

**UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS HISTOQUÍMICAS E
IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO
MICROSPORÍDIO *Encephalitozoon cuniculi* EM
TECIDOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE**

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

PALOMA KELLY DE SOUZA BELO

São Paulo - SP

2018

**UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP
PROGRAMA DE MESTRADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS HISTOQUÍMICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO MICROSPORÍDIO
Encephalitozoon cuniculi EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE.**

Dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha.

PALOMA KELLY DE SOUZA BELO

São Paulo - SP
2018

Belo, Paloma Kelly de Souza.

Aplicação de metodologias histoquímicas e imuno-histoquímicas para quantificação do microsporídio *Encephalitozoon cuniculi* em tecidos de camundongos infectados experimentalmente / Paloma Kelly de Souza Belo. - 2018.

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

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

Área de concentração: Patogenia das enfermidades infecciosas e parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha.

1. Encefalitozoonose. 2. *Encephalitozoon cuniculi*.
3. Histopatológico. 4. Imuno-histoquímica. I. Rocha, Paulo Ricardo Dell'Armelina (orientador). II. Título.

PALOMA KELLY DE SOUZA BELO

**APLICAÇÃO DE METODOLOGIAS HISTOQUÍMICAS E IMUNO-HISTOQUÍMICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO MICROSPORÍDIO
Encephalitozoon cuniculi EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE.**

Dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em: 17/12/2018.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado
UNESP – Araçatuba

Profa. Dra. Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin
Universidade Paulista - UNIP

AGRADECIMENTOS

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

Ao Ricardo Belo (pai), que mesmo com todos os acertos e desacertos da vida não mediu esforços para que me fosse proporcionado às melhores oportunidades educacionais. Além de ser o meu único fã, ser a minha maior fonte de incentivo e o melhor e mais lindo pai do mundo.

A Lindivalda, primeira e mais importante professora, guerreira e mulher que conheço, que por sorte é a minha mãe, que desde sempre ensinou-me a importância de ler, estudar e buscar o meu próprio espaço, sendo minha fonte de inspiração e força.

Aos meus irmãos, Paôla, Ricardo e Ana Flávia, que mesmo com a distância se fizeram presentes, e sempre me apoiando, assim como meus tios, Thomas e Edna, que realizaram o papel de pai e mãe com conselhos e ensinamentos.

Ao Prof. Thiago César Reis Pereira, que desde a graduação visualizou potencial em mim, por diariamente me instigar a ser uma profissional melhor; e que por longo dos anos ser um dos principais incentivadores dos meus estudos. Muito obrigada por tudo!

Ao meu orientador, Prof. Dr Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha, pela paciência e por me proporcionar uma gama ímpar de conhecimento.

Agradeço à Universidade Paulista - UNIP, por me oferecer um ambiente criativo e amigável para os estudos. Sou grata a cada professor, principalmente às Prof.^a Anete, Prof.^a Beth, Prof.^a Selene, as colaboradoras Anuska, Ronald e Paulo à direção e à administração da instituição.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer aos amigos Shadai Griffith e Ayumi que fizeram parte dessa jornada “paulista”, e que me acolheram como membro de suas famílias. E a Andressa por ser o meu apoio, minha irmã e amiga quando não tinha mais ninguém por perto. À “família UNIP” que se fez presente diariamente, proporcionando conforto, alegria, cumplicidade e o mais importante, conhecimento. Muito obrigada, Luciane, Jessica, Suzana, Michele, Fabiana Toshie, Cleide, Débora, Thiago e Iramirton.

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

RESUMO

Encephalitozoon cuniculi é um fungo formador de esporos, patógeno intracelular obrigatório, que causa a doença oportunista encefalitozoonose, em ambos animais domésticos e selvagens, e em humanos imunocomprometidos. O diagnóstico clínico da encefalitozoonose é desafiador, pois a sintomatologia da doença é inespecífica e não exclui outras doenças concomitantes, sendo recomendado o uso de exames laboratoriais para o diagnóstico etiológico. O presente estudo objetivou utilizar as metodologias histoquímicas hematoxilina e eosina (HE), Gram-Chromotrope, Fluorescência Calcoflúor, e a imuno-histoquímica (IHQ) para *E. cuniculi* para a identificação e quantificação dos esporos de *E. cuniculi* no fígado e pulmões de camundongos infectados experimentalmente e imunossuprimidos com ciclofosfamida em diferentes doses. Todas as metodologias histoquímicas e IHQ acima mencionadas marcaram os esporos de *E. cuniculi*, entretanto, houve marcação inespecífica de outras estruturas nas metodologias HE, Calcoflúor e Gram-Chromotrope, impossibilitando a quantificação dos esporos. Além disso, foi verificada associação entre um maior número de esporos de *E. cuniculi* com maiores doses de ciclofosfamida. Os resultados indicam que a IHQ é um método eficaz e recomendado para o diagnóstico etiológico de *E. cuniculi*, e para a quantificação de *E. cuniculi* em amostras de tecidos com suspeita de encefalitozoonose. Devido à baixa sensibilidade e especificidade, sugerimos que as metodologias histoquímicas HE, Calcoflúor e Gram-Chromotrope sejam utilizadas como metodologias complementares ou de triagem para o diagnóstico etiológico da encefalitozoonose em amostras de tecidos com suspeita de encefalitozoonose.

Palavras-Chave: Encefalitozoonose, *Encephalitozoon cuniculi*, histopatologia, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Encephalitozoon cuniculi is a spore-forming fungus, an obligate intracellular pathogen, which causes encephalitozoonosis in domestic and wild animals and in immunocompromised humans. The clinical diagnosis of encephalitozoonosis is challenging, as the disease symptoms are nonspecific, not excluding other concomitant diseases. Thus, it is recommended to use laboratory exams for the etiological diagnosis. The present study aimed to use the histochemical methods hematoxylin and eosin (HE), Gram-Chromotrope, Fluorescence Calcofluor, and immunohistochemistry (IHC) for *E. cuniculi* for the identification and quantification of spores of *E. cuniculi* in the liver and lungs of infected and immunosuppressed mice. All histochemical and IHC methodologies used in the present study marked the spores of *E. cuniculi*, however, there were non-specific marking of other structures in the HE, Calcofluor and Gram-Chromotrope methodologies, not allowing for quantification of spores. In addition, an association between a higher number of spores of *E. cuniculi* with a higher dose of cyclophosphamide was observed. The results indicate that the IHC is an effective and recommended method for the etiological diagnosis of *E. cuniculi*, and for the quantification of *E. cuniculi* in tissue samples suspected with encephalitozoonosis. Due to the low sensitivity and specificity, we suggest that the histochemical methodologies HE, Calcofluor and Gram-Chromotrope should be used as complementary or screening methodologies for the etiological diagnosis of encephalitozoonosis in tissue samples suspected with encephalitozoonosis.

Keywords: Encephalitozoonosis, *Encephalitozoon cuniculi*, histopathology, immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1. Patógeno.....	12
2.2. Animais, infecção experimental e imunossupressão	12
2.3. Necropsia e coleta de amostras.....	13
2.4. Colorações histoquímicas.....	13
2.5. Imuno-histoquímica (IHQ).....	14
2.6. Histomorfometria.....	14
2.7. Análise estatística.....	15
2.8. Aspectos éticos.....	15
3. RESULTADOS.....	16
3.1. Fígado.....	16
3.1.1. Hematoxilina-Eosina.....	16
3.1.2. Gram-Chromothope.....	16
3.1.3. Fluorescência calcoflúor.....	16
3.1.4. Imuno-histoquímica.....	16
3.2. Pulmões.....	17
3.2.1. Hematoxilina-Eosina.....	17
3.2.2. Gram-Chromothope.....	17
3.2.3. Fluorescência calcoflúor.....	17
3.2.4. Imuno-histoquímica.....	18
3.3. Quantificação de esporos.....	24
3.4. Quantificação da área dos granulomas.....	25
4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

As microsporidioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por esporos pertencentes ao Reino Fungi e ao Filo Microsporidia, que contêm 140 gêneros e mais de 1200 espécies (Didier; Weiss, 2008). Todos os microsporídios são patógenos intracelulares obrigatórios. O principal gênero causador de doenças em mamíferos desse reino é o *Encephalitozoon*, e as três principais espécies são: *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* e *Encephalitozoon intestinalis* (Gotti, Gagliani, 2011). *E. cuniculi* infecta animais domésticos e silvestres (Kunzel et al., 2008; Pereira et al., 2009; Harcourt-Brown, 2010; Lallo et al., 2012a; Lallo et al., 2012b; Bártová et al., 2015; Tsukada et al., 2016), sendo capaz de causar infecções locais ou disseminadas (Mohindra et al., 2002; Goldsmith et al., 2013; Levine et al., 2013).

Com relação à replicação, os esporos de *E. cuniculi* se multiplicam dentro vacúolos parasitóforos por meio da reprodução assexuada (merogonia), seguidos por ruptura de células hospedeiras infectadas (Frazen, 2004). Em seguida, os esporos são liberados no espaço extracelular. Os esporos parasitam preferencialmente células epiteliais e macrófagos (Rebel-Bauder et al., 2011), e podem se disseminar para o encéfalo, rins, intestinos e pulmões, que são considerados os órgãos de maior tropismo dos esporos (Mathis et al., 2005; Csokai et al., 2009a; Leipzig et al., 2013). *E. cuniculi* possui um arcabouço de organelas intracelulares considerado rudimentar, o que obriga o parasitismo de células como condição para a replicação dos esporos (Katinka et al., 2001).

Os microsporídios são transmitidos principalmente através da via oro-fecal (Frazen, 2004). De fato, a infecção do hospedeiro ocorre principalmente após a ingestão de comida ou água contaminada com esporos, que por sua vez são eliminados pela urina e fezes de hospedeiros infectados (Mathis et al., 2005). Uma vez no trato digestório, os esporos entram em contato com a mucosa intestinal, infectando enterócitos e macrófagos adjacentes, sendo posteriormente transportados para o sangue e, subsequentemente para outros órgãos como os rins, encéfalo, fígado e coração (Harcourt-Brown, 2010).

A tentativa de diagnóstico clínico da encefalitozoonose é desafiadora. Em geral, o diagnóstico exclusivamente clínico não é possível, pois manifestações clínicas, como síndrome vestibular, uveíte facoclástica, gastroenterite, pneumonia,

hepatite e miocardite em animais (Jass et al., 2008; Benz et al., 2011; Leipzig et al., 2013; Tsukada et al., 2016), e sintomas como diarreia crônica, ceratoconjuntivites, hepatite, peritonite e nefrites em humanos, já foram relatados. Portanto, a sintomatologia da encefalitozoonose é variada e pode ser confundida com outras doenças (Brasil et al., 1997; Mohindra et al., 2002; Goldsmith et al., 2013; Levine et al., 2013). Assim, como a sintomatologia apresentada tanto por animais como por humanos é confundível com outras doenças, o diagnóstico exclusivamente clínico é limitado (Gruber et al., 2009; Goldsmith et al., 2013; Leipzig et al., 2013). Entretanto, quando a investigação é combinada com exames laboratoriais, se obtém o diagnóstico definitivo da encefalitozoonose (Kunzel et al., 2008; Csokai et al., 2009a; Csokai et al., 2009b).

De fato, a encefalitozoonose pertence ao grupo de doenças sub-diagnosticadas, principalmente devido à falta de experiência dos médicos e dos laboratórios de patologia (Goldsmith et al., 2013).

Alguns exames laboratoriais têm sido aplicados para o diagnóstico definitivo da encefalitozoonose, como testes sorológicos, que identificam as imunoglobulinas G e M para *E. cuniculi* no soro dos pacientes (Garcia, 2002; Desoubeaux et al., 2017). A sorologia por ELISA é uma metodologia alternativa para o diagnóstico presuntivo de infecção por *E. cuniculi* (Boot et al., 2000; Garcia, 2002; Jordan et al., 2006), sendo considerada uma técnica que pode ser bem aplicada na detecção da infecção em sua fase inicial (Csokai et al., 2009a). Entretanto, anticorpos para *E. cuniculi* e *E. intestinalis* foram encontrados em humanos com HIV, apresentando reação cruzada entre espécies de *Encephalitozoon* (Desoubeaux et al., 2017; Garcia, 2002). Portanto, a sorologia pode ser uma ferramenta para o diagnóstico da encefalitozoonose, mas pode haver resultados “falso-positivo” devido relatos de reação cruzada (Csokai et al., 2009a; Desoubeaux et al., 2017).

