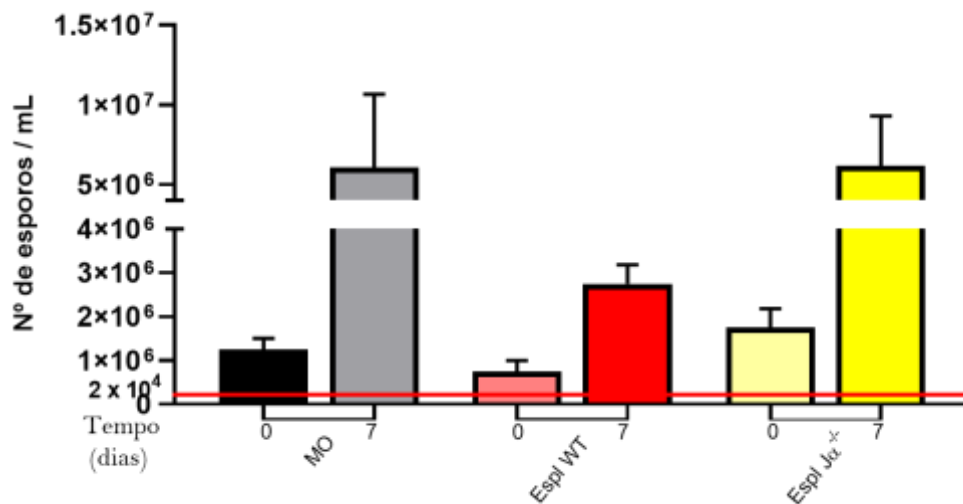
**Figura 11. Avaliação e comparação da citotoxicidade de MOs após 24 horas de infecção por *E. cuniculi*, constituindo o Tempo 0; com a quantidade de esporos recuperados e cultivados por 7 dias em células RK.** Macrófagos derivados de medula infectados por *E. cuniculi*, obtidos de camundongos *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> ou WT, cocultivados com esplenócitos de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e  $\alpha$ 18<sup>-/-</sup>. Análise de variância de uma via ANOVA com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média  $\pm$  erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\* $p < 0,05$ ).

A razão da proliferação também evidencia esses dados, sugerindo a participação de células NKT, por uma via independente de CD1d ou ainda, a colaboração de outras linhagens celulares que expressam CD1d, derivadas dos baços dos animais (Fig. 12).

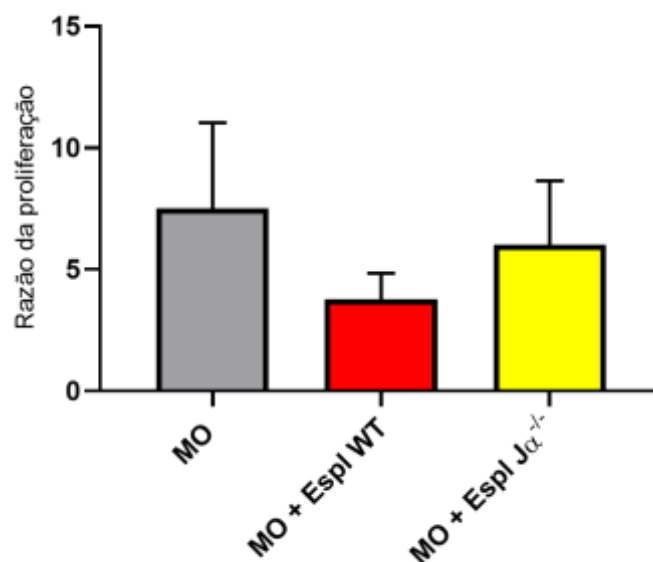


**Figura 12.** Razão da proliferação de esporos, obtida pela divisão entre o número de esporos recuperados em 7 dias das células RK pelo número obtido no Tempo 0. Macrófagos derivados de medula obtidos de camundongos *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> ou WT, infectados por *E. cuniculi* e acrescidos ou não com esplenócitos derivados de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>. Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média ± erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Com o intuito de validar os achados anteriores, houve repetição do experimento, observando-se por meio da razão proliferativa, que os macrófagos WT obtiveram maior atividade microbicida no grupo contendo esplenócitos WT (Fig. 14), convergindo com os achados anteriores. Constata-se o mesmo no tempo 0 e após 7 dias (Fig. 13), esporos proliferaram menos nas coculturas de MO WT com esplenócitos WT e proliferaram mais no grupo Jα<sup>-/-</sup>.

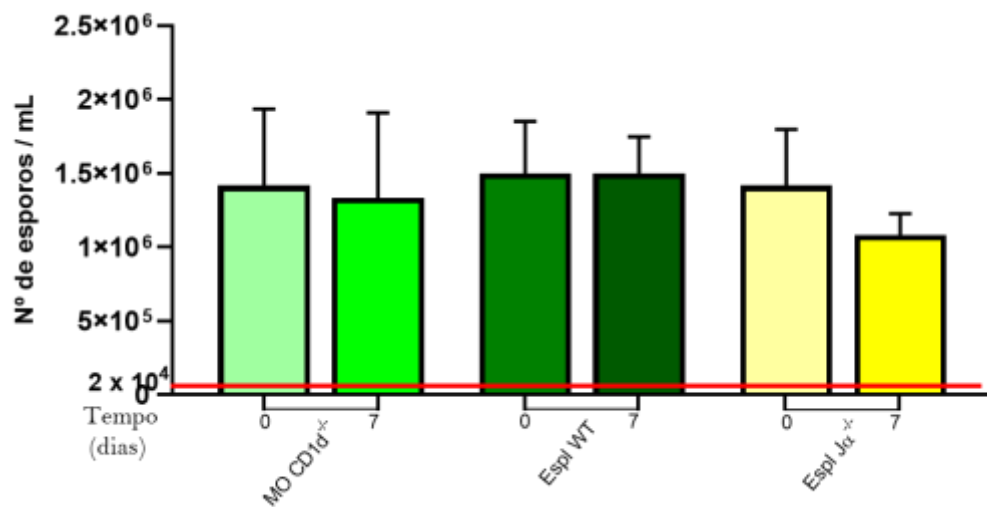


**Figura 13. Avaliação e comparação da citotoxicidade de MOs após 24 horas de infecção por *E. cuniculi*, constituindo o Tempo 0; com a quantidade de esporos cultivados por 7 dias em células RK.** Macrófagos derivados de medula obtidos de camundongos C57BL/6 (WT), infectados por *E. cuniculi* e acrescidos ou não com esplenócitos derivados de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e  $J\alpha^{18^{-/-}}$ . Análise de variância de uma via ANOVA com pós-teste de Tukey, sem significância estatística entre os grupos.

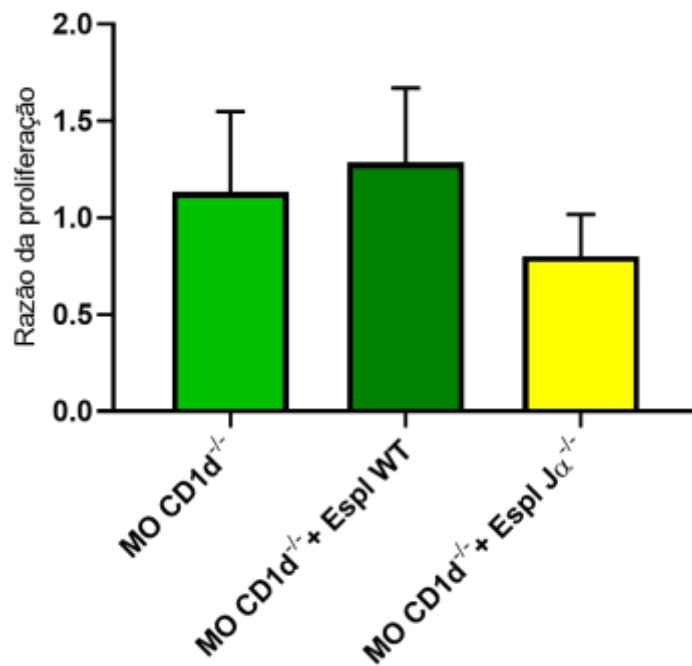


**Figura 14. Razão da proliferação de esporos, obtida pela divisão entre o número de esporos recuperados em 7 dias das células RK pelo número obtido no Tempo 0.** Macrófagos derivados de medula obtidos de camundongos C57BL/6 (WT), infectados por *E. cuniculi* e acrescidos ou não com esplenócitos derivados de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e  $J\alpha^{18^{-/-}}$ . Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey, sem significância estatística entre os grupos.

