

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**

**ELUANE DE LUCAS DA SILVA MARTINS**

**MODELO EXPERIMENTAL DE PNEUMONIA INTERSTICIAL INDUZIDA  
POR *Encephalitozoon cuniculi* VIA INTRANASAL E A RESPOSTA IMUNE  
PULMONAR ASSOCIADA**

**SÃO PAULO**

**2025**

**ELUANE DE LUCAS DA SILVA MARTINS**

**MODELO EXPERIMENTAL DE PNEUMONIA INTERSTICIAL INDUZIDA  
POR *Encephalitozoon cuniculi* VIA INTRANASAL E A RESPOSTA IMUNE  
PULMONAR ASSOCIADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental. Orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo.

**SÃO PAULO**

**2025**

Martins, Eluane de Lucas da Silva.

Modelo experimental de pneumonia intersticial induzida por *Encephalitozoon cuniculi* via intranasal e a resposta imune pulmonar associada / Eluane de Lucas da Silva Martins. - 2025.  
49 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2025.

Área de concentração: Patologia integrada e translacional.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Anete Lallo.

1. Encephalitozoonose. 2. Infecções oportunistas.  
3. Pneumonia. 4. Via intranasal. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Maria Anete Lallo, pela inspiração, pela orientação, por todo ensinamento, apoio e paciência durante o processo.

Sou grata à comissão avaliadora pela análise e contribuições para o aprimoramento do meu trabalho.

Agradeço as instituições financeiras CAPES/ PROSUP pelo financiamento e recursos para realização desta pesquisa.

Agradeço a toda equipe do departamento de Pesquisa, professores, técnicos, a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o meu desenvolvimento, e o desenvolvimento da pesquisa.

Aos novos amigos que tive o prazer de encontrar nessa jornada e aos antigos que se mantiveram ao meu lado durante todo o caminho.

Meu eterno agradecimento aos meus pais (Helena e Lucas) pelo apoio emocional, compreensão e incentivo.

Agradeço a todos que me apoiaram nos meus momentos difíceis enfrentados!

**Tese apresentada no formato de paper a ser enviada  
para o periódico *Experimental Parasitology***

**Intranasal *Encephalitozoon cuniculi*-Induced  
Experimental Model of Interstitial Pneumonia and the  
Associated Pulmonary Immune Response**

Eluane de Luca da Silva Martins<sup>1</sup>, Anuska M. Alvares-Saraiva<sup>1</sup>, José  
Guilherme Xavier<sup>1</sup>, Ronalda A. da Silva<sup>2</sup>, Elizabeth C. Pérez<sup>1</sup>, Mariela Abigail  
Almeida<sup>3</sup>, Lorena Guasconi<sup>3</sup>, Laura Silvina Chiapello<sup>3</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>CETESB-Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

<sup>3</sup>Laboratorio de Parasitología y Micología Experimental, Departamento de  
Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de  
Córdoba (UNC).

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI).  
CONICET.

## RESUMO

Microsporídios são fungos intracelulares obrigatórios, oportunistas, que infectam muitos hospedeiros vertebrados e invertebrados, causando infecções disseminadas ou localizadas. A transmissão oro fecal predomina em vertebrados. Os esporos eliminados pelas fezes, urina ou secreções respiratórias contaminam a água e alimentos, sendo adquiridos frequentemente pela via digestiva, embora ocorram infecções experimentais pelas vias hematogena, intraperitoneal e orofaríngea. A pneumonia causada por *Encephalitozoon cuniculi* tem sido associada à disseminação hematogena embora a transmissão aerógena seja considerada, ela não foi experimentalmente demonstrada. O presente trabalho teve objetivo de avaliar a infecção por *E. cuniculi* pela via intranasal em camundongos imunocomprometidos ou não, assim como analisar o padrão de resposta imune pulmonar. Foram realizados 3 experimentos: no experimento A- camundongos C57BL/6 foram tratados ou não com ciclofosfamida (Cy) e inoculados com esporos de *E. cuniculi* pela via intranasal. Após 14 dias de infecção, foi realizada a coleta de sangue para análise das citocinas do plasma e do inflamassoma NRLP3 nos leucócitos, lavado broncoalveolar para análise citológica e a coleta dos pulmões para análise histopatológica, fenotipagem das células imunes por citometria e quantificação da carga fúngica. No experimento B, camundongos wild type, IL-17RA<sup>-/-</sup> e Rag-1<sup>-/-</sup> foram inoculados com esporos de *E. cuniculi* pela via intranasal. Após 14 dias de infecção, foi realizada a coleta de soro para análise das citocinas, coleta dos pulmões para análise histopatológica e fenotipagem das células imunes por citometria. No experimento C- culturas de células pulmonares da linhagem H292 foram desafiadas com diferentes concentrações de esporos de *E. cuniculi* por célula por período de 24 e 72 horas e todos os esporos produzidos foram contabilizados. A inoculação de esporos de *E. cuniculi* pela via intranasal promoveu pneumonia intersticial em todos os animais infectados. Os animais tratados com Cy e infectados tiveram quadro de pneumonia intersticial mais intenso com maior carga fúngica, menores percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> e aumento de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-2. Os animais IL-17RA<sup>-/-</sup> e Rag-1<sup>-/-</sup> infectados apresentaram pneumonia clínica e histológica mais exacerbada, menor

percentual de linfócitos T CD8+ ou menor percentual de ativação funcional dos mesmos e associado ao baixo perfil de citocinas pró-inflamatórias. Houve redução de macrófagos alveolares M1 nos animais infectados, com exceção dos camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup>. As células H292 permitiram a proliferação dos esporos de *E. cuniculi*. Portanto concluímos que a inoculação de esporos de *E. cuniculi* pela via intranasal determinou pneumonia intersticial. Os camundongos imunocomprometidos, em especial IL-17RA<sup>-/-</sup> e Rag-1<sup>-/-</sup>, tiveram pneumonia mais grave que os animais controles, sendo a menor resistência ao patógeno associada ao menor resposta de linfócitos T CD8.

**Palavras-chave:** Encephalitozoonose. Infecções oportunistas. Pneumonia. Via intranasal

## ABSTRACT

Microsporidia are obligate intracellular opportunistic fungi that infect a wide range of vertebrate and invertebrate hosts, causing either localized or disseminated infections. In vertebrates, fecal-oral transmission is predominant. Spores excreted in feces, urine, or respiratory secretions contaminate water and food and are frequently acquired via the digestive tract, although experimental infections have been established through hematogenous, intraperitoneal, and oropharyngeal routes. Pneumonia caused by *Encephalitozoon cuniculi* has been associated with hematogenous dissemination. Although airborne transmission is considered, it has not yet been experimentally demonstrated. The aim of this study was to evaluate *E. cuniculi* infection via the intranasal route in immunocompromised and immunocompetent mice and to analyze the associated pulmonary immune response profile. Three experiments were conducted: In Experiment A, C57BL/6 mice were treated or not with cyclophosphamide (Cy) and inoculated intranasally with *E. cuniculi* spores. Fourteen days post-infection, blood was collected to assess plasma cytokines and NLRP3 inflammasome expression in leukocytes, bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was obtained for cytological analysis, and lung tissue was collected for histopathological examination, immune cell phenotyping by flow cytometry, and fungal load quantification. In Experiment B, wild-type, IL-17RA<sup>-/-</sup>, and Rag1<sup>-/-</sup> mice were inoculated intranasally with *E. cuniculi* spores. Fourteen days post-infection, serum was collected for cytokine analysis, and lung tissues were harvested for histopathological evaluation and immune cell phenotyping. In Experiment C, cultures of the human pulmonary epithelial cell line H292 were challenged with varying concentrations of *E. cuniculi* spores per cell for 24 and 72 hours. All spores produced were counted. Intranasal inoculation with *E. cuniculi* spores induced interstitial pneumonia in all infected animals. Cy-treated and infected mice developed more severe interstitial pneumonia, with higher fungal burden, reduced percentages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, and increased levels of pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-2. Infected IL-17RA<sup>-/-</sup> and Rag1<sup>-/-</sup> mice showed more severe clinical and histological pneumonia, either with reduced percentages of CD8<sup>+</sup> T cells or reduced functional activation of these

cells, along with a low pro-inflammatory cytokine profile. A reduction in M1 alveolar macrophages was observed in all infected mice, except IL-17RA<sup>-/-</sup> mice. H292 cells supported the proliferation of *E. cuniculi* spores. The results presented here demonstrate that intranasal inoculation of *E. cuniculi* spores leads to the development of interstitial pneumonia. Immunosuppressed mice—whether treated with cyclophosphamide (Cy) or genetically modified as IL-17RA<sup>-/-</sup> and Rag1<sup>-/-</sup>—developed more severe pneumonia compared to non-immunosuppressed or wild-type animals. The reduced resistance to the pathogen was particularly associated with a diminished CD8<sup>+</sup> T cell response and a predominance of M2-polarized alveolar macrophages.

**Key words:** Encephalitozoonosis. Intranasal route. Opportunistic infections. Pneumonia.

## 1. Introdução

Os microsporídios são considerados um clado irmão dos fungos e estão relacionados aos Cryptomycota. São patógenos intracelulares oportunistas e as microsporidioses têm sido relatadas em praticamente todos os invertebrados e vertebrados (Han, Weiss, 2017, Seatamanoch et al., 2022). Cerca de 17 espécies de microsporídios de dez gêneros foram identificadas como causadoras de infecções em humanos e em animais domésticos e silvestres, sendo *Encephalitozoon* spp. e *Enterocytozoon bieneusi* os causadores da maioria das infecções (Han et al., 2021). As manifestações clínicas das microsporidioses dependem da espécie infectante e do estado imunológico do hospedeiro, mas podem variar de inflamação autolimitada em indivíduos imunocompetentes a infecções fatais (Wang et al., 2018; Kechaou et al., 2025).

Tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa desempenham papéis importantes na proteção do hospedeiro contra infecção por microsporídios (Han, Weiss, 2017). Os receptores Toll-like (TLRs) de células imunes inatas podem reconhecer *E. cuniculi* (Lawlor et al., 2010) e ativar os macrófagos para produzir citocinas inflamatórias, incluindo TNF $\alpha$  e IL-8 (Lawlor et al., 2010). As células dendríticas (DCs) podem reconhecer *E. cuniculi* por TLR4 e expressar IL-12 e IFN- $\gamma$  para preparar a resposta ideal de células T CD8+ (Moretto, Khan, 2022). De forma clara tem sido demonstrado que as células T, especialmente células T CD8+, desempenham papéis cruciais na eliminação e prevenção da disseminação de microsporídios (Tang et al., 2025). As células T CD8+ exibem habilidades polifuncionais, incluindo respostas citotóxicas e secreção de citocinas, durante a infecção por microsporídios (Chávez-Galán et al., 2009, Moretto et al., 2015, Tang et al., 2025). As células T CD4+ podem produzir IFN- $\gamma$  e IL-21 durante a infecção por microsporídios, porém sua participação não é fundamental (Moretto, Khan, 2022).

O ciclo de vida dos microsporídios é caracterizado pela formação de esporos resistentes no ambiente e pela presença de uma estrutura única chamada tubo polar, utilizada para penetrar nas células hospedeiras. A transmissão dos microsporídios ocorre predominantemente pela via oro-fecal. Após a ingestão dos esporos, o tubo polar é extrusado e libera o material

infectante no interior da célula hospedeira, ponto de partida para a multiplicação do patógeno nos enterócitos (Han, Weiss, 2017). Novos esporos formados são então liberados e infectam outras células adjacentes ou podem atingir outros órgãos com a disseminação do patógeno, especialmente comum na encefalitozoonose (Wadi, Reinke, 2020).

As infecções experimentais por microsporídios em camundongos são realizadas pelas vias oral, intravenosa, intratraqueal ou intraperitoneal (Han, Weiss, 2017; Kotkova et al., 2013). Embora sejam observados casos de pneumonia por *E. cuniculi* em pacientes imunocomprometidos, em especial receptores de transplantes, a possibilidade dessa infecção ser adquirida pela via aerógena ainda é pouco compreendida. É possível que nas infecções disseminadas, os microsporídios atinjam os pulmões pela via hematógena, porém a transmissão aerógena deve ser considerada quando a pneumonia microsporidiana não é acompanhada de infecção disseminada.

Santos et al., 2022 demonstraram a ocorrência de pneumonia mista, intersticial e granulomatosa, em camundongos C57BL tratados ou não com ciclofosfamida (Cy) e infectados com *E. cuniculi* pela via orofaríngea, estabelecendo-se como modelo de pneumonia por aspiração. Os animais infectados e não-tratados com Cy tinham maior carga fúngica e infiltrado inflamatório nos pulmões, caracterizando pneumonia por *Encephalitozoon* mais pronunciada que a observada nos animais imunossuprimidos. De forma intrigante os animais imunossuprimidos mostraram maior resistência à infecção pelo patógeno, sendo essa atribuída à predominância da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> encontrada nos pulmões. Por outro lado, a pneumonia intersticial grave com alta carga fúngica foi encontrada em animais imunossuprimidos com Cy e inoculados por via intravenosa com *E. cuniculi* (Figueiredo Moreira et al., 2023). Assim, independentemente da via de infecção, foi clara a atuação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no controle da multiplicação dos microsporídios nos tecidos pulmonares.

O presente trabalho teve objetivo de avaliar o estabelecimento da infecção por *E. cuniculi* inoculados pela via intranasal em camundongos imunodeficientes ou não, assim como analisar o padrão de resposta imune pulmonar.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

### 2.1. Delineamento experimental

Com a finalidade de avaliar a suscetibilidade de camundongos à infecção experimental pelo *E. cuniculi* pela via intranasal, foram realizados 3 experimentos: Experimento *In Vivo* A, Experimento *In Vivo* B e Experimento *In Vitro*, os quais serão descritos a seguir.

**Experimento *In Vivo* A:** camundongos C57BL foram distribuídos em 5 grupos e submetidos ao seguinte protocolo – CTL (n=5) – camundongos não tratado e não-infectado; Inf (n=5) - camundongos infectado pela via intranasal com *E. cuniculi*; Cy (n=5) - camundongos tratados com ciclofosfamida (Cy) e não-infectado; Cy-Inf (n=5) - camundongos tratados com Cy e infectado pela via intranasal com *E. cuniculi*; Sham (n=5) – inoculado pela via intranasal com solução de NaCl 0,9% esterilizada. Após 14 dias de infecção, os animais foram anestesiados profundamente, então foram submetidos à punção cardíaca com coleta de sangue para análise das citocinas do plasma. Após a abertura do tórax e abdome, foi feita a perfusão dos vasos da pequena circulação com 10 mL de PBS. A seguir, realizou-se o lavado broncoalveolar (BAL) para análise citológica e a coleta dos pulmões para análise histopatológica, fenotipagem das células imunes por citometria e quantificação da carga fúngica. O fígado e os intestinos foram coletados para exame histopatológico (Figura 1A).