A biologia molecular tem sido utilizada como metodologia complementar para o diagnóstico etiológico das microsporidioses, sendo capaz de diferenciar as espécies e subespécies (genótipos), apresentando altas sensibilidade e especificidade. Além disso, a reação em cadeia da polimerase em tempo real pela transcrição reversa (qPCR, em inglês), permite a quantificação para determinação da carga parasitária de *E. cuniculi* (Rossi et al., 1998; Espy et al., 2006; Bastien et al., 2008; Csokai et al., 2009b; Moretto et al., 2015; Kotkova et al., 2018).

Ainda, diversas metodologias têm sido aplicadas para identificar

microsporídios em lesões histológicas, como as colorações histoquímicas para identificação de esporos de *E. cuniculi* (Joseph et al., 2006; Lallo et al., 2010; Rodriguez-Tovar et al., 2016). Os esporos podem ser identificados em exames histológicos, com a preparação de tecidos incluídos em parafina ou em resina plástica (Lallo et al., 2010). Há uma variedade de métodos especiais de coloração de esporos, conforme a seguir:

A técnica de hematoxilina-eosina (H-E) foi empregada para a identificação de esporos, e os esporos se apresentam de cor rósea, ligeiramente basofílica, e em pequena quantidade, sendo assim ignorados e podendo ser confundidos com estruturas celulares. A infecção por *E. cuniculi* só poderia ser sugerida após a observação da resposta inflamatória associada aos esporos (Lallo et al., 2010; Rodriguez-Tovar et al., 2016).

Gram-Chromotropo é uma técnica de coloração de Gram, aplicada nos cortes histológicos, capaz de identificar os esporos de *E. cuniculi* na cor púrpura ou violeta, contrastando com o fundo róseo, constatando com dificuldade a presença do *E. cuniculi* na lesão histológica (Lallo et al., 2010; Moura et al., 1996).

A coloração fluorescente de calcoflúor pode ser aplicada para a identificação de esporos, fluorescendo a cor azul brilhante com estruturas ovais bem definidos contra um fundo escuro, já os esporos maduros apareceram como estruturas ovóides, enquanto que os esporos imaturos ou vazios apareceram como estruturas em forma de anel (Francisco Neto et al., 2017; Rodriguez-Tovar et al., 2016). Entretanto, há relatos de que a técnica tem a vantagem de ser realizada em pouco tempo, porém apresenta vários resultados “falso-positivo”, podendo apresentar fluorescência inespecífica, o que compromete a detecção de esporos em tecidos (Didier et al., 1995; Lallo et al., 2010).

Adicionalmente, a imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica que permite a identificação de抗ígenos de *E. cuniculi* em amostras de tecidos ou células. A IHQ apresenta alta sensibilidade na identificação do patógeno nas lesões histológicas para confirmação do diagnóstico da encefalitozoonose (Habenbacher et al., 2012; Leipzig et al., 2013). A IHQ foi desenvolvida a partir de pesquisas em imunopatologia que começaram na década de 1940, porém somente em 1974, pela técnica de imunoperoxidase, foi possível utilizar a marcação de抗ígenos em tecidos (Chan, 2000; Ramos-Vara, Beissenherz, 2005). A IHQ tem por objetivo identificar o complexo抗ígeno-anticorpo em cortes de tecido por meio da utilização de

anticorpos específicos, uma vez que, antígeno-anticorpo ligam-se covalentemente. A visualização deste complexo é possível com o uso de cromógenos, como a diaminobenzidina (DAB) (Chan, 2000; Ramos-Vara, Beissenherz, 2005).

Existem poucos estudos sobre a identificação de *E. cuniculi*, bem como do diagnóstico da encefalitozoonose com a utilização da IHQ (Park et al., 1993; Giordano et al., 2005; Csokai et al., 2009b; Gruber et al., 2009; Rebel-Bauder et al., 2011; Habenbacher et al., 2012; Leipig et al., 2013). De fato, a IHQ foi utilizada com sucesso para diagnosticar uveítis, encefalites, nefrites e infecções em mamíferos com encefalitozoonose natural (Park et al., 1993; Giordano et al., 2005; Csokai et al., 2009b; Gruber et al., 2009; Rebel-Bauder et al., 2011; Habenbacher et al., 2012; Leipig et al., 2013). Em humanos, há apenas um relato de caso que utilizou a IHQ para o diagnóstico da encefalitozoonose em paciente receptor de transplante de rins e pulmões (Goldsmith et al., 2013).

A IHQ pode ser aplicada para a identificação *post mortem* de *E. cuniculi* nos olhos de coelhos com uveíte (Giordano et al., 2005). Além disso, a IHQ é recomendada como metodologia para a identificação de *E. cuniculi* em animais que vierem a óbito (Giordano et al., 2005; Csokai et al., 2009b; Gruber et al., 2009; Rebel-Bauder et al., 2011; Leipig et al., 2013).

O presente estudo objetivou utilizar metodologias histoquímicas e imuno-histoquímicas para quantificação dos esporos de *E. cuniculi* nas lesões em tecidos de camundongos infectados experimentalmente. O estudo foi realizado em amostras de fígado e pulmões de camundongos infectados experimentalmente com esporos de *E. cuniculi* e imunossuprimidos com ciclofosfamida em diferentes doses. Adicionalmente, também quantificamos as áreas dos granulomas, na tentativa de verificar uma associação entre a quantificação dos esporos com a resposta imune do hospedeiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Patógeno

Os esporos de *E. cuniculi* - obtidos da empresa Waterborne® Inc. (New Orleans, LA, USA) - foram cultivados em células RK-13 (Rabbit Kidney) no Laboratório de Culturas Celulares da Universidade Paulista. Para o desenvolvimento dos parasitos, as células RK foram mantidas em meio Eagle (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 10% de aminoácidos não-essenciais, 10% de piruvato e com o antibiótico gentamicina (20 mg/mL) em frascos (Nunc) com capacidade de 75 cm². As culturas de *E. cuniculi* foram incubadas com 5% de CO₂ à temperatura de 37°C, em intervalos de 7 dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 30 minutos à 500g para obtenção dos esporos contidos no sedimento, os quais foram armazenados a 4°C. Para a contagem dos esporos de *E. cuniculi*, foi utilizada uma câmara de Neubauer (Hornitzky, 2008).

2.2 - Animais, infecção experimental e imunossupressão.

Foram utilizados camundongos isogênicos SPF (*specific pathogen free*), machos, da linhagem C57BL/6, com 8-10 semanas de idade, obtidos no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil.

Os animais permaneceram no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista sob condições de temperatura (22 a 24°C) e umidade controladas (45 a 55%), com ciclo claro e escuro (12/12 horas), em microisoladores, onde receberam ração *ad libitum* peletizada irradiada e água esterilizada por autoclavagem.

Durante o período experimental de 28-30 dias, os animais foram divididos em 6 grupos com 5 animais cada. Os animais dos grupos infectados foram infectados pela via intravenosa na veia caudal com 1x10⁷ esporos de *E. cuniculi*, no volume 100µl, que foi diluído em PBS 1x (Lallo; Hirschfeld, 2012). Os animais dos grupos imunossuprimidos foram imunossuprimidos com ciclofosfamida (CY) pela via intraperitoneal uma vez por semana, o protocolo de imunossupressão foi adaptado

de Lallo e Hirschfeld (2012). Adicionalmente, também foi realizada infecção pela via intravenosa na veia caudal com 1×10^7 esporos de *E. cuniculi* e imunossupressão na dose de 250 mg/kg em um camundongo, que foi utilizado como controle positivo.

Os grupos experimentais estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 1. Relação dos grupos experimentais.

Grupos	Infecção	Imunossupressão
Grupo 1	1×10^7 de <i>E. cuniculi</i>	150 mg/ Kg de CY
Grupo 2	1×10^7 de <i>E. cuniculi</i>	75 mg/ Kg de CY
Grupo 3	1×10^7 de <i>E. cuniculi</i>	X
Grupo 4	X	150 mg/ Kg de CY
Grupo 5	X	75 mg/ Kg de CY
Grupo 6	X	X
Grupo controle positivo	1×10^7 de <i>E. cuniculi</i>	250 mg/ Kg de CY

2.3 - Necropsia e coleta de amostras

Após 28-30 dias pós-infecção (DPI) experimental, os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico com a utilização da associação de quetamina (100 mg/Kg), xilazina (2,5 mg/Kg) e acepromazina (2,5 mg/Kg) (Pompeu et al., 2017). Em seguida, foram colhidos fígado e pulmões de todos os grupos e animais descritos acima, que foram fixados em formol tamponado 10% por 48 horas, sendo posteriormente processados rotineiramente para a inclusão de tecidos em blocos de parafina para a microscopia de luz.

2.4 - Colorações histoquímicas

Os blocos dos tecidos em parafina foram cortados de forma seriada e em micrótomo ($4\mu\text{m}$), desparafinados rotineiramente e corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), que possui afinidade pelos ácidos nucleicos (Weber et al., 1992), Gram-Chromotropo que se liga a estruturas como o peptidoglicano (Moura et al., 1996), segundo protocolos já estabelecidos (Weber et al., 1992; Moura et al., 1996).

Para a técnica de coloração fluorescente de calcoflúor, que possui afinidade para quitina, as lâminas foram coradas com 5 mg de corante Calcoflúor branco (Sigma - Aldrich)/ mL de H_2O durante 3 min, lavados em água destilada e deixados a

temperatura ambiente para secar. Para a visualização e fotografia, foi utilizado um microscópio fluorescente Olympus BX 60 (Vávra et al., 1993; Francisco Neto et al., 2017).

2.5 - Imuno-histoquímica (IHQ)

A IHQ foi realizada utilizando o polímero HRP (kit de detecção de polímero Superpicture™, HRP, ThermoFisher Scientific). Resumidamente, amostras de tecidos cortados em lâminas de vidro silanizadas com 3µm de espessura foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) a 95°C por 15 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação das lâminas por 10 minutos em peróxido de hidrogênio a 3%, processo repetido duas vezes. O anticorpo (Ac) policlonal primário foi utilizado na diluição de 1: 1000, com IgG de coelho contra *E. cuniculi* (Cod. 18-4001-100, MEDICAGO, UPPSALA, SUÉCIA) durante 18 horas à 4°C. O anticorpo secundário anti-coelho foi aplicado por 30 minutos (ImmPRESS™ Universal Reagent Anti-Mouse/Rabbit IgG, Vector Laboratories, N. MP-7500) ligado ao complexo HRP, e foi visualizado pela reação com 3', 3' - diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. A hematoxilina de Mayer foi usada para contrastar os núcleos das células.

Todas as colorações foram realizadas em paralelo com amostras de tecidos controle positivo e negativo do anticorpo primário e secundário. Conforme descrito no item 2.2, o controle positivo da IHQ para *E. cuniculi* foi um (1) camundongo infectado com *E. cuniculi* e imunossuprimido com CY na dose de 250mg/kg pela via IP. Controle negativo do anticorpo primário foi incluído nos cortes histológico dos animais sem infecção e sem imunossupressão; Controle negativo do anticorpo secundário foram aqueles em que o anticorpo primário foi substituído por solução de PBS 1x.