Surpreendentemente, os macrófagos deficientes em CD1d, também suprimiram a quantidade de esporos, obtendo menor razão proliferativa no grupo com ausência em células iNKT (Fig. 15 e 16). O conjunto desses resultados reforça as hipóteses levantadas anteriormente, isto é, sugerem possivelmente a participação de linfócitos ativados via independente CD1d, propiciando maior atividade microbicida dos macrófagos de medula frente à microsporidiose.



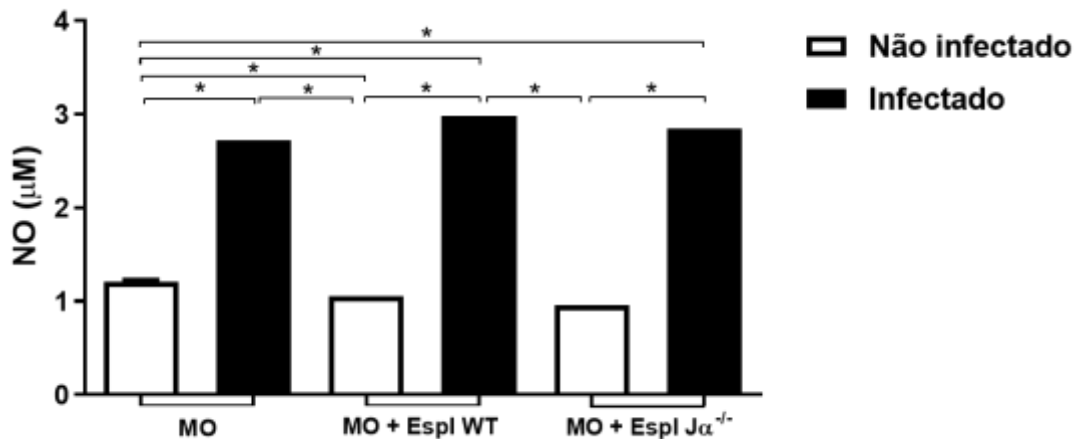
**Figura 15. Avaliação e comparação entre a proliferação de esporos de *E. cuniculi* recuperados de MOs após 24 horas, constituindo o Tempo 0; com a quantidade de esporos cultivados por 7 dias em células RK. Macrófagos derivados de medula infectados por *E. cuniculi*, obtidos de camundongos *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> ou WT, cocultivados com esplenócitos de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>. Análise de variância de uma via ANOVA com pós-teste de Tukey, sem significância estatística entre os grupos.**



**Figura 16.** Razão da proliferação de esporos, obtida pela divisão entre o número de esporos recuperados em 7 dias das células RK pelo número obtido no Tempo 0. Macrófagos derivados de medula obtidos de camundongos *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> ou WT, infectados por *E. cuniculi* e acrescidos ou não com esplenócitos derivados de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>. Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey, sem significância estatística entre os grupos.

### 3.4 Macrófagos infectados por *E. cuniculi* cocultivados com esplenócitos Jα18<sup>-/-</sup> e WT secretaram maiores concentrações de óxido nítrico

Os macrófagos infectados apresentaram maior produção de NO, se comparado com os grupos de macrófagos não infectados. Os macrófagos WT com adição de esplenócitos WT apresentaram os níveis mais elevados em conjunto com os grupos contendo esplenócitos Jα18<sup>-/-</sup> e ausentes em iNKT (Fig.17). Esses dados demonstram a atividade microbicida dos macrófagos frente à infecção por estímulo de linfócitos (linfócitos T  $\gamma\delta$  - *gamma delta* ou NKT tipo II, por exemplo), via independente ao CD1d<sup>-/-</sup> e/ou participação de outros grupos de células presentes nos baços, expressando a molécula CD1d<sup>-/-</sup>, com discreta produção de óxido nítrico.



**Figura 17. Citotoxicidade de MOs após 24 horas de infecção por *E. cuniculi* via produção de óxido nítrico.** Macrófagos derivados de medula; obtidos de camundongos C57BL/6 (WT) infectados por *E. cuniculi* e acrescidos ou não com esplenócitos derivados dos baços de camundongos C57BL/6 (WT) ou *knockout* CD1d<sup>-/-</sup> e Jα18<sup>-/-</sup>. As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA de uma via, com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média ± erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\* $p < 0,05$ ).

### 3.5 O tratamento com α-Galcer promoveu rápida resolução da infecção experimental *in vivo*

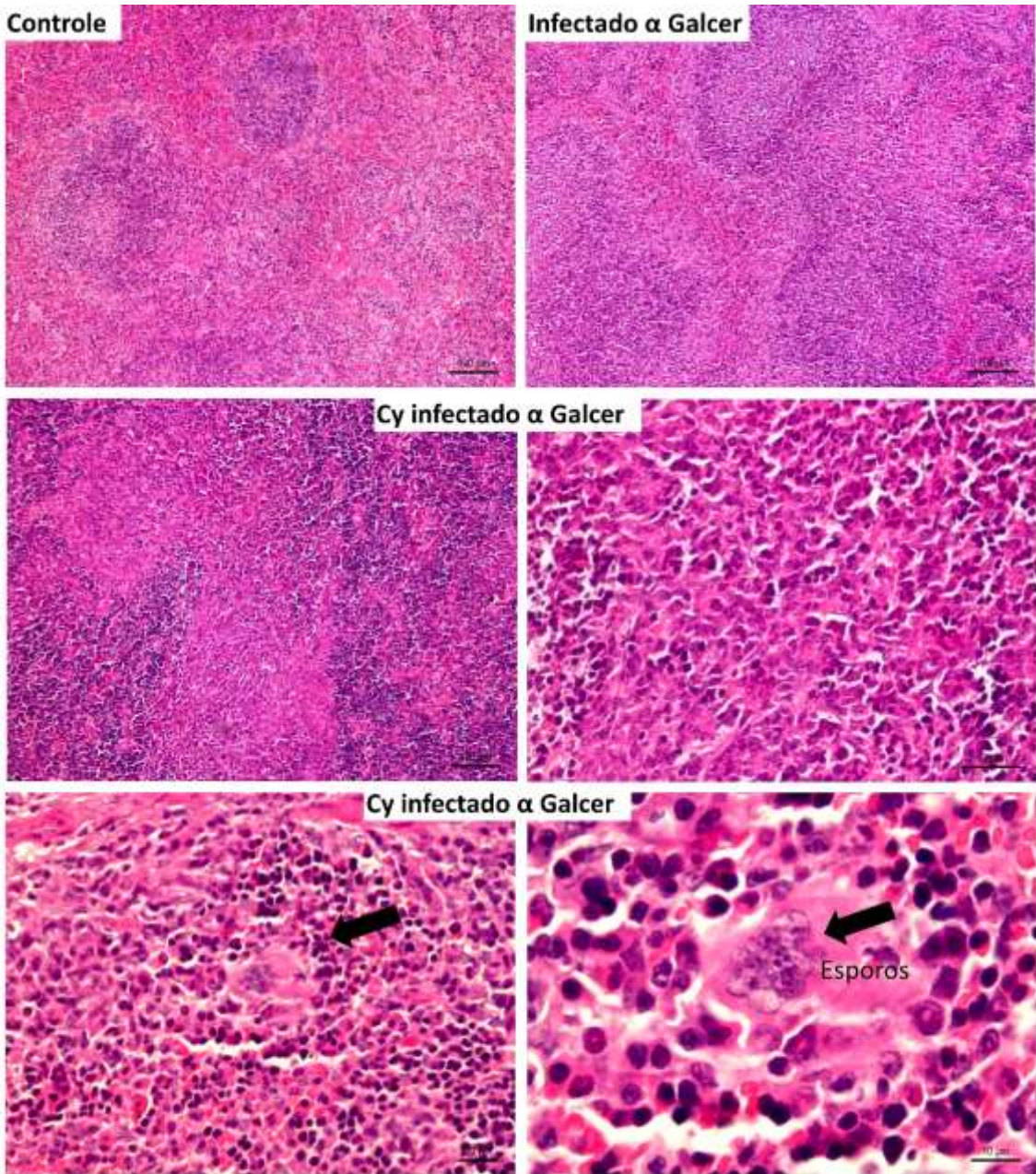
Os animais infectados tratados com α-Galcer e imunossuprimidos apresentaram esplenomegalia (Infectado α-Galcer, Cy infectado e Cy infectado + α-Galcer) (Fig.18) e hepatomegalia. Os animais infectados tratados com α-Galcer resultaram em alterações do tecido esplênico, induzindo desarranjo tecidual, principalmente no grupo imunossuprimido (Fig. 19A), e foi evidente a falta de limitação entre as polpas vermelha e branca, como também expansão linfóide com área blástica evidente e presença de esporos (setas). Em contraste, o grupo controle preservou a conformação do tecido e tamanho do órgão (Figuras 19 A, B).