**Experimento *In Vivo* B:** camundongos *knockout* IL-17RA (deficiente no receptor da IL-17A) e Rag-1 (deficiente em células T e B funcionais) e camundongos C57BL/6 (WT) foram distribuídos em 6 grupos e submetidos ao seguinte protocolo – WT - (n=3) – camundongos WT não tratado e não-infectado; WT-Inf (n=4) – camundongos WT infectado pela via intranasal com *E. cuniculi*; IL-17KO (n=3) - camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> não-infectado; IL-17KO-Inf (n=3) - camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi*; Rag-1 (n=3) - camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> não-infectado; Rag-1-Inf (n=3) - camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi*. Após 14 dias de infecção, os animais foram anestesiados profundamente, então foram submetidos à punção cardíaca com coleta de sangue e separação do soro para mensuração das citocinas. Foi realizada a perfusão dos vasos da pequena circulação com 10 mL

de PBS e os pulmões foram coletados para análise histopatológica e fenotipagem das células imunes por citometria. A seguir, fígado e intestinos foram coletados, fixados em formol a 10% para processamento histopatológico (Figura 1B).

**Experimento *In Vitro*:** Culturas de células pulmonares da linhagem H292 foram desafiadas com esporos de *E. cuniculi* nas concentrações de 1 esporo por célula, 4 ou 6 esporos por célula por período de 24 e 72 horas. Após a incubação, as células foram desprendidas e todos os esporos produzidos foram contabilizados em câmara de Neubauer (Fig. 1C).

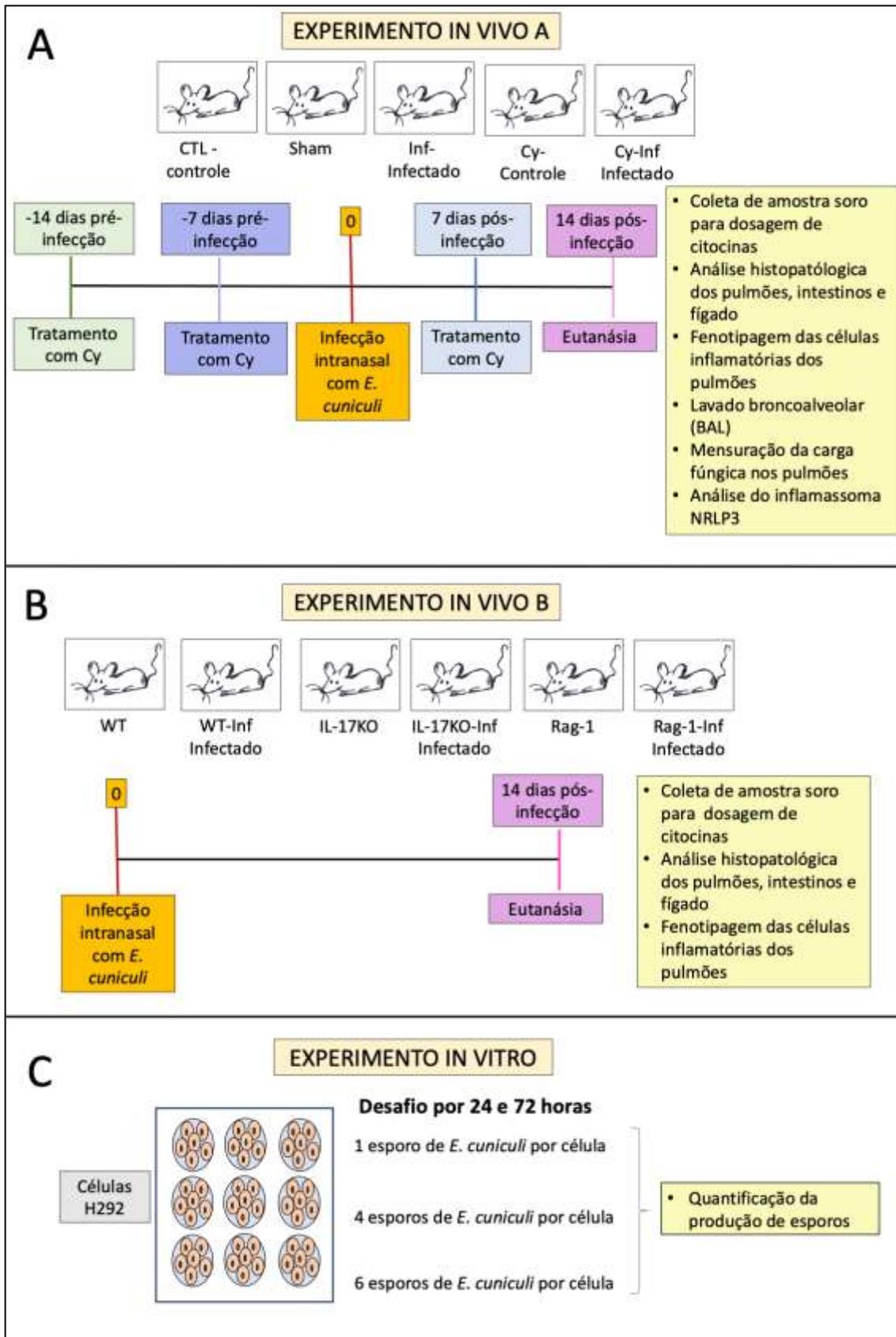


Figura 1. Delineamento experimental

A) **Experimento *In Vivo* A:** camundongos C57BL/6 foram distribuídos em 5 grupos – CTL (n=5) – camundongos não infectados e não inoculados pela via intranasal; Sham (n=5) – inoculado pela via intranasal com solução de NaCl 0,9% esterilizada; Inf (n=5) – inoculado pela via intranasal com *E. cuniculi*; Cy (n=5) – tratados com ciclofosfamida (Cy) e não-infectado; Cy-Inf (n=5) – tratados com Cy e inoculado pela via intranasal com *E. cuniculi*. Após 14 dias foram submetidos à dosagem de citocinas no plasma, análise histopatológica do pulmão, fígado e intestinos, fenotipagem das células imunes pulmonares, mensuração da carga fúngica e do inflamassoma NRLP3.

B) **Experimento *In Vivo* B:** camundongos *knockout* IL-17RA e Rag-1 e camundongos C57BL/6 wild type (WT) constituíram 6 grupos – WT - (n=3) – camundongos WT não tratado e não-infectado; WT-Inf (n=4) – camundongos WT infectado pela via intranasal com *E. cuniculi*; IL-17KO (n=3) - camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> não-infectado; IL-17KO-Inf (n=3) - camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi*; Rag-1 (n=3) - camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> não-infectado; Rag-1-Inf (n=3) - camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi*. Após 14 dias foram submetidos à dosagem de citocinas no soro, análise histopatológica do pulmão, fígado e intestinos e fenotipagem das células imunes pulmonares.

C) **Experimento *in vitro*.** Células H292 foram desafiadas com esporos de *E. cuniculi* nas concentrações 1:1, 4:1 e 6:1 esporos por célula. Após 24 e 72 horas os esporos produzidos foram contabilizados.

## 2.2. Obtenção de esporos de *E. cuniculi*

Células renais de coelho (RK-13, ATCC CCL 34) foram utilizadas para a proliferação de esporos de *Encephalitozoon cuniculi*. As células foram cultivadas em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina (meio denominado R10) e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 7 dias, os sobrenadantes das culturas foram coletados e centrifugados por 30 minutos a 500 g, após desprezar o sobrenadante, os sedimentos contendo esporos foram armazenados sob refrigeração. Os esporos obtidos foram lavados em solução tampão fosfato-

salina (PBS) e contabilizados em câmara de Neubauer. Para o experimento *in vitro*, os esporos foram purificados em gradiente de Percoll e lavados com PBS.

### **2.3. Cultura de *E. cuniculi* em células H292**

Células H292 derivadas de carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano foram utilizadas para demonstrar a proliferação de *E. cuniculi* em células pulmonares. As células H292 foram cultivadas em meio R10 e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Para análise da proliferação de *E. cuniculi* nas células H292, 2x10<sup>5</sup> células foram cultivadas em placas com 24 poços a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 12 horas. A seguir, as células H292 foram desafiadas com as concentrações 1:1, 4:1 e 6:1 esporos *E. cuniculi* por célula por 24 e 72 horas (Fig. 1A). Após os períodos de incubação, as células foram desprendidas da placa com *cell scraper* e vigorosamente homogeneizadas com auxílio de seringa e agulha 22g para rompimento das células e liberação dos esporos intracelulares. Os esporos foram contabilizados em câmara de Neubauer. O experimento foi realizado em triplicata. Um segundo experimento foi realizado em placas com lamínulas para a análise morfológica das culturas, após a coloração com Giemsa.

### **2.4. Comitê de ética**

Todos os procedimentos experimentais obedeceram à diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista, sob o número 9784060423. Os experimentos realizados com animais *knockout* IL-17RA e Rag-1, assim como C57BL/6 (WT) foram aprovados pelo Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) da Facultad de Ciencias Químicas da Universidad Nacional de Córdoba, sob o número CIUCAL-FCQ: RD-2024- 1349-E- UNC-DEC#FCQ.

## **2.5. Animais**

Foram utilizados camundongos C57-BL machos ou fêmeas, livres de patógenos específicos (SPF), com 8 a 12 semanas de idade, adquiridos do Biotério Central do Universidade Federal de São Paulo (CEDEME - Unifesp). Estes animais foram alojados em microisoladores durante todo o período experimental no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista, sob condições de temperatura (22 a 24°C) e umidade controladas (45 a 55%), com ciclo de claro e escuro (12/12 horas). Receberam ração peletizada e água esterilizada *ad libitum*. Os animais *knockout* IL-17RA, Rag-1 e C57BL/6 eram machos ou fêmeas com 8 a 12 semanas de idade e foram mantidos em microisoladores, com de temperatura variando de 22 a 24°C, 45 a 55% de umidade controladas, com ciclo de claro e escuro (12/12 horas), e receberam ração peletizada e água esterilizada *ad libitum*.

## **2.6. Inoculação dos camundongos**

Após a contenção física, os camundongos foram inoculados com 40 µL de PBS contendo  $1 \times 10^8$  esporos, divididos em 20 µL administrados em cada narina com a utilização de uma micropipeta. Com ação reflexiva autônoma de inspiração, o camundongo inalou a solução contendo esporos ou solução de cloreto de sódio a 0,9% (grupo Sham).

## **2.7. Tratamento com ciclofosfamida (Cy)**

O protocolo de tratamento adotado foi o estabelecido por Lallo e Hirschfeld (2012) com modificações para esta pesquisa. Os camundongos receberam uma dose semanal de 200 mg/kg de Cy por via intraperitoneal (Genuxal®, Asta Médica Oncologia, São Paulo, Brasil), uma vez por semana, iniciada duas semanas antes da inoculação do patógeno e mantida por todo o período experimental, no total foram 4 doses.

## **2.8. Necropsia e histopatológico**

Os animais do experimento A foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico por via intraperitoneal, utilizando-se mistura de quetamina (100 mg/Kg), xilazina (2,5 mg/Kg) e acepromazina (2,5 mg/Kg). Após a parada cardiorespiratória, foi realizada a coleta de sangue pela punção intracardíaca em tubo seco para a separação do plasma, que foi armazenado a -80 °C. Em seguida, o tórax foi aberto e a traquéia obliterada com fio de sutura para se proceder o lavado broncoalveolar (BAL), sendo realizado com a introdução de 1 mL de PBS seguida da aspiração, esse lavado foi centrifugado e o sedimento utilizado para confeccionar o esfregaço em lâmina. Antes da coleta dos pulmões, a artéria renal direita foi incisada e no ventrículo cardíaco direito foi infundido 10 mL de PBS para perfusão vascular. Em seguida, o pulmão total foi pesado e o lobo esquerdo também foi pesado separadamente e armazenado à -80 °C em RNA later para quantificação da carga fúngica. Os lobos pulmonares direitos foram divididos para citometria de fluxo e, uma parte foi fixada em formol tamponado a 10% por 72 horas, sendo processados rotineiramente para análise histopatológica.

No experimento B, o aprofundamento anestésico foi feito com isoflurano, sendo a coleta de sangue por punção cardíaca realizada após a parada respiratória. O sangue coletado em frasco seco ficou em repouso para separação do soro. O soro foi armazenado a -80 °C até a realização da quantificação de citocinas. A necropsia foi iniciada pela abertura do abdome e tórax, a seguir a artéria renal direita foi incisada e no ventrículo cardíaco direito foi infundido 10 mL de PBS para perfusão vascular. O pulmão foi coletado, os lobos direitos foram processados para citometria de fluxo e, o esquerdo fixado em formol tamponado a 10% por 72 horas, sendo processado rotineiramente para análise histopatológica. O fígado e intestinos também foram fixados e processados rotineiramente para análise histopatológica.

## **2.9. Análise citológica de macrófagos e linfócitos do BAL**

Os esfregaços do BAL dos camundongos do experimento A foram corados com Giemsa e observados em microscopia de luz com aumento de 40

vezes. Foram contadas 50 células nos esfregaços do grupo Cy-Inf, porém nos animais Inf, que apresentavam pouca celularidade, todas as células do BAL foram contabilizadas. Ao final, foram obtidas as médias de macrófagos e de linfócitos, sendo essas comparados entre os grupos Inf e Cy-Inf para graduação da gravidade da pneumonia.

## **2.10. Carga Fúngica dos animais infectados do experimento A**

A carga fúngica foi determinada pela PCR em tempo real (qPCR) a partir da quantificação do DNA genômico do fungo presente no tecido pulmonar. Após a eutanásia, os pulmões foram pesados e um lobo pulmonar constante - esquerdo, também pesado e armazenado em RNAlater a -20 °C por no máximo 30 dias. A extração foi feita com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante. As reações em cadeia da polimerase quantitativa (qPCRs) foram realizadas utilizando o QuantStudio™ 5 System Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os sistemas Syber Green (Promega Corporation®, EUA). A amplificação foi realizada em um volume total de 25 µL/reação contendo 12,5 µL do kit GoTaq® qPCR Master MixT® (Promega Corporation®, EUA) juntamente com 5 µL do DNA modelo e respectivos primers (20pmol). Os controles de qualidade incluíram amostras de DNA positivas obtidas de suspensões purificadas e controles não-modelo (NTC).

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

## **2.11. Fenotipagem dos componentes imunológicos do pulmão e do BAL**

Os lobos pulmonares destinados à citometria foram mecanicamente dissociados (BD Medimachine, Bruino, TO, ITALY) e as suspensões celulares resultantes filtradas em *cell strainer* de 70 µm e tratadas com tampão hemolítico. Os sedimentos obtidos por centrifugação foram usados para a fenotipagem das células do sistema imune por citometria de fluxo.