2.6 - Histomorfometria

Todos os tecidos submetidos às metodologias descritas nos subtópicos 2.4 e 2.5 foram examinados em microscopia de luz. Em seguida, foram realizadas dez fotomicrografias de cada seção microscópio usando a objetiva de 40x mm². A média da área de esporos marcados em marrom, medida em pixels foi contada em sistema automatizado, pelo software Metamorph® (Molecular Devices, Estados Unidos) que foi calibrado com filtros de cores digitais que regulavam áreas vermelhas, verdes e azuis. Após o filtro ser estabelecido, o mesmo foi aplicado em todas os métodos de

colorações histoquímicas e na IHQ, de tal forma que apenas células positivas eram incluídas e a coloração de fundo era excluída da medição. Posteriormente, foi quantificada a área de granuloma encontrada nas lesões histológicas de cada metodologia aplicada no subtópico 2.4 para analisar a extensão das lesões encontradas (Amaral et al., 2016).

2.7 - Análises estatísticas

Os dados foram analisados pela variância (ANOVA) de uma via, com o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Em todos os casos, os valores $p \leq 0.05$ foram considerados significativos. As análises estatísticas foram processadas no software Graph Pad Prism 5 e 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

2.8 - Aspectos éticos

Todos os experimentos foram aprovados pelas Comissões de Ética no Uso Animais (CEUA) da UNESP de Araçatuba (FOA-201400578) e UNIP (043 /18). Este estudo foi desenvolvido considerando os aspectos éticos pertinentes a pesquisas envolvendo animais conforme o acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, que estabelece normas para a prática que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os experimentos foram realizados no Biotério de roedores da UNIP-SP.

3. RESULTADOS

3.1 - Fígado

3.1.1 - Hematoxilina-Eosina (HE)

No fígado foi observada hepatite granulomatosa multifocal em todos os grupos infectados (Figura 1). Além disso, no fígado de todos animais dos grupos imunossuprimidos, foi observada rarefação difusa no citoplasma dos hepatócitos (dados não ilustrados).

A coloração HE marcou os esporos de *E. cuniculi* em tonalidade basofílica (roxo/púrpura). Além disso, também foram observados aglomerados ou “clusters” de esporos (Figura 1 A e B). Adicionalmente, nas áreas adjacentes ao processo inflamatório do grupo 1, também foi observada degeneração e morte celular, provavelmente por necrose. A quantidade de células inflamatórias (predominantemente macrófagos) presentes nas lesões hepáticas variou conforme a dose de imunossupressão, ver resultados 3.3 e 3.4).

Entretanto, a coloração HE também marcou outras estruturas com cor e tonalidade similares aos esporos de *E. cuniculi*, impossibilitando a quantificação e histomorfometria exclusivamente dos esporos. A HE foi útil para quantificar as áreas de granulomas nas lesões encontradas.

3.1.2 - Gram-Chromothope

A coloração Gram-Chromothope foi empregada nos cortes histológicos, permitindo identificar esporos multifocais de *E. cuniculi*, que se apresentavam na tonalidade rósea ou fúcsia, contrastando com o fundo róseo. Entretanto, a coloração Gram-Chromothope também marcou outras estruturas com cor e tonalidade como hemácias e células adjacentes, impossibilitando a quantificação e histomorfometria exclusivamente dos esporos (Figura 2 C e D).

3.1.3 - Fluorescência calcoflúor

Ao utilizar a coloração fluorescência calcoflúor nos cortes histológicos, observou-se marcação dos esporos de *E. cuniculi* na cor azul fluorescente em pequena quantidade, com distribuição multifocal. Além disso, foi observada afinidade do corante com outras estruturas que não são compatíveis com a morfologia dos esporos, provocando importante fluorescência inespecífica (Figura 1 D e F), o que impossibilitou a quantificação e histomorfometria exclusivamente dos esporos.

3.1.4 - Imuno-histoquímica

Com a aplicação da IHQ em cortes histológicos de fígado, foi possível observar os esporos de *E. cuniculi* na cor marrom (Figura 2 G e H). No fígado dos animais do grupo 1, 2 e 3 foi possível observar associação das lesões histopatológicas (hepatite granulomatosa multifocal) com os esporos de *E. cuniculi* (Figura 4 A-D). Além disso, no fígado dos animais do grupo 2, foram observados esporos de *E. cuniculi* em pequena quantidade (Figura 4 C). Ainda, no fígado dos animais do grupo 3, foram observados esporos esparsos de *E. cuniculi* (Figura 4 D).

3.2 - Pulmões

3.2.1 - Hematoxilina-Eosina (HE)

Nos pulmões, foi observada pneumonia granulomatosa e intersticial multifocal apenas nos grupos infectados e imunossuprimidos com CY, caracterizada por infiltrado de células compatíveis com macrófagos (Figura 1 D, E, F e Figura 3). Adicionalmente, nas áreas adjacentes ao processo inflamatório do grupo 1, também foi observada degeneração e morte celular, provavelmente por necrose.

Os esporos (roxo/púrpura) de *E. cuniculi* foram observados nos pulmões na tonalidade basofílica.

Nos pulmões do animal grupo controle positivo, também foi observada bronquiolite multifocal associada a esporos basofílicos no citoplasma das células epiteliais dos bronquíolos, bem como no espaço extracelular adjacente (Figura 6 A, B). Entretanto, a coloração HE também marcou outras estruturas com cor e tonalidade similares aos esporos *E. cuniculi* (Figura 1D, E e F), impossibilitando a quantificação e histomorfometria exclusivamente dos esporos, mas foi possível quantificar a área de granulomas das lesões encontradas.

3.2.2 - Gram-Chromothope

A coloração Gram-Chromothope foi empregada nos cortes histológicos, permitindo identificar esporos multifocais de *E. cuniculi*, que se apresentavam na tonalidade rósea ou fúcsia, contrastando com o fundo róseo, ligeiramente esbranquiçado, no fígado e nos pulmões dos grupos 1 e 2, bem como no animal controle positivo. Entretanto, a coloração Gram-Chromothope também marcou outras estruturas com cor e tonalidade similares aos esporos *E. cuniculi* como hemácias (Figura 3 C e D), impossibilitando a quantificação e histomorfometria exclusivamente dos esporos.

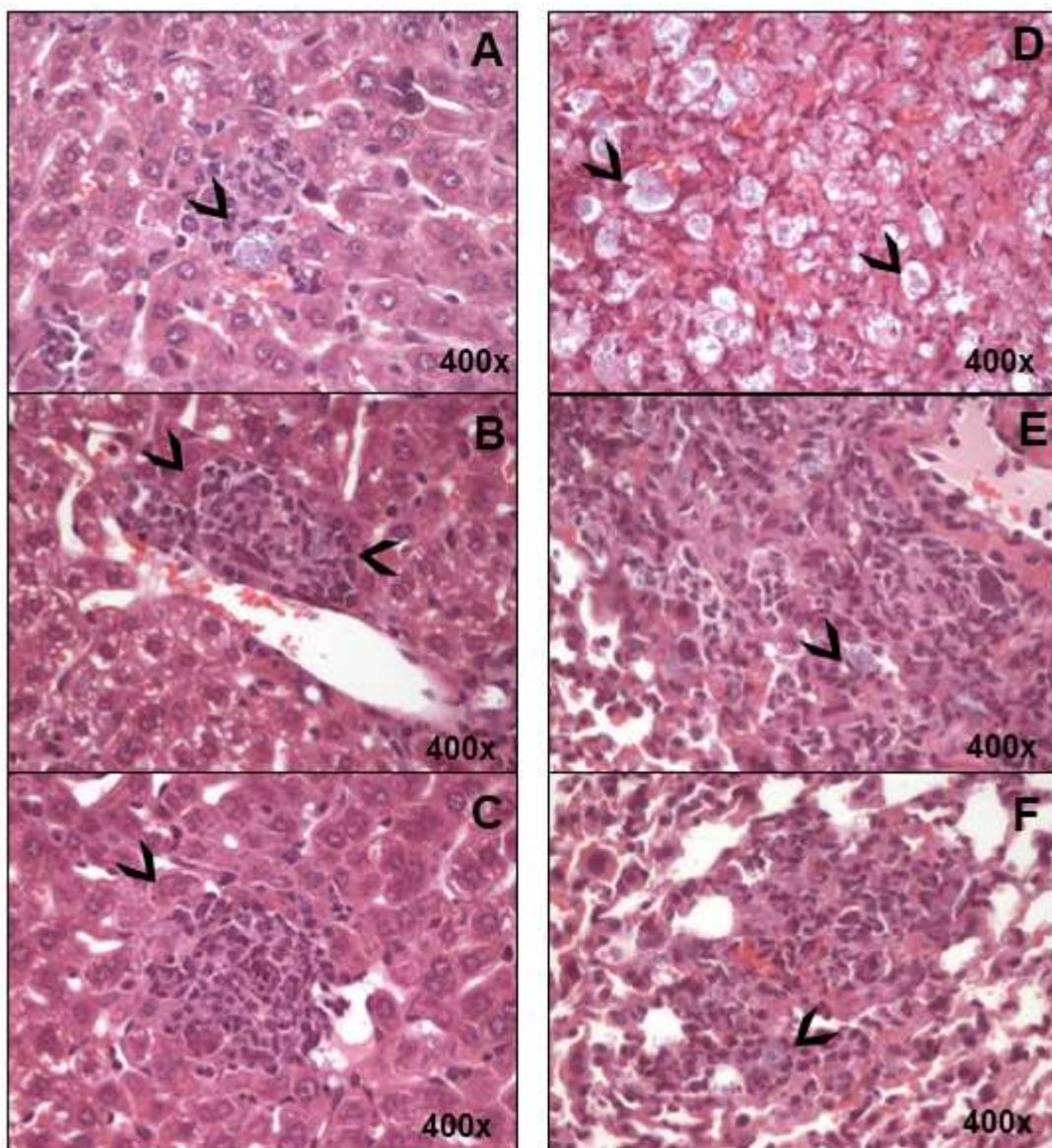
3.2.3 - Fluorescência calcoflúor

Ao utilizar a coloração fluorescência calcoflúor nos cortes histológicos, observou-se marcação dos esporos de *E. cuniculi* na cor azul fluorescente em pequena quantidade, com distribuição multifocal, tanto no fígado como nos pulmões, dos animais dos grupos 1 e 2. Além disso, foi observada afinidade do corante com outras estruturas que não são compatíveis com a morfologia dos esporos, provocando importante fluorescência inespecífica (Figura 3 E e F), o que impossibilitou a quantificação e histomorfometria exclusivamente dos esporos.