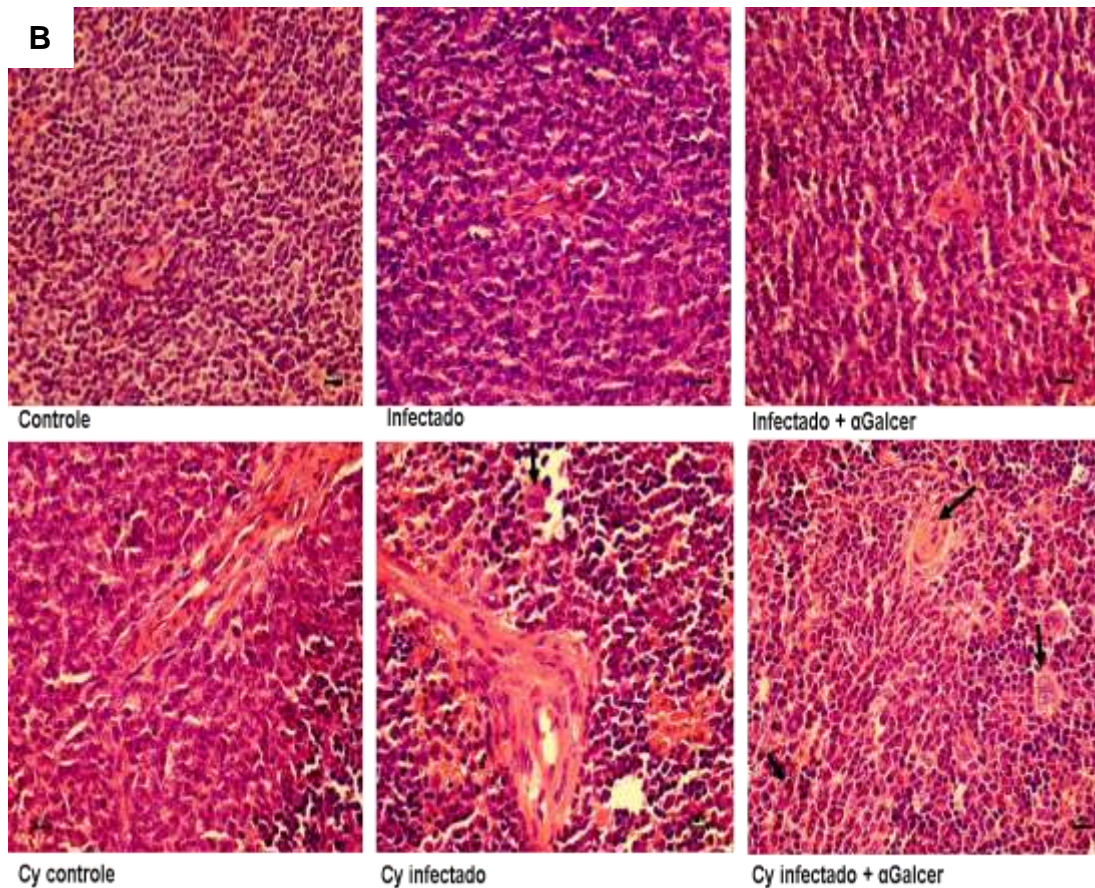




**Figura 18.** Baços de animais eutanasiados após 7 dias de infecção por *E. cuniculi* ou não, que receberam ou não tratamento com Cy e/ou  $\alpha$ -Galcer, mostrando esplenomegalia nos grupos: Infectado  $\alpha$ -Galcer, Cy infectado e Cy infectado +  $\alpha$ -Galcer.