Para efetuar o bloqueio dos receptores Fc, as amostras foram incubadas por 20 minutos em banho de gelo com anticorpo anti-CD16/CD32, em solução PBS acrescido com 1% de albumina sérica bovina - PBS-BSA 1% (20 µL). No experimento A, as células foram lavadas para serem incubadas por 30 (trinta) minutos a 4°C com os seguintes anticorpos monoclonais: anti- CD19 de camundongo conjugado a *Allophycocyanin* – APC (Ebioscience), anti-CD45 de camundongo conjugado a *Phycoerithrin* - PE (Bio Albra), anti-CD4 de camundongo conjugado a *Peridinin Chlorophyll Protein Complex* - PerCP, anti-CD8 a *Fluorescein Isothiocyanate* - FITC, anti-F4/80 de camundongo conjugado – PE Cy7a (Ebioscience), anti- CD11b de camundongo conjugado – APC Cy7 (BD Biosciences), anti-SIGLEC-F de camundongo conjugado APC. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspendidas em 100 µL de PBS, centrifugadas a 4°C por 5 minutos com 500g, o sobrenadante foi descartado e as células fixadas em solução tamponada de paraformaldeído (PFA) 1% para leitura posterior. Para remover o PFA, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 5 minutos com 2000 rpm e ressuspendidas em PBS (200 µL) para realização da leitura em citometro de Fluxo BD Accuri™ C6 (Biosciences).

No experimento B, as células foram lavadas para serem incubadas por 30 (trinta) minutos a 4°C com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD45 de camundongo conjugado a APC Cy7 (BD Biosciences), anti-CD19 de camundongo conjugado a FITC (BD Biosciences), anti-SIGLEC-F de camundongo conjugado APC, anti-F4/80 de camundongo conjugado – PE Cy7a (Ebioscience), anti-Ly6G de camundongo conjugado – PE Cy7a (Ebioscience), anti-MHCII de camundongo conjugado a PE Texas Red, anti-streptavidin ef710 de camundongo conjugado a PERCP, anti-CD4 de camundongo conjugado a APC, anti-CD8 de camundongo conjugado a PE Cy5, anti-CD19 de camundongo conjugado a PE Cy7, anti-CD3 de camundongo conjugado – APC Cy7a (Ebioscience), anti-IL-17 de camundongo conjugado a PE, anti-IFN- α conjugada

a PE Dazzle e viability BV510. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS (200 µL) para realização da leitura em LSRT Fortessa™ High-Parameter Flow Cytometer (Biosciences). Todos os dados de citometria foram avaliados no software FlowJo V10.0 (BD Biosciences).

## 2.12. Quantificação das citocinas

As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram mensuradas no plasma (experimento A) ou no soro (experimento B) com o kit “CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit” (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA), de acordo com as normas técnicas determinadas pelo fabricante para detecção. Brevemente, 20 µL de cada amostra foram incubadas juntamente com as *beads* de captura, específicas para cada citocina, conjugadas a APC e com o anticorpo secundário conjugado a PE, por duas horas em temperatura ambiente protegidas por luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas com *wash buffer*, centrifugadas e ressuspensas no mesmo tampão para análise de 2 cores por citômetro de fluxo BD Accuri™C6 (BD Biosciences, Mountain View, CA). As análises foram realizadas usando o software de análise FCAP *Array software* versão 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

## 2.13. Extração de RNA total de leucócitos

Após o descongelamento dos leucócitos dos animais do experimento A, o RNA total foi isolado das amostras utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das amostras em 250 µL do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), seguido pela centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos novos devidamente identificados, em seguida, o RNA foi precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). Após a incubação por 10 minutos a temperatura ambiente as amostras foram novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria após sua ressuspensão em

20 µL de água DEPC, utilizando as razões OD 260/280 ( $\geq 1,8$ ) e OD 260/230 ( $\geq 1,0$ ) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience) e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.14. Síntese de DNA complementar (cDNA)**

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da reação de transcrição reversa de 2000 ng de RNA total na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 µL contendo 500 µM de dNTP, 25 µg/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U de inibidor de RNase, 10 µM de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. Em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$  com posterior inativação enzimática a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído para concentração final de 100 ng/µl e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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

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

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

Gene (ID)	Primers	5'-3' Sequence	Reaction conditions	Product size (bp)
Nr1p3 (11461)	Forward	ATT ACC CGC CCG AGA AAG G	95°C – 15 sec;	141
	Reverse	TCG CAG CAA AGA TCC ACA CAG	58°C – 30 sec, 72°C – 30 sec	
Asc1 (14433)	Forward	AGA CAT GGG CTT ACA GGA	95°C – 15 sec;	256
	Reverse	CTC CCT CAT CTT GTC TTG G	60°C – 30 sec, 72°C – 30 sec	
Caspase 1 (14433)	Forward	TGA AAG AGG TGA AAG AAT T	95°C – 15 sec;	386
	Reverse	TCT CCA AGA CAC ATT ATC T	59°C – 30 sec, 72°C – 30 sec	
IL-1 $\beta$ (16176)	Forward	GAC CTT GGA TGA GGA CA	95°C – 15 sec;	183
	Reverse	AGC TCA TAT GGG TCC GAC AG	60°C – 30 sec, 72°C – 30 sec	
Rnu6 (19862)	Forward	CTC GTC TCG GC AGC ACA	95°C – 15 sec;	94
	Reverse	AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT	60°C – 30 sec, 72°C – 30 sec	

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

## 2.17. Estatística

As comparações estatísticas foram pelo teste t e ou análise de variância ANOVA de uma via. Os valores utilizados como média  $\pm$  erro padrão, padrão com significância para valores menores que  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Graph Pad Prism.

## 3. Resultados

### 3.1. A infecção intranasal por *E. cuniculi* promoveu pneumonia intersticial

A inoculação de esporos de *E. cuniculi* pela via intranasal promoveu pneumonia intersticial (Fig. 2, Fig. 3) nos animais dos grupos infectados dos experimentos A e B (Inf, Cy-Inf, WT-Inf, IL-17KO-Inf e Rag-1-Inf), demonstrando

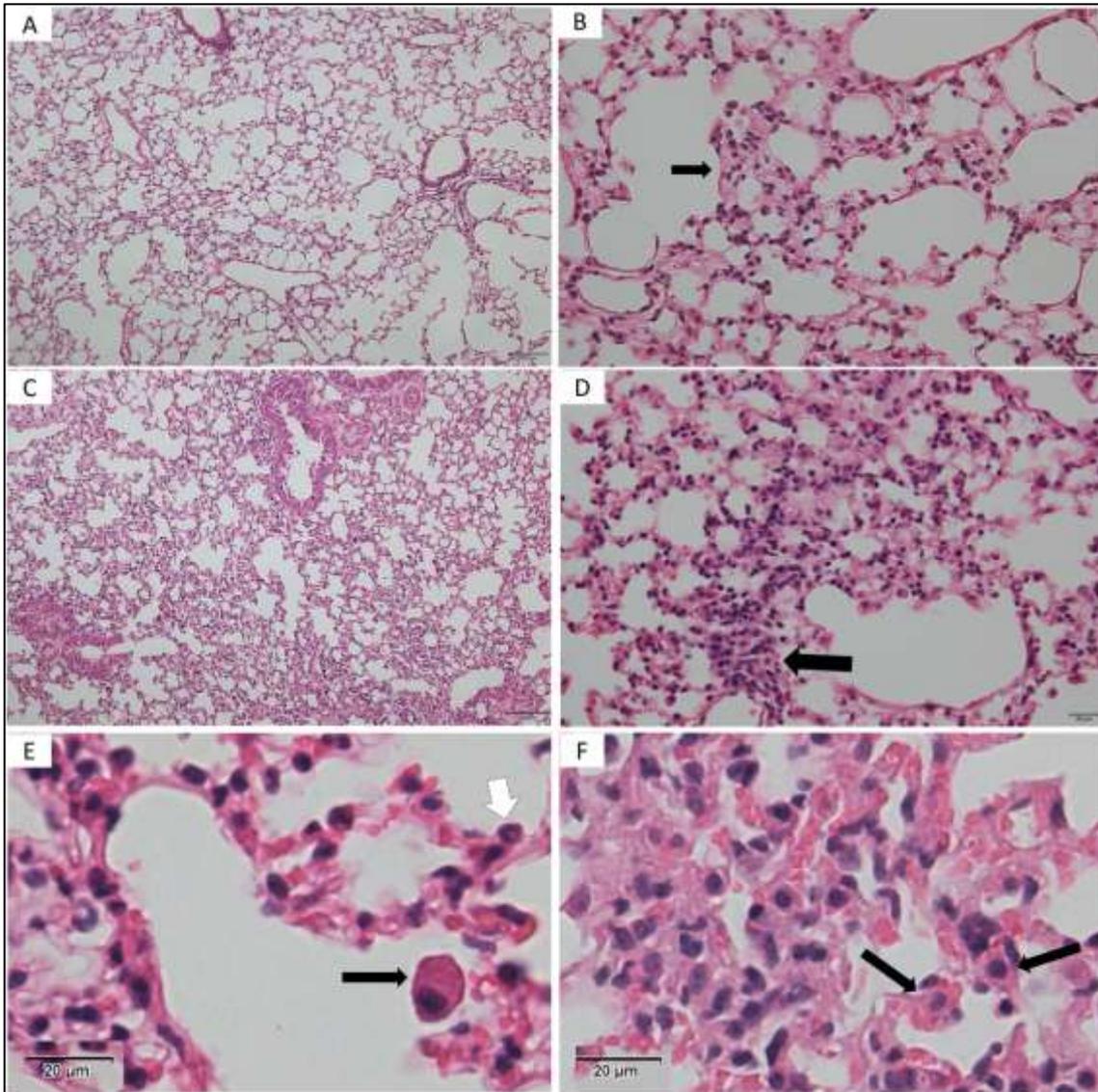
experimentalmente a transmissão aerógena. No experimento A, nenhum sinal clínico foi observado nos animais infectados. Os cortes histológicos dos pulmões dos camundongos Inf demonstraram preservação da compartimentalização pulmonar com redução das áreas de troca associadas a espessamento de paredes alveolares com infiltrados leucocitários discretos (Fig. 2A, 2B). Nos camundongos Cy-Inf foram observados múltiplos sítios de infiltração leucocitária em parede alveolar, com predomínio linfoplasmocítico (Fig. 2C, 2D). Também foram encontrados macrófagos alveolares (Fig. 2E) na luz dos alvéolos junto à parede alveolar, por sua vez, os macrófagos intersticiais (Fig. 2F) foram vistos na parede alveolar circundados ou não por outros leucócitos, como neutrófilos (Fig. 2E). Congestão vascular e hemorragia foram eventuais.

Em adição, a contagem de macrófagos e linfócitos no BAL permitiu demonstrar que os animais tratados com Cy infectados tiveram maiores contagens dessas células no BAL (Fig. 4A, 4B). A carga fúngica de *E. cuniculi* mensurada nos tecidos pulmonares (Fig. 4C) foi semelhante nos grupos Inf e Cy-Inf. Portanto, embora a pneumonia tenha sido observada nos dois grupos, os animais tratados com Cy tiveram quadro mais grave, confirmado pelo BAL.

No experimento B, a infecção pelo *E. cuniculi* foi clinicamente mais grave nos animais *knockout* com a presença de emagrecimento, apatia e definhamento, sinais não observados nos animais WT-Inf. O padrão de lesões histopatológicas foi semelhante aos apresentados pelos animais do experimento A, porém com maior infiltração inflamatória leucocitária (Fig. 3A, 3B). Observou-se paredes alveolares espessadas por infiltrado leucocitário mononuclear (Fig. 3C) e nos animais Rag-1-Inf foram demonstradas infiltrações leucocitárias mononucleares granulomatosas, com predomínio de linfócitos (Fig. 3D). A presença de congestão vascular, hemorragias e pneumócitos histologicamente preservados completaram o quadro observado mediante infecção experimental (Fig. 3).

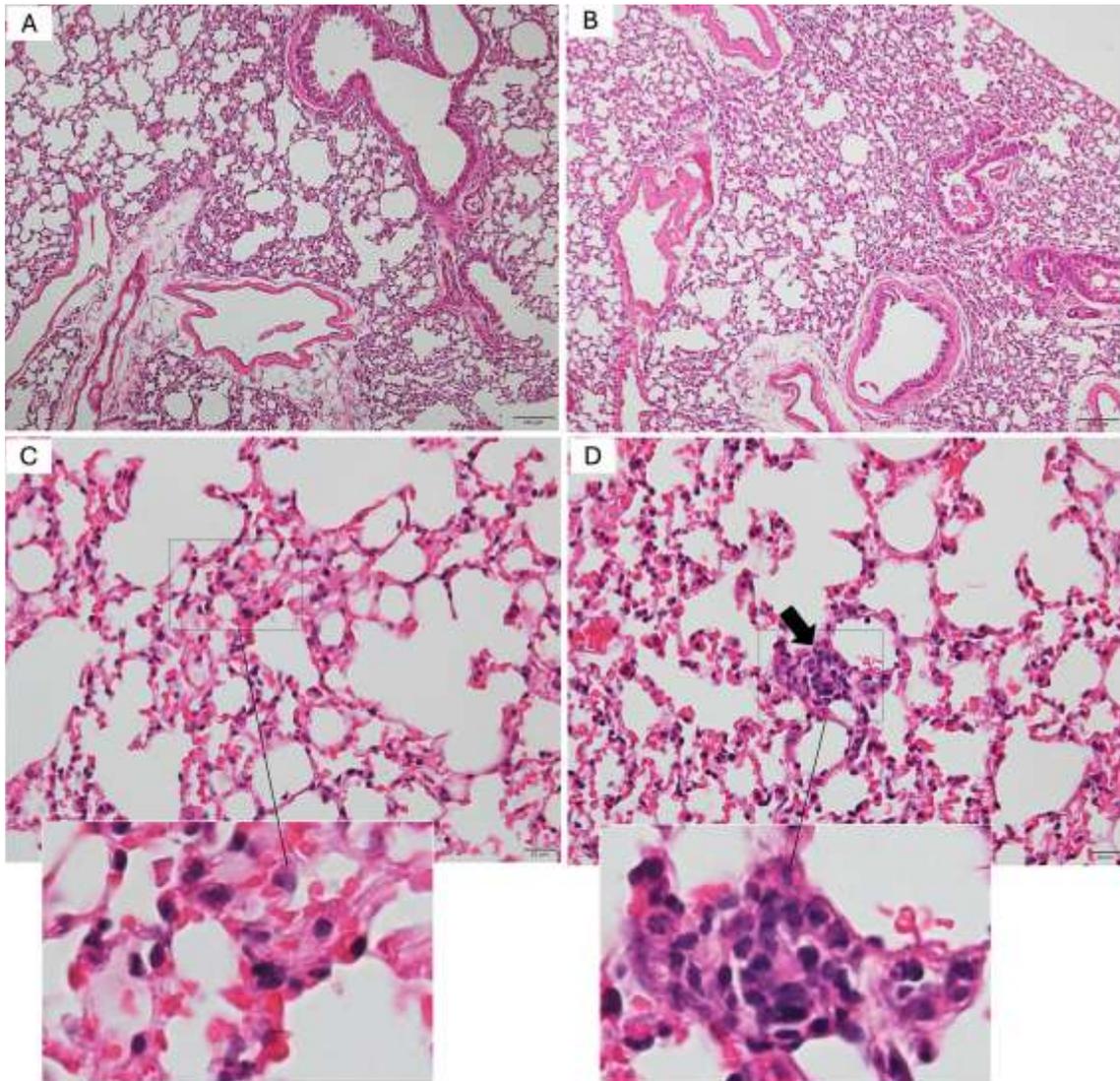
Para observar a disseminação da infecção, outros órgãos foram histologicamente estudados. Apenas o fígado apresentou deforma esporádica infiltrado inflamatório nodular com predominância de células mononucleares em região periportal ou sinusoidal (zona 1) nos dois grupos infectados, Inf (Fig. 5A), Cy-Inf (Fig. 5B), IL-17KO-Inf (Fig. 5C) e Rag-1-Inf (Fig. 5D), sendo que os

infiltrados inflamatórios foram maiores e mais frequentes nos animais IL-17KO-Inf e Rag-1-Inf. Não foram observadas lesões intestinais (Dados não apresentados).