3.2.4 - Imuno-histoquímica

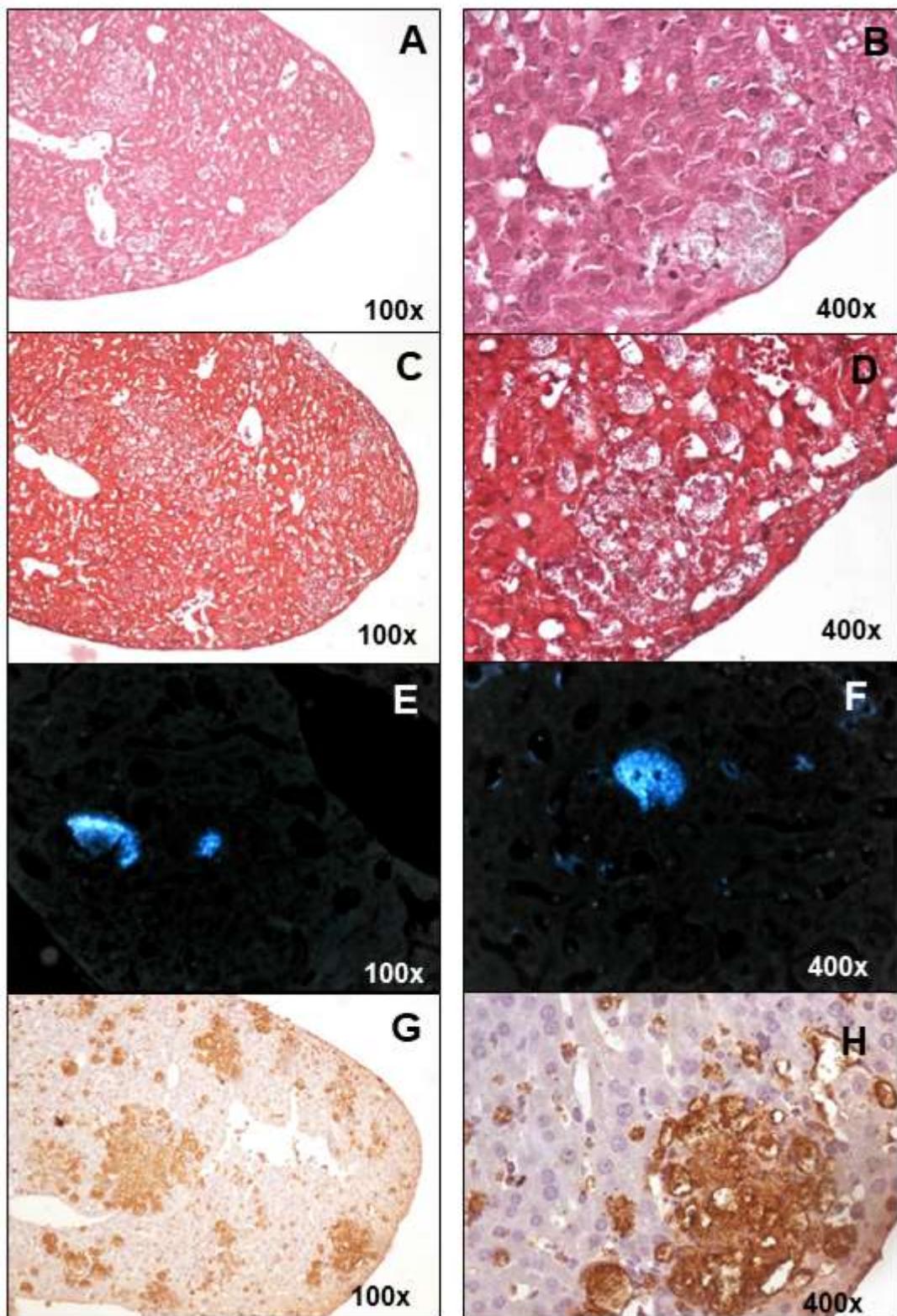
Nos pulmões do animal controle positivo (Figura 3 G e H) e dos grupos 1 e 2, foram observados esporos *E. cuniculi*, possivelmente dentro de pneumócitos, macrófagos e também nas células epiteliais dos bronquíolos. Também foi observada a proliferação disseminada de esporos de *E. cuniculi* (Figura 5 A, B e C). No grupo 3, não foi observada lesão histológica associada a presença dos esporos nos pulmões (Figura 5 D). Nos pulmões do animal grupo controle positivo, também foi observada bronquiolite multifocal associada a esporos basofílicos no citoplasma das células epiteliais dos bronquíolos, bem como no espaço extracelular adjacente (Figura 6 C e D).

Figura 1. Fotomicrografias representativas de HE para *E. cuniculi* no fígado e pulmões de camundongos infectados experimentalmente.



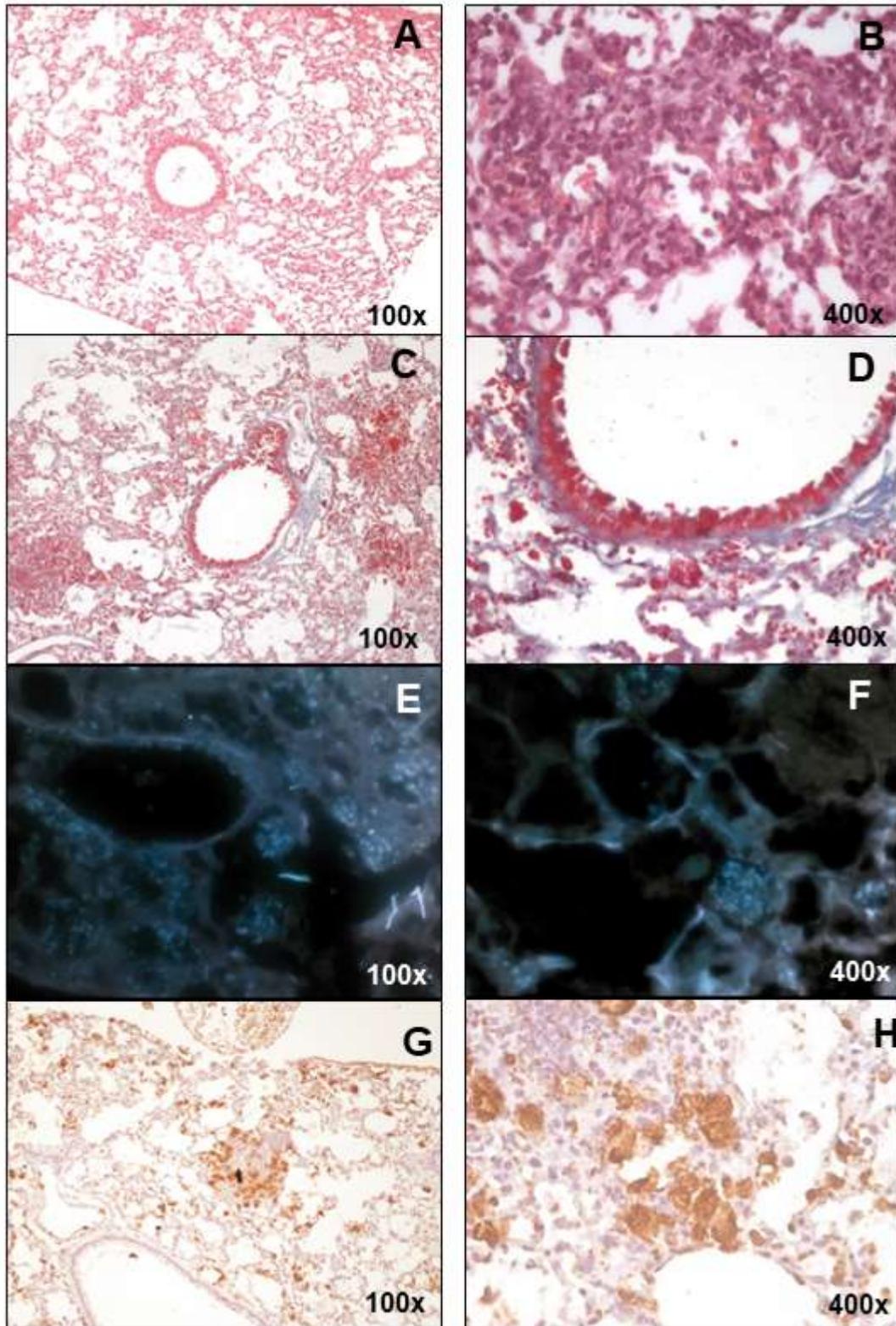
Legendas: Cortes histológicos de fígado e pulmões incluídos em parafina e corados com HE. **A e B)** Fígado, grupo 1, hepatite multifocal granulomatosa associada a esporos basofílicos de *E. cuniculi* (cabeça de seta) **C)** Fígado, grupo 2, hepatite multifocal granulomatosa (cabeça de seta). **D e E)** Pulmões, grupo controle positivo, pneumonia granulomatosa multifocal associada a esporos basofílicos de *E. cuniculi* (cabeça de seta) **F)** Pulmões, grupo 3, pneumonia granulomatosa multifocal.

Figura 2. Fotomicrografias representativas do fígado de camundongos infectados experimentalmente com esporos de *E. cuniculi*.



Legendas: Cortes histológicos de fígado incluídos em parafina **A e B)** Controle positivo, coloração Gram-Chromothope, hepatite multifocal granulomatosa. **C e D)** Controle positivo, coloração HE, hepatite multifocal granulomatosa. **E e F)** Controle positivo, coloração fluorescência calcoflúor, hepatite multifocal granulomatosa. **G e H)** Controle positivo, IHQ, hepatite multifocal granulomatosa.

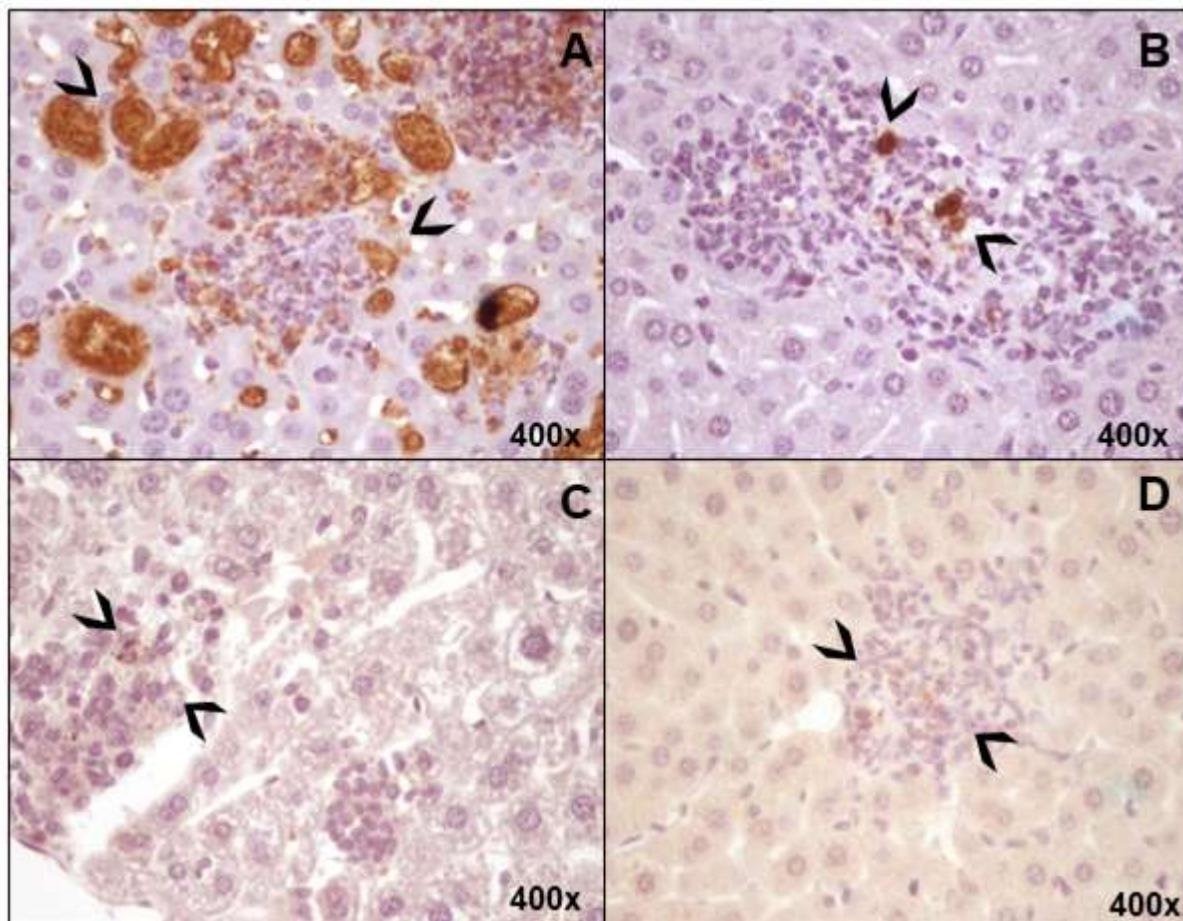
Figura 3. Fotomicrografias representativas dos pulmões de camundongos infectados experimentalmente com esporos de *E. cuniculi*.



