

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE
ASSOCIADA A HEPATITE GRANULOMATOSA CAUSADA PELO
Encephalitozoon cuniculi

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

THIAGO CÉSAR REIS PEREIRA

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE
ASSOCIADA A HEPATITE GRANULOMATOSA CAUSADA PELO
Encephalitozoon cuniculi

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

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

THIAGO CÉSAR REIS PEREIRA

São Paulo
2018

Pereira, Thiago César Reis.

Caracterização da resposta imune associada à hepatite
granulomatosa

por *Encephalitozoon cuniculi* / Thiago César Reis Pereira – 2018.
72 f. : il. + CD-ROM.

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

Área de Concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

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

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

1. *Encephalitozoon cuniculi*. 2. Hepatite. 3. Imunologia. I. Rocha,
Paulo Ricardo Dell'Armeline (Orientador). II. Título.

THIAGO CÉSAR REIS PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE
ASSOCIADA A HEPATITE GRANULOMATOSA CAUSADA PELO
*Encephalitozoon cuniculi***

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

Profa. Dra. Leoni Villano Bonamin
Universidade Paulista – UNIP

Profa. Dra. Anuska Marcelino Alvares-Saraiva
Universidade Paulista – UNIP

Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado
UNESP- Araçatuba

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

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese primeiramente aos meus pais, que sempre me incentivaram muito em todos os momentos da vida, colocando em primeiro lugar a minha educação, ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina, por todos os conhecimentos transmitidos e ajuda ao longo destes três anos, à Paloma Belo, a qual foi minha aluna e hoje é uma companheira de profissão exemplar.

AGRADECIMENTOS

Nesta página, muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que ajudaram a realizá-lo.

Ao Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha, pela orientação na pesquisa científica, pelo incentivo, confiança, disponibilidade e amizade.

À UNIP, pela infraestrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho.

À Paloma Belo, por toda amizade, companheirismo e ajuda ao longo destes últimos anos.

A toda equipe do centro de pesquisa da UNIP, em especial a funcionária Suzana, que sempre me apoiou e transmitiu seus conhecimentos sobre laboratório. Também agradeço às Profas. Maria Anete Lallo, Dra. Anuska Marcelino Alvares-Saraiva, Dra. Elizabeth Cristina Perez Hurtado, a Dra. Fabiana Camargo Toshie e a todos os professores do Programa de Doutorado em Patologia experimental e ambiental da UNIP.

Em especial aos meus pais, minha irmã e minha noiva Luanna, sempre presentes em minha vida.

“O esforço só é expresso em recompensa quando
uma pessoa se recusa a desistir.”

(Napoleon Hill)

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD - Morte Celular Induzida Por Ativação
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHGNA - Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DPI - Dias Pós-Infecção
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
ICLAS - *International Council of Laboratory Animal Science*
IgG - Imunoglobulinas G
IgM - Imunoglobulinas M
MHC - Complexo de Histocompatibilidade
MS - Ministério da Saúde
NK - Natural Killers
PCR - Polymerase Chain Reaction
SNC - Sistema Nervoso Central
SPF - Specific Pathogen-Free
SUS - Sistema Único de Saúde
TGF - Fator Transformador de Crescimento
TNF α - Fator De Necrose Tumoral
VHB - Vírus Da Hepatite B
VHC - Vírus Da Hepatite C
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa
IFN- γ – Interferão gamma
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-17 – Interleucina 17

RESUMO

O microsporídio *Encephalitozoon cuniculi* é um fungo oportunista causador da encefalitozoonose, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, tais como pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana e pacientes em quimioterapia. A investigação sobre a resposta imune no fígado de pacientes com encefalitozoonose local e/ou disseminada ainda foi pouco esclarecida. Assim, este trabalho objetivou caracterizar a resposta imune local e sistêmica na hepatite granulomatosa experimental murina. Para isso, foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, imunossuprimidos com ciclofosfamida (CY) e infectados com *E. cuniculi*. As análises fenotípicas das populações celulares indicam que a infecção por *E. cuniculi* induziu no fígado aumento significativo de linfócitos TCD4+, TCD8+ e B, além de macrófagos, em relação ao controle não infectado. Já no baço, a infecção por *E. cuniculi* não alterou as populações celulares TCD4+, TCD8+, B e macrófagos em relação ao controle não infectado. Além disso, a infecção por *E. cuniculi* e imunossupressão por CY induziu aumento significativo de macrófagos no fígado em relação ao grupo controle não infectado e ao grupo CY, associada ao aumento de macrófagos no baço em relação ao grupo controle não infectado e ao grupo infectado. Com relação às citocinas *Th1*, *Th2*, e *Th17*, a infecção por *E. cuniculi* aumentou os níveis das citocinas IFN- γ em relação ao grupo controle e CY, e TNF- α em relação ao grupo controle, associada ao aumento significativo da citocina IFN- γ no soro. Além disso, a infecção por *E. cuniculi* e imunossupressão por CY induziu aumento significativo de IFN- γ , TNF- α e IL-10 no fígado em comparação ao grupo controle não infectado, associado ao aumento significativo da citocina IFN- γ no soro. Em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram que a hepatite granulomatosa murina causada por *E. cuniculi* é caracterizada por um processo predominantemente pró-inflamatório, demonstrando um importante papel do fígado na resposta imune contra a encefalitozoonose, mesmo em condições de imunossupressão.

Palavras-chave: *Encephalitozoon cuniculi*. Hepatite. Imunologia.

ABSTRACT

The microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* is an opportunistic fungus that causes encephalitozoonosis, especially in immunosuppressed individuals, such as patients infected with the human immunodeficiency virus and patients on chemotherapy. Investigation of the immune response in the liver of patients with local and / or disseminated encephalitozoonosis has not been clarified. Thus, this work aimed to characterize the local and systemic immune response in murine experimental granulomatous hepatitis. For this, male C57BL / 6 mice, immunosuppressed with cyclophosphamide (CY) and infected with *E. cuniculi* were used. Phenotypic analyzes of the cell populations indicate that infection by *E. cuniculi* induced a significant increase in TCD4 +, TCD8 + and B lymphocytes in the liver, in addition to macrophages, in relation to the uninfected control. In the spleen, *E. cuniculi* infection did not alter the cellular populations TCD4 +, TCD8 +, B and macrophages in relation to the uninfected control. In addition, *E. cuniculi* infection and CY immunosuppression induced a significant increase of macrophages in the liver in relation to the uninfected control group and CY group, associated to the increase of macrophages in the spleen in relation to the uninfected control group and the infected group. With regard to the Th1, Th2, and Th17 cytokines, *E. cuniculi* infection increased levels of the cytokines IFN- γ in relation to the control group and CY, and TNF- α in relation to the control group, associated to the significant increase of the cytokine IFN - γ in serum. In addition, *E. cuniculi* infection and CY immunosuppression induced a significant increase in IFN- γ , TNF- α and IL-10 in the liver compared to the uninfected control group, associated with a significant increase in IFN- γ serum cytokine. Together, the results of the present study demonstrate that murine granulomatous hepatitis caused by *E. cuniculi* is characterized by a predominantly pro-inflammatory process, demonstrating an important role of the liver in the immune response against encephalitozoonosis, even under conditions of immunosuppression.

Key words: *Encephalitozoon cuniculi*. Hepatitis. Immunology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A – Morfologia do <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	20
Figura 1B – Ciclo de multiplicação do <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	20
FIGURA 2 - Camundongo. Fígado. Hepatite granulomatosa multifocal leve a moderada. A, B, C e D (onde a Figura B é a ampliação da Figura A e a Figura D é a ampliação da Figura C: Histopatologia das lesões microscópicas granulomatosas, predominantemente compostas por macrófagos, associadas a inúmeros esporos basofílicos de <i>E. cuniculi</i> no citoplasma de macrófagos e livres no espaço extra-celular (setas). Coloração Hematoxilina e Eosina.....	38
Figura 3 – Quantificação de linfócitos TCD4+ e TCD8+, detectados no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,001^{**}$	39
Figura 4 – Quantificação de linfócitos B+, detectados no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos $p < 0,001$	40
Figura 5 – Quantificação de macrófagos detectados no fígado de Camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles $p < 0,05^{*}$; $p < 0,0001^{***}$	41
Figura 6 – Quantificação de células detectados no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles.....	42
Figura 7 – Quantificação de linfócitos TCD4+, presentes no baço de camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$	43
Figura 8 – Quantificação de linfócitos TCD8+, presentes no baço de camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E.</i>	

<i>cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles $p<0,05^*$	43
Figura 9 – Quantificação de linfócitos B+ presentes no baço de camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles $p<0,0001^{***}$	44
Figura 10 – Quantificação de macrófagos presentes no baço de camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles, $p<0,001^{**}$	45
Figura 11 – Quantificação de células dendríticas no baço de camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles.....	46
Figura 12 – Níveis de citocinas $TNF\alpha$, $IFN-\gamma$ detectadas no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles, $p<0,05^*$	47
Figura 13 – Níveis de citocina IL-6 detectada no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p<0,05^*$	48
Figura 14 – Níveis de citocina IL-2 detectada no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.....	49
Figura 15 – Níveis de citocina IL-10 detectada no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculada (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A	

análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05$, $p < 0,001^{**}$	50
Figura 16 – Níveis de citocina IL-4 e IL-17 detectadas no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.....	51
Figura 17 – Níveis de citocinas IFN- γ detectadas no Soro de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes para a citocina IFN- γ $p < 0,05^{*}$, $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$	51
Figura 18 – Níveis de citocinas TNF- α detectadas no Soro de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.....	52
Figura 19 – Níveis da citocina IL-10 detectada no Soro de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.....	53
Figura 20 – Níveis da citocina IL-6 detectada no soro de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente.....	54
Figura 21 – Níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17, detectadas nos soros de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculadas (+) ou não (-) com <i>E. cuniculi</i> . A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.....	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO – HEPATOPATIAS.....	16
2 MICROSPORÍDIOS E MICROSPORIDIOSES	18
2.1 O Filo Microsporidia	18
2.2 Morfologia e Replicação celular	18
3 EPIDEMIOLOGIA	21
3.1 Prevalência	21
3.2 Grupos e fatores de Risco.....	21
3.3 Fontes de Infecção/Forma Infectante.....	22
3.4 Resistência e Sensibilidade Ambiental	23
4 DIAGNOSTICO DAS MICROSPORIDIOSES.....	24
5 RESPOSTA IMUNE CONTRA PATOGENOS INTRACELULARES	23
5.1 Imunidade Inata e adaptativa	263
6 ASPECTOS IMUNITARIOS NAS MICROSPORIDIOSES	30
7 JUSTIFICATIVA	32
8 OBJETIVOS	33
8.1 Objetivo geral.....	33
8.2 Objetivos Específicos	33
9 METODOLOGIA.....	34
9.1 Tipo de Pesquisa	34
9.2 Animais	34
9.3 Patógeno.....	34
9.4 Imunossupressão	35
9.5 Infecção.....	35
9.6 Necropsia, colheita de amostras	35
9.6.1 Citometria de fluxo e análise fenotípica dos componentes imunológicos	
36	
9.7 Histopatologia	37
9.8 Quantificação de citocinas.....	34
9.9 Análise Estatística	37

9.10 Aspectos Éticos.....	37
10 RESULTADOS.....	38
10.1 Componentes imunitários do Fígado	38
10.1.1 Linfócitos TCD4+, TCD8+ e B no Fígado	39
10.1.2 Macrófagos no Fígado.....	41
10.1.3 Células Dendríticas no Fígado.....	42
10.2 Componentes imunitários do Baço	42
10.2.1 Linfócitos TCD4+, TCD8+ e B+ no Baço	42
10.2.2 Macrófagos no Baço.....	45
10.2.3 Células Dendríticas no Baço.....	46
10.3 Citocinas	47
10.3.1 IFN- γ e TNF α no fígado	47
10.3.2 IL-6 no fígado.....	48
10.3.3 IL-2 no fígado.....	49
10.3.4 IL-10 no fígado.....	50
10.3.5 IL-4 e IL-17 no fígado	51
10.3.6 IFN- γ e TNF α no Soro	51
10.3.7 IL-10 no Soro	53
10.3.8 IL-6 no Soro	54
10.3.9 IL-2, IL-4, e IL-17 no Soro.....	55
11 DISCUSSÃO	56
12 CONCLUSÕES	Erro! Indicador não definido.
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO – HEPATOPATIAS

As doenças de um modo geral trazem consequências sociais significativamente negativas para o indivíduo, para a família, para a sociedade e, de maneira mais ampla, para as populações afetadas. Entre os principais efeitos negativos para a sociedade podemos destacar a redução da produtividade econômica. O conhecimento correto do real impacto de uma doença é essencial na formulação de políticas públicas de saúde a fim de que possam ser priorizadas intervenções de saúde e pesquisas que levem à alocação adequada de recursos¹. Apesar das hepatopatias serem consideradas de baixa relevância por muitos profissionais da área da saúde, há de se salientar que algumas doenças hepáticas, como as hepatites virais, a doença hepática alcoólica e a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) são altamente prevalentes na população. Adicionalmente, outros processos patológicos, como a cirrose hepática, o carcinoma hepatocelular e as hepatites fulminantes são extremamente letais e também contribuem para a incidência das hepatopatias¹.

Um estudo de 2017, estimou que serão diagnosticados aproximadamente dois milhões de casos de doenças hepáticas crônicas no ano de 2050, e que a doença hepática relacionada ao álcool continuará sendo a etiologia mais frequente de hepatopatia crônica, seguida da doença hepática gordurosa não alcoólica².

Com relação às causas das hepatites de origem infecciosa, é sabido que as hepatites virais se mantêm como grande ameaça à saúde da população humana. Aspectos epidemiológicos, de infraestrutura e populacionais, como a pobreza e falta de acesso aos serviços de saúde contribuem para o diagnóstico de novos casos dessas doenças. De fato, a Assembleia Mundial de Saúde tem sistematicamente manifestado preocupação com as hepatites virais. Em 2010, a 63ª Assembleia Mundial de Saúde adotou a resolução WHA63.18, na qual conclamou os países membros a promover abordagens custo-efetivo para prevenção, controle e tratamento de hepatites virais, além de definir o dia 28 de julho como Dia Mundial de Combate as Hepatites Virais. Alguns anos depois, reconhecendo a necessidade de intensificar e expandir a resposta as hepatites, a 67ª Assembleia Mundial de Saúde, por meio da resolução WHA67.6 de 2014, solicitou apoio técnico necessário para permitir que os Estados-Membros desenvolvessem estratégias nacionais robustas de prevenção, diagnóstico e tratamento das hepatites virais com metas temporais. Em resposta a essa Resolução, a Organização Mundial de Saúde iniciou as atividades da estratégia

global do setor de saúde para as hepatites virais para o período 2016 - 2021, que inclui medidas para eliminação das hepatites virais B e C como ameaça à saúde pública até 2030, indo, assim, ao encontro da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável das Nações Unidas³.

Nos Estados Unidos, a etiologia mais comum de doença hepática crônica é a hepatite causada pelo vírus da hepatite C, seguido do uso de bebidas alcoólicas e da doença hepática gordurosa não alcoólica¹. Um estudo demonstrou que a prevalência da maior parte das doenças causadoras de doença hepática crônica permaneceu estável, com exceção da DHGNA, que aumentou significativamente, concomitantemente com o aumento da prevalência da obesidade⁴.