A

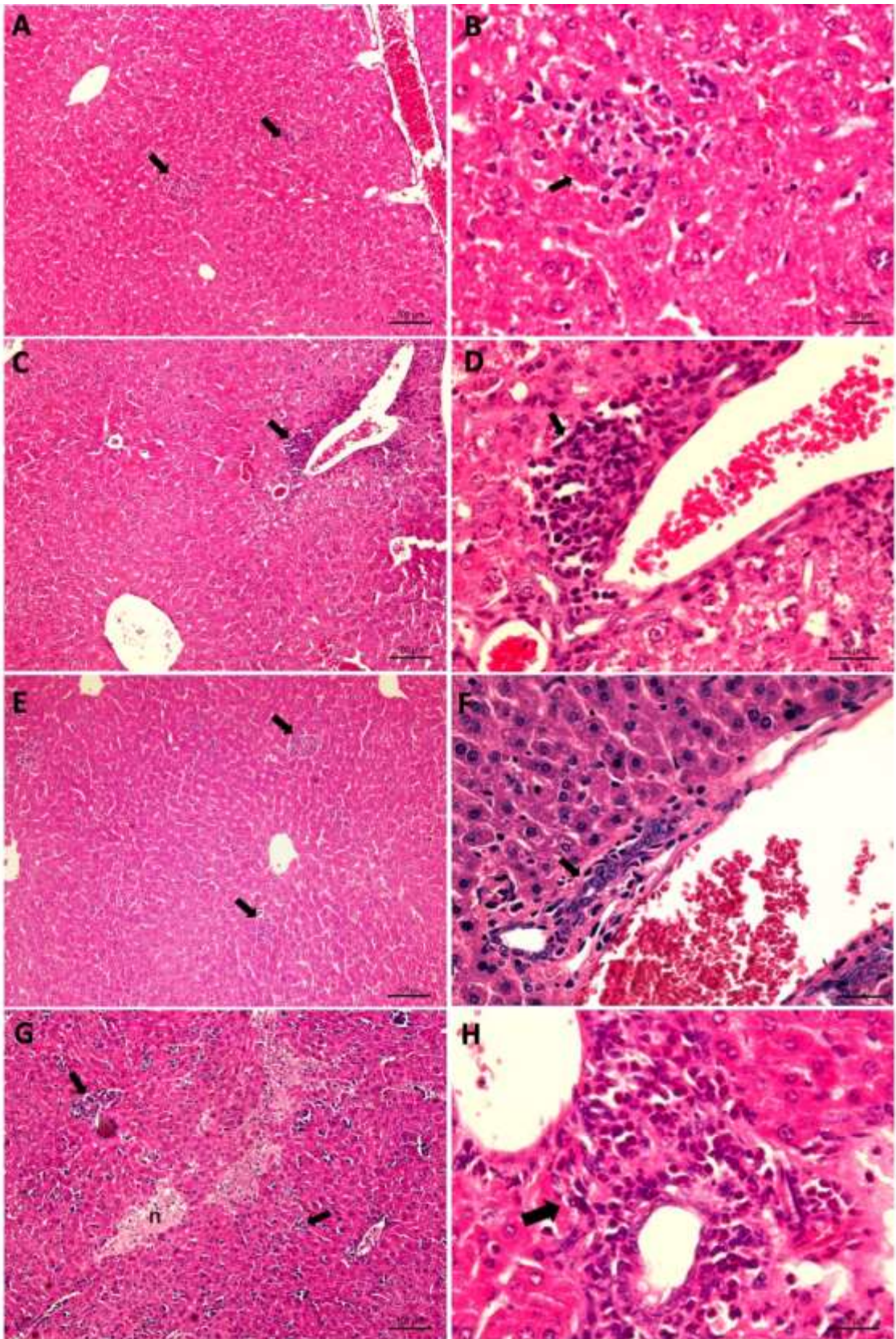




**Figura 19. Fotomicrografias de baços de camundongos C57BL/6 infectados ou não por *E. cuniculi*, tratados ou não com Ciclofosfamida (Cy) e  $\alpha$ -Galcer; após 7 dias. A)** Animais dos grupos Cy infectado e Cy infectado +  $\alpha$ -Galcer demonstraram desordem tecidual com evidente expansão linfóide e presença de esporos (setas). **B)** Animais dos grupos Cy infectado e Cy infectado +  $\alpha$ -Galcer apresentaram respectivamente, células gigantes multinucleadas, leucócitos polimorfonucleares e células mononucleares (setas).

Microscopicamente, as lesões ocasionadas por *E. cuniculi* nos fígados dos animais caracterizaram-se por pequenos focos de infiltração celular compostos de agregados leucocitários, tanto em camundongos imunossuprimidos, quanto em animais tratados com  $\alpha$ -Galcer em decorrência do processo inflamatório. Os animais infectados e tratados com  $\alpha$ -Galcer e Cy manifestaram pequenos aglomerados com células polimorfonucleares, característica de processo inflamatório agudo. Observa-se também, que todos os animais tratados com  $\alpha$ -Galcer apresentaram predomínio de granulócitos, com aparentes perfis de resolução do processo infeccioso (Fig. 20).

A infecção pelo *E. cuniculi* foi associada à presença de infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares no parênquima hepático, algumas vezes situado ao redor de vasos sanguíneos, via de disseminação do patógeno após a inoculação IP. A extensão das lesões estava relacionada ao tipo de tratamento instituído no animal, sendo observado infiltrado inflamatório mais abundante em animais tratados com  $\alpha$ -Galcer. Embora os animais imunossuprimidos sejam mais suscetíveis à infecção, a Cy reduziu a infiltração inflamatória devido aos seus efeitos diretos sobre essas linhagens celulares. A administração de  $\alpha$ -Galcer intensificou o infiltrado inflamatório e, ainda, observou-se presença de áreas de necrose (Fig. 20 – G). Também foi observada discreta pneumonia intersticial multifocal, com infiltrado linfoplasmocítico, em especial nos animais tratados com Cy e  $\alpha$ -Galcer (Fig. 20).

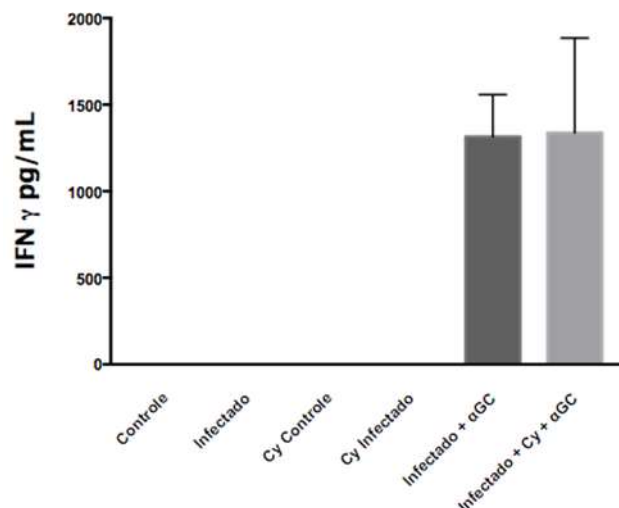


**Figura 20. Fotomicrografia de lesões hepáticas de camundongos infectados com *E. cuniculi*, imunossuprimidos com Cy e/ou tratados com  $\alpha$ -Galcer. (A, B) Camundongos infectados com *E. cuniculi* apresentando discretos infiltrados inflamatórios. (C, D)**

Camundongos Infectados com *E. cuniculi* tratados com  $\alpha$ -Galcer com infiltrados inflamatórios mais extensos. (E, F) Camundongos Infectados com *E. cuniculi* imunossuprimidos com Cy com infiltrados inflamatórios discretos. (G, H) Camundongos Infectados com *E. cuniculi* imunossuprimidos com Cy e tratados com  $\alpha$ -Galcer com infiltração inflamatória difusa em pequenos focos ou com infiltrados mais extensos ao redor de vasos sanguíneos. Notar áreas de necrose (n) associadas às lesões. Coloração HE.

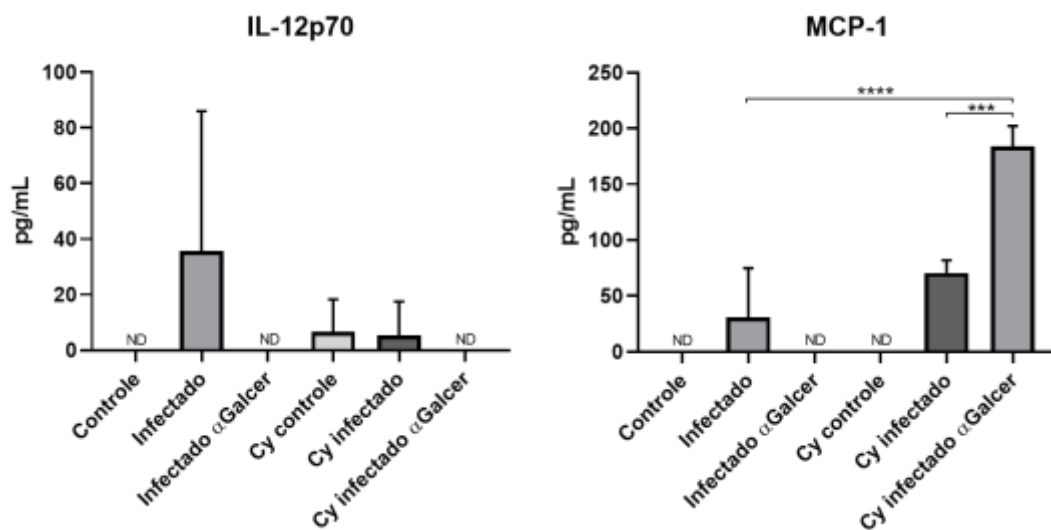
### 3.6 Mensuração de citocinas

Células NKT, quando estimuladas, produzem grandes quantidades de IFN- $\gamma$  [19], então foram mensuradas e comparadas as dosagens de IFN- $\gamma$  produzidas nos soros dos animais, 24h após o inóculo de *E. cuniculi*, com o objetivo de verificar a possível participação de células iNKT e células apresentadoras de antígenos após infecção. Os animais que receberam a administração de  $\alpha$ -Galcer tiveram níveis altos de IFN- $\gamma$ , indicando maior ativação de células NKT (Fig. 21).