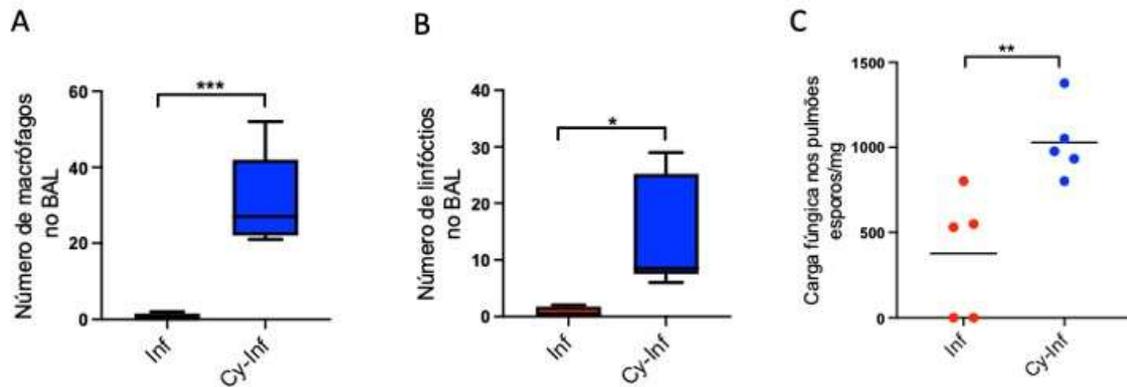
**Figura 2.** Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos infectados e tratados ou não com ciclofosfamida (Cy) revelam pneumonia intersticial causada pela inoculação intranasal de *E. cuniculi* do experimento A. A) Notar que as espessuras das paredes alveolares estão finas na maioria dos alvéolos em camundongos Inf. B) Algumas paredes alveolares mostram infiltrado mononuclear (seta preta) ocorreu em camundongos Inf. C) Paredes alveolares com espessura mais grossa indicam maior infiltrado mononuclear em camundongos Cy-Inf. D) Notar presença de infiltrado inflamatório (seta preta) com predominância de células mononucleares e presença esporádica de

polimorfonucleares evidenciada por infiltrado leucocitário em parênquima pulmonar. E) Detalhamento de macrófago alveolar (seta preta) na luz do alvéolo e neutrófilo no interstício (seta branca) em camundongos Cy-Inf. F) Detalhe de macrófagos intersticiais (setas pretas) constituindo a parede alveolar em camundongos Cy-Inf. Coloração HE.

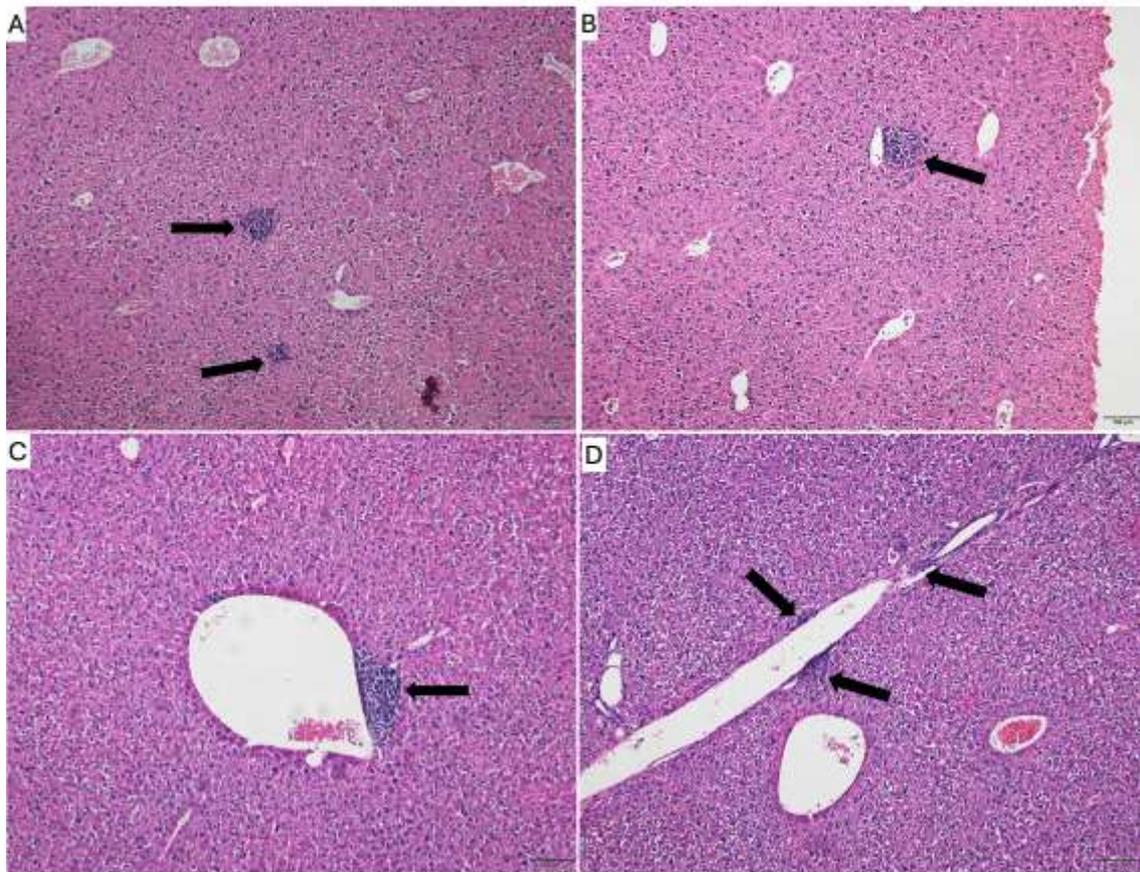


**Figura 3.** Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos *knockout* IL-17RA, Rag-1 e de camundongos C57BL/6 do experimento B, infectados pela via intranasal de *E. cuniculi* revelam pneumonia intersticial. A) Notar que as espessuras das paredes alveolares estão mais espessas na maioria dos alvéolos em camundongos IL-17KO-Inf. B) Camundongos Rag-1-Inf também mostram paredes alveolares mais espessas pela infiltração de células

mononucleares. C) Em maior aumento e no inserto pode-se observar o predomínio de infiltrado mononuclear (seta preta) nas paredes alveolares de camundongos IL-17KO-Inf. D) Nos camundongos Rag-1-Inf, a infiltração nodular por células mononucleares (seta preta) foi observada em parênquima pulmonar. Coloração HE.



**Figura 4.** Carga fúngica e contagem de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos infectados e tratados ou não com ciclofosfamida (Cy). A) Número de macrófagos contabilizados no BAL de camundongos Inf e Cy-Inf. B) Número de linfócitos contabilizados no BAL de camundongos Inf e Cy-Inf. C) Quantificação da carga fúngica no parênquima pulmonar de camundongos pertencentes aos grupos Infectado (Inf) e Cy-Infectado (Cy-Inf) pela técnica de PCR em tempo real (qPCR). Teste t de Student revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ .

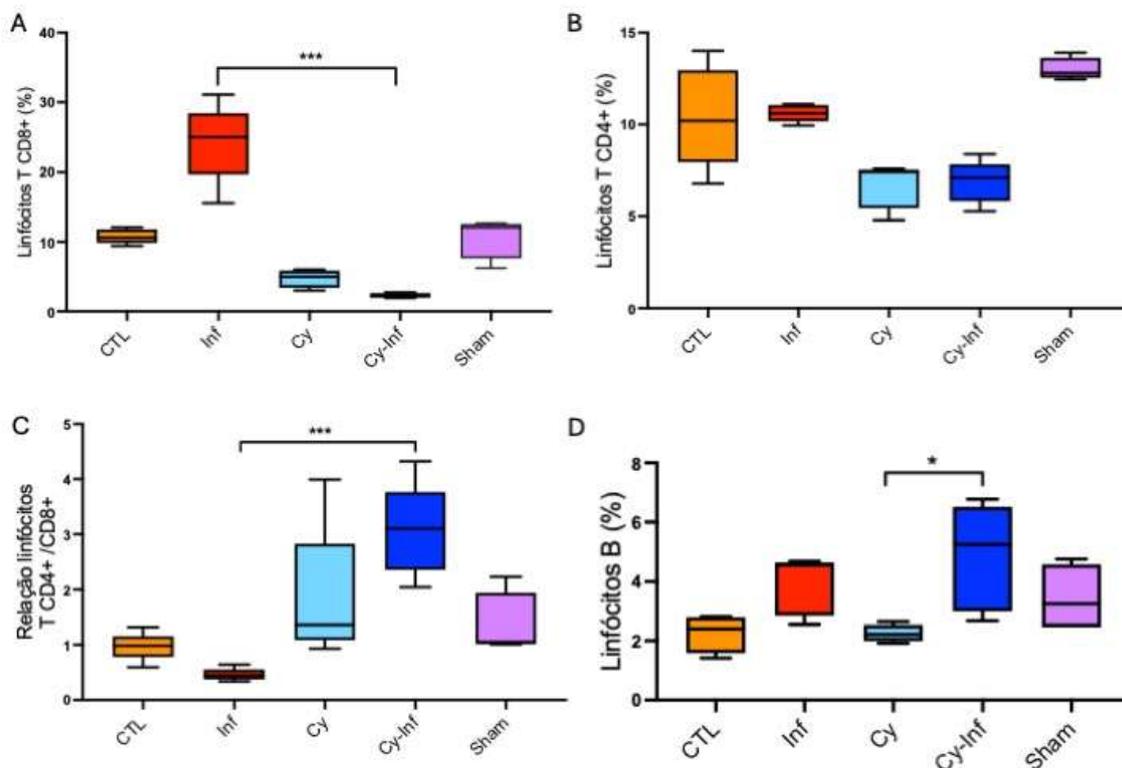


**Figura 5.** Fotomicrografias do parênquima hepático de camundongos infectados pela inoculação intranasal de *E. cuniculi*. A) Infiltrado leucocitário mononuclear (seta) em camundongos infectado. B) Infiltrado leucocitário mononuclear (seta) junto ao sinusoide em camundongos tratado com ciclofosfamida e infectado. C) Infiltrado leucocitário mononuclear (seta) adjacente a sinusoide em camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> infectado. D) Infiltrados leucocitários mononucleares (seta) junto ao sinusoide em camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> infectado. Coloração HE.

### 3.2. Redução de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> estava associado à pneumonia mais grave

No experimento A, a análise histopatológica demonstrou que os animais Cy-Inf tiveram quadro de pneumonia intersticial mais intenso com maior carga fúngica e nesses animais foram observados os menores percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, assim como maior proporção de linfócitos T CD4 em relação aos linfócitos T CD8 no tecido pulmonar em comparação aos animais do grupo Inf (Fig. 6A, 6B, 6C). Nos animais do grupo Inf observou-se maior percentual de

linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tecido pulmonar e adicionalmente, a proporção entre linfócitos T CD8 por linfócitos T CD4 foi maior (Fig. 6A, 6B, 6C).