Legendas: Cortes histológicos dos pulmões incluídos em parafina **A e B)** Controle positivo, coloração

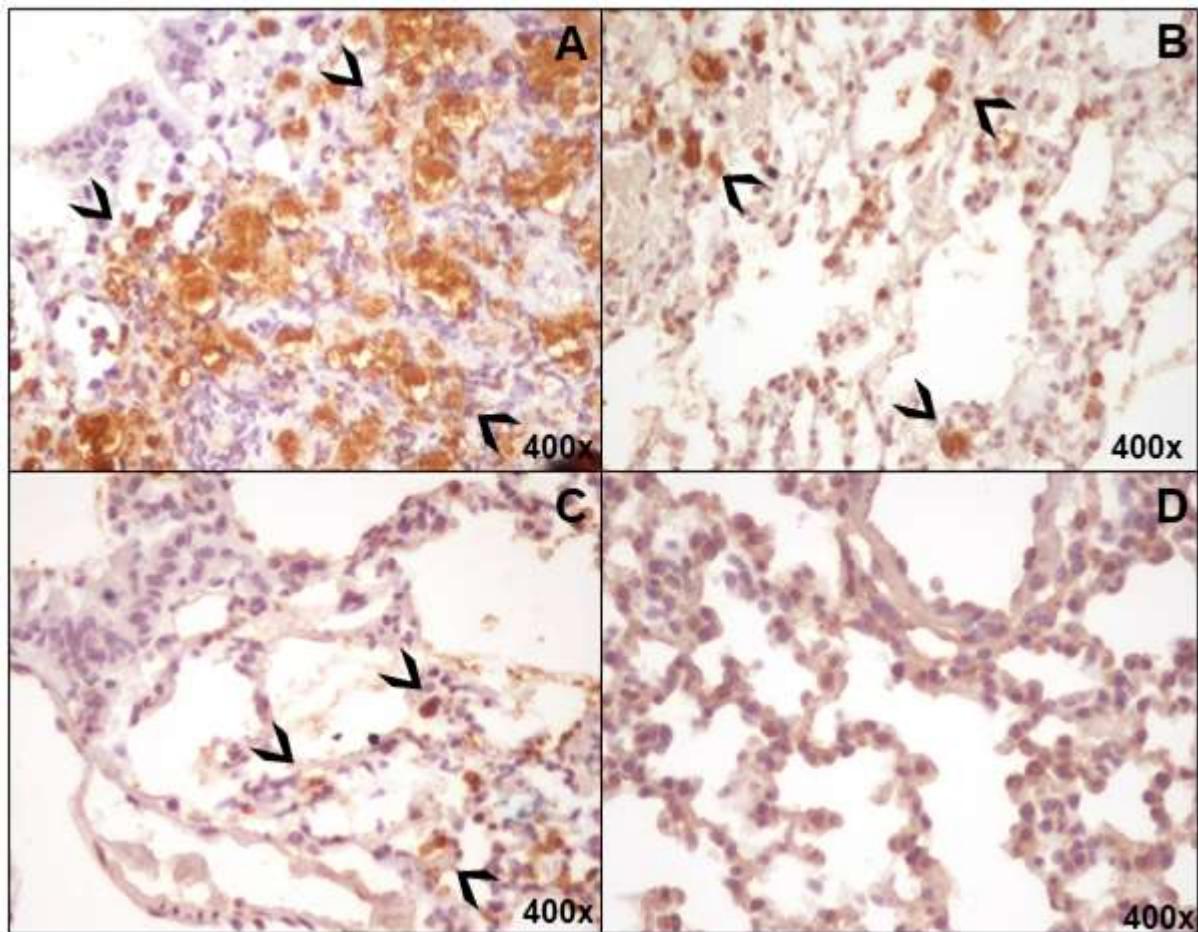
Gram-Chromothope, pneumonia multifocal granulomatosa. **C e D)** Controle positivo, coloração HE, pneumonia multifocal granulomatosa. **E e F)** Controle positivo, coloração fluorescência calcoflúor, pneumonia multifocal granulomatosa. **G e H)** Controle positivo, IHQ, pneumonia multifocal granulomatosa.

Figura 4. Fotomicrografias representativas de IHQ para *E. cuniculi* no fígado de camundongos infectados experimentalmente.



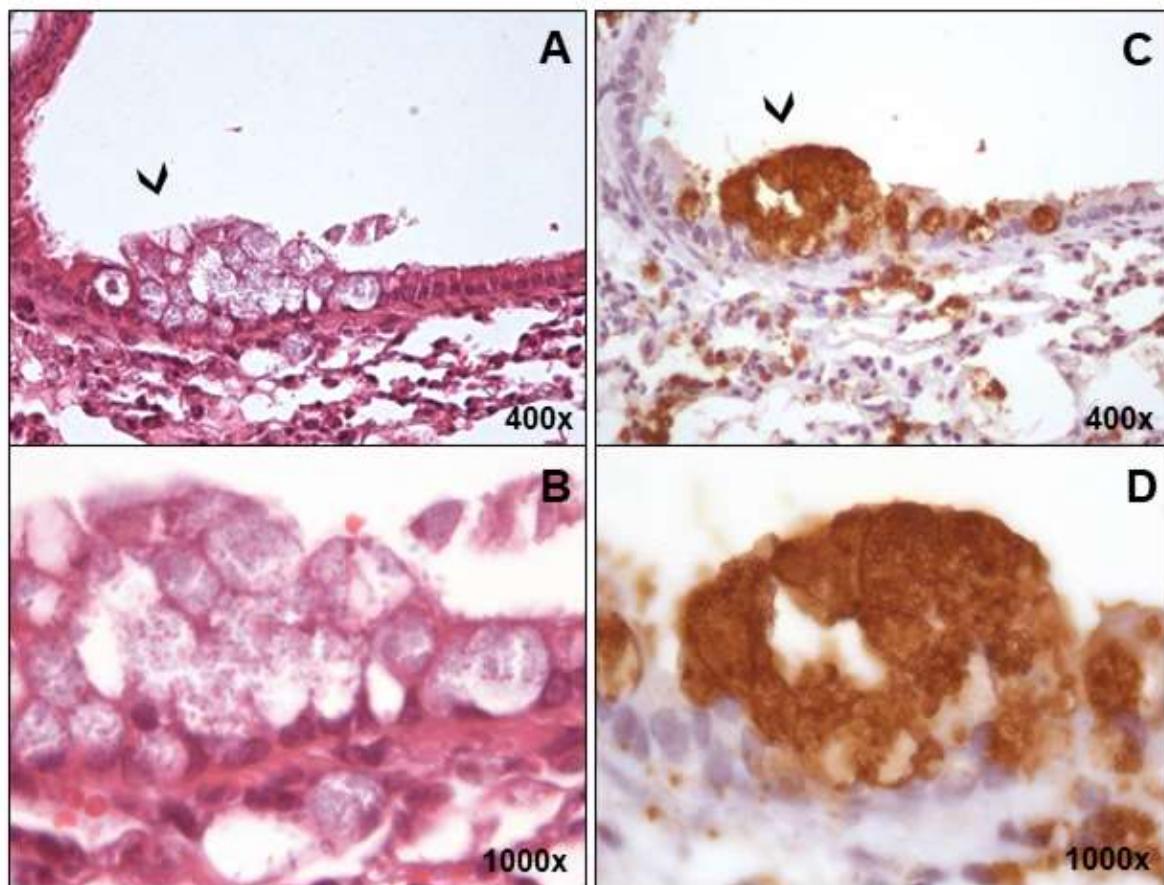
Legendas: Cortes histológicos de fígado incluídos em parafina e corados com IHQ para *E. cuniculi*. **A)** Fígado, grupo controle positivo, clusters de esporos de *E. cuniculi* na cor marrom (cabeça de seta). **B)** Fígado, grupo 1, hepatite granulomatosa multifocal associada a esporos de *E. cuniculi* na cor marrom (cabeça de seta). **C)** Fígado, grupo 2, hepatite granulomatosa multifocal associada a esporos de *E. cuniculi* na cor marrom (cabeça de seta). **D)** grupo 3, foram observados esporos esparsos (cabeça de seta). Fotomicrografia de IHQ (coloração com cromógeno DAB, contra-corado com Hematoxilina de Mayer).

Figura 5. Fotomicrografias representativas de IHQ para *E. cuniculi* nos pulmões de camundongos infectados experimentalmente.



Legendas: Cortes histológicos de pulmões incluídos em parafina e corados com IHQ para *E. cuniculi*. **A)** Pulmões, grupo controle positivo, clusters de esporos de *E. cuniculi* na cor marrom (cabeça de seta). **B)** Pulmões, grupo 1, hepatite granulomatosa multifocal associada a esporos de *E. cuniculi* na cor marrom (cabeça de seta). **C)** Pulmões, grupo 2, pneumonia granulomatosa multifocal associada a esporos de *E. cuniculi* na cor marrom (cabeça de seta). **D)** Pulmões, grupo 3, ausência de marcação para *E. cuniculi*. Fotomicrografia de IHQ (coloração com cromógeno DAB, contra-corado com Hematoxilina de Mayer).

Figura 6. Fotomicrografias representativas de bronquiolite por *E. cuniculi* nos pulmões de camundongo infectado experimentalmente.



Legendas: Cortes histológicos de pulmões incluídos em parafina e corados com IHQ e HE para *E. cuniculi*. **A e B)** HE, grupo controle positivo, clusters de esporos de *E. cuniculi* na cor roxo/púrpura nos bronquíolos (cabeça de seta). **C e D)** IHQ, grupo controle positivo, clusters de esporos de *E. cuniculi* na cor marrom nos bronquíolos (cabeça de seta). Fotomicrografia de IHQ (coloração com cromógeno DAB, contra-corado com Hematoxilina de Mayer) e HE.

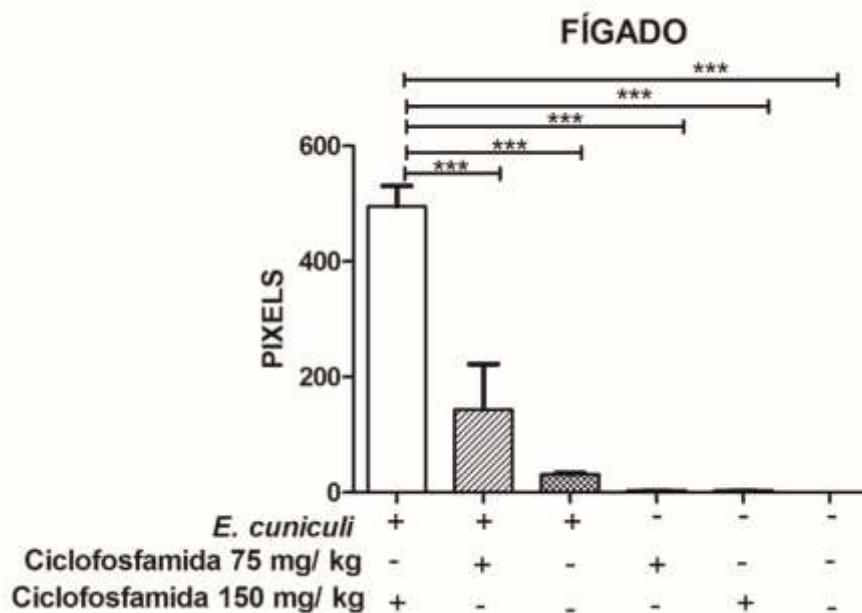
3.3 - Quantificação de esporos de *E. cuniculi*

Conforme descrito anteriormente, não é recomendado utilizar as técnicas de colorações histoquímicas HE e Gram-Chromothope, fluorescência de calcoflúor para a histomorfometria, pois as técnicas apresentaram resultados “falso-positivos” na marcação de esporos de *E. cuniculi* e de outras estruturas.

Com a IHQ, foi possível quantificar esporos de *E. cuniculi* no fígado e pulmões e realizar a histomorfometria através do software Metamorph®. No fígado do grupo dos animais infectados e imunossuprimidos com CY na dose de 150 mg/kg, foi observada diferença estatisticamente significativa na quantificação dos pixels dos esporos de *E. cuniculi* ($p < 0,001$) (Figura 7).