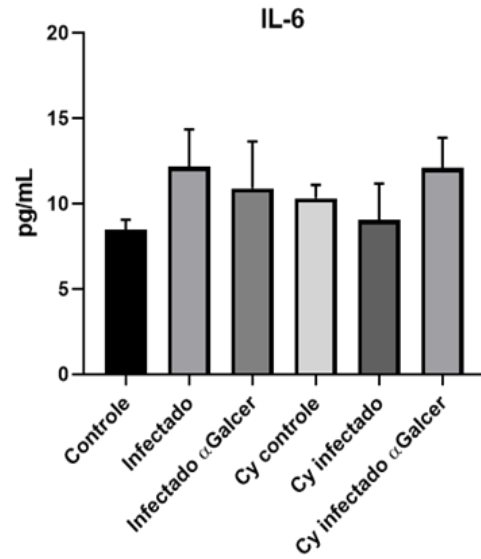
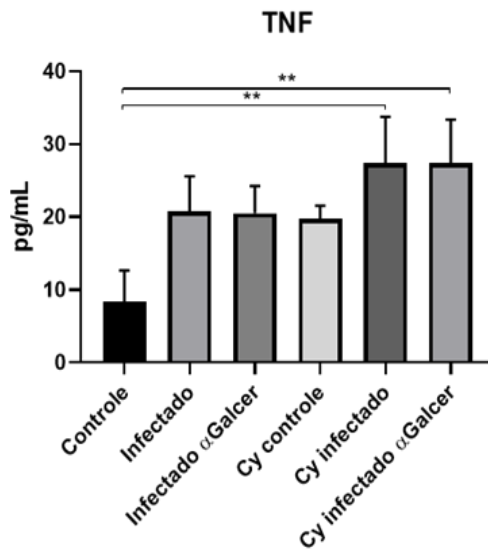
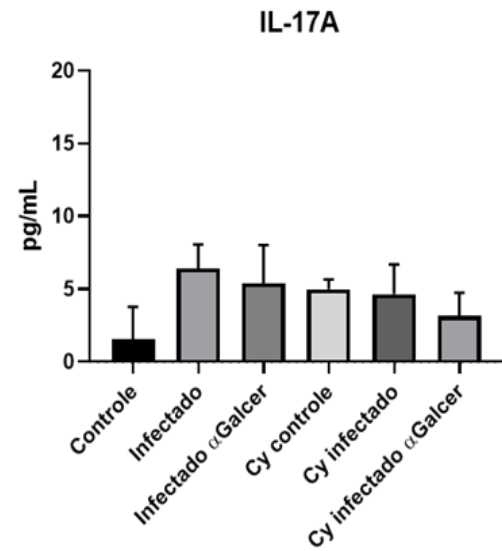
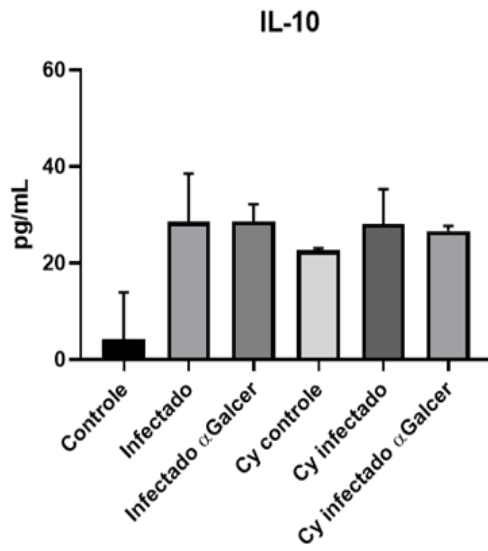


**Figura 21. Produção de IFN- $\gamma$  em soro de camundongos C57BL/6 infectados ou não por *E. cuniculi*, tratados ou não com Ciclofosfamida (Cy) e  $\alpha$ -Galcer; após 24 horas.** Animais dos grupos Infectado +  $\alpha$ -Galcer e Cy infectado +  $\alpha$ -Galcer demonstraram altos níveis de IFN- $\gamma$ .

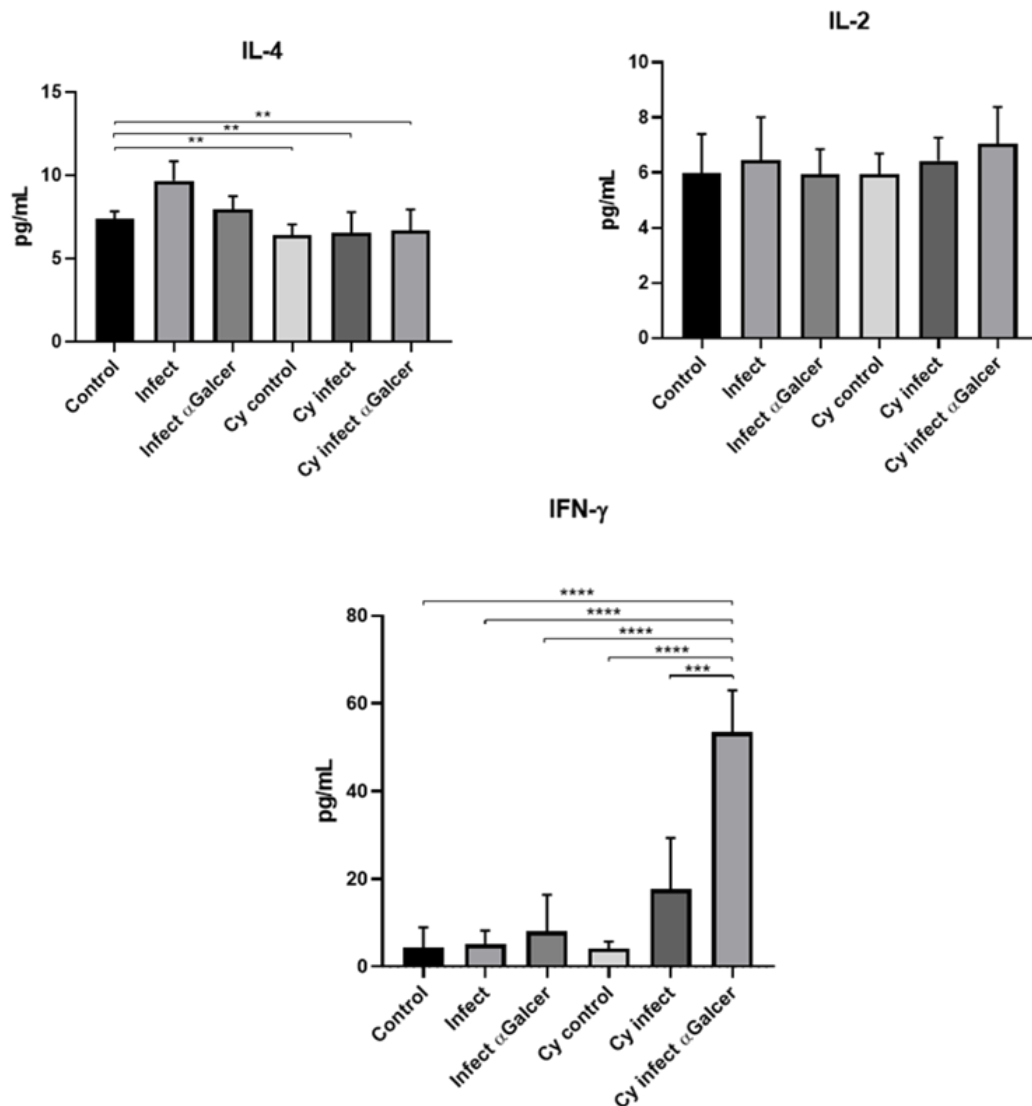
A dosagem de citocinas no soro dos animais, após 7 dias de infecção, demonstrou que os animais infectados e tratados com Cy e  $\alpha$ -Galcer tinham concentrações das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF e MCP-1 aumentadas em relação aos demais grupos. No grupo infectado, também houve aumento de MCP-1 em relação ao grupo controle, ainda que IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foram identificadas, porém com baixos níveis mensurados em relação ao grupo controle (Fig. 22 e 23).