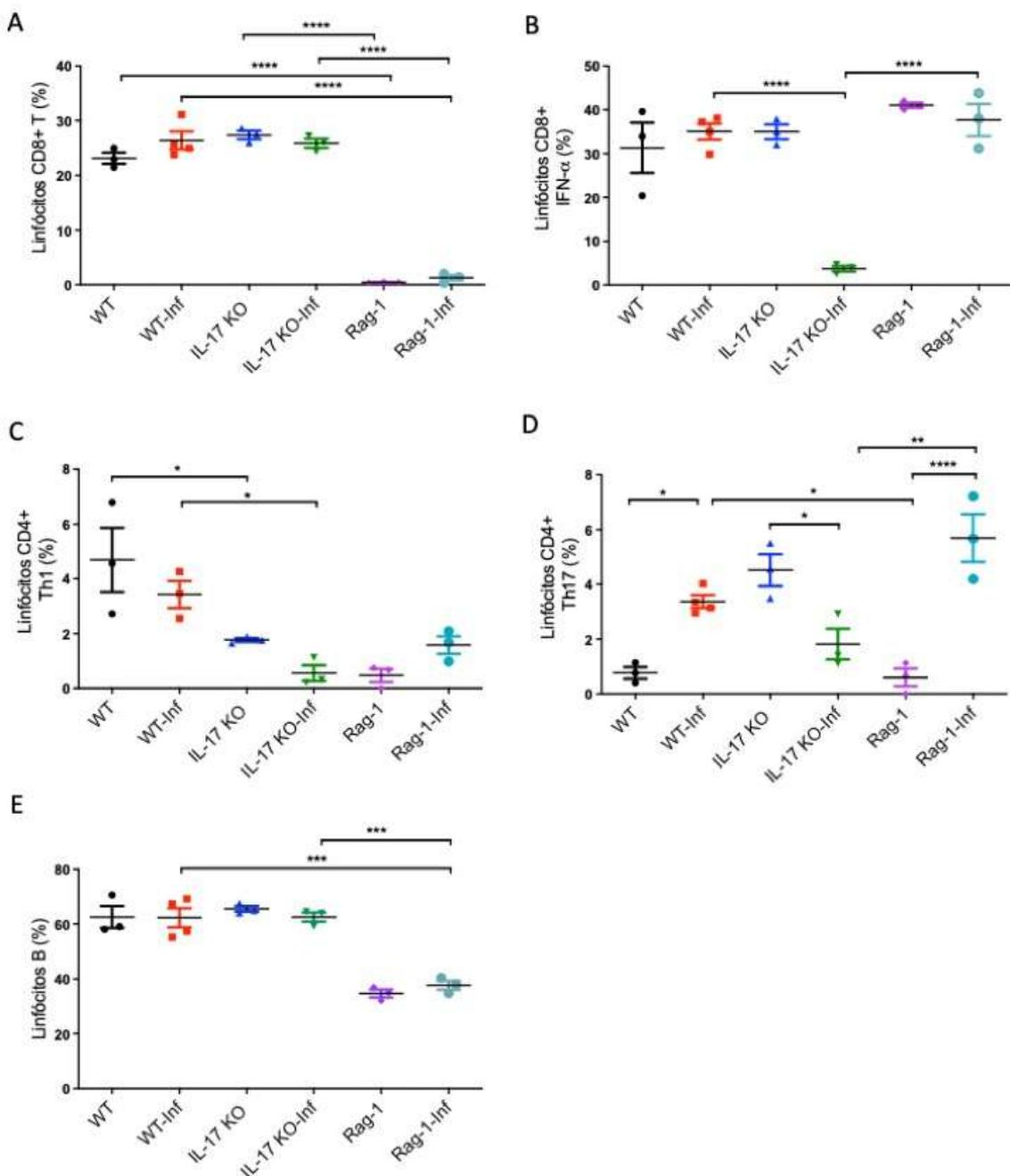


**Figura 6.** Percentual de células T e B presentes no parênquima pulmonar de camundongos não-infectado (CTL); Inf - camundongos infectados pela via intranasal com *E. cuniculi*; Cy - tratados com ciclofosfamida (Cy) e não-infectado; Cy-Inf - tratados com Cy e inoculado pela via intranasal com *E. cuniculi*; Sham - inoculado pela via intranasal com solução de NaCl 0,9% esterilizada. A) % Linfócito T CD8<sup>+</sup>. B) % Linfócito T CD4<sup>+</sup>. C) Relação entre T CD4<sup>+</sup>/ T CD8<sup>+</sup>. D) % Linfócitos B. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,001^{***}$ ,  $p < 0,0001^{****}$ .

No experimento B, as análises fenotípicas de linfócitos demonstraram redução da população de linfócitos T CD8 nos camundongos Rag-1, infectados ou não (Fig. 7A). Os camundongos IL-17KO-Inf apresentaram percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> semelhante aos animais WT-Inf (Fig. 7A), contudo esses linfócitos tinham menor expressão de IFN- $\alpha$  (Fig. 7B). Os percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup>Th1 estavam reduzidos em camundongos IL-17KO-Inf em comparação ao WT-Inf (Fig. 7C). Em relação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>Th17 observou-se maior percentual dessa população em camundongos WT-Inf e Rag-1-Inf em comparação aos seus controles, respectivamente WT e Rag-1 (Fig. 7D),

ou seja, a infecção aumentou essa população celular. Contudo, nos camundongos IL-17KO, o comportamento desse tipo celular foi contrário, a infecção reduziu o percentual de linfócitos T CD4+Th17 (Fig. 7D).

Em relação aos linfócitos B, os animais do grupo Cy-Inf tinham maior percentual desse tipo celular ao comparar com o controle Cy (Fig. 6D), enquanto nos camundongos Rag-1, infectados ou não, essa população estava reduzida (Fig. 7E).



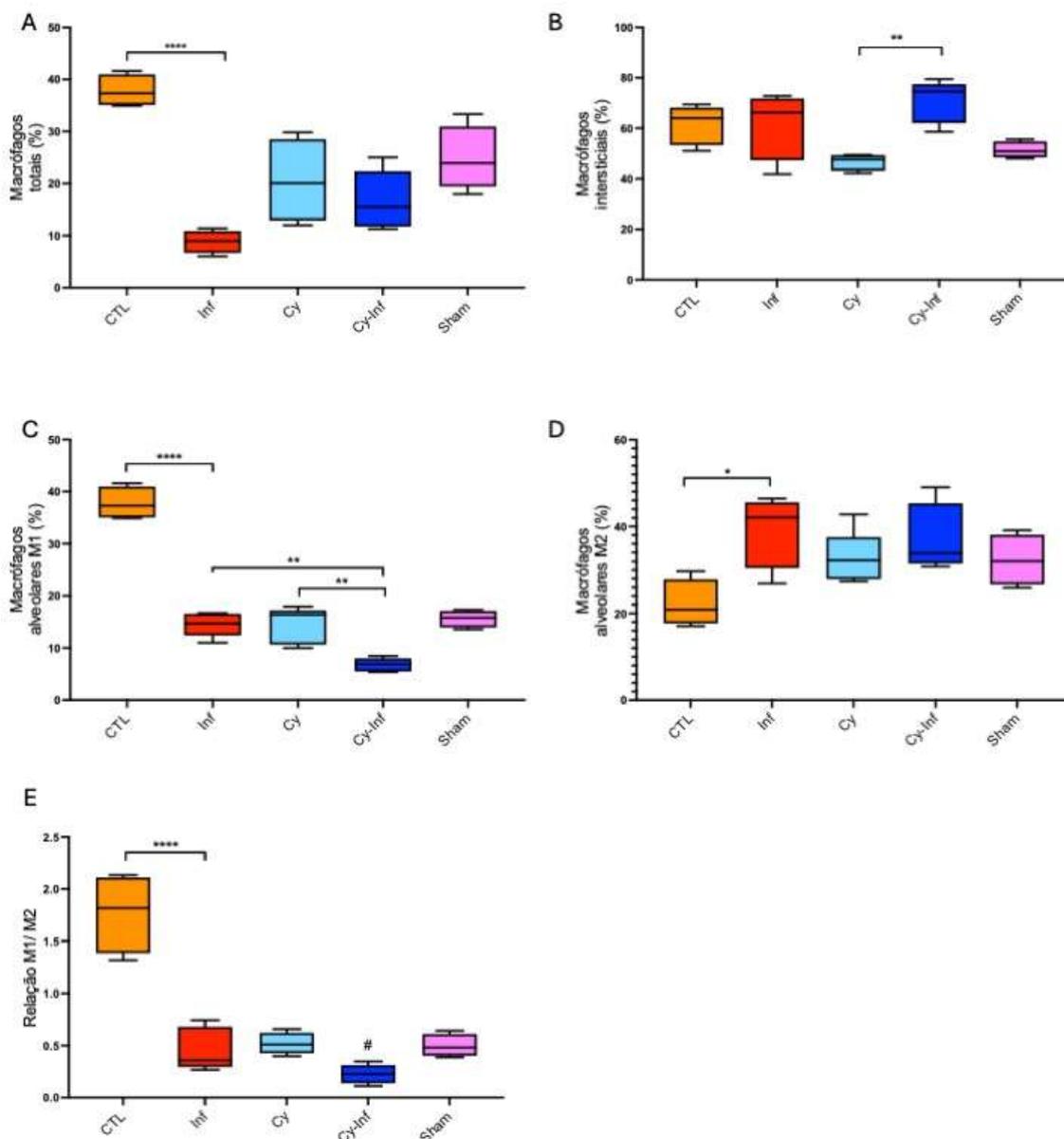
**Figura 7.** Percentual de células T e B presentes no parênquima pulmonar de camundongos wild type não-infectado (WT); camundongos WT infectados pela via intranasal com *E. cuniculi* (WT-Inf); camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> não-infectado (IL-17KO); camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi* (IL-17KO-Inf); camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> não-infectado (Rag-1); camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi* (Rag-1-Inf). A) % Linfócito T CD8<sup>+</sup>. B) % Linfócito T CD8 IFN- $\alpha$ <sup>+</sup>. C) % de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1. D) % de linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th17. E) % Linfócitos B. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ .

### **3.3. Infecção pulmonar pelo *E. cuniculi* reduziu o perfil M1 e aumentou o perfil M2**

No experimento A, os animais dos grupos Inf, Cy, Cy-Inf e Sham apresentaram percentual de macrófagos totais menores que os animais CTL (Fig. 8A). Foi evidenciado maior percentual de macrófagos intersticiais nos animais Cy-Inf em relação ao seu respectivo controle Cy (Fig. 8B). Quanto ao percentual de macrófagos M1, também foi evidenciada redução dos percentuais nos grupos Inf, Cy, Cy-Inf e Sham em relação ao grupo CTL e, adicionalmente, identificou-se menor percentual de M1 no grupo Cy-Inf em relação ao Inf e Cy (Fig. 8C). Por sua vez, as populações de macrófagos M2 foram maiores nos animais Inf, Cy, Cy-Inf e Sham em relação ao CTL (Fig. 8D), resultado confirmado pela análise da proporção entre macrófagos do perfil M1 em relação ao M2. Os animais dos grupos Inf, Cy, Cy-Inf e Sham apresentaram maior número de M2 proporcionalmente ao M1 na comparação com o CTL (Fig. 8E). No grupo Cy-Inf a proporção M1/M2 foi inferior a 0,5, demonstrando equilíbrio nas duas populações de macrófagos, ressaltando o papel da infecção pelo *E. cuniculi* na modulação dos macrófagos alveolares M2.

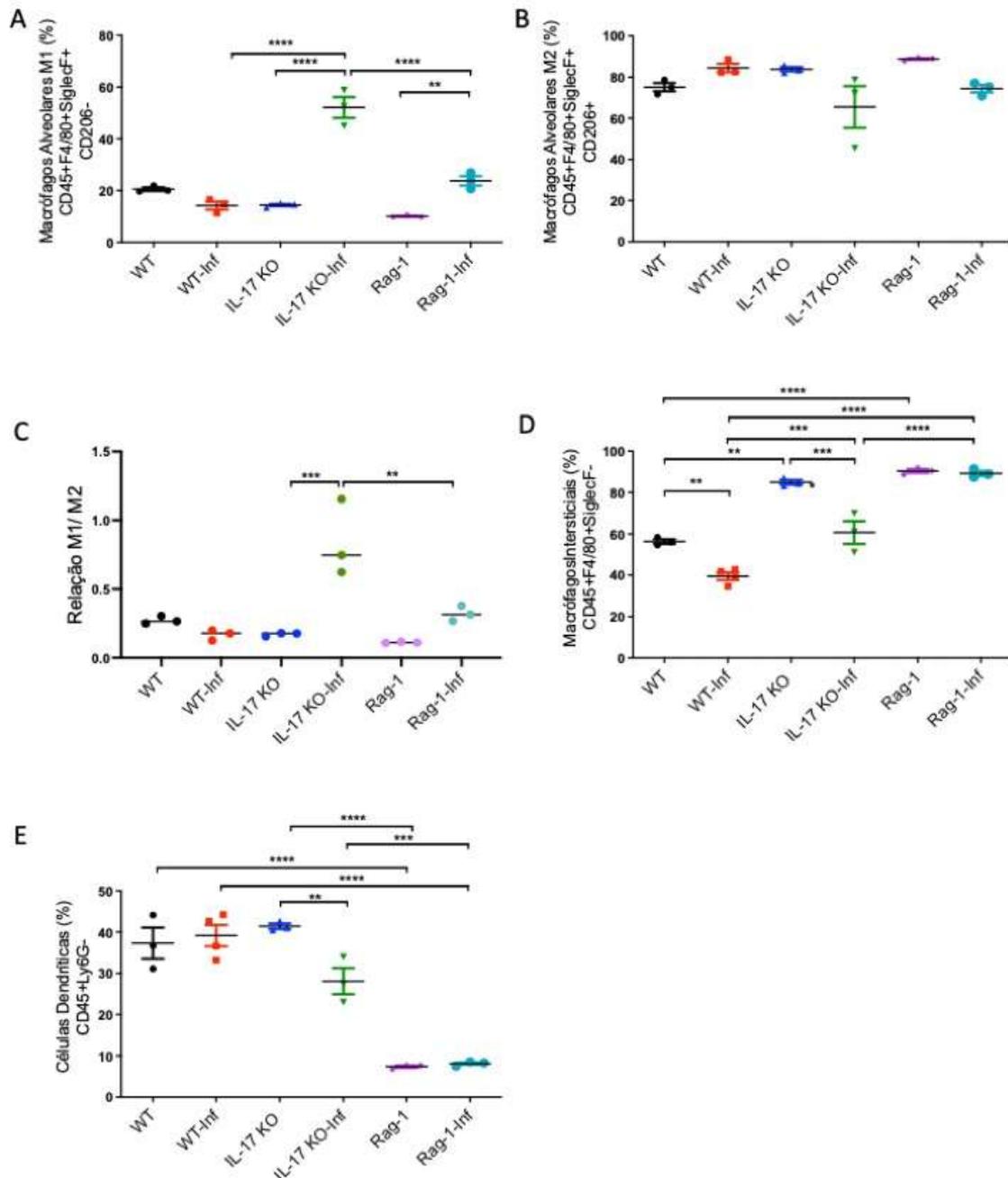
No experimento B, os camundongos IL-17KO-Inf apresentaram maior percentual de macrófagos M1 que os demais grupos (Fig. 9A), por sua vez, as populações de macrófagos M2 não apresentaram diferenças entre os grupos (Fig. 9B). A análise da proporção entre macrófagos M1 e M2 confirmou que os camundongos IL-17KO-Inf apresentaram maior população do perfil M1 (Fig. 9C). O percentual de macrófagos intersticiais estava reduzido nos camundongos WT-Inf e IL-17KO-Inf em comparação aos seus respectivos controles e ao Rag-1-Inf (Fig.9D). Na análise das células dendríticas nos

pulmões, foi demonstrada redução dessa população em camundongos IL-17KO-Inf comparado ao seu respectivo controle (Fig. 9E), assim como foi observada redução dessa população nos animais Rag-1 infectados ou não (Fig. 9E).



**Figura 8.** Percentuais das populações de macrófagos presentes no parênquima pulmonar de camundongos: CTL- não-infectado; Inf - camundongos infectados pela via intranasal com *E. cuniculi*; Cy - tratados com ciclofosfamida (Cy) e não-infectado; Cy-Inf - tratados com Cy e inoculado pela via intranasal com *E. cuniculi*; Sham - inoculado pela via intranasal com solução de NaCl 0,9% esterilizada. A) % total de macrófagos (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>). B) % de macrófagos intersticiais (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>SiglecF<sup>-</sup>). C) % de macrófagos alveolares M1 (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>). D) % de macrófagos alveolares M2 (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>). E) Relação entre M1 e M2. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou p<0,05\*, p<0,01\*\*,

$p < 0,0001^{****}$  e teste t de Student revelou  $p < 0,01\#$  na comparação entre Cy e Cy-Inf.