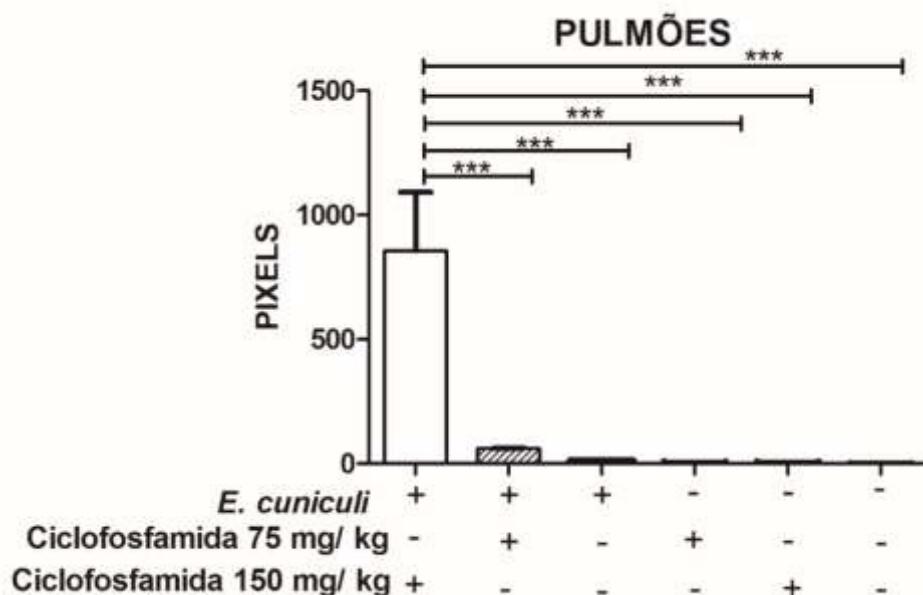
Nos pulmões do grupo dos animais infectados e imunossuprimidos com CY na dose de 150 mg/kg, foi observada diferença estatisticamente significativa na quantificação dos pixels dos esporos *E. cuniculi* ($p < 0,001$) (Figura 8).

Figura 7. Quantificação do total de pixels dos esporos de *E. cuniculi* no fígado.



Legenda: Contagem total em pixels de esporos (representados como média \pm desvio padrão) no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com CY (+) ou não (-) e inoculado (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Os dados foram analisados pela metodologia ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey-Kramer. Os asteriscos mostram diferenças significativas para comparações entre o grupo com dose de ciclofosfamida de 150mg/kg e infecção versus demais grupos. As barras ilustram as diferenças estatísticas entre grupos. *** $p < 0,001$.

Figura 8. Quantificação do total de pixels dos esporos de *E. cuniculi* nos pulmões.



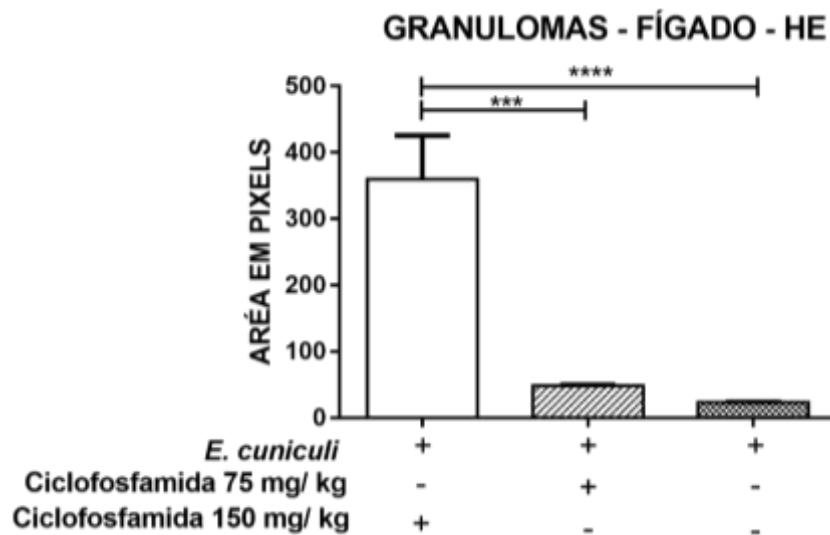
Legenda: Contagem total em pixels de esporos (representados como média ± desvio padrão) no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com CY (+) ou não (-) e inoculado (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Os dados foram analisados pela metodologia ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey-Kramer. Os asteriscos mostram diferenças significativas para comparações entre o grupo com dose de cyclofosfamida de 150mg/kg e infecção versus demais grupos. As barras ilustram as diferenças estatísticas entre grupos. *** p <0,001.

3.4- Quantificação da área dos granulomas

Com a coloração HE e a IHQ, foi possível quantificar extensão das lesões encontradas associadas aos esporos de *E. cuniculi* no fígado e pulmões através da área de granulomas com o uso do software Metamorph® (Figuras 9-12).

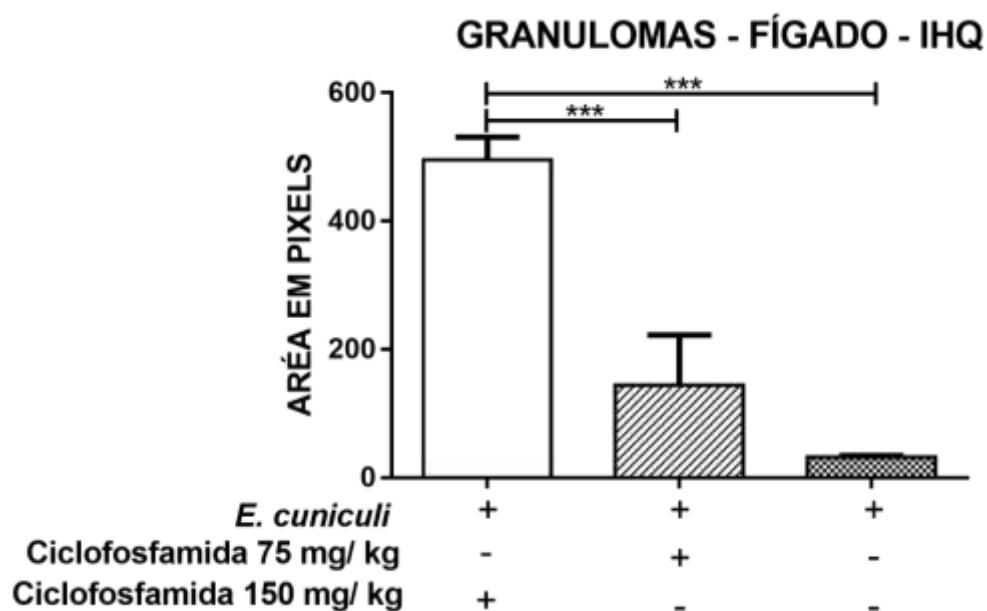
Conforme já mencionado, as colorações Gram-Chromothope e fluorescência de calcoflúor não foram utilizadas para a quantificação de granuloma, pois, não foi possível definir as áreas de granuloma sem a marcação de outras estruturas, como hemácias e outras células adjacentes.

Figura 9. Quantificação da área dos granulomas no fígado por HE.



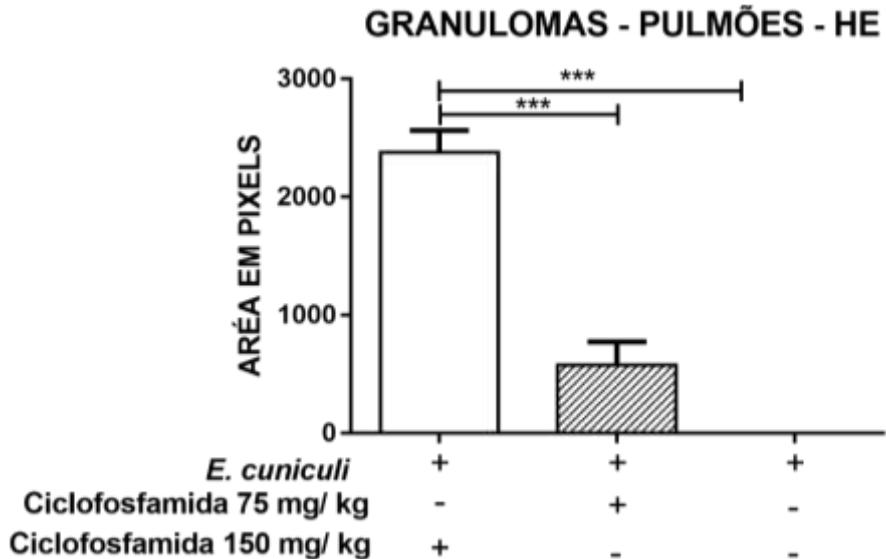
Legenda: Contagem total em pixels da área de granulomas (representados como média ± desvio padrão) no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com CY (+) ou não (-) e inoculado (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Os dados foram analisados pela metodologia ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey-Kramer. Os asteriscos mostram diferenças significativas para comparações entre o grupo com dose de ciclofosfamida de 150mg/kg e infecção versus demais grupos. As barras ilustram as diferenças estatísticas entre grupos. *** p <0,001.

Figura 10. Quantificação da área dos granulomas no fígado por IHQ.



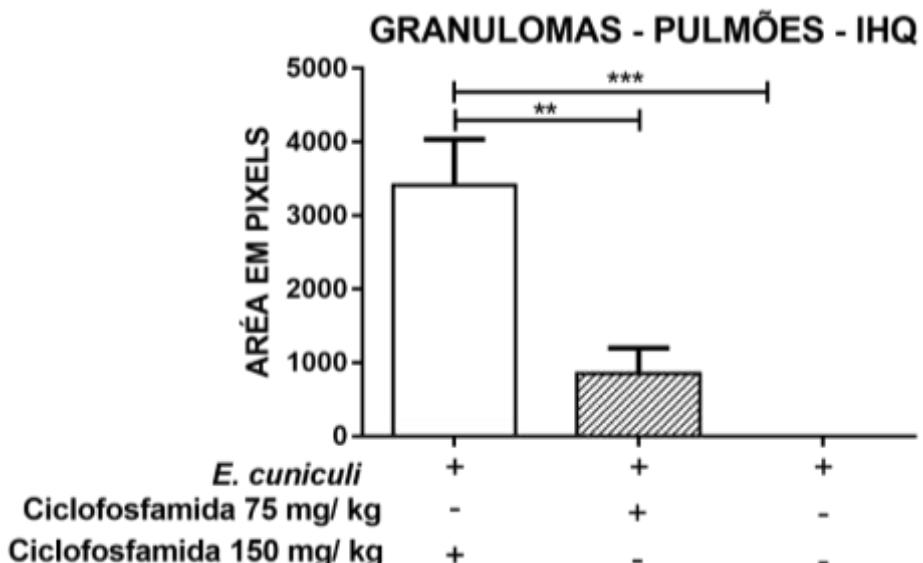
Legenda: Contagem total em pixels da área de granulomas (representados como média ± desvio padrão) no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com CY (+) ou não (-) e inoculado (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Os dados foram analisados pela metodologia ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey-Kramer. Os asteriscos mostram diferenças significativas para comparações entre o grupo com dose de ciclofosfamida de 150mg/kg e infecção versus demais grupos. As barras ilustram as diferenças estatísticas entre grupos. *** p <0,001.

Figura 11. Quantificação da área dos granulomas nos pulmões por HE.



Legenda: Contagem total em pixels da área de granulomas (representados como média ± desvio padrão) no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com CY (+) ou não (-) e inoculado (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Os dados foram analisados pela metodologia ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey-Kramer. Os asteriscos mostram diferenças significativas para comparações entre o grupo com dose de ciclofosfamida de 150mg/kg e infecção versus demais grupos. As barras ilustram as diferenças estatísticas entre grupos. *** p <0,001.

Figura 12. Quantificação da área dos granulomas nos pulmões por IHQ.



Legenda: Contagem total em pixels da área de granulomas (representados como média ± desvio padrão) no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com CY (+) ou não (-) e inoculado (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Os dados foram analisados pela metodologia ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey-Kramer. Os asteriscos mostram diferenças significativas para comparações entre o grupo com dose de ciclofosfamida de 150mg/kg e infecção versus demais grupos. As barras ilustram as diferenças estatísticas entre grupos. *** p <0,001.

4. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o microsporídio *E. cuniculi* tem sido detectado em uma variedade de espécies animais, incluindo o ser humano, nos quais a infecção por este parasito pode causar grave doença (Harcourt-Brown, 2010; Künzel et al., 2008; Valencakova et al., 2008). Assim, a importância atribuída às microsporidioses, principalmente a encefalitozoonose, tem aumentado (Valencakova et al., 2008). As infecções causadas pelos microsporídios são inicialmente assintomáticas, e os sinais clínicos desenvolvem-se no curso da infecção (Harcourt-Brown, 2010). Além disso, o desenvolvimento da encefalitozoonose depende de vários fatores, como a via de infecção, genótipo de microsporídio e da resposta imune de cada indivíduo (Kotkova et al., 2018). Em camundongos imunocompetentes, como o C57BL/6 e BALB/c, a infecção por *E. cuniculi* permanece aparentemente assintomática e latente, desde que haja um equilíbrio entre a multiplicação do patógeno e a resposta imune do hospedeiro. Entretanto, camundongos imunocomprometidos, como SCID ou camundongos atípicos desenvolvem doença aguda e potencialmente fatal (Lallo et al., 2002; Lallo; Hirschfeld, 2012; Da Costa et al., 2017; Kotkova et al., 2017; 2018). No presente trabalho, foram utilizados diferentes métodos para identificar e quantificar os esporos de *E. cuniculi*. De acordo com a literatura, ainda não foram realizados estudos sobre a quantificação de esporos de *E. cuniculi* por IHQ em modelos experimentais *in vivo*, particularmente no fígado e nos pulmões.

No presente estudo, verificamos que a coloração HE permitiu a visualização de clusters dos esporos, bem como identificou morfológicamente os esporos com mais facilidade nas lesões no fígado e pulmões de camundongos infectados experimentalmente com *E. cuniculi*. Estudos anteriores também relataram a marcação dos esporos com a HE (Joseph et al., 2006; Lallo et al., 2010; Rodriguez-Tovar et al., 2016; 2017). Entretanto, a coloração HE também pode marcar estruturas como leveduras, sendo necessária a utilização de outras colorações para complementar a identificação dos esporos (Joseph et al., 2006). Os esporos foram observados na cor roxo/ púrpura, devido o corante hematoxilina ter afinidade por ácidos nucleicos, como DNA, RNA ou a proteína quitina da porção externa nos esporos (Vávra et al., 1993).

Dentre as várias técnicas de coloração histológicas disponíveis para marcação de esporos de *E. cuniculi*, as colorações Gram, Tricrômica modificada e fluorescência de calcoflúor, são as mais indicadas para identificar os esporos em tecidos de coelhos infectados naturalmente por *E. cuniculi*. Entretanto, também foi relatada marcação inespecífica de fundo, o que pode dificultar a visualização e diferenciação do patógeno em tecidos (Dider et al., 1995; Joseph et al., 2006; Lallo et al., 2010; Rodriguez-Tovar et al., 2016; 2017). No presente estudo, as colorações histoquímicas também marcaram inespecificamente estruturas não compatíveis morfologicamente com os esporos *E. cuniculi*, como hemárias e células adjacentes.

As colorações HE, Gram-Chromotrope e calcoflúor são metodologias econômicas e recomendadas para identificar esporos de *E. cuniculi*, e podem auxiliar no diagnóstico da encefalitozoonose (Joseph et al., 2006). Entretanto, não são metodologias com alta sensibilidade e especificidade para a identificação os esporos, como a IHQ (Rebel-Bauder et al., 2011; Habenbacher et al., 2012; Leipig et al., 2013).

A literatura científica já demonstrou que a IHQ foi eficaz para diagnosticar encefalites, uveítes, hepatites e nefrites causadas por *E. cuniculi in situ* (Park et al., 1993; Giordano et al., 2005; Gruber et al., 2009; Rebel-Bauder et al., 2011; Habenbacher et al., 2012; Leipig et al., 2013). Entretanto, estudos que utilizaram a IHQ para identificação dos esporos de *E. cuniculi* não descreveram detalhadamente a caracterização da associação do patógeno com o processo inflamatório no fígado e nos pulmões (Park et al., 1993; Giordano et al., 2005; Gruber et al., 2009; Rebel-Bauder et al., 2011; Habenbacher et al., 2012; Leipig et al., 2013).

Estudos sobre a infecção natural por *E. cuniculi* em coelhos demonstraram que ocorre inflamação principalmente no encéfalo, fígado e pulmões, caracterizado por infiltrado inflamatório composto por células compatíveis com macrófagos, além de linfócitos e plasmócitos (Csokai et al., 2009b; Gruber et al., 2009; Leipig et al., 2013). Em coelhos, o patógeno causou pneumonia intersticial linfoplasmocitária associada a infiltrados granulomatosos em 37% dos casos. Já no fígado, foram observados infiltrados granulomatosos em 16% dos casos, e hepatite linfoplasmocitária periportal em 95% dos casos (Leipig et al., 2013). Além disso, em coelhos, na infecção experimental de *E. cuniculi* pela via retal, foi observada hepatite multifocal e acentuada (Fuentealba et al., 1992). Portanto, a histopatologia indica que ocorre a ativação tanto da imunidade inata quanto adaptativa em resposta ao

processo infeccioso. Os resultados de histopatologia do presente estudo indicam que a imunossupressão por CY contribuiu para a linfotoxicidade, que foi associada à predominância de macrófagos, facilitando a disseminação do patógeno no fígado e pulmões no período experimental. De fato, a CY é citotóxica, principalmente linfotoxicidade e hepatotóxica (Deleve et al., 1996; Paul et al., 2001; Gilbar et al., 2012; Subramaniam et al., 2013). Ainda, os resultados do presente estudo indicam que a disseminação dos esporos de *E. cuniculi* é dependente da dose de CY, tanto no fígado como nos pulmões dos camundongos infectados experimentalmente. Estudos anteriores identificaram uma maior susceptibilidade a encefalitozoonose nos animais infectados e tratados com ciclofosfamida (Lallo; Hirschfeld, 2012; Da Costa et al., 2017; Francisco Neto et al., 2017).

De acordo com Lallo et al. (2002), o fígado foi o órgão mais afetado pela infecção intra-peritoneal por *E. cuniculi* em camundongos Balb-C e imunossuprimidos com dexametasona. As lesões foram caracterizadas por inflamação granulomatosa no fígado. Adicionalmente, após 35 dias de infecção intra-peritoneal, foi observado nos pulmões, infiltrado inflamatório multifocal. No presente estudo, foram observadas proporcionalmente mais lesões nos pulmões do que no fígado, e essas lesões foram associadas a uma maior quantificação do patógeno nos grupos de animais infectados e imunossuprimidos (Figura 7 e 8).

Os resultados do presente estudo ainda demonstram que no grupo apenas infectados por *E. cuniculi* e sem imunossupressão, foram observados no fígado poucos esporos aos 28-30 dias pós infecção. Entretanto, recentemente foi demonstrado que a patogenicidade/virulência de *E. cuniculi* não está exclusivamente associada a carga ou quantificação dos esporos, sendo o genótipo de *E. cuniculi* outro importante fator na determinação da virulência da encefalitozoonose (Kotkova et al., 2018).

A hibridização *in situ* (HIS) é uma técnica que permite relacionar a presença de genes e seus transcritos com os processos patológicos (Valenzuela et al., 2006; Wilkinson, 1995). Contudo, quando a HIS foi comparada a IHQ para a identificação de esporos de *E. cuniculi*, foi observado que a camada externa de quitina dos esporos dificulta marcação dos mesmos pela HIS (Habenbacher et al., 2012). O sucesso da metodologia IHQ para a marcação dos esporos de *E. cuniculi* provavelmente está relacionado a capacidade do anticorpo primário conseguir se ligar covalentemente às proteínas da parede dos esporos, que estão presentes em

todas as fases de desenvolvimento dos mesmos (Habenbacher et al., 2012; Leipzig et al., 2013). No presente estudo, foi observado que o anticorpo primário marcou especificamente os esporos de *E. cuniculi*.

Estudos ainda indicam que o fígado pode desempenhar um papel importante na resposta imune contra *E. cuniculi*, pois, como neste tecido ocorre ativação em cadeia de macrófagos, provavelmente devido ao aumento da citocina interferon (IFN- γ), a resposta do microambiente hepático pode ser mais efetiva. Devido às células de Kupfer serem células com capacidade de apresentação de抗ígenos, as mesmas podem desempenhar um papel importante nos mecanismos de tolerância imunológica (You et al., 2008; Fisher et al., 2018). Estudos anteriores demonstraram que *E. cuniculi* estimula o aumento de macrófagos e linfócitos B no combate ao patógeno (Da Costa et al., 2017). No presente estudo, foi observado no fígado dos grupos infectados e imunossuprimidos por CY que todas as lesões histopatológicas observadas estavam associadas ao aumento de células compatíveis com macrófagos em todos os grupos infectados com *E. cuniculi*, sugerindo que o fígado ativou exacerbadamente a resposta imunológica inata para combater a disseminação de *E. cuniculi*. De fato, os resultados indicam que houve uma correlação (dados não comparados estatisticamente) entre uma maior quantificação dos esporos de *E. cuniculi* com maiores granulomas com a imunossupressão da população linfocitária por CY na dose de 150mg/kg (Figuras 9-12). No contexto do fígado, tais resultados sugerem que um maior número de esporos induz aumento da resposta imune inata pelos macrófagos hepáticos ou células de kupfer. De fato, estudo anterior demonstrou o papel importante das citocinas IFN- γ , IL-6 e TNF α no fígado de camundongos infectados por *E. cuniculi* e imunossuprimidos por CY (Pereira, 2018).

Existem poucos estudos relatando a importância da resposta imune inata nos pulmões, como os macrófagos alveolares e macrófagos intersticiais em processos infecciosos (Hussel; Sino, 2014; Koch et al., 2017). Interessantemente, sabe-se que macrófagos desempenham papel importante na manutenção da homeostasia dos pulmões, removendo patógenos e partículas nocivas (Lee, 2012). Neste estudo, foi verificada pneumonia granulomatosa multifocal, bem como, presença de esporos de *E. cuniculi* associado a observação de células compatíveis com macrófagos. No entanto, no grupo com a infecção por *E. cuniculi* sem imunossupressão, não foram observadas lesões histopatológicas nos pulmões, sugerindo que resposta dos

pulmões a encefalitozoonose é deficitária quando associada à imunossupressão por CY. A CY pode ser citotóxica aos macrófagos alveolares (Venkatesan; Chandrakasan, 1994; Li et al., 1997; Santosuoso et al., 2002).

No presente estudo, identificamos bronquiolite multifocal associada clusters de esporos marcados por IHQ, no grupo infectado com *E. cuniculi* (controle positivo, immunossuprimido com CY na dose de 250 mg/kg) (Figura 5). Na literatura científica, há dois relatos de caso descrevendo bronquiolite causada por microsporídios em humanos, porém o agente etiológico identificado foi *Encephalitozoon hellem*, através da análise do lavado broncoalveolar de pacientes com HIV-AIDS (Schwartz et al., 1993; Weber et al., 1993). Os mesmos estudos sugerem que os microsporídios podem ser disseminados pela via aerógena. Entretanto, o presente estudo de infecção experimental por *E. cuniculi* pela via intravenosa, com imunossupressão da resposta imune adaptativa por CY, juntamente com os relatos da literatura de pacientes co-infectados pelo vírus HIV e *E. hellem*, com imunossupressão da resposta imune adaptativa (Schwartz et al., 1993; Weber et al., 1993), indicam que os microsporídios causam bronquiolite, além de pneumonia. Portanto, considerando os resultados da infecção experimental do presente estudo, os microsporídios podem se disseminar para os bronquíolos em processos de infecção sistêmica pela via hematógena, não aerógena, não corroborando com as hipóteses da literatura da transmissão aerógena da literatura (Schwartz et al., 1993; Weber et al., 1993).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo indicam que a IHQ é um método altamente sensível e específico para o diagnóstico etiológico de *E. cuniculi*, e para a quantificação de *E. cuniculi* em amostras de tecidos com suspeita de encefalitozoonose.