**Figura 22.** Níveis de citocinas detectadas em soro de camundongos C57BL/6 tratados ou não com Ciclofosfamida e  $\alpha$ -Galcer e infectados ou não por *E. cuniculi*, após 7 dias. As citocinas IL-12 p70 e MCP-1, mensuradas por citometria de fluxo após 7 dias de infecção. Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média  $\pm$  erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).







**Figura 23.** Níveis de citocinas detectadas em soro de camundongos C57BL/6 tratados ou não com Ciclofosfamida e  $\alpha$ -Galcer e desafiados ou não por *E. cuniculi*. As citocinas IL-12 p70, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-10 e IL-17 mensuradas por citometria de fluxo após 7 dias de infecção. Análise de variância de uma via (ANOVA), com pós-teste de Tukey. Todos os valores relatados como a média  $\pm$  erro padrão da média, com significância para valores menores que  $p \leq 0,05$  (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4. Discussão

No presente estudo, as células iNKT participaram da resposta imune contra *E. cuniculi*, ocasionando o aumento da atividade microbicida de macrófagos, uma vez que macrófagos WT infectados e cultivados com os esplenócitos derivados de camundongos  $J\alpha^{-/-}$ , isto é, deficientes em células iNKT, resultaram em maior proliferação de esporos em células RK. Sada-Ovalle *et al.* [25], demonstraram que as células iNKT são suficientes para suprimir o crescimento intracelular do bacilo *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*. Segundo o estudo, a função efetora da célula iNKT depende da expressão do CD1d por macrófagos infectados, indicando que o reconhecimento do CD1d é necessário. Contudo, a citocina IL-12 produzida pelo macrófago infectado, também é necessária para ativação da função efetora das células iNKTs. Outro fator importante, relatado pelos autores citados, foi a produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos estimulados por macrófagos infectados com *Mtb*.

Nas culturas com adição de esplenócitos, oriundos de camundongos  $CD1d^{-/-}$ , também houve proliferação dos esporos, se comparado com as culturas WT, porém, em menor quantidade em relação aos esporos recuperados do grupo  $J\alpha^{-/-}$ . Os dados sugerem que a diminuição de esporos nessas culturas pode ser decorrente da participação de células iNKT, mas provavelmente de outros grupos de células, como os linfócitos  $T\gamma\delta$ , outras linhagens de células NKT - como NKT tipo II, independente da participação restrita de células iNKT. Já foi descrito o aumento precoce e significativo de linfócitos  $T\gamma\delta$  alguns dias após a infecção por *E. cuniculi*, desempenhando papel protetor complementar durante a infecção [16].

A supressão do desenvolvimento de *E. cuniculi*, também ocorreu nas culturas com macrófagos de medula derivados de camundongos  $CD1d^{-/-}$ , que não expressam a molécula CD1d. Tal fato poderia ser elucidado pelo emprego de esplenócitos totais derivados de baços nesse modelo, sem uma prévia separação específica de células. Assim, há indicativos da existência de outros conjuntos celulares coletados dos baços. Em suma, segundo Brossay *et al.* [26], as glicoproteínas CD1d são expressas em células de origem hematopoiética, como células dendríticas, células B, células T e macrófagos. A principal via de ativação das células restritas à CD1d, conforme mencionado, dá-se pelo reconhecimento de antígenos glicolipídicos associados à

molécula CD1d, presente na célula APC, reconhecido pelo TCR do linfócito inato. Isso significa que as células NKT reconhecem uma classe de antígenos ignorados pelas células T convencionais [27]. Alguns estudos sugerem a ativação de células iNKT sem a sinalização clássica do TCR, após o reconhecimento do complexo lipídico CD1d, mas por sinalização de citocinas, como por exemplo, IFN- $\gamma$  e IL-12 na infecção microbiana [28]. Não obstante, a expressão de CD1d não se restringe às células APCs, linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressaram níveis altos de CD1d, após ativação promovida por células iNKT de forma independente, isto é, mesmo na ausência de antígenos exógenos e células dendríticas [29].

A fim de determinar o aumento da resposta imune por células iNKT em camundongos infectados experimentalmente, neste estudo, utilizou-se um composto ativador eficiente, o glicolípido sintético (originalmente derivado de uma esponja marinha), conhecido como  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -Galcer). Esse agonista se liga efetivamente à molécula CD1d, formando um complexo associado de glicolípido + CD1d. O complexo se une ao TCR da célula iNKT, levando à ativação dessas células em camundongos e humanos [30]. Depois do envolvimento com o complexo CD1d +  $\alpha$ -Galcer, as células iNKT tornam-se ativadas, e apenas alguns minutos depois, inicia uma rápida produção de citocinas. Na sequência, também ocorre a regulação positiva de marcadores como CD69 (marcador de ativação de linfócitos T), aumentos da proliferação celular e da capacidade citotóxica. As citocinas secretadas não apenas desencadearão a ativação de células T, NK, células B e dendríticas, mas também direcionarão as respostas imunológicas para as respostas Th1 ou Th2 [17].

Diversos estudos com o uso de camundongos CD1d<sup>-/-</sup> e J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> infectados experimentalmente, revelaram que as células iNKT podem exacerbar ou melhorar o resultado da infecção. Afinal, tais células possuem diversos mecanismos para modular a imunidade do hospedeiro. Além disso, a ativação farmacológica de células iNKT com o ligante sintético  $\alpha$ Galcer, frequentemente aumenta a resistência do hospedeiro à infecção [25].

A ciclofosfamida (Cy) é amplamente utilizada como fármaco citotóxico e imunossupressor na terapia antitumoral, em doenças autoimunes, transplantes de órgãos, profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), após transplante de medula óssea alogênico mieloablativo [31, 32]. A Cy possui atividade alquilante

citotóxica, ou seja, estabelece ligações cruzadas com os filamentos de DNA da célula impedindo sua replicação. Sua ação altera o ciclo celular, interrompendo-o ou conturbando etapas importantes da proliferação celular. Conseqüentemente, pode ocasionar a apoptose celular; além de atrasar ou suprimir a resposta de células T; interferir na ativação de células fagocíticas, afetar outros grupos de células, como neutrófilos, hemácias, plaquetas e outros tipos de linfócitos [33].

Dados do grupo estudado demonstraram que camundongos imunossuprimidos com Cy apresentaram intensa redução de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, tal como infecção grave e letal quando infectados por *E. cuniculi* [24]. No presente estudo, os animais C57BL/6 infectados e imunossuprimidos apresentaram algumas manifestações leves da microsporidiose, como esplenomegalia e hepatomegalia. Contudo, houve um quadro geral assintomático na maioria dos animais não imunossuprimidos. Porém, quando os animais foram tratados com Cy e  $\alpha$ -Galcer, os baços e fígados dobraram de tamanho, o mesmo notado, inclusive, nos animais infectados e tratados apenas com  $\alpha$ -Galcer. Achados observados na histopatologia, indicaram o tecido esplênico com significativa alteração, assim como notória desordem tecidual, principalmente no grupo imunossuprimido, que apresentou expansão linfoide com área blástica evidente.

Todos os animais tratados com  $\alpha$ -Galcer apresentaram predomínio de granulócitos e células gigantes multinucleadas, com aparentes perfis de resolução do processo infeccioso, diferente dos animais infectados e tratados com  $\alpha$ -Galcer e Cy, que manifestaram pequenos aglomerados com células polimorfonucleares, característica de processo inflamatório agudo. Torna-se distinto devido a essa subpopulação celular ser predominante em processos infecciosos de até 3 dias, diferentemente desses animais, com necropsias realizadas 7 dias após a injúria. Em suma, o tratamento com  $\alpha$ -Galcer potencializou a resistência do hospedeiro à infecção, enquanto que o tratamento com  $\alpha$ -Galcer e Cy desencadeou na resposta aguda tardia do processo infeccioso, sendo possível observar presença de esporos no baço do hospedeiro com 7 dias de infecção.