**Figura 9.** Percentuais das populações de macrófagos presentes no parênquima pulmonar de camundongos wild type não-infectado (WT); camundongos WT infectados pela via intranasal com *E. cuniculi* (WT-Inf); camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> não-infectado (IL-17KO); camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi* (IL-17KO-Inf); camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> não-infectado (Rag-1); camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi* (Rag-1-Inf).

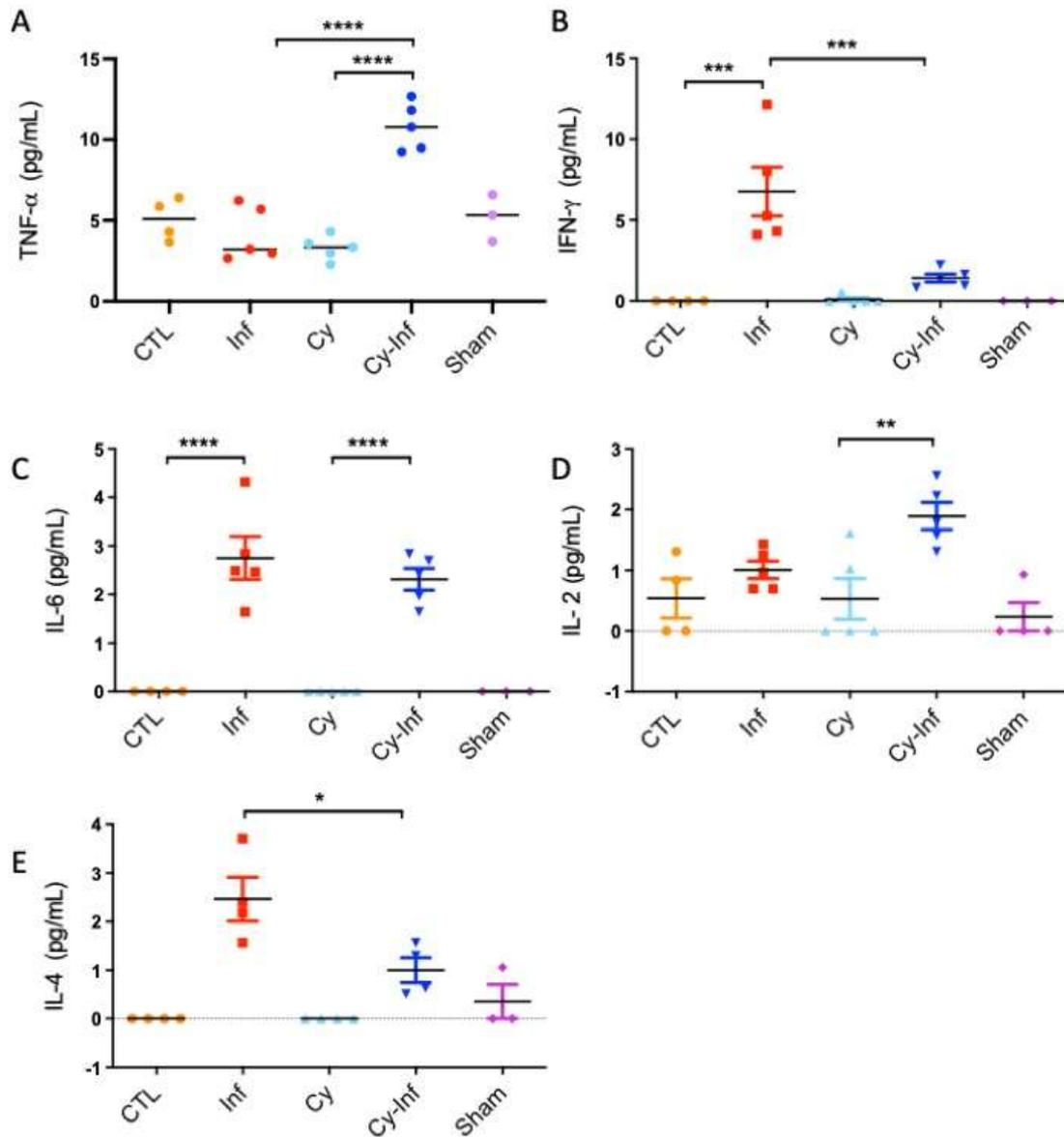
A) % de macrófagos alveolares M1 (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>). B) % de macrófagos alveolares M2 (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>SiglecF<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>). C) Relação entre M1 e M2. D) % de macrófagos intersticiais (CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>SiglecF<sup>-</sup>). E) % de células dendríticas (CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>). Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ,  $p < 0,0001^{****}$ .

### **3.4. Perfil de citocinas pró-inflamatórias predominou nos camundongos com pneumonia por *E. cuniculi***

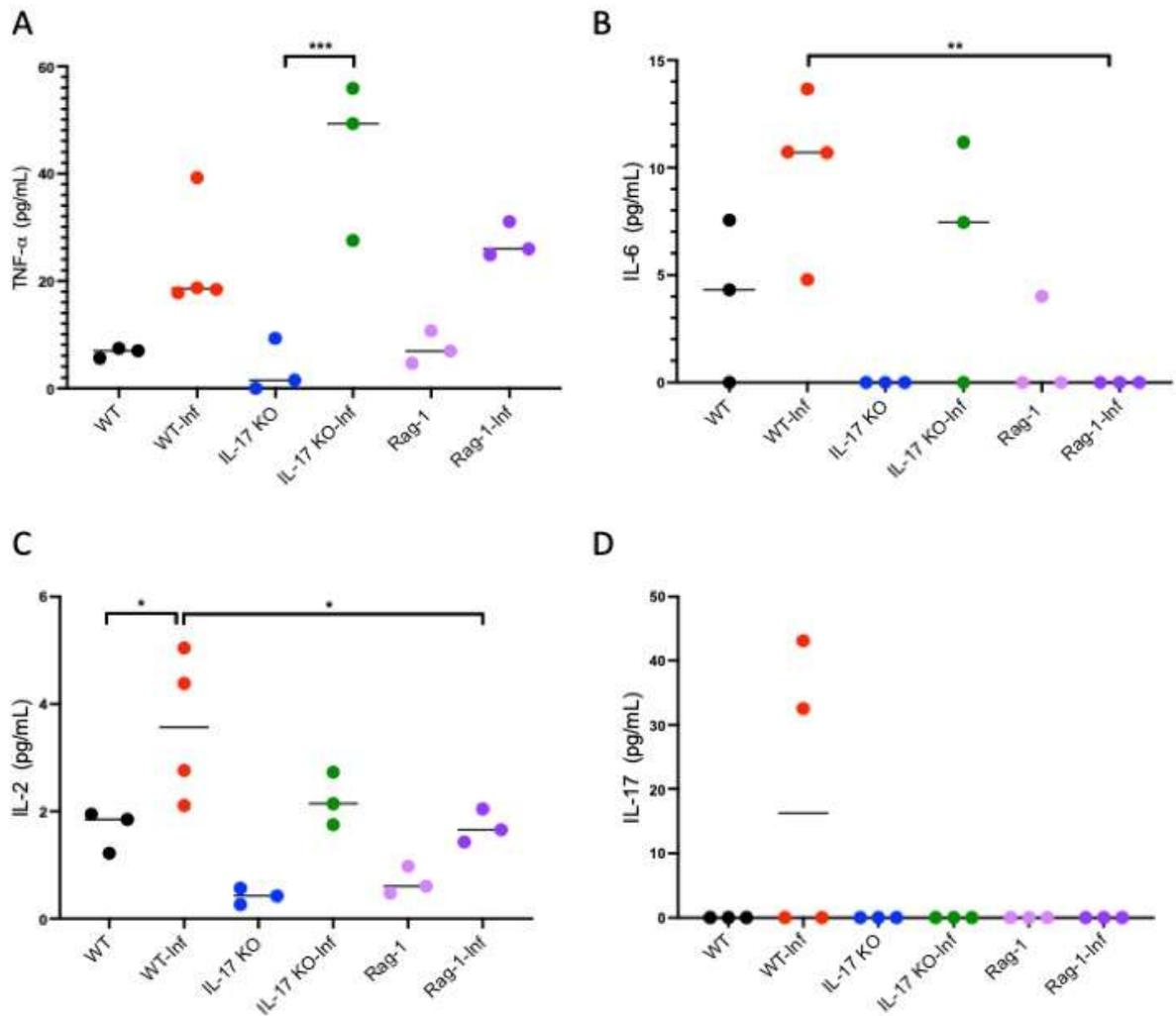
A presença de citocinas pró- e antiinflamatórias foi observada no plasma dos animais infectados pela via intranasal com *E. cuniculi* (Fig. 10), porém com diferenças entre os grupos. Os animais Cy-Inf apresentaram aumento de TNF- $\alpha$  (Fig. 10A) e IL-2 (Fig. 10D), já nos animais Inf observou-se aumento de IFN- $\gamma$  (Fig. 10B), esse justificado pelo aumento dos linfócitos T CD8 no tecido pulmonar e sua atividade citotóxica. Nos dois grupos, Inf e Cy-Inf a citocina IL-6 estava aumentada (Fig. 10C) e, apenas nos animais do grupo Inf, demonstramos aumento de IL-4 (Fig. 10E), indicativo de resposta antiinflamatória. As citocinas IL-10 e IL-17 não foram detectadas (dados não mostrados).

No experimento B, observou-se predomínio de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2 (Fig. 11). Os camundongos WT-Inf demonstraram aumentos nas citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2 (Fig. 11A, 11B, 11C) na comparação com seus controles e foram os únicos a apresentar IL-17 (Fig. 11D), embora sem significância. Os camundongos IL-17KO-Inf e Rag-1-Inf apresentaram as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-2 aumentadas em relação aos seus controles (Fig. 11A, 11C). Os camundongos Rag-1-Inf demonstraram menor quantificação de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-2 que os animais WT-Inf (Fig. 11A, 11C). As citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 não foram detectadas no experimento B (dados não mostrados).

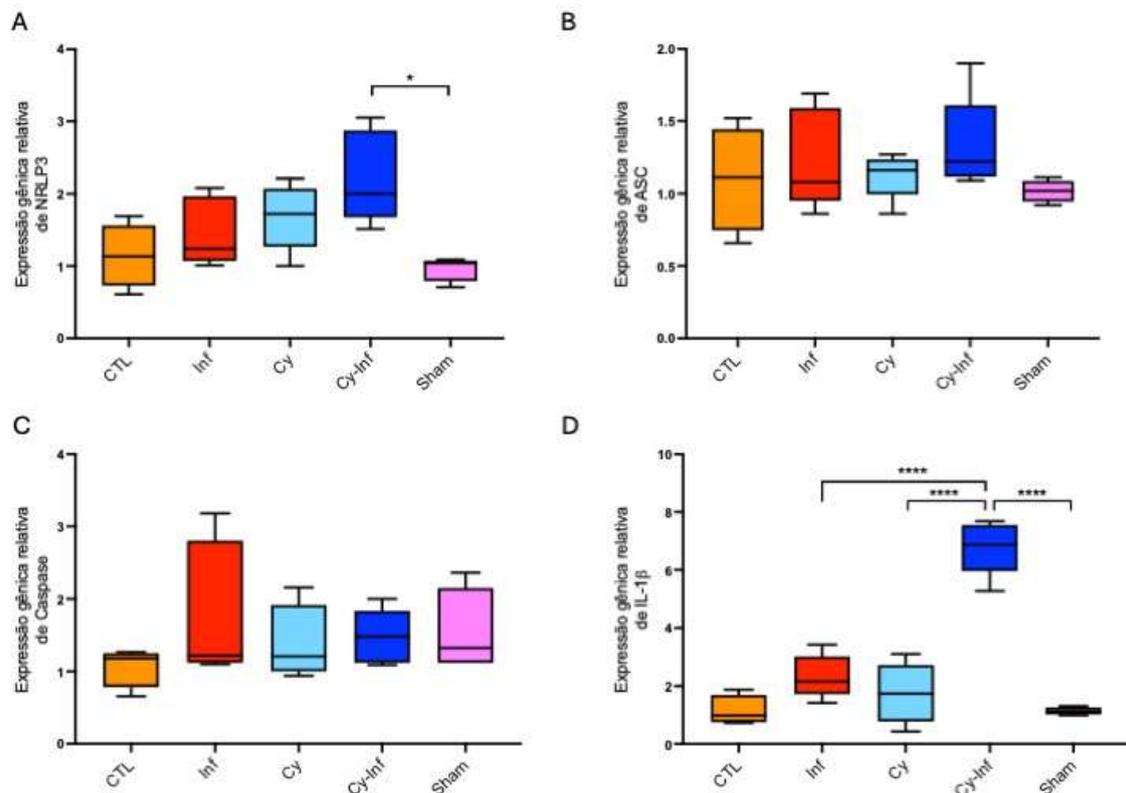
No experimento A, também foi analisada a expressão relativa dos genes relacionados ao inflamassoma complexo NLRP3 em leucócitos coletados do sangue periférico, embora o grupo Cy-Inf tenha apresentado maior expressão de IL-1 $\beta$ , esse aumento não estava relacionado a ativação da cascata do inflamassoma NLRP3 (Fig. 12).



**Figura 10.** Mensuração de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 no plasma de camundongos (CTL) não-infectado; Inf - camundongos infectados pela via intranasal com *E. cuniculi*; Cy - tratados com ciclofosfamida (Cy) e não-infectado; Cy-Inf - tratados com Cy e inoculado pela via intranasal com *E. cuniculi*; Sham - inoculado pela via intranasal com solução de NaCl 0,9% esterilizada. A) TNF- $\alpha$ , B) IFN- $\gamma$ , C) IL-6, D) IL-2, E) IL-4. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ,  $p < 0,0001^{****}$ .



**Figura 11.** Mensuração de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17 no plasma de camundongos wild type não-infectado (WT); camundongos WT infectados pela via intranasal com *E. cuniculi* (WT-Inf); camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> não-infectado (IL-17KO); camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi* (IL-17KO-Inf); camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> não-infectado (Rag-1); camundongos Rag-1<sup>-/-</sup> infectado pela via intranasal com *E. cuniculi* (Rag-1-Inf). A) TNF-α, B) IL-6, C) IL-2, D) IL-17. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou p<0,05\*, p<0,01\*\*, p<0,001\*\*\*.