Os microsporídios constituem um grupo de agentes infecciosos oportunistas ainda pouco estudados. Entretanto, dados científicos sobre a resposta imune do fígado contra a principal microsporidiose, ou seja, a encefalitozoonose, ainda são escassos^{5,6,7}. Até o presente momento, foram descritas somente as lesões histopatológicas em estudos da encefalitozoonose natural e experimental^{5,6,7, 29, 51, 52}

2 MICROSPORÍDIOS E MICROSPORIDIOSES

2.1 O Filo Microsporidia

Os Microsporídios são organismos eucariotos unicelulares, parasitas intracelulares obrigatórios e produtores de esporos⁸. Estes organismos foram inicialmente classificados como protozoários, e posteriormente foram reclassificados filogeneticamente como fungos⁹. Os microsporídios constituem um grupo de patógenos pouco estudados, apesar de terem sido identificadas até hoje mais de 1200 espécies¹⁰, distribuídas por cerca de 140 gêneros¹¹⁻¹⁴, infectando invertebrados e vertebrados^{15, 16,17}. Estes agentes infecciosos causam doenças genericamente descritas como crônicas nos hospedeiros¹⁸.

2.2 Morfologia e Replicação celular

O pesquisador Carl Wilhelm von Nägeli descreveu, em 1957, o primeiro microsporídio causador da doença do bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.), designada pebrina¹⁴, como *Nosema bombycis* Nägeli. À época, Nägeli descreveu o patógeno como uma levedura pertencente ao Reino Fungi¹². Posteriormente, foi descrito o Filo Microsporidia¹³, mas esta classificação não está isenta de controvérsia, já que também foram incluídos no Reino Protozoa por Goldfuss (1818) e no agora inexistente Reino Archeozoa por Haeckel (1894), o que evidencia a intensa polêmica gerada nos últimos dois séculos em torno da sistemática deste grupo singular¹⁹.

Um estudo abrangente sobre a classificação do Reino Fungi incluiu os Microsporídios num ramo basal deste reino, que os descreveu como “grupo-irmão” dos fungos e não como “verdadeiros fungos”²⁰. Examinando a sua classificação ambígua e complexa, optou-se por incluir o Filo Microsporidia no Reino Protista¹², apesar das fortes evidências da sua natureza fúngica. Morfologicamente, são eucariotas verdadeiros, isto é, possuem um núcleo tipicamente eucariota, um sistema de membranas internas e citoesqueleto, mas revelam características moleculares e citológicas remissivas de procariotas²¹, que incluem o tamanho do genoma – à escala do das bactérias –, a ausência de mitocôndrias identificáveis, de peroxissomas, de hidrogenossomas e do típico aparelho de Golgi²². Entretanto, dados de biologia molecular e celular confirmaram que os microsporídios são fungos atípicos^{19, 23-26}.

A característica morfológica mais diagnosticável de um microsporídio é a sua forma infectante – o esporo – que é a única fase do ciclo de vida viável fora da célula hospedeira e a fase mais facilmente morfológicamente identificável⁸. Os microsporídios são constituídos por uma célula única, cujas dimensões podem variar entre de 5-10 μm ^{11, 13}

Com relação à forma, esta também é variável, podendo ser mais ou menos alongada (bastonete até redonda), mas a maioria é ovóide⁸. O esporo é constituído por uma parede grossa, que é composta por três camadas: (i) o exósporo (camada externa eletronicamente densa e de composição proteica), (ii) o endósporo (camada interna eletronicamente luzente, e de composição quitinosa), (iii) e a membrana plasmática, que envolve o citoplasma, o núcleo ou núcleos, vacúolo posterior e o aparelho infeccioso ou de extrusão²⁷.

O aparelho infeccioso destes parasitas é a característica distintiva destes organismos, sendo composto por três organelas: (i) o filamento polar – estrutura tubular enrolada em hélice ligada ao ápice do esporo através do disco ancorante, (ii) o polaroplasto, (iii) e o vacúolo posterior (Figura 1A)²⁸. O número de voltas do filamento polar, o seu arranjo espacial relativo e o ângulo de inclinação da hélice permitem diagnosticar por microscopia eletrônica de transmissão a espécie de microsporídio⁸.

A extrusão deste filamento polar permite ao patógeno inocular o esporoplasma na célula hospedeira, sendo este o principal mecanismo infeccioso dos microsporídios^{10,11}. Com a entrada do esporoplasma do parasita na célula hospedeira, inicia-se a fase proliferativa do ciclo de vida, caracterizada pela ocorrência da merogonia, evento em que o parasita aumenta massivamente o seu número com a formação de células designadas merontes. Segue-se a fase esporogênica, que consiste na formação das células infecciosas – evento designado por esporogonia – que, ao germinarem, reiniciam o ciclo, conforme demonstra (Figura 1B)²⁷.

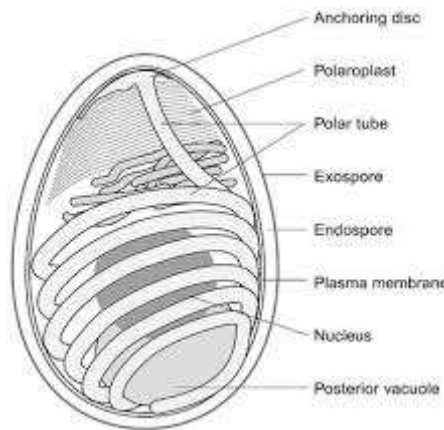


Figura 1A – Morfologia do *Encephalitozoon cuniculi*

Fonte: Esquema do esporo de um microsporidio (Adaptado de Franzen, 2005)

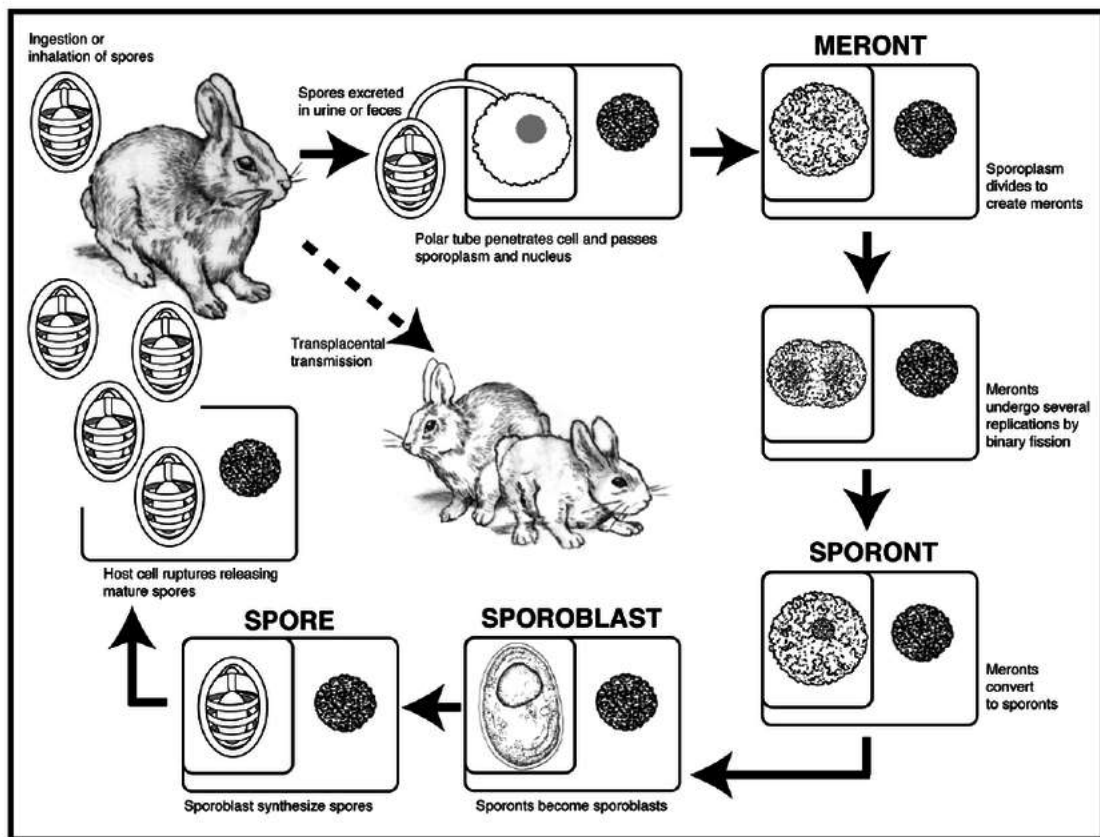


Figura 1B – Ciclo de multiplicação do *Encephalitozoon cuniculi*

Fonte: Magalhães N, Lobo ML, Antunes F, Matos O. Aves e cães como potencial fonte de infecção zoonótica por microsporídeos para o homem. Ver. Port. Cienc. Vet. 2006;101:69-75.

3 EPIDEMIOLOGIA

Os microsporídios podem infectar uma ampla gama de hospedeiros, incluindo humanos, outros mamíferos e aves. O *Encephalitozoon cuniculi* é um patógeno natural de mamíferos causador da encefalitozoonose, que é considerada uma zoonose, conforme já relatado na literatura²⁹⁻³³.

3.1 Prevalência

A prevalência da microsporidiose humana varia entre 0% e 50%, e em pacientes com HIV, de 2 e 78% dependendo da região geográfica, sendo mais prevalentes nos países desenvolvidos^{34,35}. Estudo de revisão sistemática da literatura com dados do Irã observou uma prevalência média de 8,18% de diagnóstico de microsporídioses em pacientes imunocomprometidos³⁶. Por ser um grupo de doenças pouco estudado, faltam dados científicos na literatura mundial sobre a real prevalência das microsporídioses³¹. Segundo a literatura, as espécies de microsporídios do gênero *Encephalitozoon* são as mais prevalentes (6,7% para ambos *E. hellem* e *E. intestinalis*). Este gênero também infecta animais selvagens, indicando um aumento do número de fontes de infecção para humanos³¹.

3.2 Grupos e fatores de Risco

A imunossupressão é o principal fator de risco para ao aumento da susceptibilidade às microsporídioses^{29,37,51,52}.

O potencial zoonótico foi identificado em 17 espécies, sendo que as espécies do gênero *Encephalitozoon* são responsáveis por grande parte das microsporídioses prevalentes em humanos e também em outros animais^{31, 38}. As populações mais suscetíveis às microsporídioses são: indivíduos imunocompetentes, como viajantes, pessoas que usam lentes de contato, crianças, idosos e imunocomprometidos infectados pelo vírus HIV, receptores de transplante de órgãos, pacientes com câncer submetidos à quimioterapia ou qualquer terapia imunossupressora^{22, 31,39}.

3.3 Fontes de Infecção/Forma Infectante

As principais fontes de infecção das microsporidioses são água ou alimentos contaminados, secreções/fluidos corporais ou fezes corporais de indivíduos infectados (humanos ou animais), bem como órgãos de indivíduos infectados^{12, 30, 31, 32, 39}.

A transmissão das microsporídioses é predominantemente horizontal, ocorrendo principalmente pela rota fecal-oral, por ingestão de esporos em água ou alimentos contaminados, além de contato com animais e humanos infectados⁴⁰. Embora seja considerada mais rara, existe a possibilidade de transmissão vertical (transplacentária) de mães para crias durante a gestação através da placenta. Ainda, existe a possibilidade de transmissão através da inalação dos esporos, porém este dado ainda não foi confirmado com dados científicos. Os esporos são a forma infectante dos microsporídios¹².

3.4 Hospedeiros

O Filo Microsporidia é subdividido em uma variedade de famílias e gêneros. O gênero *Encephalitozoon* é o principal causador de doença em animais, incluindo as espécies *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* e *Encephalitozoon intestinalis*³⁸. Até hoje, a maioria dos conhecimentos disponíveis sobre a imunidade inata e adaptativa contra os microsporídios foram disponibilizados através de pesquisas experimentais com o *E. cuniculi*³⁰.

Das 14 espécies de microsporídios conhecidos por infectar os seres humanos, *Enterocytozoon bieneusi* é uma das mais comuns e tem sido associada principalmente à diarreia. O *E. bieneusi* tem maior prevalência principalmente em pessoas cientes da imunodeficiência, embora a infecção em populações imunocompetentes seja cada vez mais detectada. Os Microsporídios são capazes de causar infecção assintomática em pessoas imunocompetentes, e podem se reativar durante condições de baixa do sistema imunológico, como durante a gravidez ou por meio de transplante de órgãos³⁰.

3.5 Resistência e Sensibilidade Ambiental

Os esporos são resistentes a mudanças ambientais e capazes de sobreviver até quatro semanas a 22°C em tempo seco¹². Além disso, os esporos dos microsporídios são altamente resistentes no ambiente e podem sobreviver durante vários meses em condições húmidas.

4 DIAGNOSTICO DAS MICROSPORIDIOSES

Microsporídios são difíceis de detectar e, geralmente, técnicas especiais são necessárias para diagnosticar infecções por microsporídios. A identificação de microsporídios foi baseada inicialmente principalmente em estudos ultraestruturais usando microscopia eletrônica de transmissão. A ultraestrutura dos microsporídios através da microscopia eletrônica é patognomônica para o filo e permite distinguir entre todos os gêneros microsporidiais. No entanto, durante a última década, os procedimentos de diagnósticos para a detecção de microsporídios foram alterados notavelmente. O diagnóstico das microsporidioses em amostras teciduais pode ser difícil por várias razões, entre elas, pelo pequeno tamanho dos esporos (comprimento médio de 5 micrômetros) e pela presença do parasita por vezes sem resposta inflamatória tecidual¹². As metodologias de ELISA e Western Blotting são os métodos sorológicos e têm sido úteis para o diagnóstico de microsporidioses em animais de laboratório e humanos imunologicamente competentes. No entanto, o teste de sorologia com o emprego dessas metodologias perdeu importância, após a descoberta de novas espécies de microsporídios em seres humanos e animais e em indivíduos imunodeficientes, que não podem expressar respostas de anticorpos significativos ou específicas¹².

Com relação às amostras clínicas, os microsporídios podem ser diagnosticados em amostras de urina, escarro, lavado broncoalveolar, líquido biliar, aspirado duodenal e fezes, sendo que também podem ser identificados em colheitas e raspagens de tecido de mucosa sinovial, córnea, conjuntiva, e secreção nasal, além de biopsias traquiobronquial, do intestino delgado, seio paranasal, fígado, músculos em colecistectomia e líquidos cefalorraquidiano. Espécimes frescos devem ser colhidos para cultura de células e para estudos moleculares; em casos de infecção disseminada é recomendável que a urina seja enviada para análise³⁷.

As espécies mais comuns de microsporídios que infectam os humanos são o *E. cuniculi* o *E. bieneusi*. Este último ainda não foi cultivado a longo prazo em culturas, e isso é o que tem impedido o progresso em encontrar um agente antimicrosporidial contra esta infecção importante⁴¹. No caso do paciente ter comprometimento do sistema imune, a melhor forma de diagnosticar microsporidiose é a utilização da reação de cadeia em polimerase (PCR, em inglês), com a combinação desses métodos já citados acima. Esses métodos moleculares são utilizados em amostras

fecais, biopsia intestinal, aspirado duodenal ou bile para indicar a presença dos microsporídios⁴².