Os dados sugerem a participação das células iNKT contra a microsporidiose, reforçando o papel fundamental das células do sistema imune inato na resistência à *Encephalitozoonose*. Da mesma forma, Kawakami *et al.* [35] demonstraram que o tratamento com  $\alpha$ -Galcer de camundongos infectados com *Cryptococcus neoformans* resultou na diminuição da carga fúngica nos pulmões e no baço, promovendo

respostas protetoras Th1. Em decorrência disso, a eliminação do patógeno foi atrasada em camundongos deficientes em células iNKT. O acúmulo de células iNKT nos pulmões dos camundongos infectados por *C. neoformans* ocorreu de maneira dependente da quimiocina MCP-1.

Há evidências de que as células NKT, quando estimuladas por  $\alpha$ -Galcer induzem à proliferação de células NK [40], tanto *in vitro* [38] quanto *in vivo* [39] e aumentam a citotoxicidade dessas células contra tumores. Células iNKT também têm atividade antitumoral com citotoxicidade dependente da ativação via CD1d [41] e podem regular a ativação de células T e B [42, 43]. Embora não estejam totalmente elucidados os mecanismos pelos quais as células NKT estimulam as células NK e linfócitos T CD8<sup>+</sup> na resposta antitumoral, sabe-se que as células NKT liberam citocinas, como o IFN- $\gamma$ , propiciando o aumento dessas populações celulares. Não obstante, quando combinadas com quimioterápicos, como Cy, por exemplo, células NKT podem aumentar a sobrevivência de camundongos portadores de câncer de mama metastático [44].

Neste trabalho, os animais que receberam a administração de  $\alpha$ -Galcer, expressaram níveis altos de IFN- $\gamma$ , indicando a ativação de células iNKT e o controle da infecção, e quando estimuladas produzem grandes quantidades desta citocina [19]. Foram detectados nos animais infectados e tratados com Cy e  $\alpha$ -Galcer, concentrações elevadas das citocinas pro-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF e MCP-1, indicando resposta imune tardia promovida possivelmente por linfócitos T. Portanto, o tratamento com  $\alpha$ -Galcer promoveu o estímulo às células iNKT, que participaram da resposta inata e recuperaram a resposta adaptativa de perfil Th-1, mesmo após a imunossupressão ocasionada por Cy. Após 7 dias de infecção, houve produção tardia de IFN- $\gamma$  e MCP-1 nesses animais, possivelmente produzidas por outros tipos de células, como linfócitos TC8<sup>+</sup> ou células NK, estimuladas provavelmente no início do processo infeccioso, por células iNKT. Afinal,  $\alpha$ -Galcer conseqüentemente promove a proliferação desse grupo de células e as células NKT produzem IFN- $\gamma$  até aproximadamente 24 horas após infecção.

Estudos com ambos camundongos CD1d<sup>-/-</sup> e J $\alpha$ 281<sup>-/-</sup> infectados com *Mtb* revelaram que a ausência de células T restritas a CD1d não altera o resultado da infecção por tuberculose. No entanto, o tratamento de camundongos com  $\alpha$ -Galcer,

que ativa especificamente células iNKT, prolonga significativamente a sobrevivência de camundongos infectados [34]. Inclusive, uma única dose de  $\alpha$ -Galcer administrada no dia seguinte à infecção prolonga a sobrevivência dos camundongos [25], fato observado no presente trabalho, um indicativo remoto de sua administração. Mesmo que as células iNKT não sejam ativadas de forma otimizada na infecção natural por *E. cuniculi*, podem apresentar, a longo prazo, resultados eficazes para o sistema imune, quando ativadas farmacologicamente.

Estudos com *Encephalitozoon intestinalis* mostraram que camundongos sem o gene de IFN- $\gamma$  são incapazes de controlar a infecção [36]. Com base em observações *in vitro*, foi sugerido que o IFN- $\gamma$  também desempenha um papel importante na imunidade protetora contra a infecção por *E. cuniculi* [8,10]. Camundongos infectados com *E. cuniculi* e tratados com anticorpos contra IFN- $\gamma$  ou IL-12 apresentaram aumento de mortalidade. A utilização de camundongos *knockout* para genes de citocinas Th1 confirmam a importância de IFN- $\gamma$  ou IL-12 na resposta imune contra *E. cuniculi*.

Em conclusão, os resultados indicam que as células NKT, restritas a CD1d, são importantes para a imunidade antifúngica, especialmente as células NKT do tipo invariante, modulando nos experimentos *in vitro*, resposta supressora na proliferação dos esporos internalizados por macrófagos derivados de medula, decorrente da capacidade microbicida e perfil M1 dessas células. Em conjunto, a resposta celular por iNKT, montada contra *E. cuniculi* *in vivo*, pode ser exacerbada com uso de  $\alpha$ -Galcer.

## 5. Referências

1. STENTIFORD GD, BECNEL JJ, WEISS LM, KEELING PJ, DIDIER ES, WILLIAMS BA, BJORNSON S, KENT ML, FREEMAN MA, BROWN MJ, TROEMEL ER, ROESEL K, SOKOLOVA Y, SNOWDEN KF, SOLTER LF. Microsporidia - Emergent Pathogens in the Global Food Chain. **Trends Parasitol.** 32(4):336–348, 2016.

2. CALI A, WEISS LM, TAKVORIAN PM. A review of the development of two types of human skeletal muscle infections from microsporidia associated with pathology in invertebrates and cold-blooded vertebrates. **Folia Parasitol.**; 52(1-2): 51–61, 2005.
3. FAYER R, SANTIN-DURAN M. **Structure of microsporidia.** In: Weiss LM, Becnel JJ. (Eds) *Microsporidia – Pathogens of opportunity.* Wiley Blackwell: Oxford. 2014. pp.1-70.
4. ANANE S, ATTOUCHI H. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. **Gastroenterol Clin Biol.** 34:450-464, 2010.
5. DIDIER ES. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in human and animals. **Acta Trop.** 94: 61-76, 2005.
6. MATHEWS A, HOTARD A, HALE-DONZE H. Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. **Microbes and Infect.** 11:905-911, 2009.
7. FISCHER J, WEST J, AGOCHUKWU N, SUIRE C, HALE-DONZE H. Induction of host chemotactic response by *Encephalitozoon* spp. **Infect and Immun.** 75:1619–1625, 2007.
8. DIDIER ES. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum Microspora) replication in murine peritoneal macrophages. **Parasite Immunol.** 17:405–412, 1995.
9. DIDIER ES, BOWERS LC, MARTIN AD, KURODA MJ, KHAN IA, DIDIER PJ. Reactive nitrogen and oxygen species, and iron sequestration contribute to

macrophage-mediated control of *Encephalitozoon cuniculi* (Phylum Microsporidia) infection *in vitro* and *in vivo*. **Microb Infect.** 12: 1244-1251, 2010.

10. BRAUNFUCHSOVA P, KOPECKY J, DITRICH O, KOUDELA B. Cytokine response to infection with the microsporidian, *Encephalitozoon cuniculi*. **Folia Parasitol.** 46:91–95, 1999.

11. PEREIRA A, ALVARES-SARAIVA AM, KONNO FTC, SPADACCI-MORENA DD, PEREZ EC, MARIANO M, LALLO MA. 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): 1-22, 2019.

12. KHAN IA, MORETTO M. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. **Infect Immun.** 67 (4): 1887-1893, 1999.

13. JEKLOVA E, LEVA L, MATIASOVIC J, ONDRACKOVA P, KUMMER V, FALDYNA M. Characterization of humoral and cell-mediated immunity in rabbits orally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. **Vet Res.** 51:79, 2020.