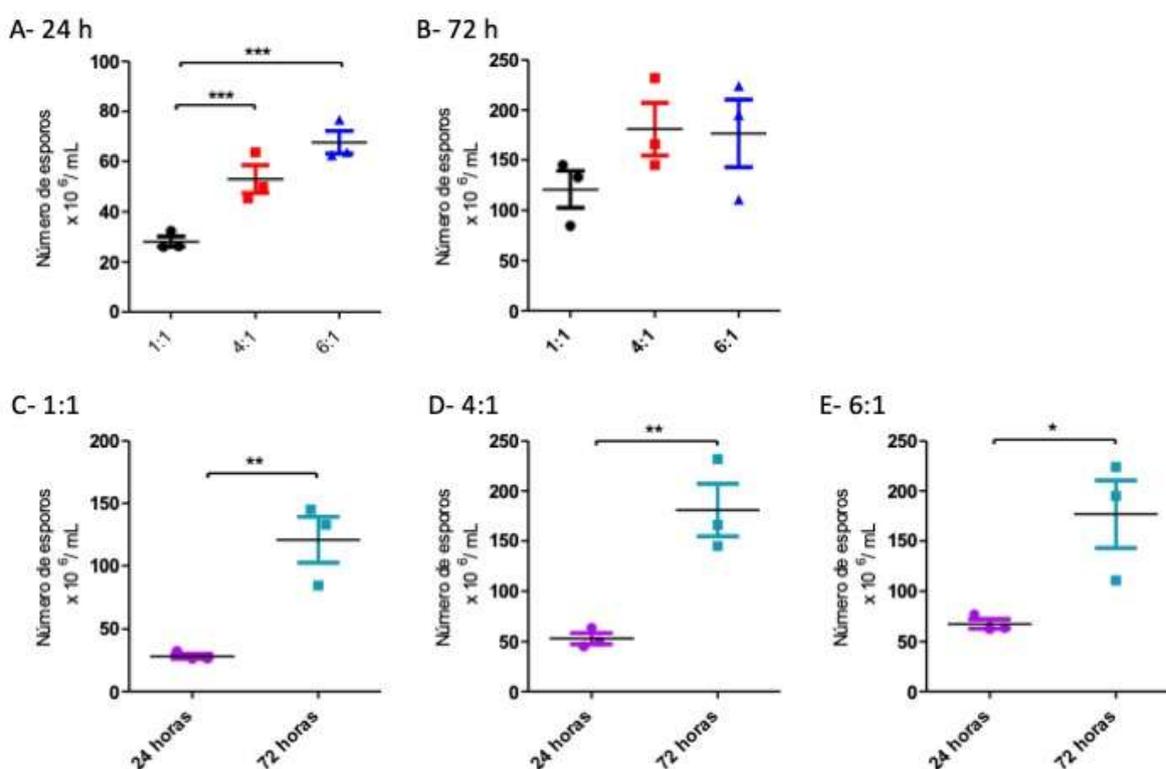


### 3.5 Esporos de *E. cuniculi* proliferaram em células H292

Foram utilizadas as células pulmonares da linhagem H292, nas quais o microsporídio se proliferou em todas as concentrações de inóculo utilizado para o desafio, o que confirma seu tropismo pelas células pulmonares. No menor tempo de incubação, 24 horas, as concentrações 4:1 e 6:1 determinaram a maior

proliferação de esporos do patógeno, contudo, em 72 horas, não houve diferença entre as 3 concentrações de inóculo, embora tenha sido observada uma tendência de maior produção nas concentrações maiores (4:1 e 6:1) (Fig. 13A, 13B).

Ao analisar a variação do tempo de incubação na quantidade de esporos produzidos pelas diferentes concentrações empregadas, ficou evidente que o maior tempo de incubação, 72 horas, foi superior para a produção de esporos, sendo observados aumentos de 1 vez até 4 vezes na comparação com as quantidades produzidas em 24 horas (Fig. 13C, 13D, 13E). Dessa forma podemos concluir que para períodos curtos de incubação, a produção de esporos é diretamente proporcional à concentração de esporos utilizada. Com relação ao tempo, uma concentração intermediária (4:1) é recomendada para a excelência na produção de esporos.



**Figura 13.** Proliferação de esporos de *E. cuniculi* em células de pulmão da linhagem H292. A) Quantificação de esporos de *E. cuniculi* obtidos após 24 horas de desafio com as concentrações 1:1, 4:1 e 6:1 esporos por célula. B) Quantificação de esporos de *E. cuniculi* obtidos após 72 horas de desafio com

as concentrações 1:1, 4:1 e 6:1 esporos por célula. Comparações das quantidades de esporos obtidos em 24 ou 72 horas nas concentrações 1:1 (C), 4:1 em (D) e 6:1 (E) esporos por célula. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey em (A) e (B) revelou  $p < 0,001^{***}$ . Teste T aplicado em (C, D, E) revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ .

#### 4. Discussão

A pneumonia provocada por fungos oportunistas, como os microsporídios, tornou-se um relevante desafio para a saúde pública, especialmente por acometer pessoas com doenças crônicas ou com o sistema imunológico comprometido (Özkoç et al., 2016). Nos últimos anos, esse cenário é evidenciado pelo crescimento no número de casos de microsporidiose, tanto em pacientes imunossuprimidos quanto em imunocompetentes (Kotkova et al., 2013; Kicia et al., 2016; Kicia et al., 2019; Seatamanoch et al., 2022, Ulasan Bagci et al., 2023). Os mecanismos de transmissão dos microsporídios não estão totalmente claros, em especial os que envolvem as vias aéreas. Estudos experimentais demonstraram o estabelecimento da infecção por *E. cuniculi* pela administração de esporos por via oral, intraperitoneal, intravenosa, intratraqueal (Wasson, Pepper, 2000) e, recentemente, foi demonstrada a infecção orofaríngea (dos Santos, 2022). No entanto, os estudos sugerem que a microsporidiose pulmonar geralmente é causada pela disseminação por via hematogênica de infecções do trato gastrointestinal ou urinário, em vez da possível transmissão aerógena (Bryan, 1995, Wasson, Pepper, 2000, Hidifira et al., 2023, Figueiredo Moreira et al., 2022).

Os resultados aqui apresentados demonstraram que inoculação de esporos de *E. cuniculi* pela via intranasal resultou em pneumonia intersticial, confirmando ser essa uma rota de infecção. Contudo, como na maioria dos modelos experimentais de encefalitozoonose, a gravidade da infecção foi diretamente associada à competência da resposta imune do hospedeiro. Os animais imunossuprimidos com Cy e infectados (Cy-Inf) apresentaram pneumonia mais intensa e maior carga fúngica que o grupo infectado (Inf). Estudos de infecção experimental com *E. cuniculi* em camundongos tratados

com Cy infectados pela via intraperitoneal (Lallo, Hirschfeld, 2012) e intravenosa (Figuerêdo Moreira et al., 2022) revelaram quadros graves de pneumonia intersticial caracterizada por extenso infiltrado inflamatório mononuclear, diferentemente do que foi identificado aqui em camundongos imunossuprimidos por Cy. O infiltrado inflamatório observado foi leve a moderado. Adicionalmente, a ausência de lesões ou presença de lesões escassas causadas por *E. cuniculi* em outros órgãos, como o fígado, sugerem que os mecanismos de defesa associados a essa via transmissão dificultam a presença e multiplicação patógeno nos tecidos pulmonares.

A encefalitozoonose experimental pela via intraperitoneal ou oral já foi descrita em modelos murinos com deficiência imunológica, tais como camundongos SCID e Nude, os quais desenvolveram infecção disseminada e grave com ascite, hepatite, pneumonia e óbito (Khan et al., 1999, Khan et al., 2001). Assim, corroboram os achados clínicos e patológicos observados nos animais *knockout* IL17RA<sup>-/-</sup> e Rag-1<sup>-/-</sup>, nos quais foi observada pneumonia clínica e histológica mais exacerbada. Os camundongos IL-17RA<sup>-/-</sup> não expressam o receptor IL-17RA, com conseqüente bloqueio na sinalização de IL-17A, IL-17F, IL-17C e parcial para IL-17E (IL-25), o que torna esses animais suscetíveis às infecções fúngicas oportunistas (Trautwein-Weidner et al., 2015; Corneth et al., 2019), como foi observado em nosso estudo.

Por sua vez, os camundongos Rag-1 (*Recombination Activating Gene 1*) apresentam um rearranjo dos genes de receptores antigênicos para células T (TCR) e de imunoglobulinas em linfócitos B, o que resulta na deficiência completa de células T e B maduras, embora com preservação da atividade imune inata (Miller, Robinson, 2012, Dufaud et al., 2019). No presente estudo, esse grupo apresentou sinais clínicos bem graves com definhamento, apatia e perda de peso, assim como uma pneumonia intersticial caracterizada por infiltrado inflamatório acometendo grande parte do parênquima. Corroborando nossos resultados, foi demonstrado que camundongos deficientes em Rag-1 foram mais suscetíveis à candidíase oral (Hernández-Santos, 2013), à criptotocose (Dufaud et al., 2019) e ao *Mycobacterium tuberculosis* (Miller, Robinson, 2012) quando comparados aos camundongos controles WT.

Nos camundongos Cy-Inf, a suscetibilidade à pneumonia intersticial foi associada ao baixo percentual de linfócitos T CD8 e T CD4. Adicionalmente, esses animais tinham maior percentual de macrófagos intersticiais, menor percentual de macrófagos M1 e perfil predominante de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-2, achados que explicam o processo inflamatório associado. Já nos camundongos Inf, identificou-se aumento linfócitos T CD8+ e das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e IL-6, em associação à menor carga fúngica. Em pulmões saudáveis existem poucas células T CD8 residentes em estado estacionário, representando 1-2% de todas as células hematopoiéticas CD45+ (Bree et al., 2005). O aumento no número de células T CD8 geralmente está associado ao recrutamento ativo para o pulmão inflamado durante uma infecção (Chen, Kolls, 2013). Anteriormente, foi demonstrada que a redução na carga fúngica de *E. cuniculi* foi diretamente proporcional ao aumento do percentual de linfócitos T CD8+ presentes no tecido pulmonar de camundongos tratados com Cy e infectados por via hematogena (Figueiredo Moreira et al., 2022). Adicionalmente, a pneumonia mais exacerbada em camundongos Rag-1-Inf demonstrada por sinais clínicos e quadro histopatológico, corrobora a importância de linfócitos T, em especial T CD8, como agente limitador da infecção pelo *E. cuniculi*. A deficiência adicional de células T CD4 Th1 e B completam o painel de alterações limitantes para o combate a esse patógeno intracelular.

Na maioria dos casos, as células T CD8+ são ativadas por IL-2 produzida pelos linfócitos T CD4+ (Opala et al., 2015). Entretanto, a falta de células T CD4+ não afeta a resposta dos linfócitos T CD8 como foi observado em animais T CD4<sup>-/-</sup> infectados intraperitonealmente pelo *E. cuniculi*, sendo este um exemplo de infecção intracelular independente de células T CD4+ (Khan et al, 1999). No presente estudo, embora os percentuais de linfócitos T CD4+ do grupo Cy-Inf não tenham demonstrado diferença entre os grupos do experimento A, a proporção entre linfócitos T CD4 por CD8 foi maior nos animais do grupo Cy-Inf, fato que poderia explicar a presença de IL-2 como fator de sinalização para células T CD8 e CD4 contra o *E. cuniculi*. Apesar disso, o grupo Cy-Inf apresentou baixo percentual de células T CD8, fato que poderia explicar a baixa produção e secreção de IFN- $\gamma$ , e o combate ao patógeno. Nos camundongos

Rag-1-Inf, a produção de citocinas pró-inflamatórias foi baixa, porém vale ressaltar que cerca de 30 a 40% dos linfócitos T CD8 expressavam internamente IFN- $\gamma$ , o que indica claramente ativação funcional (Uhl et al., 2023). Considerando a imaturidade funcional dos linfócitos T CD8 em camundongos Rag-1, é provável que o estímulo para a expressão de IFN- $\gamma$  tenha origem na população de macrófagos intersticiais e na secreção de IL-12, que não foi mensurada nesse experimento (Del Vecchio et al., 2007). Também foi observada aumento do percentual de linfócitos T CD4 Th17 nesses animais, embora a citocina IL-17 não tenha sido mensurada no sangue. Nos camundongos IL-17KO-Inf a população de linfócitos T CD8 não estava reduzida, porém apresentaram baixa expressão de IFN- $\gamma$ , demonstrando pouca ativação funcional. Contudo, esse grupo apresentou maior percentual de macrófagos M1 e maior produção de TNF- $\alpha$ , demonstrando a participação da imunidade inata no controle do patógeno.

Os pulmões possuem duas populações distintas de macrófagos: macrófagos alveolares (MA), que estão em contato próximo com as células epiteliais tipo I e II dos alvéolos, e macrófagos intersticiais (MI), que estão localizados no parênquima entre o endotélio microvascular e o epitélio alveolar. Os MAs desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio pulmonar. Em condições normais, eles apresentam alta atividade fagocítica e produzem citocinas antiinflamatórias, contribuindo tanto para o reparo tecidual quanto para a prevenção de inflamação excessiva (Mu al., 2021). Os MAs poderiam ser classificados fenotipicamente e funcionalmente em dois tipos principais: macrófagos M1 (pró-inflamatórios, pró-fibróticos e que recrutam ativamente neutrófilos) e macrófagos M2 (antiinflamatórios, anti-fibróticos, pró-asmáticos e pró-resolução, com propriedades regenerativas) (Mu al., 2021). Os MAs são modulado em M1 e M2 pelo microambiente único do pulmão, que compreende contato íntimo com as células epiteliais, alta tensão de oxigênio e exposição a fluido rico em surfactante, todos essenciais para a homeostase do tecido, defesa do hospedeiro, eliminação de surfactante e detritos celulares, reconhecimento de patógenos, início e resolução da inflamação pulmonar e reparo de tecido danificado (Hu, Christman, 2019). A segunda linha de defesa nos pulmões contra patógenos invasores são os MI, sendo essas células

apresentadoras de antígeno e reguladoras dos processos relacionados às células T (Wang et al., 2018; Schyns et al., 2019).

O estudo de Santos et al. (2022) demonstrou aumento da população de MA nos pulmões dos animais infectados não-imunossuprimidos, associado a um perfil misto de citocinas, Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) e Th2 (IL-4), sugestivo da presença concomitante de MA dos perfis M1 e M2. De forma geral, no presente estudo, a população de macrófagos M1 diminuiu após a infecção, com exceção dos animais IL-17KO-Inf que teve aumento nesse perfil de macrófagos. Adicionalmente, os grupos infectados tinham maior percentual de macrófagos M2, com exceção dos animais IL-17KO-Inf. Anteriormente foi demonstrado que, em condições *in vitro*, os macrófagos peritoneais obtidos de camundongos XID desafiados com *E. cuniculi* apresentaram um perfil de macrófagos M2, com morte predominante por necrose, enquanto os macrófagos de camundongos Balb/C mostraram uma polarização para o perfil M1, com morte por apoptose e liberação de altos níveis das citocinas IL-6 e IL-10 (Pereira et al., 2019). Portanto, a modulação do perfil M2 pode favorecer a sobrevivência de *E. cuniculi*, como tem sido descrito para outros patógenos (Krakauer, 2018, Mily et al., 2020).