5 RESPOSTA IMUNE CONTRA PATOGENOS INTRACELULARES

5.1 Imunidade Inata e adaptativa/adquirida

A função primordial do sistema imunológico é identificar as estruturas próprias do organismo e proteger, bem como identificar as não próprias e combatê-las⁴³. Quando há uma resposta coletiva e organizada desse sistema frente à introdução de algum antígeno, ela é designada resposta imunológica. Este sistema é composto pelas imunidades: inata e adaptativa⁴⁴.

A imunidade inata é caracterizada como a primeira linha de defesa contra microrganismos. Essa resposta imune é importante na proteção contra micróbios formadores de pus (piogênicos), ou seja, infecções bacterianas, fungos e parasitas multicelulares. Os granulócitos, principalmente, os neutrófilos, o sistema complemento, as células Natural Killers (NK), entre outros, são componentes celulares importantes desta imunidade⁴³.

A primeira linha de defesa contra qualquer patógeno intracelular é mantida pelos componentes da imunidade inata, de forma inespecífica. A resposta inata é realizada por meio de proteínas séricas e receptores de superfície em diversos tipos celulares como os (TLR: toll-like receptors), que são uma família de proteínas transmembrânicas de tipo I que formam uma parte do sistema imunológico inato. Nos vertebrados também possibilitam a adaptação do sistema imune. Os TLRs foram descobertos no invertebrado mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) e são os responsáveis do reconhecimento de várias vias de padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPs pathogen-associated molecular patterns, em inglês) e expressados por um amplo espectro de agentes infecciosos. Monócitos, macrófagos e neutrófilos fagocitam patógenos microbianos e estimulam a resposta de citocinas dando como resultado o desenvolvimento da imunidade inata ou natural, a resposta inflamatória e medeiam a efetiva imunidade adaptativa. Sua função, em resumo, é o reconhecimento do patógeno e a estimulação da resposta imunológica contra agentes patológicos, os quais são capazes de agir de forma imediata a agentes invasores como microrganismos ou substâncias estranhas⁴⁵.

Os macrófagos teciduais são uma população heterogênea de células residentes em todos os tecidos do corpo que contribuem para a manutenção da homeostase e desencadeiam a ativação imune em resposta a estímulos lesivos. Essa

heterogeneidade pode estar associada a funções específicas do tecido, no entanto, a presença de populações distintas de macrófagos dentro do mesmo microambiente indica que a heterogeneidade dos macrófagos também pode ser influenciada fora da especialização de tecidos⁴⁶.

Funcionalmente, os linfócitos T dividem-se em linfócitos T auxiliares ou helpers (LTh), linfócitos T citotóxicos (LTc) e linfócitos T supressores (LTs). Cada um deles possui receptores característicos, também eles, identificáveis por técnicas imunológicas e que apresentam funções específicas. Os linfócitos T citotóxicos são importantes para resposta imune celular, pois atacam diretamente as células estranhas que expressam o MHC-I e destroem a célula infectada ou sob dano, através da destruição da sua membrana celular. Esta resposta imunitária específica baseia-se na ativação e ataque das células CD8+^{44, 47}.

Algumas bactérias como *Mycobacterium tubercucolis* e *Legionella pneumophila* possuem a capacidade de resistir à fagocitose e de se replicar no interior dos fagócitos, estimulando a produção de IL-12. Esta citocina ativa as células NK que passam a produzir IFN- γ com a finalidade de aumentar a produção de substâncias microbidas no interior dos fagócitos. As células NK também são capazes de identificar células infectadas por vírus (diminuição expressão de moléculas MHC-I) e promover a destruição destas através da liberação de perforina e granzima, que culmina na apoptose da célula alvo e eliminação do agente infeccioso. Existem pacientes com ausência ou deficiência na atividade de células NK. Nesses indivíduos deficientes de células NK, são relatadas infecções virais recorrentes por *Varicella Zoster Virus*, *Herpes Simplex Virus*, *Epstein Barr Virus*, *Cytomegalovirus* e *Papilloma Virus*, uma vez que a resposta de células NK contra células infectadas é de extrema importância no combate aos vírus²⁹.

Diversos patógenos são capazes de se replicar no interior dos fagócitos (p.ex. *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania*) e podem ser destruídos mediante participação das células T CD4⁺. Os agentes infecciosos presentes dentro de vesículas no citoplasma da célula podem entrar na via de processamento e apresentação de antígeno via molécula de MHC de classe II. As células T CD4 que reconhecem este complexo são ativadas e produzem IFN- γ que irá aumentar a atividade microbicida no interior dos fagócitos³⁰.

Tendo em vista que alguns agentes infecciosos são capazes de permanecer vivos no interior dos fagócitos, muitas vezes pode haver a formação de granulomas.

Esta estrutura é formada predominantemente por macrófagos e linfócitos T, e tem a finalidade de evitar a disseminação do patógeno, mas que muitas vezes pode culminar em um processo inflamatório intenso levando destruição e substituição do tecido danificado pela fibrose²⁹.

Já os patógenos que têm a capacidade de se replicar no citoplasma da célula infectada (exemplo: vírus da Hepatites A,B,C,D e E), ou mesmo os agentes infecciosos que escapam dos fagossomos ou impedem a formação do fagolisossomos (p.ex *Listeria monocytogenes*, *Trypanosoma cruzi*), podem ser eliminados pelas células T citotóxicas (T CD8). Estes patógenos podem entrar na via de processamento e apresentação de antígenos via molécula de MHC-I e ativar os linfócitos T CD8, que irão produzir granzima e perforina, que por sua vez destruirão as células-alvo infectadas³⁰.

A imunidade adquirida é desenvolvida quando entramos em contato direto ou indireto com determinantes antigênicos capazes de induzir resposta imunológica. Seus principais componentes incluem os linfócitos B e T, os quais induzem a resposta imune humoral e celular, respectivamente⁴⁴.

A imunidade humoral é mediada por células B que amadurecem e se diferenciam em plasmócitos, que por sua vez são responsáveis pela produção de secreção dos anticorpos. Os anticorpos reconhecem e neutralizam antígenos microbianos e os preparam para serem eliminados, sendo o principal mecanismo de defesa contra micro-organismos extracelulares e suas toxinas. A imunidade celular é mediada pelas células T (CD4+ e CD8+) que promovem a destruição de microrganismos intracelulares, como vírus e algumas bactérias que sobrevivem e proliferam no interior de fagócitos, ou a destruição das células infectadas para eliminar os reservatórios da infecção. As infecções que desencadeiam as hepatites virais ativam diretamente a imunidade celular²⁹, já que a maioria dos patógenos são intracelulares facultativos e/ou obrigatórios.

Apesar da exposição contínua do fígado a patógenos, toxinas e antígenos alimentares, sabe-se que a resposta imune adaptativa do fígado favorece a indução da tolerância imunológica, acarretando na diminuição do processo pró-inflamatório. De fato numerosos estudos demonstraram que: (1) os antígenos alimentares derivados do trato gastrointestinal são tolerados no fígado; (2) transplantes de órgãos hepáticos alogênicos são aceitos através das principais barreiras do complexo de histocompatibilidade (MHC) 1; (3) a pré-exposição às células doadoras através da veia

porta de animais receptores aumentou sua aceitação de tecido sólido; e (4) a pré-exposição de antígenos solúveis pela veia porta leva à tolerância imunológica sistêmica. Entretanto os mecanismos de tolerância imune sistêmica induzida pelo fígado não são bem compreendidos, embora várias hipóteses, incluindo apoptose de células T, desvio imunológico e supressão ativa, tenham ganhado algum suporte com estudos experimentais⁴⁸.

6 ASPECTOS IMUNITARIOS NAS MICROSPORIDIOSES

Com relação à encefalitozoonose, evidências indicam que a imunidade mediada pelas células T é a mais importante no combate do organismo hospedeiro contra *E. cuniculi*, que foi demonstrado através dos efeitos letais dos microsporídios em pacientes com imunodeficiência de células T. As células T produzem interleucinas (IL), que conferem um mecanismo defensivo que facilita a fagocitose imunomediada pelos macrófagos⁴⁹. Tanto os linfócitos T CD4+ como os CD8+ são importantes na resposta imune contra a encefalitozoonose. A deficiência em linfócitos T CD4+ não causou morte nos camundongos *knock out* (KO) CD4-/-, porém todos os camundongos KO CD8-/- morreram pela infecção por *E. cuniculi*³². Portanto, os linfócitos T CD8+ são especialmente importantes no combate à infecção e na sobrevivência do hospedeiro⁵⁰. A imunidade mediada pelas células T CD8+ é indiretamente dependente das células T CD4+, já essas células produzem fatores de inflamação, como as citocinas do tipo *Th1*:IFN- γ , IL-2 e IL-12^{32,50}. Além disso, o mecanismo mais eficaz da ação e eliminação da célula infectada pelo *E. cuniculi* é através da atividade citotóxica, mediada pelos linfócitos T CD8, através da via das perforinas. De fato, a ausência deste mecanismo imunitário causou óbito em camundongos experimentalmente infectados com *E. cuniculi*³².

Complementarmente, na encefalitozoonose, foi verificado que as células B têm importância na mediação da resposta imune⁵¹. Estudo anterior que investigou a resposta imune celular contra a encefalitozoonose verificou mudanças tanto nos perfis celulares como nos níveis de citocinas identificadas em camundongos após a transferência adotiva de células B-1, sugerindo que estas células possuem papel importante na regulação da resposta imune contra estes patógenos. Assim, a transferência de células B-1 confere maior resistência a encefalitozoonose experimental induzida por via oral nos camundongos do genótipo BALB/c XID⁵².

Os anticorpos derivados da resposta imune adaptativa são fundamentais para a resposta imune no combate a infecção, sendo capazes de opsonizar os microsporídios, tornando-os facilmente alvos para os macrófagos, que neutralizam a sua atividade e inibem a infecção de novas células hospedeiras⁵³. No caso da infecção por *E. cuniculi*, a produção de imunoglobulinas G (IgG) em animais imunocompetentes ocorre durante as duas primeiras semanas pós-infecção. O pico de produção é atingido às 5-6 semanas e geralmente persiste por toda a vida do hospedeiro^{35, 49}.

Durante a infecção por *E. cuniculi*, o título de IgM aumenta e o de IgG diminui, porém, animais com infecções recorrentes podem manifestar alterações na produção de anticorpos⁵⁴. A presença de IgM é indicativa de infecção ativa (aguda, reativada ou reinfeção) pelo que se deve optar por instituir terapia específica nessa situação. A presença de IgG indica infecção crônica. A titulação diferenciada de anticorpos IgM e IgG dá-nos, por isso, uma ideia do estado da infecção. Contudo, a maioria dos testes de rotina só consegue detectar anticorpos do tipo IgG⁵⁵.

Os anticorpos maternos contra *E. cuniculi* passam para a descendência através do colostro conferindo proteção aos coelhos até às 4 semanas de idade³², mas entre as 4 e as 8 semanas os animais tornam-se seronegativos⁵⁶. A soroconversão em resposta a uma infecção ativa ocorre em animais jovens entre as 8 e as 10 semanas de idade, e acredita-se que nesta fase a infecção é transmitida por contato com a progenitora⁵⁴.

Estudo anterior experimentalmente em camundongos demonstrou que a doença metabólica *diabetes mellitus* tipo 1 (DM) induzido pela estreptozitocina aumenta a susceptibilidade a encefalitozoonose causada por *E. cuniculi*. Neste estudo, foi demonstrado que o DM diminui a população de células imunes, tais como células B-1, B-2 e T CD4+, que estavam associados a baixos níveis da citocina IFN- γ ⁵¹.

7 JUSTIFICATIVA

É sabido que os esporos de *E. cuniculi* possuem ampla variedade de hospedeiros entre os mamíferos e tem a capacidade de se disseminar em múltiplos tecidos. A encefalitozoonose é uma doença subdiagnosticada, sendo necessário a utilização de técnicas de laboratório altamente sensíveis e específicas para o diagnóstico confirmatório⁴².

Pesquisas realizadas com outros patógenos inoculados por via oral⁵¹ mostraram que a resposta imune da mucosa intestinal possui um papel crítico na proteção de hospedeiros infectados, o que foi também demonstrado para microsporídios em estudo realizado por Moretto et al. (2004)⁵⁷. Porém, existe uma lacuna quando se pensa quais respostas imunes os microsporídios podem induzir em diferentes órgãos, em especial em pacientes com doenças hepáticas ou que sofreram transplante de órgãos, já que ambas condições favorecem infecções por patógenos oportunistas. Em estudos experimentais, foi verificado que o padrão de disseminação do parasita depende da via de infecção, como observado por Moretto et al. (2015)⁵⁸, no qual animais infectados por via oral apresentaram menores cargas parasitárias no baço e no fígado do que os que receberam uma dose infecciosa por via intraperitoneal. Além disso, resultados de um estudo experimental sugerem que a encefalitozoonose é provavelmente é uma doença caracterizada pela latência, podendo reativar, infectar vários órgãos, como os rins, sistema nervoso central (SNC) e fígado, em indivíduos imunodeprimidos³⁰.

O modelo experimental usando camundongos e *E. cuniculi* vem sendo desenvolvido como forma de se investigar e responder as lacunas existentes frente à resposta imunológica devido ao fato deste mimetizar a infecção humana^{29,51,52,59-62}.

O fígado é o principal órgão onde passam todas as substâncias vindas do intestino, e possui um microambiente único. O fígado contém a maior população absoluta dos macrófagos teciduais do organismo de mamíferos⁶³. De fato, a distribuição dos macrófagos hepáticos (células de Kupfer) nos sinusóides hepáticos permite que estas células estejam em maior contato com as células sanguíneas⁶⁴. Até o presente momento, não estão disponíveis dados científicos sobre a relação, o papel ou a importância dos macrófagos hepáticos na infecção por *E. cuniculi* e na encefalitozoonose. Ainda, não existem informações sobre a dinâmica da infecção, persistência, latência e replicação de *E. cuniculi* nas células de Kupfer.

Apesar de trabalhos na literatura científica terem observado lesões hepáticas na encefalitozoonose experimental^{29,51,52,59-62}, a caracterização da resposta imune na hepatite em indivíduos com encefalitozoonose, bem como em várias outras doenças infecciosas (virais, bacterianas e por protozoários), ainda não foi esclarecida. Sendo assim, no presente projeto é proposto um modelo murino experimental de investigação da caracterização dos subtipos celulares da resposta imune hepática e esplênica contra *E. cuniculi*. Adicionalmente, quantificamos as principais citocinas que poderiam estar relacionadas com essa resposta imune contra *E. cuniculi*.

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta imune associada à hepatite causada pela infecção por *E. cuniculi* em camundongos C57BL/6 imunocompetentes e imunossuprimidos por ciclofosfamida.

8.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar e quantificar fenotipicamente as células do sistema imune (TCD4+, TCD8+, B, Macrófagos e Células Dendríticas) por citometria de fluxo no fígado;
- Caracterizar e quantificar fenotipicamente as células do sistema imune (TCD4+, TCD8+, B, Macrófagos e Células Dendríticas) por citometria de fluxo no baço;
- Identificar e quantificar as citocinas *Th1*, *Th2* e *Th17* envolvidas na resposta imune hepática em amostras de fígado e soro por citometria de fluxo;
- Documentar a hepatite granulomatosa através da histopatologia.

9 METODOLOGIA

9.1 Tipo de Pesquisa

O presente estudo caracterizou-se como pesquisa experimental *in vivo*, realizada no laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Paulista (UNIP-SP), a partir da utilização de camundongos linhagem C57BL/6 e esporos de *E. cuniculi*.