14. MILLS CD. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. **Cri. Rev. Immunol.** 32: 463–488, 2012.

15. FERRICK DA, SCHRENZEL MD, MULVANIA T, HSIEH B, FERLIN WG, LEPPER H. Differential production of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by  $\gamma\delta$  T cells *in vivo*. **Nature.** 373: 255, 1995.



16. MORETTO M, DURELL B, SCHWARTZMAN JD, KHAN IA.  $\gamma\delta$ T Cell-deficient mice have a down-regulated CD8<sup>+</sup> T cell immune response against *Encephalitozoon cuniculi* infection. **J. Immunol.** 166: 7389-7397, 2001.
17. HUNG JT, HUANG JR, YU AL. Tailored design of NKT-stimulatory glycolipids for polarization of immune responses. **J Biom Science.** 24:22, 2017.
18. MICHEL ML, KELLER AC, PAGET C, FUJIO M, TROTTEIN F, SAVAGE PB, WONG CH, SCHNEIDER E, DY M, LEITE-DE-MORAES MC. Identification of an IL-17-producing NK1.1<sup>neg</sup> iNKT cell population involved in airway neutrofilia. **JEM.** 204 (5): 995-1001, 2007.
19. BRIGL M, BRY L, KENT SC, GUMPERZ JE, BRENNER MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. **Nat. Immunol.** 4, 1230–1237, 2003.
20. SANTOS-DETILIO, B.A.N. **Caracterização das células T Natural Killer (NKT) de células mononucleares de sangue periférico em indivíduos saudáveis de diferentes continentes.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 95p., 2012.
21. GODFREY DI, MACDONALD HR, KRONENBERG M, SMYTH MJ, VAN KAER L. NKT cells: what's in a name? **Nat Rev Immunol.** 4:231– 237, 2004.
22. KAWAKAMI K, KINJO Y, UEZU K, YARA S, MIYAGI K, KOGUCHI Y, NAYAKAMA T, TANIGUCHI M, SAITO A. Monocyte chemoattractant protein-1- dependent increase of V  $\alpha$ 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in Cryptococcal infection. **J Immunol.** 167(11):6525-6532, 2001.

23. GREEN LC, DIDIER PJ, DIDIER ES. Fractionation of Sporogonial Stages of the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* by Percoll® Gradients. **Eukaryotic Microbiol.** 46 (4): 434-438, 2007.
24. LALLO MA, HIRSCHFELD MPM. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. **Expl Parasitol.** 131:339 – 343, 2012.
25. SADA-OVALLE I, CHIBA A, GONZALES A, BRENNER MB, BEHAR SM. Innate Invariant NKT Cells Recognize *Mycobacterium tuberculosis*–Infected Macrophages, Produce Interferon- $\gamma$ , and Kill Intracellular Bacteria. **Plos Pathogens.** 12 (4): 1-9, 2008.
26. BROSSAY L, CHIODA M, BURDIN N, KOESUKA Y, CASORATI G, DELLABONA P, KRONENBERG M. CD1d-mediated Recognition of an  $\alpha$ -Galactosylceramide by Natural Killer T Cells is highly conserved through mammalian evolution. **J Exp Med.** 188: 1521-1528, 1998.
27. GODFREY DI, KRONENBERG M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. **J Clin Invest.** 114 (10): 1379-88, 2004.
28. BRIGL M, TATITURI RV, WATTS GF, BHOWRUTH V, LEADBETTER EA, BARTON N, COHEN NR, HSU FF, BESRA GS, BRENNER MB. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. **J Exp Med.** 208:1163–1177, 2011.
29. QIN Y, OH S, LIM S, SHIN JH, YOON MS, PARK S. Invariant NKT cells facilitate cytotoxic T-cell activation via direct recognition of CD1d on T cells. **Exp Mol Med.** 51:126, 2019.

30. TORINA A, GUGGINO G, LA MANNA MP, SIRECI G. The Janus Face of NKT Cell function in autoimmunity and infectious diseases. **Int J Mol Sci.** 440 (19): 1-10, 2019.
31. MANENTE FA, QUINELLO C, FERREIRA LS, ANDRADE CR, JELLMAYER JA, PORTUONDO DL, BATISTA-DUHARTE A, CARLOS IZ. Experimental sporotrichosis in a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model. **Med Mycol.** 56: 711-722, 2018.
32. MOURA MLC, ALVARES-SARAIVA AM, PEREZ EC, XAVIER JG, SPADACCI-MORENA DD, MOYSÉS CRS, DELL'ARMELENA ROCHA PR, LALLO MA. Cyclophosphamide treatment mimics sub-lethal infections with *Encephalitozoon intestinalis* in immunocompromised individuals. **Front Microbiol.** 2205 (10): 1-13, 2019.
33. ALMEIDA VL, LEITÃO A, REINA LDCB, MONTANARI CA, DONNICI CL. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova.** 28 (1):118-29, 2005.
34. CHACKERIAN A, ALT J, PERERA V, BEHAR SM. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. **Infect Immun.** 70: 6302-6309, 2002.
35. KAWAKAMI K, KINJO Y, YARA S, KOGUCHI Y, UEZU K, NAKAYAMA T, TANIGUCHI M, SAITO A. Activation of V $\alpha$ 14(+) natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun.** 69: 213–220, 2001.
36. ACHBAROU A, OMBROUCK C, GNERAGBE T, CHARLOTTE F, RÉNIA L, DESPORTES-LIVAGE I, MAZIER D. Experimental model for human intestinal

microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. **Parasitol Immunol.** 18: 387-392, 1996.

37. JARKASS HTE, REINKE AW. The ins and outs of host-microsporidia interactions during invasion, proliferation and exit. **Cell Microbiol.** 22 (11): 1-12, 2020.

38. ISHIHARA S, NIEDA M, KITAYAMA J, OSADA T, YABE T, KIKUCHI A, KOEZUKA Y, PORCELLI SA, TADOKORO K, NAGAWA H, JUJI T.  $\alpha$ -Glycosylceramides enhance the antitumor cytotoxicity of hepatic lymphocytes obtained from cancer patients by activating CD3-CD56+ NK cells in vitro. **J Immunol.** 165 (3): 1659-1664, 2000.

39. EBERL G, MACDONALD HR. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. **Eur J Immunol.** 30 (4): 985-92, 2000.

40. CARNAUD C, LEE D, DONNARS O, PARK SH, BEAVIS A, KOEZUKA Y, BENDELAC A. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. **J. Immunol.** 163: 4647, 1999.

41. METELITSA LS, NAIDENKO OV, KANT A, WU H, LOZA MJ, PERUSSIA B, KRONENBERG M, SEEGER RC. Human nkt cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. **J Immunol.** 167 (6): 3114-3122, 2001.

42. NISHIMURA T, KITAMURA H, IWAKABE K, YAHATA T, OHTA A, SATO M, TAKEDA K, OKUMURA K, KAER LV, KAWANO T, TANIGUCHI M, NAKUI M, SEKIMOTO M, KODA T. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **Int Immunol.** 12:987-94, 2000.

43. GALLI G, PITTONI P, TONTI E, MALZONE C, UEMATSU Y, TORTOLI M, MAIONE D, VOLPINI G, FINCO O, NUTI S, TAVARINI S, DELLABONA P, RAPPUOLI R, CASORATI G, ABRIGNANI S. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. **Proc Natl Acad Sci.** 104 (10): 3984-3989, 2007.

44. GEBREMESKEL S, LOBERT L, TANNER K, WALKER B, OLIPHANT T, CLARKE L, DELLAIRE G, JOHNSTON B. Natural Killer T-cell immunotherapy in combination with chemotherapy-induced immunogenic cell death targets metastatic breast cancer. **Cancer Immunol Res.** 5 (12): 1086–1097, 2017.