Por outro lado, estudos indicam que os MAs não são apenas fagócitos essenciais para a remoção de células lesionadas e subsequente reparo tecidual, mas também são necessários para prevenir respostas inflamatórias exacerbadas que poderiam causar danos teciduais secundários e o comprometimento respiratório. Em consonância com isso, experimentos *ex vivo* com MAs isolados de humanos e camundongos também demonstram que esses macrófagos produzem níveis muito mais baixos de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- $\alpha$  e IL-6) em resposta à inflamação aguda, quando comparados aos monócitos/macrófagos recrutados, ou seja MI (Gwyer Findlay, Hussell, 2012, Hiruma, 2018). Talvez outro fator que pode justificar a constatação de infecção pulmonar e pneumonia intersticial com pouco infiltrado inflamatório possa ser o contato inicial do patógeno com os MAs, considerando sua atuação microbicida com pouca repercussão pró-inflamatória.

Por sua vez, nos camundongos Cy-Inf foi observado maior percentual de MIs e menor de macrófagos M1 nos pulmões, sendo esses achados associados à infecção mais grave. A redução dos macrófagos alveolares M1, cuja atividade

microbicida é a primeira barreira para as infecções respiratórias, está diretamente relacionada a maior carga fúngica e ao quadro de pneumonia mais grave. Durante a infecção pulmonar aguda, ou inflamação, uma redução na população de MA residentes é frequentemente observada e referida como a "reação de desaparecimento de macrófagos", e este é certamente o caso na infecção por SARS-CoV-2 (Grant et al., 2021; Liao et al., 2020) e poderia explicar a redução dos MA1 no grupo Cy-Inf. Também vale ressaltar que a redução dos M1 no grupo Cy não infectado é indicativo do efeito da Cy sobre os macrófagos alveolares, fato que tornaria os animais desse grupo menos resistentes à infecção pela via orofaríngea. A compreensão das variações que envolvem as populações de células imunológicas, seus subprodutos (citocinas, quimiocinas e exossomos) e sua funcionalidade ainda é limitada, o que evidencia a necessidade de investigações mais aprofundadas no futuro.

Os resultados aqui apresentados permitiram concluir que a inoculação de esporos de *E. cuniculi* pela via intranasal determinou pneumonia intersticial. Os camundongos imunossuprimidos com Cy, knockout IL-17RA e Rag-1 tiveram pneumonia mais grave que os animais não imunossuprimidos ou *wild type*, sendo a menor resistência ao patógeno associada especialmente a menor resposta de linfócitos T CD8 e ao predomínio de macrófagos alveolares M2.

### Referências Bibliográficas

- Bryan, R.T. 1995. Microsporidiosis as an AIDS-related opportunistic infection. Clin Infect Dis. Suppl 1, S62-65. doi: 10.1093/clinids/21.supplement\_1.s62.
- 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(1), 15-25. doi: 10.1038/cmi.2009.3.
- Chen, K., Kolls, J.K. 2013. T cell-mediated host immune defenses in the lung. Annu Rev Immunol. 31, 605-33. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100019.
- Corneth OBJ, Schaper F, Luk F, Asmawidjaja PS, Mus AMC, Horst G, et al. 2019. Lack of IL-17 receptor A signaling aggravates lymphoproliferation in C57BL/6 lpr mice. Sci Rep. 9(1):4032. doi:10.1038/s41598-019-39483-w.

- de la Rúa, N.M., Samuelson, D.R., Charles, T.P., Welsh, D.A., Shellito, J.E. 2016. CD4(+) T-Cell-independent secondary immune responses to pneumocystis pneumonia. *Front Immunol.* 7, 178. doi: 10.3389/fimmu.2016.00178.
- Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, et al. 2007. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res.* 13(16):4677–85. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0776.
- Dufaud C, Rivera J, Rohatgi S, Pirofski LA. 2018. Naïve B cells reduce fungal dissemination in *Cryptococcus neoformans*-infected Rag1<sup>-/-</sup> mice. *Virulence.* 9(1):173–84. doi:10.1080/21505594.2017.1370529.
- Figueiredo Moreira, I., Alvares-Saraiva A.M., Pérez, E.C., Xavier, G.J., Spadacci-Morena, D.D., Silva de Araújo, R., Rocha, P.R.D.A., Lallo, M.A. 2022. Opportunistic pneumonia caused by *E. cuniculi* in mice immunosuppressed with cyclophosphamide. *Immunobiology.* 227(3), 152194. doi: 10.1016/j.imbio.2022.152194.
- Grant, R.A., Morales-Nebreda, L., Markov, N.S., Swaminathan, S., Querrey, M., Guzman, E.R., Abbott, D.A., Donnelly, H.K., Donayre, A., Goldberg, I.A., Klug, Z.M., Borkowski, N., Lu, Z., Kihshen, H., Politanska, Y., Sichizya, L., Kang, M., Shilatifard, A., Qi, C., Lomasney, J.W., Argento, A.C., Kruser, J.M., Malsin, E.S., Pickens, C.O., Smith, S.B., Walter, J.M., Pawlowski, A.E., Schneider, D., Nannapaneni, P., Abdala-Valencia, H., Bharat, A., Gottardi, C.J., Budinger, G.R.S., Misharin, A.V., Singer, B.D., Wunderink, R.G. 2021. NU SCRIPT study investigators. Circuits between infected macrophages and T cells in SARS-CoV-2 pneumonia. *Nature.* 590(7847), 635-641. doi: 10.1038/s41586-020-03148-w.
- Gwyer Findlay E, Hussell T. 2012. Macrophage-mediated inflammation and disease: a focus on the lung. *Mediators Inflamm.* 2012:140937. doi:10.1155/2012/140937.
- Han, B., Pan, G., Weiss, L.M. 2021. Microsporidiosis in humans. *Clin Microbiol Rev.* 34(4), e0001020. doi: 10.1128/CMR.00010-20.
- Han, B., Weiss, I.m. 2017. microsporidia: Obligate intracellular pathogens within the Fungal kingdom. *Microbiol Spectr.* 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0018-2016>.
- Hernández-Santos N, Huppler AR, Peterson AC, Khader SA, McKenna KC, Gaffen SL. 2013. Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral

mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunol.* 6(5):900–10.  
doi:10.1038/mi.2012.128.

- Hidifira, A.M., Alvares-Saraiva, A.M., Perez, E.C., Spadacci-Morena, D.D., de Araujo, R.S., Lallo, M.A. 2023. Increased susceptibility to encephalitozoonosis associated with mixed Th1/Th2 profile and M1/M2 profile in mice immunosuppressed with cyclophosphamide. *Exp Parasitol.* 254, 108606. doi: 10.1016/j.exppara.2023.108606
- Hiruma T, Tsuyuzaki H, Uchida K, Trapnell BC, Yamamura Y, Kusakabe Y, et al. 2018. IFN- $\beta$  improves sepsis-related alveolar macrophage dysfunction and postseptic acute respiratory distress syndrome-related mortality. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 59(1):45–55. doi:10.1165/rcmb.2017-0261OC.
- Hu, G., Christman, J.W. 2019. Editorial: Alveolar macrophages in lung inflammation and resolution. *Front Immunol.* 10, 2275. doi: 10.3389/fimmu.2019.02275.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peiretillade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., Alaoui, H.E., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivarés, C. P. 2001. Genome sequence and compaction of the eukarote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature.* 414, s450–453. doi.org/10.1038/35106579
- Kechaou, R., Magne, D., Senghor, Y., Brin, C., Louvion, K., Parrot, L., Morgand, M., Nourrisson, C., Poirier, P., Bigot, J., Hennequin, C., Moreno-Sabater, A. 2025. Microsporidiosis in patients with autoimmune diseases undergoing monoclonal antibody associated therapy. *Mycopathologia.* 190(1), 12. doi: 10.1007/s11046-024-00918-2.
- Khan AI, Moretto M, Weiss LM. 2001. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect.* 3(5):401–5. doi:10.1016/s1286-4579(01)01397-1.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H., Moretto, M. 1999. CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol.* 162(10), 6086-91. PMID: 10229850.
- Kicia, M., Wesolowska, M., Cebulski, K., Jakuszko, K., Piesiak, P., Kowalc, A., Sak, B., Krajewska, M., Hendrich, A.B., Kváč, M., Kopacz, Ž. 2019. Symptomatic respiratory *Encephalitozoon cuniculi* infection in renal transplant recipients. *Int J Infect Dis.* 79, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.016>

- Kicia, M., Wesolowska, M., Kopacz, Z., Jakuszko, K., Sak, B., Květonová, D., Krajewska, M., Kváč, M. 2016. Prevalence and molecular characteristics of urinary and intestinal microsporidia infections in renal transplant recipients. *Clin Microbiol Infect.* 22, 462. e5-462.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.014>
- Kotkova, M., Sak, B., Kvetonova, D., Kvac, M. 2013. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS One.* 8, e60941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060941>
- Krakauer T. 2018. Living dangerously: *Burkholderia pseudomallei* modulates phagocyte cell death to survive. *Med Hypotheses.* 121:64–9.
- Lallo, M.A., Hirschfeld, M.P.M. 2012. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. *Exp parasitol.* 131, 339-343.
- Lawlor, E.M., Moretto, M.M., Khan, I.A. 2010. Optimal CD8 T-cell response against *Encephalitozoon cuniculi* is mediated by Toll-like receptor 4 upregulation by dendritic cells. *Infect Immun.* 78(7), 3097-102. doi: 10.1128/IAI.00181-10.
- Liao, M., Liu, Y., Yuan, J., Wen, Y., Xu, G., Zhao, J., Cheng, L., Li, J., Wang, X., Wang, F., Liu, L., Amit, I., Zhang, S., Zhang, Z. 2020. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. *Nat Med.* 26(6), 842-844. doi: 10.1038/s41591-020-0901-9.
- Miller HE, Robinson RT. 2012. Early control of *Mycobacterium tuberculosis* infection requires IL12RB1 expression by RAG1-dependent lineages. *Infect Immun.* 80(9):3064–74. doi:10.1128/IAI.00426-12.
- Mily A, Kalsum S, Loreti MG, Rekha RS, Muvva JR, Lourda M, et al. 2020. (Polarization of M1 and M2 human monocyte-derived cells and analysis with flow cytometry upon *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Vis Exp.* 163). doi:10.3791/61807.
- Moretto, M.M., Harrow, D.I., Khan, I.A. 2015. Effector CD8 T cell immunity in microsporidial infection: a lone defense mechanism. *Semin Immunopathol.* 37(3),281-7. doi: 10.1007/s00281-015-0482-8.
- Moretto, M.M., Khan, I.A., 2022. Immune response to Microsporidia. *Exp Suppl.* 114, 373-388. doi: 10.1007/978-3-030-93306-7\_13.

- Mu X, Li Y, Fan GC. 2021. Tissue-resident macrophages in the control of infection and resolution of inflammation. *Shock*. 55(1):14–23. doi:10.1097/SHK.0000000000001601.
- Opata, M.M., Hollifield, M.L., Lund, F.E., Randall, T.D., Dunn, R., Garvy, B.A., Feola, D.J. 2015. B Lymphocytes are required during the early priming of CD4+ T cells for clearance of pneumocystis infection in mice. *J Immunol*. 195(2), 611-20. doi: 10.4049/jimmunol.1500112.
- Özkoç, S., Bayram Delibaş, S., Akisü, Ç. 2016. Evaluation of pulmonary microsporidiosis in iatrogenically immunosuppressed patients. *Tuberk Toraks*. 64(1), 9-16. doi: 10.5578/tt.10207.
- Pereira A, Alvares-Saraiva AM, Konno FTC, Spadacci-Morena DD, Perez EC, Mariano M, et al. 2019. B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile ameliorates microbicidal functions and disrupts the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(9):e0007674. doi:10.1371/journal.pntd.0007674.
- Santos, M.S. Infecção orofaríngea pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos. Tese [Doutorado] Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP. 2022.
- Schyns, J., Bai, Q., Ruscitti, C., Radermecker, C., De Schepper, S., Chakarov, S. 2019. Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. *Nat Commun*. 10: 3964. doi: 10.1038/s41467-019-11843-0.
- Seatamanoch, N., Kongdachalert, S., Sunantaraporn, S., Siriyasatien, P., Brownell, N. 2022. Microsporidia, a highly adaptive organism and its host expansion to humans. *Front Cell Infect Microbiol*. 12, 924007. doi: 10.3389/fcimb.2022.924007.
- Tang, Y., Cao, L., Jin, J., Li, T., Chen, Y., Lu, Y., Li, T., Weiss, L.M., Pan, G., Bao, J., Zhou, Z. 2025. Single-cell transcriptional responses of T cells during microsporidia infection. *Commun Biol*. 8(1), 567. doi: 10.1038/s42003-025-07990-4.
- Trautwein-Weidner K, Gladiator A, Nur S, Diethelm P, LeibundGut-Landmann S. 2015. IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is independent of neutrophils. *Mucosal Immunol*. 8(2):221–31. doi:10.1038/mi.2014.57.

- Uhl LFK, Cai H, Oram SL, Mahale JN, MacLean AJ, Mazet JM, et al. 2023. Interferon- $\gamma$  couples CD8<sup>+</sup> T cell avidity and differentiation during infection. *Nat Commun.* 14(1):6727. doi:10.1038/s41467-023-42455-4.
- Ulusan Bagci, O., Muftuoglu, C., Guldaival, F., Serce Unat, D., Mert, U., Polat, G., Toz, S.O., Moon, M.H., Caner, A. 2023. Molecular prevalence of microsporidia infection in patients with lung cancer. *Am J Trop Med Hyg.* 108(5), 895-900. doi: 10.4269/ajtmh.22-0506.
- Wadi, L., Reinke, A.W. 2020. Evolution of microsporidia: an extremely successful group of eukaryotic intracellular parasites. *PLoS Pathog.* 16, e1008276. doi: 10.1371/journal.ppat.1008276.
- Wang, Z.D., Liu, Q., Liu, H.H., Li, S., Zhang, L., Zhao, Y.K., Zhu, X.Q. 2018. Prevalence of *Cryptosporidium*, microsporidia and *Isospora* infection in HIV-infected people: a global systematic review and meta-analysis. *Parasit Vectors.* 11(1), 28. doi: 10.1186/s13071-017-2558-x.
- Wasson, K., Peper, R.L. 2000. Mammalian microsporidiosis. *Vet. Pathol.* 37(2), 113-128. doi:1 [10.1354/vp.37-2-113](https://doi.org/10.1354/vp.37-2-113)