9.2 Animais

Camundongos C57BL/6, do gênero masculino specific pathogen-free (SPF), com quatro semanas de idade, foram infectados pela via intra-venosa (I.V.) na veia da cauda com volume de 50 µl contendo 1.10^7 esporos de *Encephalitozoon cuniculi* diluídos em solução PBS 1x. Foram utilizadas seringas e agulha de insulina estéreis e descartáveis. Os experimentos foram conduzidos no biotério da Universidade Paulista, que possui estrutura bem como certificação para manutenção de animais SPF. Todos os animais foram alimentados com ração e água estéreis. A maravalha estéril foi trocada duas vezes por semana. Os animais SPF utilizados no experimento de citometria de fluxo foram adquiridos do biotério da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME, UNIFESP).

9.3 Patógeno

Os esporos de *E. cuniculi* utilizados para a infecção foram obtidos da empresa Waterborne® Inc. (New Orleans, LA, USA), cultivados em células renais de coelho (RK-13, ATCC CCL 34) em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato, aminoácidos não-essenciais e gentamicina (20mg/ml). As culturas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO₂ no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Paulista. A cada 07 (sete) dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 30 minutos a 1500 rpm para obtenção dos esporos contidos no sedimento, que foram ressuspensos em PBS com 0,1% de Tween 20 e centrifugado com Percoll a 50%. Os esporos coletados do sobrenadante foram lavados 3 vezes em

solução tampão fosfato-salina (PBS) armazenados a 4°C. Para contagem dos esporos *E. cuniculi* foi utilizada a câmara de Neubauer⁶⁵.

9.4 Imunossupressão

O protocolo de imunossupressão adotado foi o estabelecido por Lallo e Hirschfeld (2012)⁶², com pequenas modificações, onde os camundongos receberam uma dose semanal de 75 mg/kg de ciclofosfamida por via intraperitoneal (Genuxal®, Asta Médica Oncologia, São Paulo, Brasil), iniciada no dia da inoculação do patógeno e mantida por todo o período experimental.

9.5 Infecção Experimental

Os animais divididos em 4 grupos: Grupo *Infectado* – camundongos inoculados com *E. cuniculi* com 7 animais; Grupo *Cy-Infectado* – camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e inoculados com *E. cuniculi*, com 6 animais; Grupo *Cy-Não-Infectado* – camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e não-inoculados com 4 animais; e Grupo *Não-Infectado* – camundongos não inoculados e não imunossuprimidos com ciclofosfamida com 3 animais, foram mantidos sob as mesmas condições⁶².

9.6 Necropsia, colheita de amostras

Aos 30 (trinta) dias pós-infecção (DPI), os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico para tal foi administrado por via intraperitoneal utilizando-se mistura de quetamina (40 mg/Kg), xilazina (8 mg/Kg) e fentanil (4 mg/Kg). Em seguida, foi realizado pinçamento até a verificação da ausência de sensibilidade. Posteriormente, a necropsia foi iniciada com a punção cardíaca através da abertura do tórax com tesoura, coletando-se até 1 (um) mL de sangue, que foi posteriormente dividido em 2 (duas) alíquotas para determinação da carga parasitária (dados não demonstrados) e obtenção do soro após centrifugação. Em seguida, foram injetados 50mL de solução PBS 1x estéril pela via intracardíaca. O

fígado foi colhido e processado para a citometria de fluxo (protocolo abaixo), além de congelado para dosagem de citocinas e carga parasitária.

9.6.1 Citometria de fluxo e análise fenotípica dos componentes imunológicos

O fígado foi transferido para tubo falcon de 15 mL com solução salina balanceada de Hanks (HBSS) em soro fetal bovino a 2% e colocado em gelo até a dissociação com cell strainer de 70 micrômetros. Em seguida foi utilizado tampão de hemólise para lise das hemácias. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 500g em solução de percoll 37% em HBSS1x. Em seguida, as células foram lavadas e 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 – BV605 (Biolegend), anti-CD4 de camundongo conjugado a PerCP, anti-CD8 de camundongo conjugado a FITC, anti-F4/80 de camundongo conjugado – PEC y7a (Ebioscience), anti-CD11b de camundongo conjugado – APCCy7 (BD Biosciences). As amostras processadas de fígado e baço foram posteriormente marcadas com anticorpos para a identificação das células: macrófagos hepáticos e esplênicos (F4/80+, CD11b+, CD11c-), células dendríticas hepáticas e esplênicas (F4/80+, CD11c+, CD11b-), linfócitos TCD4 (CD45+, CD4+), linfócitos TCD8 (CD45+, CD8+) e linfócitos B (CD45+, CD19+).

9.7 Histopatologia

Foram colhidos fragmentos do fígado e baço para posterior fixação em solução de formol tamponado a 10% por até 48 horas, que foram clivados e processados rotineiramente, e finalmente embebidos em parafina para análise histopatológica.

Posteriormente, fragmentos teciduais foram rotineiramente cortados em fragmentos de 03 (três) µm de espessura. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro, corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (HE) e coloração de Gram-Cromotrope (MOURA et al., 1996) e examinados pela microscopia de luz - Nykon Eclipse E200, Tokio, Japão²⁹.

9.8 Quantificação das citocinas

Foi colhido um fragmento do fígado (200mg) de cada animal, que foi submergido em tubo de polipropileno de 1,5mL contendo solução de inibidores de protease (Sigma-Aldrich P8340-1ML) e congelado a -20°C . Posteriormente, o fígado foi descongelado, triturado (TissueRuptor II, Qiagen, Germany) e centrifugado a 10.000 r.p.m. O sobrenadante foi coletado em novo tubo e congelado a -20°C para posterior quantificação das citocinas. Além disso, o soro foi obtido após processamento do sangue colhido de cada animal e armazenado a -20°C . Em seguida, as amostras de fígado e soro foram descongeladas e preparadas de acordo com as normas técnicas determinadas pelo fabricante do kit “CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit” (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) para detecção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α e IFN- γ ^{29,51,52}.

9.9 Análise Estatística

As comparações estatísticas foram feitas pelo teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste posterior de Tukey. Para determinação dos intervalos de confiança de 95% da média, as análises foram realizadas utilizando a ferramenta *bootstrap*⁶⁵. Em todos os casos, o nível de significância adotado será de $\alpha < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa “GRAPHPAD PRISM” versão 5.0 para Windows® (Graphpad Software).

9.10 Aspectos Éticos

Este estudo foi desenvolvido considerando-se os aspectos éticos pertinentes a pesquisas envolvendo animais conforme a lei 6.638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática da vivisseção de animais, bem como os Princípios Éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) de 1991, entidade filiada ao *International Council of Laboratory Animal Science* (ICLAS)⁶⁶. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UNESP (Protocolo número FOA-201400578) e UNIP (CEUA 043-18).

10 RESULTADOS

10.1 Histopatologia

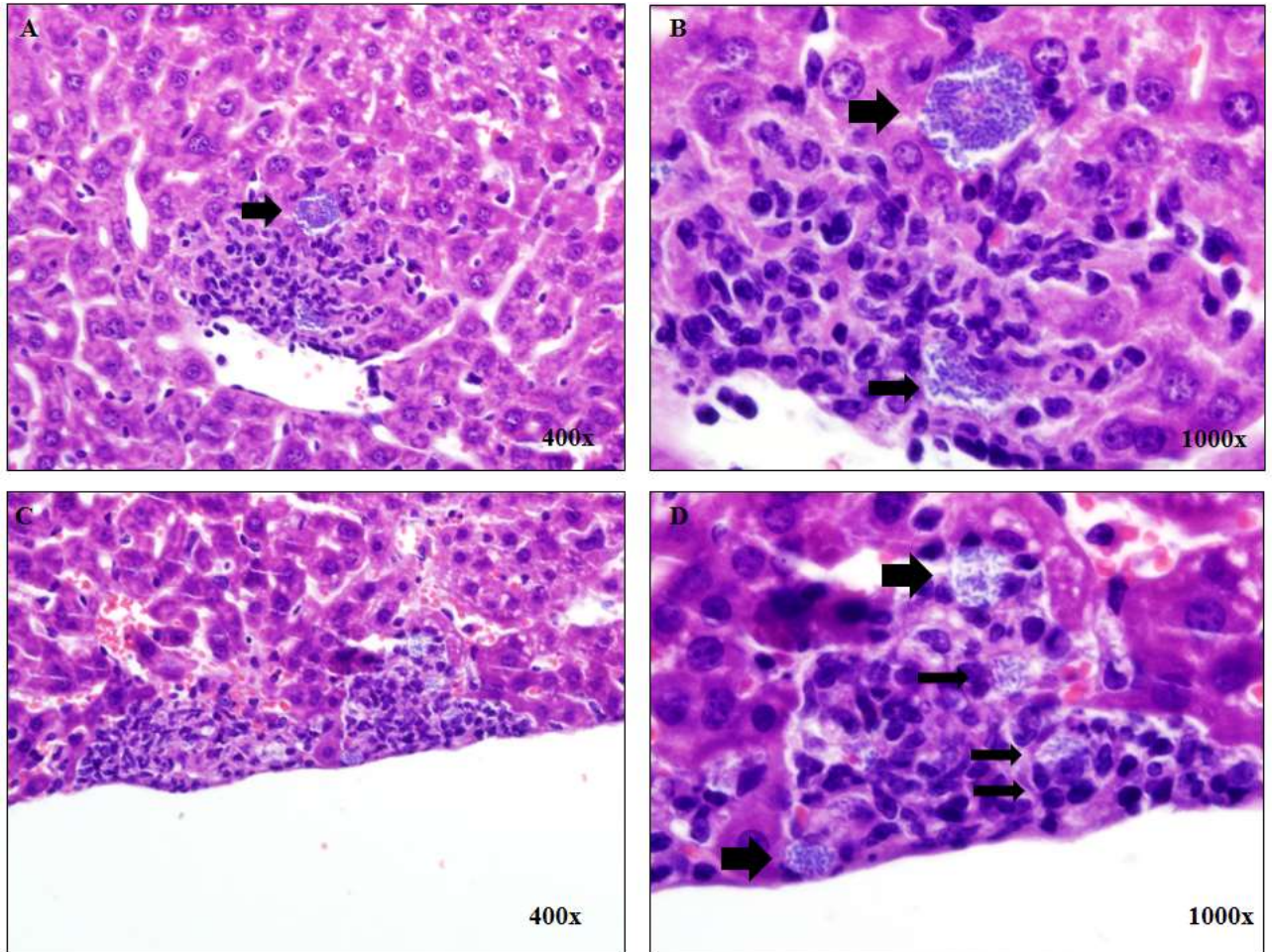


Figura 2 - Camundongo. Fígado. Hepatite granulomatosa multifocal leve a moderada. A, B, C e D (onde a Figura B é a ampliação da Figura A e a Figura D é a ampliação da Figura C: Histopatologia das lesões microscópicas granulomatosas, predominantemente compostas por macrófagos, associadas a inúmeros esporos basofílicos em formato de bastão de *E. cuniculi* no citoplasma de macrófagos e livres (setas, aglomerados). Hematolixina e Eosina

No fígado de todos os grupos *Infectados* e *Cy-infectados* (Figura A,B,C,D), foi observada hepatite granulomatosa multifocal moderada, associada a esporos basofílicos de *E. cuniculi*, além de vacuolização hidrópico-vacuolar difusa no citoplasma dos hepatócitos. Os esporos foram observados aglomerados em clusters ou isolados, principalmente na região central do processo inflamatório granulomatoso. No grupo *Infectados*, foi observada hepatite multifocal, composta predominantemente por macrófagos, e linfócitos. Já no grupo *Cy-infectados* foi observada hepatite multifocal, composta por células morfológicamente compatíveis com macrófagos. Além disso, a quantidade e tamanho dos granulomas, bem como áreas de necrose

associadas, foram mais intensas somente no grupo de animais infectados e imunossuprimidos.

No grupo Cy, foi observada vacuolização hidrópico-vacuolar difusa no citoplasma dos hepatócitos. No grupo *Não-Infectado* não foram observadas alterações microscópicas no fígado.

10.2 Componentes imunitários do Fígado

A análise fenotípica das populações celulares no fígado incluiu a quantificação de macrófagos, células dendríticas, linfócitos T CD4+, CD8+ e B+.

10.2.1 Linfócitos TCD4+, TCD8+ e B no Fígado

Em relação aos linfócitos TCD4+ e TCD8+, houve um aumento significativo no grupo Infectados em comparação com os demais grupos (Figura 03).

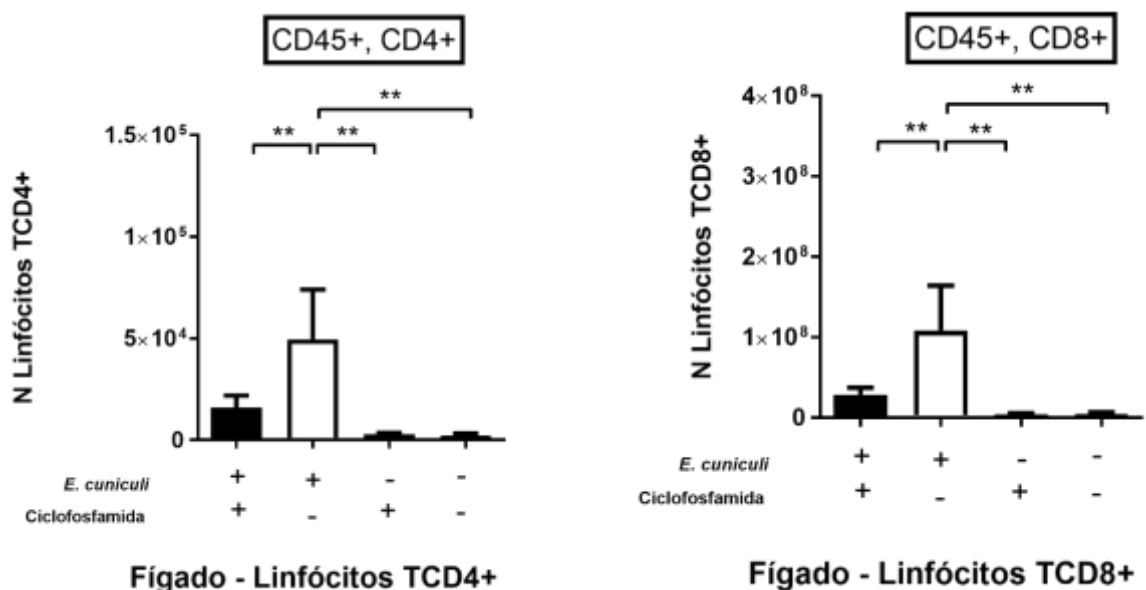


Figura 3 – Quantificação de linfócitos TCD4+ e TCD8+, detectados no fígado de Camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,001^{**}$.

Em relação aos linfócitos B+, houve um aumento significativo no grupo Infectados em comparação com os demais grupos (Figura 4).