Além disso, devido à menor sensibilidade e especificidade, sugerimos que as metodologias histoquímicas HE, Gram-Chromotrope e fluorescência calcoflúor sejam utilizadas como metodologias complementares ou de triagem para o diagnóstico etiológico da encefalitozoonose em amostras de tecidos com suspeita de encefalitozoonose.

REFERÊNCIAS

- Amaral GF, Dossa PD, Viebig LBI, et al. Astrocytic expression of GFAP and serum levels of IL-1 β and TNF- α in rats treated with different pain relievers Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016; 54 (4): 623-633.
- Bártová E, Marková J, Sedlák K. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in European hares (*Lepus europaeus*). Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 2015; 22 (4): 674 - 676.
- Bastien P, Gary W, Procop U, Reischl. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than "Conventional" PCR. journal of clinical microbiology. 2008; 46 (6):1897 - 1900.
- Benz P, Maass G, Csokai J, et al. Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in the feline cataractous lens. Vet. Ophthalmol. 2011; 1: 37- 47.
- Brasil P, Bonfim D, Moura H. Microsporidiose humana na síndrome de imunodeficiência adquirida, Rev. Ass Med Brasil.1997; 43 (3): 254 - 64.
- Boot R, Hansen C, Nozari N, Thuis H. Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. Laboratory Animals. 2000; 34(3):281–289.
- Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impacto on surgical pathology ratice. Seminary Diagnostic Pathology. 2000; 17 (3): 170 - 177.
- Csokai J, Joachim A, Gruber A, et al. Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. Veterinary Parasitology. 2009a; 163 (2):18 - 26.
- Csokai J, Gruber A, Kunzel F, et al. Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. Parasitology Research. 2009b; 104 (3): 629 - 635.
- Da Costa LF, Alvares-Saraiva AM, Dell' Armelina Rocha PR, et al. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. Immunobiology (jena. 1979). 2017; 222: 218 - 227.
- Deleve LD, Wang XD, Huybrechts MM. Cellular Target of Cyclophosphamide Toxicity in the Murine Liver: Role of Glutathione and Site of Metabolic Activation. Hepatology. 1996; 24(4).

Desoubeaux G, Pantin A, Peschke R, et al. Application of Western blot analysis for the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits: example of a quantitative approach. Parasitol Res. 2017; 116: 743 - 750.

Didier ES, Vossbrinck CR, Baker MD, et al. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology. 1995; 111 (4):411- 421.

Didier ES, Weiss LM. Overview of microsporidia and microsporidiosis, Protistology. 2008; 5: 243 - 255.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(1):165 - 256.

Fisher BS, Green RR, Brown RR, et al. Liver macrophage-associated inflammation correlates with SIV burden and is substantially reduced following cART. PLoS Pathog. 2018; 21: 14 (2).

Francisco Neto A, Rocha PRD, Perez EC, et al. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice PLOS ONE. 2017; 12 (11).

Fuentealba IC, Mahoney NT, Shadduck JA, Harvill J, Wicher V, Wicher K. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. Vet Pathol. 1992; 29(6):536 - 540.

Garcia LS. Laboratory identification of the microsporidia. Journal of Clinical. Microbiology. 2002; 40 (6): 1892 - 1901.

Gilbar PJ, Richmond J, Wood J, et al. Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion induced by a single dose of oral cyclophosphamide. Ann Pharmacother. 2012; 46:23.

Giordano C, Weigt A, Vercelli A, et al. Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits Veterinary Ophthalmology. 2005; 8 (4): 271 - 275.

Goldsmith CS, Visvesvara GS, Almeida M, et al. *Encephalitozoon cuniculi* Infection in a Kidney Transplant Recipient, Microsc. Microanal. 2013; 19.

Gotti LSM, Gagliani LH. Microsporidiosis humana: aspectos epidemiológicos e diagnósticos nos pacientes com AIDS. Revista UNILUS Ensino e Pesquisa. 2011; 8 (14).

Gruber A, Pakozdy, Weissenbock H, et al. A Retrospective Study of Neurological Disease in 118 Rabbits J. Comp. Path. 2009; 140 31 - 37.

Habenbacher B, Klang A, Fragner K, et al. Comparative evaluation of specific methods for labeling of *Encephalitozoon cuniculi* li Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: 2012; 24 (2): 370 - 375.

Harcourt-Brown FM. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: the mystery disease, Master

class na AAVAC/UEPV Annual Conference, Hobart, Austrália. 2010.

Hornitzky M. Nosema Disease – Literature review and three surveys of beekeepers – Part 2. Rural Industries Research and Development Corporation. 2008; 8 (6).

Hussell T, Sino TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific contexto. Nat Rev Immunol 2014; 14: 81 - 93.

Jass A, Matiasek K, Henke J, et al. Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. Veterinary Record. 2008; 162 (19):618 - 622.

Joseph J, Vemuganti GK, Garg P, et al. Histopathological evaluation of ocular microsporidiosis by differentstains BMC Clinical Pathology 2006; 6 (6): 1 - 8.

Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. 2001; 414: 450 - 453.

Koch CM, Chiu SF, Misharin AV, et al. Lung interstitial macrophages: establishing identity and uncovering heterogeneity. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2017; 57:7 - 9.

Kotkova M, Sak B, Kvetonova D, Kvac M. The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice Exp Parasitol. 2017; 182:16 - 21.

Kotkova M, Sak B, Kváč M. Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III - Comparison using quantitative real-time PCR. Exp Parasitol. 2018; 192: 93 - 97.

Kunzel F, Gruber A, Tichy A, et al. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. Veterinary Parasitology. 2008; 151: 115 - 124.

Lallo MA, Bondan EF, Xavier JG, et al. Técnicas de coloração para detecção de *Encephalitozoon cuniculi* em cortes histológicos. Ciência Rural. 2010; 40 (11): 2406 - 2410.

Lallo MA, Calábria P, Bondan EF, et al. Identification of Encephalitozoon and Enterocytozoon (microsporidia) spores in stool and urine samples obtained from free-living South American Coatis (*Nasua nasua*). Appl Environ Microbiol. 2012a; 78 (12):4490 - 4492.

Lallo MA, Calábria P, Milanelo L. Encephalitozoon and Enterocytozoon (microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds. Microsporidia spores in birds.Vet Parasitol. 2012b; 190 (4): 418 - 422.

Lallo MA, Hirschfeld MPM. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. Expl Parasitol. 2012; 131:339 - 343.

Lallo MA, Santos MJ, Bonda EF. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. Revista Saúde

Pública. 2002; 36: 621- 6.

Lee JS. Heterogeneity of lung mononuclear phagocytes in chronic obstructive pulmonar disease. J Innate Immun. 2012; 4 (5): 489 - 497.

Leipig M, Matiasek K, Rinder H, et al. Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2013; 25 (1): 16 - 26.

Levine DJ, Riley DJ, Tio F, et al. Diagnostic Features of Granulomatous Interstitial Nephritis Due to *Encephalitozoon cuniculi* in a Lung Transplant Recipient. The American Journal of Surgical Pathology. 2013; 37 (3): 447 - 452.

Li L, Hamilton RF, Taylor DE, Holian A. Acrolein-Induced Cell Death In Human Alveolar Macrophages. Toxicology And Applied Pharmacology. 1997; 145: 331 - 339.

Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic potential of the microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18: 423 - 445.

Mohindra AR, Lee MW, Visvesvara G, et al. Disseminated microsporidiosis in a renal transplant recipient. Transpl Infect Dis. 2002; 4 (2): 102 -107.

Moura H, Silva JLN, Sodré FCP, et al. Gram-Chromotrope: a New Technique that Enhances Detection of Microsporidial Spores in Clinical Samples j. Euk. Microbiol. 1996; 43 (5).

Moretto MM, Harrow DI, Hawley TS, et al. Interleukin-12-producing CD103_ CD11b_ CD8_ dendritic cells are responsible for eliciting gut intraepithelial lymphocyte response against *Encephalitozoon cuniculi*. Infect Immun. 2015; 83: 4719 - 4730.

Park JH, Ochiai K, Itakura C: Direct ABC immunohistochemistry to *Encephalitozoon cuniculi*. J Vet Med Sci. 1993; 55: 325 - 328.

Pereira A, Araújo RS, Favorito SE, et al. Occurrence of Microsporidia in small wildlife mammals in the state of São Paulo, Brazil, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2009; 61 (6): 1474 -1477.

Pereira TCR. Caracterização da resposta imune associada a hepatite granulomatosa causada pelo *Encephalitozoon cuniculi*. São Paulo. Tese [Doutorado em Patologia Ambiental e Experimental] – UNIP; 2018.

Paul D, King M, Perry C. Hepatotoxicity of Chemotherapy. The Oncologist. 2001; 6:162 - 176.

Pompeu E, Belon AR, Seabra DI. Anestesia das principais espécies animais utilizadas em protocolos experimentais. In: Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e Manejo de Animais de Laboratorio. 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2017: 597.

Ramos-Vara JA, Beissenherz ME. Optimization of immunochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2005; 12 (4): 307 - 11.

Rebel-Bauder B, Leschnik MA, Maderner A, et al. Generalized Encephalitozoonosis in a Young Kitten with Cerebellar Hypoplasia J. Comp. Path. 2011; 1: 1 - 6.

Rodríguez-Tovar LE, Nevárez-Garza AM, Trejo-Chávez A, et al. the Histological Lesions in Brain, Kidney, and Liver during Primoinfection Outbreak in Rabbits *Encephalitozoon cuniculi*: Grading J. of P. 2016: 1 - 9.

Rodríguez-Tovar LE, Villarreal-Marroquín A, Nevárez-Garza AM, et al. Histochemical study of *Encephalitozoon cuniculi* spores in the kidneys of naturally infected New Zealand rabbits. J Vet Diagn Invest. 2017; 29(3): 269 - 277.

Rossi P, La Rosa G, Ludovisi A, et al. Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. Int J Parasitol. 1998; 28(9):1361 - 6.

Santosuoso M, Divangahi M, Zganiacz A, Xing Z. Reduced tissue macrophage population in the lung by anticancer agent cyclophosphamide: restoration by local granulocyte macrophage-colony-stimulating factor gene transfer. Blood. 2002; 99(4): 1246 - 1247.

Schwartz DA, Visvesvara GS, Leitch GJ, et al. Pathology of symptomatic microsporidial (*Encephalitozoon hellem*) bronchiolitis in the acquired immunodeficiency syndrome: a new respiratory pathogen diagnosed from lung biopsy, bronchoalveolar lavage, sputum, and tissue culture. Hum Pathol. 1993; 24 (9): 937 - 43.

Subramaniam SR, Cader RA, Mohd R, et al. Low-dose cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity. Am J Case Rep. 2013; 14: 345 - 349.

Tsukada R, Osaka Y, Takano T, et al. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in cats in Japan. J. Vet. Med. Sci. 2016; 78: 1615 - 1617.

Valenzuela MGS, et al. Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia J Bras Patol Med Lab. 2006; 42 (3): 207-213.

Valencakova A, Balent P, Petrovova E, et al. Encephalitozoonosis in household pet Nederland dwarf rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Veterinary Parasitology. 2008; 153 (3-4): 265 - 269.

Vávra J. et al. Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidioses. Folia Parasitologica. 1993; 40: 267-272.

Venkatesan N, Chandrasekaran G. Cyclophosphamide Induced Early Biochemical Changes in Lung Lavage Fluid and Alterations in Lavage Cell Function. Lung. 1994; 172: 147 - 158.

Weber, R. et al. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. New England Journal of Medicine. 1992; 326: 161-166.

Weber R, Kuster H, Visvesvara GS, Bryan RT, Schwartz DA, Lüthy R. Disseminated microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem*: pulmonary colonization, microhematuria, and mild conjunctivitis in a patient with AIDS. Clin Infect Dis. 1993; 17(3): 415 - 9.

Wilkinson DG. RNA detection using non-radioactive in situ hybridization. Curr Opin Biotechnol. 1995; 6 (1): 20 - 3.

You QLC, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T Cell Tolerance Induction by Murine Hepatic Kupffer Cells. Hepatology. 2008; 48 (3).