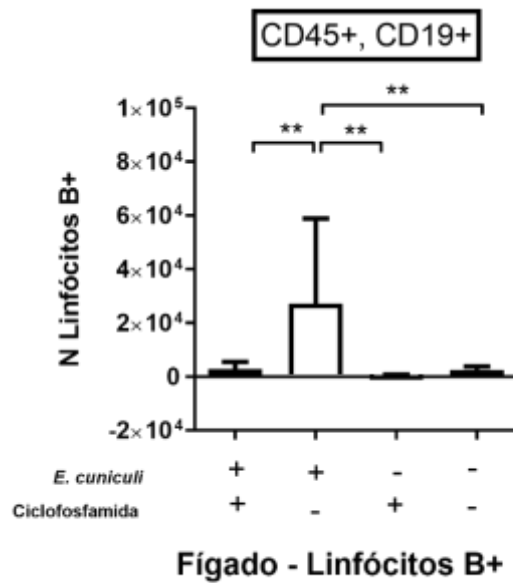


Figura 4 – Quantificação de linfócitos B+, detectados no fígado de Camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos $p < 0,001$.

10.2.2 Macrófagos no Fígado

Foi identificado aumento significativo dos macrófagos em todos os grupos em relação ao grupo controle não imunossuprimido (Figura 05).

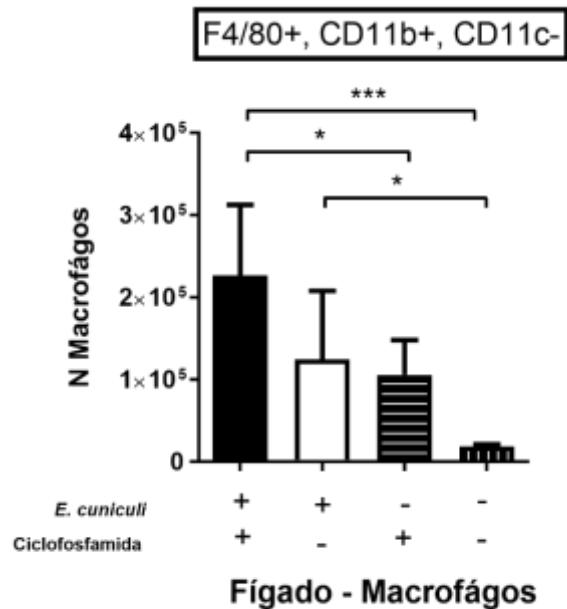


Figura 5 – Quantificação de macrófagos detectados no fígado de Camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles $p < 0,05^*$; $p < 0,0001^{***}$.

10.2.3 Células Dendríticas no Fígado

A identificação fenotípica das células dendríticas não revelou alterações significativas (Figura 06).

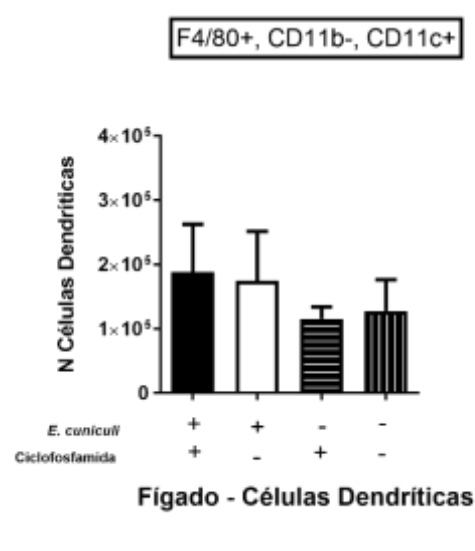


Figura 6 – Quantificação de células dendríticas no fígado de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles.

10.3 Componentes imunitários do Baço

A análise fenotípica das populações celulares no baço incluiu a quantificação absoluta de macrófagos, células dendríticas, linfócitos T CD4+, CD8+ e B+.

10.3.1 Linfócitos TCD4+, TCD8+ e B+ no Baço

Em relação ao linfócito TCD4+, houve uma redução significativa dos grupos *Infectado-CY* e *CY* em relação aos grupos *controle* e ao *Infectado* (Figura 07).

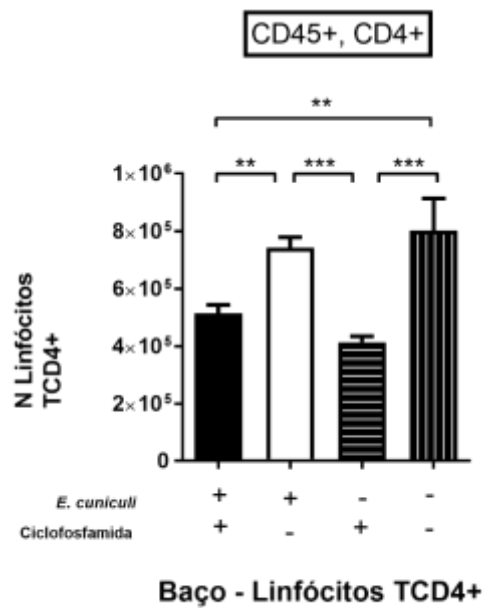


Figura 7 – Quantificação de linfócitos TCD4+, presentes no baço de Camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$.

Houve um aumento significativo dos linfócitos TCD8+ somente no grupo *Infectados* em relação ao grupo *Cy-não infectado* (Figura 8).

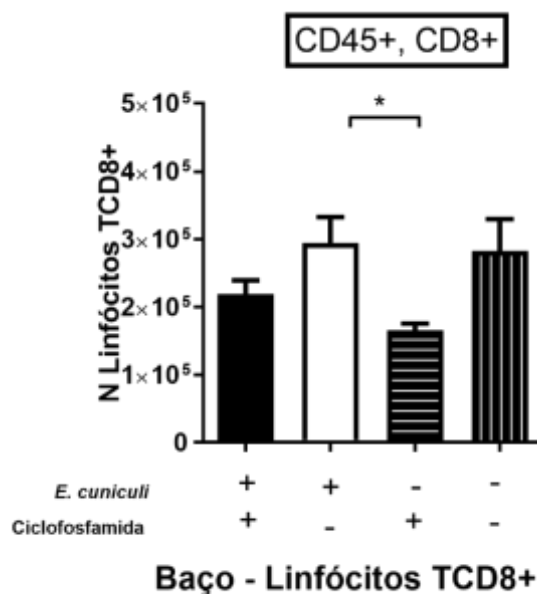


Figura 8 – Quantificação de linfócitos TCD8+, presentes no baço de camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles $p < 0,05^*$.

Houve uma redução significativa dos linfócitos B+ nos grupos *Infectado-CY* e *CY* em relação aos grupos *controle* e ao *Infectado* (Figura 09).

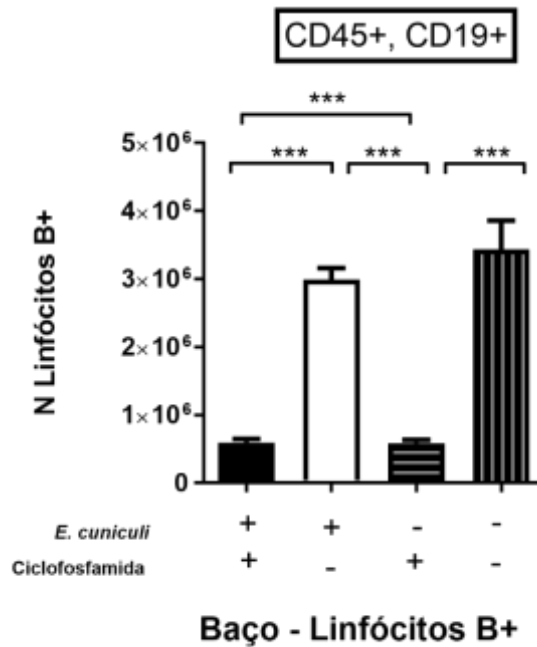


Figura 9 – Quantificação de linfócitos B+ presentes no baço de camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles $p < 0,0001^{***}$.

10.3.2 Macrófagos no Baço

Houve um aumento significativo dos macrófagos do grupo *Cy-Infestado* em relação aos grupos *Infestados* e *controle* (Figura 10).

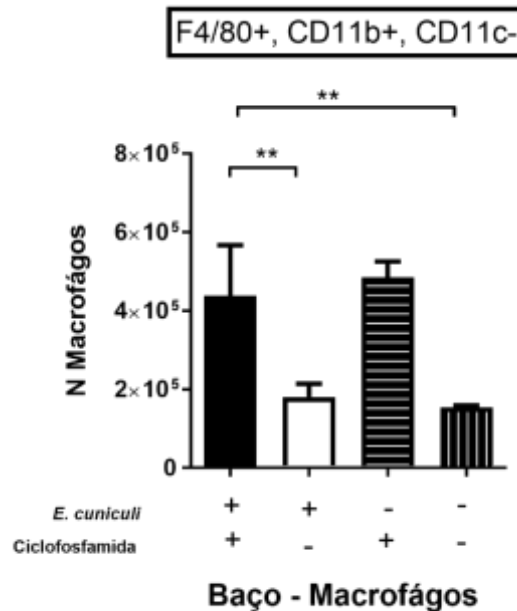


Figura 10 – Quantificação de macrófagos presentes no baço de camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles, $p < 0,001^{**}$.

10.3.3 Células Dendríticas no Baço

Não houve diferenças significativas da quantificação das células dendríticas (Figura 11).

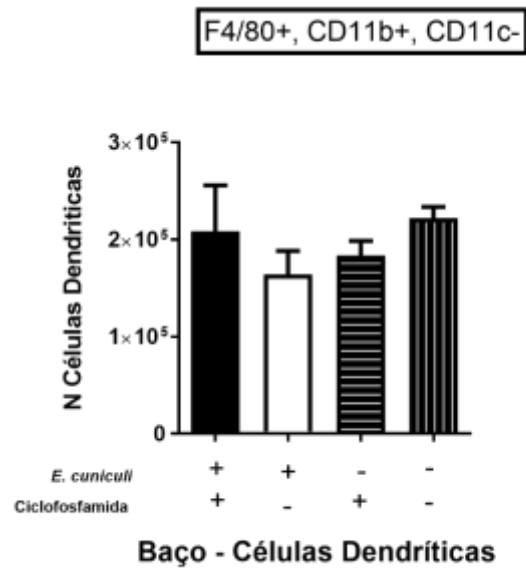


Figura 11 – Quantificação de células dendríticas no baço de Camundongos C57BL/6, imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles.

10.4 Citocinas

10.4.1 IFN- γ e TNF α no fígado

A infecção por *E. cuniculi* aumentou os níveis de IFN- γ e TNF α no fígado de animais do grupo *Infectados* e grupo *Cy-Infectado* em relação aos demais grupos *não infectados* (Figura 12).

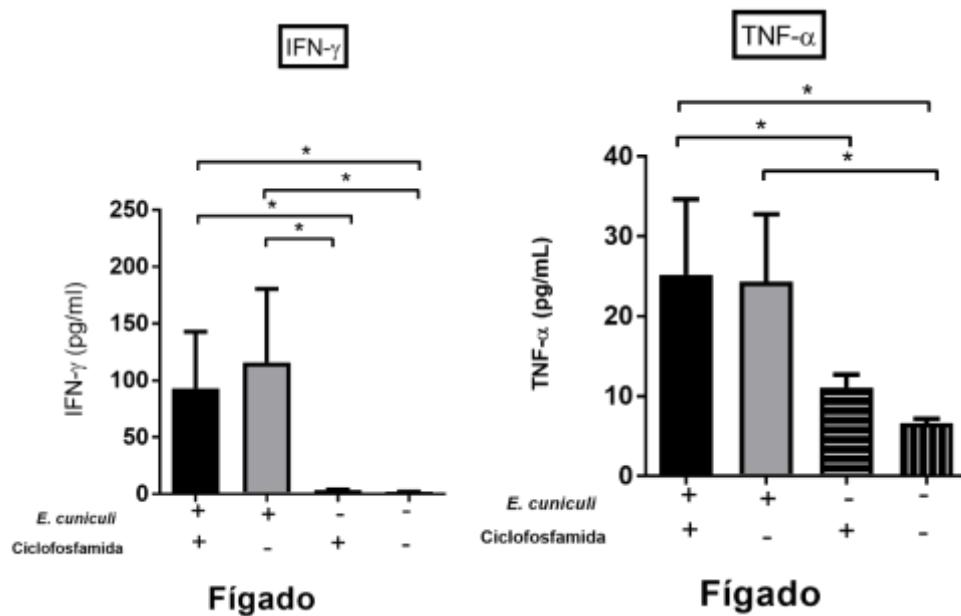


Figura 12 – Níveis de citocinas TNF α , IFN- γ detectadas no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos infectados e seus respectivos controles, $p < 0,05^*$.

10.4.2 IL-6 no fígado

A quantificação da citocina IL-6, revelou diferença significativa do grupo *Infectado* e grupo *Cy-não infectado*, em relação ao grupo *Controle* (Figura 13).

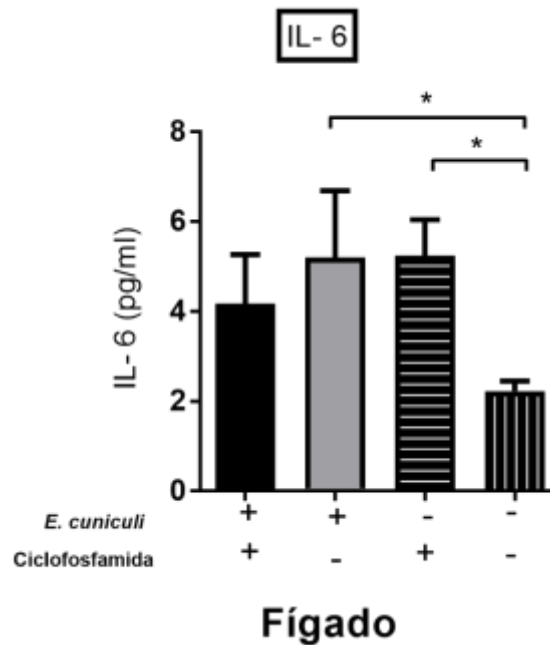


Figura 13 – Níveis da citocina IL-6 detectada no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05^*$.

10.4.3 IL-2 no fígado

Não foram observadas diferenças significativas da citocina IL-2 (Figura 14).

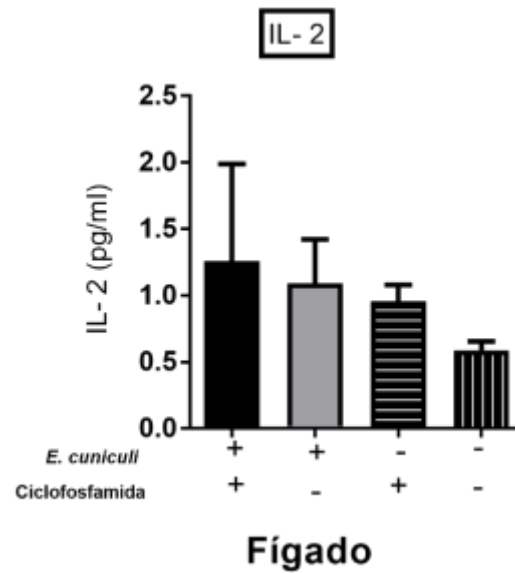


Figura 14 – Níveis da citocina IL-2 detectada no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.

10.4.4 IL-10 no fígado

Com relação a citocina IL-10, houve um aumento significativo no fígado de todos os grupos em relação ao grupo *controle não infectado* (Figura 15).

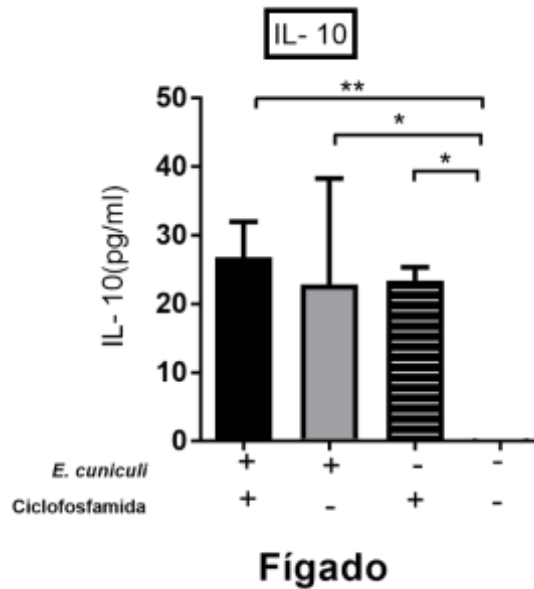


Figura 15 – Níveis de citocina IL-10 detectada no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculada (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05$, $p < 0,001^{**}$.

10.4.5 IL-4 e IL-17 no fígado

Os valores das citocinas IL-4 e IL-17 nos diferentes grupos experimentais não foram estatisticamente significantes (Figura 16).

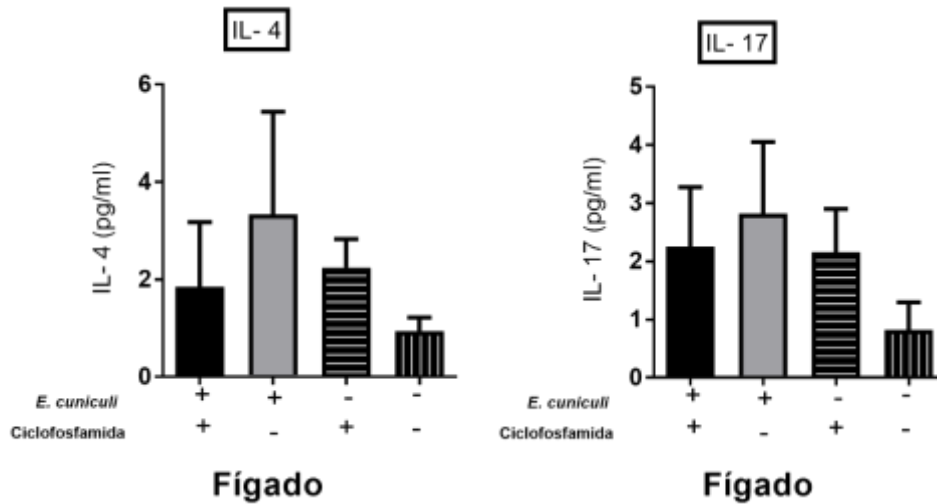


Figura 16 – Níveis de citocina IL-4 e IL-17 detectadas no fígado de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.

10.4.6 IFN- γ e TNF α no Soro

O patógeno aumentou os níveis séricos de IFN- γ nos grupos Infectados quando comparados aos grupos *controle* e *Cy-não Infectado* (Figura 17).

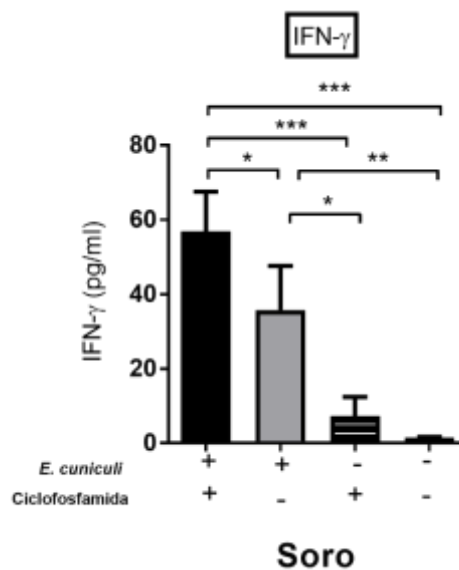


Figura 17 – Níveis de citocinas IFN- γ detectadas no Soro de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes para a citocina IFN- γ $p < 0,05^*$, $p < 0,001^{**}$, $p < 0,0001^{***}$.

Não foi observada diferença estatística da citocina TNF- α , apenas um aumento biologicamente significativo (Figura 18).

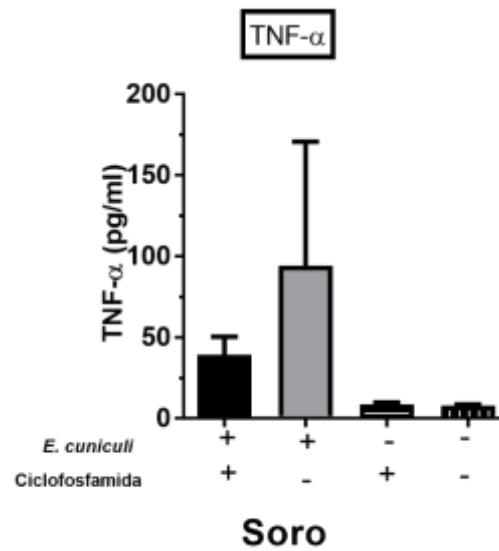


Figura 18 – Níveis de citocinas TNF- α detectadas no Soro de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.

10.4.7 IL-10 no Soro

A citocina IL-10 não foi detectada no soro de nenhum dos grupos experimentais (Figura 19).

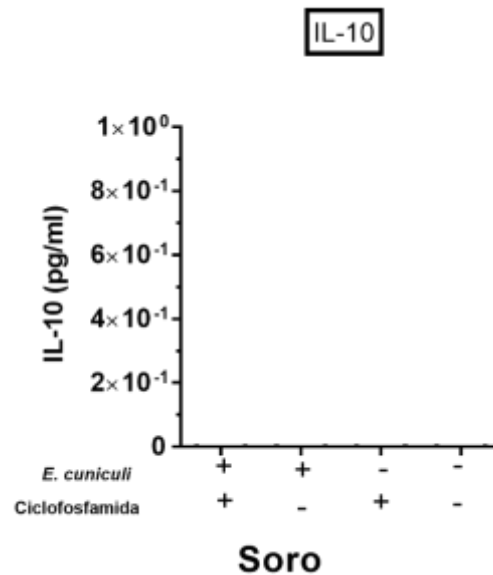


Figura 19 – Níveis da citocina IL-10 detectada no Soro de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.

10.4.8 IL-6 no Soro

Não houve uma diferença significativa da citocina IL-6 em todos os grupos comparados aos controles (Figura 20).

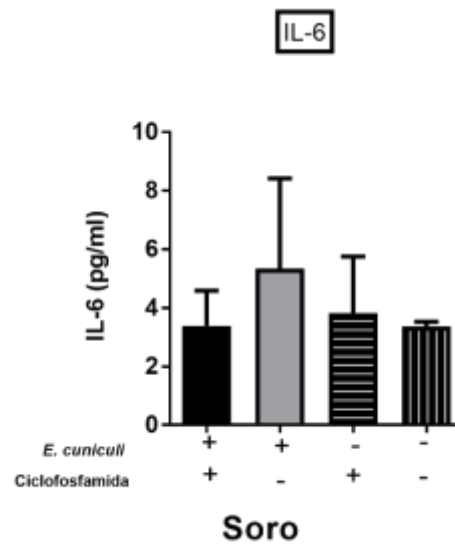


Figura 20 – Níveis da citocina IL-6 detectada no soro de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente.

10.4.9 IL-2, IL-4, e IL-17 no Soro

Não houve aumento significativo das citocinas IL-2, IL-4 e IL-17 de todos grupos em relação ao grupo *Não Infectado* (Figura 21).

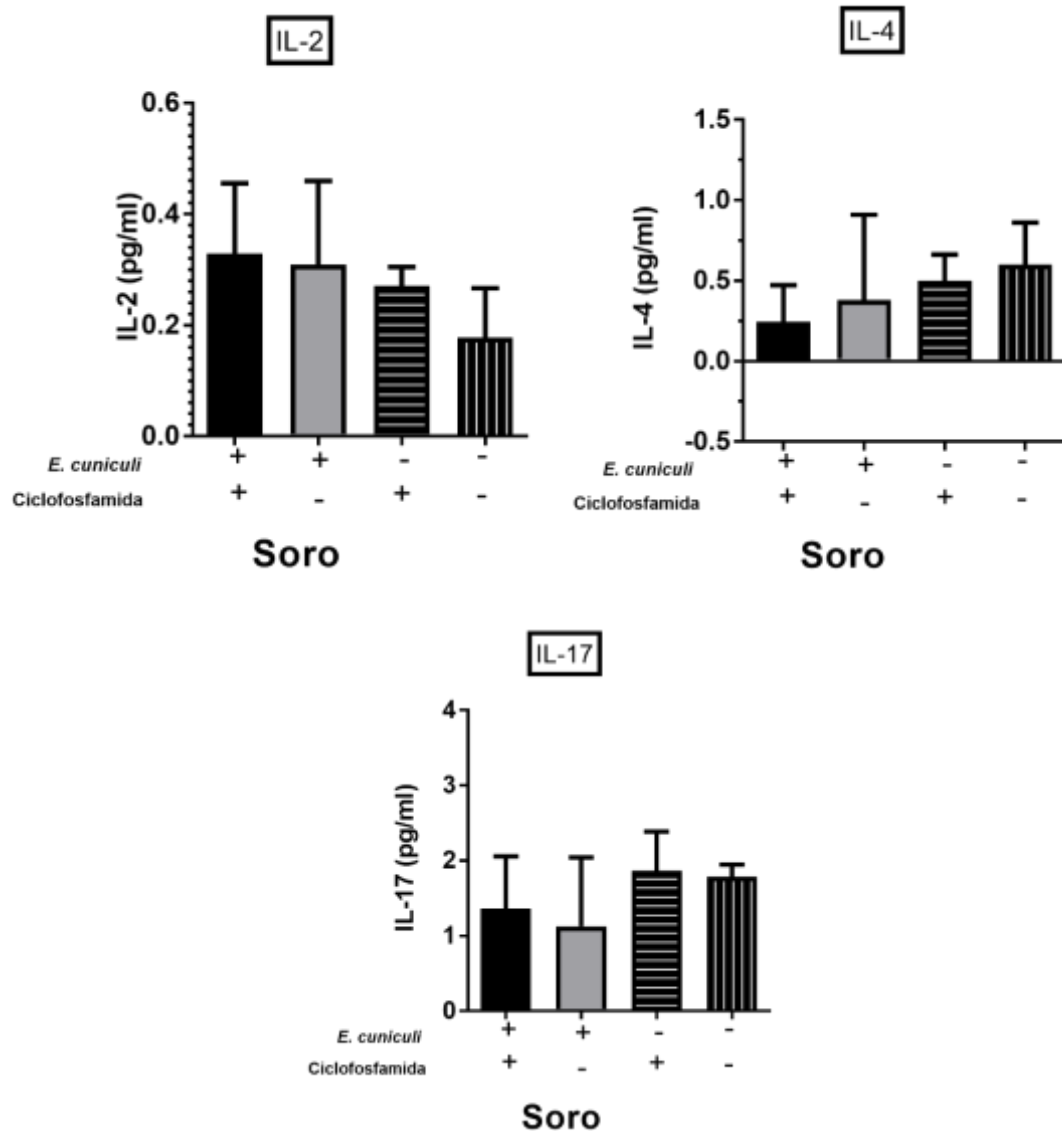


Figura 21 – Níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17, detectadas nos soros de camundongos imunossuprimidos com Cy (+) ou não (-) e inoculadas (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey não revelou diferenças estatisticamente significantes.

11 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a resposta do sistema imune do fígado e baço contra a infecção intravenosa por *E. cuniculi* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com ciclofosfamida. Os resultados, inéditos na literatura, indicam que as alterações celulares foram mais significantes no grupo infectado quando comparados aos animais não imunossuprimidos.

As taxas de mortalidade decorrentes de doenças hepáticas estão aumentando no mundo⁶⁷. De acordo com dados do Reino Unido, a doença hepática é a quinta principal causa de morte depois de doenças cardíacas, acidente vascular encefálico, doenças respiratórias e o câncer⁶⁸. Na Ásia, as doenças hepáticas foram a oitava causa de morte em 2016⁶⁹. No Brasil, de acordo com dados do DATASUS, de 2001 a 2016 as doenças hepáticas ocuparam o oitavo lugar no *ranking* de mortalidade⁷⁰.

Em 1987, foi descrito o primeiro caso de hepatite por *E. cuniculi* em um paciente de 35 anos infectado pelo HIV, com contagem de CD4 = 48 células/mm e sarcoma de Kaposi⁷¹. Desde então, as microsporidioses tem sido descrita como doenças oportunistas, principalmente em pacientes transplantados, diabéticos, crianças e idosos^{29, 53, 72, 73, 74}.

A ciclofosfamida é um fármaco citotóxico que se liga ao DNA e induz a apoptose, causando mielossupressão e diminuindo as populações de neutrófilos, linfócitos, hemácias e plaquetas, suprimindo a resposta das células T e B⁷⁷. Outras reações adversas importantes da ciclofosfamida incluem: a toxicidade hematológica, a insuficiência renal⁷⁶, a hiponatremia⁷⁷, o comprometimento neurológico⁷⁸, a amenorreia⁷⁹, a menopausa precoce⁸⁰, a perda de cabelo⁸¹ e a hepatotoxicidade⁸¹.

Os resultados da citometria de fluxo do presente estudo demonstram que no baço do grupo CY houve efeito linfotóxico, com diminuição significativa dos linfócitos TCD4+ em relação aos grupos infectado e controle; diminuição significativa de TCD8+ em relação em grupo infectado; e diminuição significativa dos linfócitos B em relação a todos os outros grupos. Adicionalmente, no fígado do grupo CY, foi observado aumento significativo das citocinas IL-6 e IL-10 em comparação ao grupo controle.

Estudos anteriores sobre a encefalitozonose murina sugerem a ciclofosfamida como droga imunossupressora (linfotóxica) e imunomoduladora, em compartimentos de linfócitos, podendo rapidamente esgotar as células B e T, sendo seguido pela recuperação, proliferação e mobilização extensiva da medula óssea, de acordo com

o órgão²⁹. Observamos, no presente estudo, que as populações de linfócitos B+, TCD4+ e TCD8+, reduziram significativamente no fígado e no baço com a infecção por *E. cuniculi* associado ao tratamento imunossupressor pela ciclofosfamida na dose de 75mg/kg/semana pela via intraperitoneal. Interessantemente, também observamos que as populações de macrófagos diminuíram com a infecção e a ciclofosfamida no baço, sugerindo migração e maturação de monócitos para outros locais, como o fígado. Entretanto, estudos mais aprofundados sobre a migração de fagócitos poderão confirmar essa hipótese.

A literatura científica descreve que os efeitos do tratamento com a ciclofosfamida determinaram um quadro de encefalitozoonose bem mais grave, porém sintomas como ascite acentuada e lesões histopatológicas mais intensas²⁹ o que foi diferente dos resultados obtidos com camundongos *atímicos* e *SCID*, que possuem deficiência acentuada das células T^{29,69}. Ambos estudos identificaram uma maior suscetibilidade a encefalitozonose nos animais infectados e tratados com ciclofosfamida^{29, 59,60, 69}.

A hepatotoxicidade é uma reação adversa da ciclofosfamida que normalmente ocorre em altas doses⁸¹. Quando a hepatotoxicidade ocorre em baixas doses, a reação é classificada como rara, mas séria⁸². A falência hepática aguda já foi relatada com a ciclofosfamida na dose de 200mg em paciente adulto com glomerulonefrite progressiva secundária a granulomatose de Wegner.

Outro fator que pode ser monitorado e associado à hepatotoxicidade é a taxa de sódio. Considera-se hiponatremia uma desordem de eletrólitos identificada na prática clínica⁷⁸. Embora muitos casos sejam leves ou relativamente sintomáticos, considera-se a hiponatremia de importância clínica, aquela com alta morbidade e mortalidade. Embora no presente trabalho não tenhamos quantificado os fatores eletrolíticos, o aumento da citocina IL-10 no grupo imunossuprimido indica que a ciclofosfamida causou um efeito hepatotóxico com a administração contínua por 30 dias.

Estudo anterior²⁹, no qual se pesquisou o papel da célula B-1, na resposta imune de camundongos infectados pela via oral, observou-se redução na população de linfócitos T CD4+ no baço. Além disso, foi observada uma acentuada redução no percentual dessas células em todos os animais infectados, resultado semelhante ao nosso. Também houve diminuição no percentual de linfócitos TCD8+ em camundongos BALB/c e XID+B-1 infectados pelo *E. cuniculi*. No presente estudo, houve aumento significativo de TCD8+ somente no grupo infectado, demonstrando

tanto um efeito indutor de resposta imune devido a infecção por *E. cuniculi*, como também o efeito linfotóxico da Cy no grupo *CY-infetado*. Como utilizamos camundongos considerados geneticamente imunocompetentes (C57BL/6), é provável que este seja o motivo da diferença dos dois estudos experimentais.

A resposta imune protetora contra a encefalitozoonose é mediada por linfócitos TCD8+^{32,84}, corroborando os achados do presente estudo, com aumento significativo dos linfócitos TCD8+ no fígado somente com a infecção por *E. cuniculi*, reforçando o importante papel dos linfócitos T na resposta imune contra a encefalitozoonose. Estudos anteriores demonstraram aumento das populações de linfócitos T CD4+, CD8+ e células B+ em resposta à inoculação oral e intraperitoneal de *E. cuniculi*, evidenciando a importância dos linfócitos na imunidade inata e adquirida contra a encefalitozoonose^{29,52}. Observamos que a ciclofosfamida reduziu as populações de células B+, TCD4+ e TCD8+ no grupos Cy e *Cy-Infetado* no fígado e baço, sendo estas falhas as prováveis responsáveis por tornar estes animais mais suscetíveis à encefalitozoonose⁶⁰.

Estudos experimentais sobre a encefalitozoonose descrevem a importância da via de infecção para a eficaz resposta imune, conduzidos com o emprego da inoculação por via intraperitoneal^{29,61,84}. Em geral, as microsporidioses são transmitidas pela rota oro-fecal, através da ingestão dos esporos dos microsporídios³¹. A resposta do sistema imune contra o *E. cuniculi* é diretamente influenciada e dependente da velocidade da multiplicação do patógeno do tipo de resposta imune do hospedeiro. Em nosso estudo, os resultados da histopatologia indicam que, apesar do quadro aparentemente assintomático dos animais, houve disseminação da infecção para múltiplos órgãos, como fígado, baço, encéfalo e pulmões (resultados não apresentados). No entanto, também houve grande mudança no perfil das populações de células B+ e macrófagos no fígado após a infecção. Esses dados diferem dos observados no estudo prévio, onde utilizou-se a via intraperitoneal para infecção²⁹, reforçando o importante papel da resposta imune específica se diferencia para cada órgão em combate a encefalitozoonose.

A produção de anticorpos contra microsporídios contribui com a resistência e facilita a opsonização, neutralização e fixação de complemento, os quais habilitam a fagocitose de esporos, contribuindo com a eficiência da resposta imune⁸⁵. Assim, as células B+ devem contribuir com a imunidade contra os microsporídios já que são produtoras de IgM, uma imunoglobulina pentamérica com 10 sítios de ligação

antigênica, fator que favorece a opsonização, fagocitose, apresentação antigênica e, consequentemente, a atividade de linfócitos TCD8+ e TCD4+²⁹. De forma geral, os macrófagos reconhecem patógenos e respondem secretando fatores de inflamação, como quimiocinas e citocinas, que por sua vez recrutam novas células de defesa, incluindo monócitos para combater infecções⁸⁶. Em estudo anterior⁵² foi observado que nos camundongos BALB/c inoculados com *E. cuniculi* por via intraperitoneal ocorre um aumento de macrófagos no peritônio, assim como observamos no fígado no presente estudo. Mais uma vez, evidencia-se que o aumento da população macrofágica no fígado pode estar relacionado com evolução favorável para o hospedeiro e desfavorável ao patógeno em condições de imunocompetência.

Estudos prévios mostraram que a deficiência de células B-1 aumenta a suscetibilidade de encefalitozoonose em camundongos Balb/c XID, favorecendo a disseminação de fungos. De fato, a transferência de células B-1 para camundongos XID permitiu uma resposta mais eficiente contra o patógeno, provavelmente promovendo a regulação de citocinas pró-inflamatórias, dando mais evidências do papel das células B-1 no aumento de citocinas pró-inflamatórias²⁹.

Para uma resposta imunitária eficaz, os macrófagos atuam numa cascata sequencial e coordenada para remover um microrganismo patogénico, resolvendo inflamação e reparando o tecido danificado. Quando o dano tecidual ocorre, macrófagos residentes de um determinado tecido liberam citocinas inflamatórias, além de quimiocinas, e recrutam células efectoras, tais como os neutrófilos. Subsequentemente, os macrófagos no local danificado regulam positivamente a expressão de genes, como *Retnla*, *Chil3*, e *Arg1*, que são importantes no contexto da reparação tecidual e de processos anti-inflamatórios^{87, 88}.

A ativação de células TCD8+ tem sido associada à liberação de IL-12, que também é importante função das células dendríticas⁸⁹. Além disso, alguns estudos já relataram que as células dendríticas da mucosa do intestino desempenham um papel essencial na indução de receptores *homing* intestinal preferenciais, como CCR9 em células T^{90,91}. A liberação destes receptores por células dendríticas intestinais é mediada pelo ácido retinoico^{92,93}, portanto, em estudos subsequentes, as populações de células dendríticas da mucosa intestinal infectadas por *E. cuniculi*, comparando as populações de CD11b e CD8. As células dendríticas da mucosa intestinal são capazes de produzir a citocina IFN- γ em resposta a infecção por patógenos intracelulares, ativando a resposta linfocítica citotóxica⁵⁸.

O *Toxoplasma gondii* e os vírus das hepatites B e C são patógenos intracelulares que estimulam respostas imunes polarizadas envolvendo perfis de citocinas Th1 (mediadores pró-inflamatórios), como IL-12, IFN- γ e o óxido nítrico. A imunidade contra a toxoplasmose é em grande parte mediada por células T. As células T CD8 + desempenham um papel importante como linfócitos efetores contra o parasita, enquanto as células T CD4 + são importantes para regular as respostas imunes ao *T. gondii* e ambas atuam sinergicamente, fornecendo uma imunidade protetora que permite a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção crônica. O IFN- γ é crítico para mediar a imunidade protetora contra o *Toxoplasma* e, durante a infecção crônica, as células T CD8 + são uma importante fonte dessa citocina, o que é essencial para controlar a reativação do parasita⁹³. Comparativamente, a eliminação da infecção dos HBV e HCV exige respostas de células T CD4 + e CD8 + vigorosas durante a fase aguda da infecção⁹⁴. De fato, os resultados do presente estudo e a literatura sugerem que a encefalitozoonose ocorre quando há depressão de TCD4+ e TCD8+⁵².

Com relação as células TCD4+ e TCD8+, houve um processo pró-inflamatório disseminado. Se compararmos com outros estudos experimentais sobre encefalitozoonose, verifica-se que as vias de inoculação do patógeno influenciam diretamente na ativação da resposta imune adaptativa^{29,51,52}.

Estudos com outros patógenos intracelulares, como o *T. gondii* demonstraram o papel importante da citocina IFN- γ , que pode ser produzida por TCD4, TCD8, células NK, bem como neutrófilos⁹⁵. A produção desta citocina é crucial para a ativação de macrófagos e, portanto, para a efetiva resposta imune contra *T. gondii*. Interessantemente, na infecção por *E. cuniculi* a resposta imune também é mediada por IFN- γ , dentre outros. Os resultados do presente estudo demonstraram aumento significativo do IFN- γ com a infecção intravenosa e imunossupressão por ciclofosfamida, tanto no soro quanto no fígado, sugerindo que quanto maior a carga parasitária, maior o dano celular, com maior produção e citocinas, como o IFN- γ . Resultados de estudos anteriores reforçam essa hipótese sobre IFN- γ na encefalitozoonose^{29,32,51,52}. Assim, sugerimos que para o fígado desempenhar um papel importante na resposta imune contra *E. cuniculi*, ocorre ativação massiva de macrófagos, provavelmente devido ao aumento de IFN- γ , pela resposta do microambiente hepático ser mais efetiva, já que as células de Kupfer são células com capacidade de apresentação de antígenos (APCs)^{63, 64}.

As citocinas *Th1*, como IFN- γ e IL-12 são importantes para a imunidade protetora contra vários agentes patogênicos intracelulares virais, bacterianos e parasitários, incluindo a infecção por *E. cuniculi*^{32,35,38,41}. De fato, na encefalitozoonose experimental murina houve aumento de IFN- γ e IL-6 no soro de camundongos BALB/c com 14 dpi e IFN- γ com 21 dpi²⁹. Além disso, em outro estudo, em camundongos do genótipo XID infectados com *E. cuniculi* submetidos à transferência adotiva de células B-1, foi verificado um importante aumento no soro das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , IL-2, TNF- α e IL-6, sugerindo um importante papel destas citocinas na capacidade de resposta imune contra a encefalitozoonose⁵².

A IL-6 é uma citocina helicoidal de 184 aminoácidos. Essa proteína é sintetizada por fibroblastos, monócitos, macrófagos, células T e células endoteliais. A produção e secreção de IL-6 pode ser induzida em processos inflamatórios, tais como por estimulação de receptor de tipo Toll TLR-4, pelo lipopolissacárido ou após estimulação das células pela citocina IL-1 ou pelo fator de necrose tumoral TNF α ⁹⁶. A IL-6, que foi inicialmente chamada de fator estimulante de células B-2, induz a diferenciação de células B ativadas em células plasmáticas produtoras de imunoglobulina (Ig). A IL-6 também é um modulador importante das funções efectoras das células T CD4 +, modulando, assim, a resposta imune celular na infecção pelos retrovírus. A IL-6, em combinação com o fator de crescimento transformante (TGF)- β , induz preferencialmente a diferenciação de células T CD4 + nativas em células Th17 e inibe o desenvolvimento de células T reguladoras induzidas por TGF- β (Treg). Portanto, a IL-6 é considerada um dos fatores-chave que contribuem para a modulação da resposta imune adaptativa contra retrovírus após a estimulação do ligante específico TLR⁹⁷.

Além disso, em resposta à estimulação dos TLR, células linfoides e não linfoides podem produzir citocinas pró-inflamatórias. Assim como as citocinas TNF- α e IL-1, a IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória muito importante induzida por agonistas dos TLR⁹⁷. A IL-6 é uma citocina multifuncional, sendo importante para iniciar a imunidade inata e regular as respostas imunes adaptativas, estando envolvida na proteção contra patógenos virais durante uma infecção⁹⁷. Adicionalmente, nas infecções por retrovírus, a IL-6 tem um efeito importante sobre a sobrevivência e proliferação das células T CD4. A IL-6 retém a expressão de Bcl-2 de células T CD4 e, assim, prolonga a sobrevivência celular em culturas de células T *in vitro*. Também foi demonstrado que a IL-6 protege as células TCD4 da morte celular induzida por

ativação pela inibição da expressão da via Fas/FasL. A IL-6 aumenta a proliferação de células T durante a ativação das mesmas e, portanto, foi descrita como uma molécula coestimuladora para ativação de células T. As células TCD4 específicas do antígeno também se expandem mais vigorosamente *in vivo* se a IL-6 exógena for fornecida durante a imunização⁹⁶.

Adicionalmente, a IL-6 também desempenha um papel crítico no desenvolvimento da memória de células T CD4+ em infecções virais, como na hepatite C, que atualmente é uma das causas mais prevalentes de hepatopatias⁹⁸ em todo mundo^{95,96}. No entanto, inúmeras evidências também revelam as propriedades anti-inflamatórias desta citocina citotípica. Por exemplo, em um modelo de pancreatite, demonstrou-se que a deficiência de IL-6 leva a uma resposta inflamatória mais grave. A ausência de IL-6 também leva a níveis melhorados de IFN- γ em resposta à administração sistemática de endotoxina LPS em camundongos e a administração de IL-6 recombinante pode inibir este efeito. Portanto, a IL-6 é capaz de regular as condições pró e anti-inflamatórias, além de contribuir para a homeostase imune^{97,98}. Os resultados do presente estudo sugerem que o aumento da citocina IL-6 no fígado e soro esteja provavelmente relacionado à resposta imune contra *E. cuniculi*, bem como à ação da ciclofosfamida.

As células de Kupfer são uma população tolerogênica de APCs no fígado e podem desempenhar um papel importante nos mecanismos de tolerância imunológica sistêmica mediada pelo fígado. As células de Kupfer expressam as citocinas imunossupressoras IL-10 e o fator de crescimento transformador beta (TGF-B), que estão envolvidos na geração de um ambiente único de citocinas, induzindo principalmente a tolerância dos linfócitos infiltrados no fígado⁴⁸. Os resultados do presente estudo sobre a não observação de diferenças significantes entre os grupos experimentais das populações de células dendríticas no fígado podem estar associados à capacidade complementar de apresentação de antígenos conhecida pelas células de kupfer⁴⁸.

Estudo anterior verificou que a expressão gênica do RNA mensageiro da citocina IL-10 aumentou nos esplenócitos de camundongos infectados *in vitro* com *E. cuniculi*. Como a citocina IL-10 tem sido associada à regulação da resposta imune *Th1* em outros modelos de doenças infecciosas, é possível que desempenhe um papel semelhante na infecção por *E. cuniculi*³².

Nossos resultados mostraram que a infecção por *E. cuniculi* e a imunossupressão por ciclofosfamida aumentaram os níveis de IL-10 no fígado - mas não no soro - significativamente comparados ao controle. Assim, considerando os 30 dias de infecção por *E. cuniculi*, concluímos que a IL-10 atue na resolução da cascata pró-inflamatória no fígado.

Outros patógenos intracelulares, como o VHB, podem induzir o aumento da IL-10 pelo fígado. De fato, a infecção crônica pelo VHB induz ao aumento dos níveis séricos de IL-10. Houve uma estreita correlação temporal entre níveis de IL-10, a carga viral para o VHB e a hepatite. Além disso, o bloqueio de IL-10 *in vitro* resgatou as respostas de células T CD8 específicas de vírus⁹⁸. Ainda, sugere-se que a dosagem sérica de IL-10 possa ser utilizada indicador do insucesso do tratamento com medicamentos contra o VHC em humanos, tornando a infecção crônica⁹⁹.

Em conjunto, os resultados indicam um importante papel do fígado na resposta imune inata contra a encefalitozoonose.

12 CONCLUSÕES

O controle da infecção depende fortemente da eficiência da imunidade induzida pelo microsporídio no órgão efetor, a qual não está ligada somente às características internas do hospedeiro, como também a capacidade de manipulação e evasão do parasita na resposta imunológica. O presente estudo evidenciou que o estado de imunossupressão induzido pela ciclofosfamida deixa o hospedeiro mais suscetível à disseminação do microsporídio no fígado, assim como causa também toxicidade aos linfócitos e hepatócitos. É escassa a literatura estabelecendo uma relação patológica entre microsporídios e doenças hepáticas causadas por *E. cuniculi* em pacientes imunossuprimidos. Desta forma, o presente estudo sobre encefalitozoonose demonstrou uma maior suscetibilidade à encefalitozoonose em pacientes imunossuprimidos, colocando este agente oportunista no espectro das hepatopatias que podem acometer os pacientes transplantados imunossuprimidos pelo uso da ciclofosfamida.

A ativação do sistema imune contra *E. cuniculi* foi observada através do aumento das populações celulares no fígado e baço, associada ao aumento das citocinas pró-inflamatórias no fígado e soro, demonstrando direta correlação com a atividade inflamatória hepática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – Kim WR, Brown JRRS, Terrault NA, et al. Burden of liver disease in the United States: Summary of a workshop. *Hepat.* 2002; 36: 227-42.
- 2 – Méndez-Sánchez N, Villa AR, Chávez-Tapia NC, et al. Trends in liver disease prevalence in Mexico from 2005 to 2050 through mortality data. *Ann Hepatol.* 2005; 4: 52-55.
- 3 – Teles SA. Viral hepatitis: a challenge for nursing. *Rev Bras Enferm.* 2017; 70: 231-2.
- 4 – Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, et al. Changes in the Prevalence of the Most Common Causes of Chronic Liver Diseases in the United States from 1988-2008. *Clin Gast Hepatol.* 2001; 9: 524-30.
- 5 – Leipig M, Matiassek 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. *J Vet Diagn Invest.* 2013; 25(1): 16-26.
- 6 – Akerstedt J. An indirect ELISA for detection of *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). *Acta VetScand.* 2002; 43(4): 211-220.
- 7 – Akerstedt J. Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2002; 49(8): 400-405.
- 8 – Keeling PJ, Fast NM. MICROSPORIDIA: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annu Rev Micr.* 2002; 56: 93–116.
- 9 – Gill EE, Fast NM. Assessing the microsporidia-fungi relationship: combined phylogenetic analysis of eight genes. *Gene.* 2006; 375: 103-109.
- 10 – Magalhães N, Lobo ML, Antunes F, Matos O. Aves e cães como potencial fonte de infecção zoonótica por microsporídeos para o Homem. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 2006; 101: 69-75.
- 11 – Franzen C. Microsporidia: how can they invade other cells. *Trends in parasitology.* 2004; 52: 36-40.
- 12 – Franzen C. Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal.* 2008; 2: 1-34.
- 13 – Becnel JJ, Andreadis TG. Microsporidia in insects. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis.* Wittner, M. (ed.). Washington, D.C. American Society for Microbiology. 1999: 447-539.

- 14 – Wittner M. Historic Perspective on the Microsporidia: Expanding Horizons. In: The Microsporidia and Microsporidiosis. Wittner, M. (ed.). Washington, D.C. Ameri Soci Micro. 1999: 1-6.
- 15 – Canning EU, Feist SW, Longshaw M, et al. *Microgemmavivaresin*. sp. (Microsporidia, Tetramicidae), infecting liver and skeletal muscle of sea scorpions, *Taurulusbubalis* (Euphrasen 1786) (Osteichthyes, Cottidae), an Inshore, littoral fish. J Eukaryot Micro. 2005; 52: 123-131.
- 16 – Didier ES. Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta Tropica. 2005; 94: 61-76.
- 17 – Azevedo C, Matos E. Fine structure of a new species, *Loma myrophis* (Phylum Microsporidia), parasite of the Amazonian fish *Myrophisplatyrhynchus*(Teleostei, Ophichthidae). Europ J Protistol. 2002; 37: 445-452.
- 18 – Lewis LC, Sumerford DV. Bing LA, Gunnarson RD. Dynamics of *Nosema pyraustain* natural populations of the European corn borer, *Ostrinianubilalis*: A six-year study. BioControl. 2006; 51: 627-642.
- 19 – Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of Life. Biological Reviews.1998; 73: 203–266.
- 20 – Hibbett DS. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. Mycologia. 2007. 98: 917–925.
- 21 – Méténier G, Vivarès C. Molecular characteristics and physiology of microsporidia. Microbes and Infection. 2001; 3: 407-415.
- 22 – Mathis A, Weber R, Deplazes P. Zoonotic Potential of the Microsporidia. Clinical Microbiology Reviews. 2005; 18(3): 423–445.
- 23 – Bruns TA. Kingdom revised. Nature. 2006: 758-760.
- 24 – James TY, Kauff F, Schoch CL, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature. 2006; 443: 818-822.
- 25 – Baldauf SL, Roger AJ, Wenk-Siefert I, et al. A Kingdom-Level Phylogeny of Eukaryotes Based on Combined Protein. Data Science. 2000. 290,972-976.
- 26 – Hirt RP, John MLJ, Healy B, et al. Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 580-585.
- 27 – Bigliardi E, Sacchi L. Cell biology and invasion of the microsporidia. Microbes and Infection. 2001; 3: 373-379.
- 28 – Vávra J. Dabiovar R, Hollister WS, et al. Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. Folia Parasitologica. 1993; 40: 267-272.

- 29 – Da Costa LF, Alvares-Saraiva AM, Dell'Armeline Rocha PR, et al. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *Immunobiology (jena)*. 1979), v. 222, p.218-227,2017.
- 30 – Kotkova M, Bohumil Sak, Dana Kvetonova, et al. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS One*. 2013; 8(4): 60941.
- 31 – Didier ES, Vossbrinck CR, Stovall ME, et al. Diagnosis and epidemiology of microsporidia infections in humans. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2004; 35: 65-81.
- 32 – Khan IA, Moretto M, Weiss LM. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect*. 2001; 3: 401-405.
- 33 – Mukhopadhyay A, Wei B, Zullo SJ, et al. *In vitro* evidence of inhibition of mitochondrial protease processing by HIV-1 protease inhibitors in yeast: a possible contribution to lipodystrophy syndrome. *Mitochondrion*. 2002; 1(6): 511-518.
- 34 – Sak B, Brady D, Pelikánová M, et al. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *Journal of clinical microbiology*. 2011; 49(3): 1064-1070.
- 35 – Anane S, Attouchi H. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastro Clin biolo*. 2010; 34(8): 450-464.
- 36 – Ghoyounchi R, Abmdpour E, Spotin A, et al. Microsporidiosis in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2017.
- 37 – Gotti LSM, Gagliani LH. Microsporidiose humana: aspectos epidemiológicos e diagnósticos nos pacientes com AIDS. *Revis UNILUS Ens e Pesquisa*. 2011; 8(14).
- 38 – Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: current status. *Current opinion in infectious diseases*. 2006; 19(5): 485.
- 39 – Didier ES, Didier PJ. AI Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*. 2009; 2: 709-720.
- 40 – Dengjel B, Zahler M, Hermanns W, et al. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *Jof Clinical Microb*. 2001; 39(12): 4495-4499.
- 41 – Visvesvara GS. *In vitro* cultivation of microsporidia of clinical importance. *Clin Microbiol ver*. 2012; 15: 401-13.
- 42 – Connors K, Role of Il-21 in CD8 T cell response against *Encephalitozoon cuniculi* infection. 2017.

- 43 – Peakman M, Vergani, D. *Imunologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara, pág. 1-165, 1999.
- 44 – Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, pág. 1-132, 2005.
- 45 – Kristensson K. Microbes' roadmap to neurons. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12: 345-57.
- 46 – F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. 2017;62:161-179.
- 47 – Abul K, Abbas A, Lichtman H. *Imunologia Celular e Molecular*. Sexta Edição. Rio de Janeiro. Elsevier. pág. 1-80, 2003. ISBN-13: 978-0323222754.
- 48 – You QLC, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T Cell Tolerance Induction by Murine Hepatic Kupffer Cells. *Hepatology*. 2008; 48(3).
- 49 – Valencakova A, Halanova M. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comp Immun, Microb and Infec Dis*. 2012; 35: 1-7.
- 50 – Texier C, Vidau C. Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr Opin in Microb*. 2010;3: 443-449.
- 51 – Francisco Neto A, Dell'Armeline Rocha PR, Perez EC, et al. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *PLoS ONE*. 2017; 12(11).
- 52 – Santos DL, Lallo MA. The role of B-1 cells in reducing susceptibility to oral infection by *Encephalitozoon cuniculi*, 2017.
- 53 – Didier ES, Weiss LM. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis*. 2011; 24: 490-495.
- 54 – Keeble EJ, Shaw DJ. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet Rec*. 2006; 158: 539-544.
- 55 – Jeklova E, Jekl V, Kovarcik K, et al. Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet Paras*. 2010; 170: 143-148.
- 56 – Santaniello A, Dipineto L. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Res Vet Sci*. 2009; 87: 67-69.
- 57 – Moretto M, Weiss LM, Khan IA. Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol*. 2004; 172 (7): 4402–4409.

- 58 – 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*. 2004; 83(12): 4719-4730.
- 59 – Lallo MA, Dos Santos MJ, Bondan EF. Experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection in dexamethasone-immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 52(9): 3067-3071.
- 60 – Lallo MA, Hirschfeld MPM. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. *Exper Parasitol*. 2012; 131(3): 339-343.
- 61 – Lallo MA, Calábria P, Bondan EF, et al. Identification *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) spores in feces and urine samples obtained from free-living South American Coatis (*Nasua nasua*) *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78: 4490-4492.
- 62 – Lallo MA, Hirschfeld MPM. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. *Exper Parasitol*. 2012; 131(3): 339-343.
- 63 - 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):e1006871. doi: 10.1371/journal.ppat.1006871. eCollection 2018 Feb
- 64 - Herbein G, Coaquette A, Perez-Bercoff D, et al. Macrophage activation and HIV infection: can the Trojan horse turn into a fortress? *Curr Mol Med*. 2002; 2(8):723-38.
- 65 – Hornitzk M. Nosema Disease – Literature review and three surveys of beekeepers – Part 2. Rural Industries Research and Development Corporation. 2008; 8(6).
- 66 – Field A. *Discovering statistics using IBM SPSS statistics*. Sage, 2013.
- 67 – Simard EP, Ward EM, Siegel R, et al. Cancers with Increasing Incidence Trends in the United States: 1999 Through 2008. *CA Cancer J Clin*. 2012; 62: 118-28.
- 68 – UK national statistics (UK). [acesso em maio de 2018]. Disponível em: <http://www.statistics.gov.uk/>.
- 69 – Kosis. Statistics Korea, Korean Statistical Information Service. Annual report on the cause of death statistics. 2010. Disponível em: http://kosis.kr/abroad/abroad_01List.jsp
- 70 – Ministério da Saúde do Brasil. Sistema de informação sobre mortalidade no período de 1999 a 2016. Dados de declarações de óbitos (em CD-ROM) 2017. Brasília, Fundação Nacional de Saúde.

- 71 – Brasil P, Bonfim DL, Moura H. Microsporidiose humana na síndrome de imunodeficiência adquirida. *Ver Ass Med Brasil*. 1997; 43: 254-64.
- 72 - Kicia M, Wesolowska M, Jakuszko K, et al. Concurrent infection of the urinary tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 1780- 1782.
- 73 – Lores B, López-Miragaya I, Arias C, et al. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus--negative patients from Vigo, Spain. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 918-921.
- 74 - Müller A, Bialek R, Kämper A, et al. C. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 1630-1632.
- 75 - Brodsky IE, Medzhitov R. Targeting of immune signalling networks by bacterial pathogens. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 521–526.
- 76 - Lotan E, Leader A, Lishner M, et al. Unrecognized renal insufficiency and chemotherapy associated adverse effects among breast cancer patients. *Anticancer Drugs*. 2012; 23: 991–995.
- 77 - 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.
- 78 - Bruining DM, Van Roon EN, De Graaf H.; et al. Cyclophosphamide-induced symptomatic hyponatraemia. *Neth J Med*. 2011; 69: 192–5.
- 79 – Furst DE, Tseng CH, Clements PJ, et al. Adverse events during the Scleroderma Lung Study. *Am J Med*. 2011; 124: 459–67.
- 80 - González LA, Pons-Estel GJ, Zhang JS, et al. Effect of age, menopause and cyclophosphamide use on damage accrual in systemic lupus erythematosus patients from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LXIII). *Lupus*. 2009; 18: 184–6.
- 81 - Subramaniam SR, Cader RA, Mohd R, et al. Low-dose cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity. *Am J Case Rep*. 2013; 14: 345–9.
- 82 – Vieira FP, Redigüeiri CF, Redigüeiri CF. A regulação de medicamentos no Brasil. *Artmed*. 2013: 672.
- 83 – Braunfuchsová P, Salát J, Kopecký J. CD8+ T-lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Int. J. Parasitol*. 2001; 15: 681-686.
- 84 - Schmidt EC, Shadduck JA. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. *Infect Immun*. 1983; 40(3): 936- 942.

- 85 – Weidner E, Manale SB, Halonen SK, et al. Microsporidian spore invasion tubes as revealed by fluorescent probes. *Biol Bull*, 1994; 187(2): 255-6.
- 86 – Mathews A, Hotard A, Hale-Donze H. Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes Infect*. 2009; 11(12); 905-11.
- 87 – Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454: 436–444.
- 88 – Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:723–737.
- 89 – Conti BJ, Santiago KB, Sforzin JM. Células dendríticas: mini-revisão. *Biosaúde*. 2014; 16(1).
- 90 – Johansson BL, Belew M, Eriksson S, et al. Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation media aimed for capture of negatively charged biomolecules at high salt conditions. *J Chromatogr A*. 2003; 1016(1): 21-33.
- 91 – Mora C, Chittaro PM, Sale PF, et al. Patterns and processes in reef fish diversity. *Nature*. 2003; 421: 933–936.
- 92 – Johansson -Lindbom B, Svensson M, Pabst O, et al. Agace WW. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med*. 2005; 202:1063–1073.
- 93 – Abd El-Rehim A, El-Henawy, Abdel-Razik A, Zakaria S, et al. Is toxoplasmosis a potential risk factor for liver cirrhosis? *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine - Elsevier*. 2015; 8(10): 784–791.
- 94 – Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, et al. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*. 2004;21:527–538.
- 95 – Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(2):109-21.
- 96 – Dirk S, Stefan R. J. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of Hepatology the home of liver reseracher*. 2016; 64(6): 66.
- 97 – Wu W, Dietze KK, Gibbert K, et al. Ligand induced IL-6 counter-regulates the anti-viral CD8(+) T cell response during an acute retrovirus infection. *Sci Rep*. 2015; 21.
- 98 - Xu Y, Liu Y, Zhao M, et al. Dynamic Perturbations of CD4 and CD8 T Cell Receptor Repertoires in Chronic Hepatitis B Patients upon Oral Antiviral Therapy. *Front Immunol*. 2017;8:1142.

99 - Jabłońska J, Pawłowski T, Laskus T, et al. The correlation between pretreatment cytokine expression patterns in peripheral blood mononuclear cells with chronic hepatitis c outcome. *BMC Infectious Diseases* 2015 **15**:556