

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE DOUTORADO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

ALDO FRANCISCO ALVES NETO

**SUSCETIBILIDADE DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS
INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA À INFECÇÃO
PELO *Encephalitozoon cuniculi***

SÃO PAULO

2016

ALDO FRANCISCO ALVES NETO

**SUSCETIBILIDADE DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS
INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA À INFECÇÃO
PELO *Encephalitozoon cuniculi***

Tese 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.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Anete Lallo.

SÃO PAULO

2016

Alves Neto, Aldo Francisco

Suscetibilidade de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina à infecção pelo *Encephalitozoon cuniculi* / Aldo Francisco Alves Neto. - 2016.

45 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Doutorado) apresentado ao curso de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Imunologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo.

1. Ciclofosfamida. 2. Diabetes mellitus. 3. *Encephalitozoon cuniculi*. 4. Imunossupressão. I. Título. II. Lallo, Maria Anete (orientadora).

ALDO FRANCISCO ALVES NETO

**SUSCETIBILIDADE DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS
INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA À INFECÇÃO
PELO *Encephalitozoon cuniculi***

Tese 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.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Anete Lallo.

Aprovado em ____/____/____:

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Elizabeth Christina Perez Hurtado
Universidade Paulista – UNIP

Profa. Dra. Diva Denelle Spadacci-Morena
Instituto Butantan

Prof. Dr. James Venturini
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
UNESP

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
Animais.....	13
Patógenos.....	13
Indução de Diabetes mellitus por estreptozotocina.....	13
Tratamento com ciclofosfamida (Cy).....	14
Infecção experimental.....	14
Necropsia e coleta de amostras.....	15
Carga parasitária.....	15
Análise fenotípica dos componentes imunológicos.....	16
Quantificação das citocinas.....	17
Análise estatística.....	17
RESULTADOS.....	18
Camundongos diabéticos foram mais suscetíveis à infecção pelo <i>E. cuniculi</i>	18
Glicemia, peso e carga parasitária.....	18
Achados histopatológicos.....	20
Componentes da resposta imune na cavidade peritoneal e baço.....	23
Perfil de citocinas séricas de camundongos diabéticos após a infecção por <i>E. cuniculi</i>	27
Camundongos diabéticos imunossuprimidos com Cy foram mais suscetíveis à encefalitozoonose causada por <i>E. cuniculi</i>	28
Glicemia, peso e carga parasitária.....	28
Achados histopatológicos.....	30
Componentes da resposta imune na cavidade peritoneal e baço.....	32
Perfil de citocinas séricas de animais diabéticos tratados com Cy após a infecção por <i>E. cuniculi</i>	36
DISCUSSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	45

**Suscetibilidade de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina à
infecção pelo *Encephalitozoon cuniculi***

Aldo Francisco Neto¹, José Guilherme Xavier¹, Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha¹,
Elizabeth Christina Perez Hurtado¹, Giovani Bravin Peres¹, Diva Denelle Spadacci-
Morena², Anuska Marcelino Alvares-Saraiva¹, Maria Anete Lallo¹.

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

²Departamento de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Resumo

Microsporídios são agentes oportunistas descritos em indivíduos imunossuprimidos pelo HIV ou qualquer tratamento supressor da resposta imune, também pode ocorrer em transplantados, idosos e crianças. O Diabetes mellitus (DM) tem sido associado a redução da resposta de células T, da função de neutrófilos, alteração da imunidade humoral determinando maior suscetibilidade às infecções. Por esta razão, avaliou-se a suscetibilidade de camundongos com diabetes induzidos com estreptozotocina (STZ) à encefalitozoonose por *E. cuniculi*. Adicionalmente, avaliamos a encefalitozoonose em camundongos diabéticos imunossuprimidos pelo tratamento com ciclofosfamida (Cy). Para tal, camundongos C57BL/6 foram inoculados com 1×10^7 esporos de *E. cuniculi* por via intraperitoneal, após terem sido induzidos ao diabetes pela aplicação de STZ. A análise da infecção e da resposta imune foi realizada por citometria de fluxo para caracterizar as populações celulares na cavidade peritoneal e do baço e, ainda, quantificou-se os níveis séricos de citocinas dos perfis *Th1*, *Th2*, *Th17*. A análise histopatológica foi feita em fragmentos de baço, fígado, rins, pulmões, encéfalo e intestino delgado e se obteve a carga parasitária do lavado peritoneal. Os animais

diabéticos infectados foram mais suscetíveis à encefalitozoonose, com maior carga parasitária e com lesões e sintomas mais graves quando comparados aos não diabéticos. Os animais diabéticos tinham menores quantidades de células B-1, B-2 e T CD4⁺ no peritônio e T CD4⁺ no baço, apresentaram altos níveis de IL-6 e TNF- α e baixos níveis de IFN- γ . Adicionalmente, os efeitos produzidos pelo diabetes e o tratamento com Cy determinaram quadro de encefalitozoonose mais grave, com maior carga parasitária, sintomas como ascite e muitas lesões, sendo a doença especialmente grave nos diabéticos imunossuprimidos com Cy. Concluimos que o diabetes induzido por STZ tornou os camundongos mais suscetíveis à encefalitozoonose provavelmente por apresentarem diminuição das populações de células B-1, B-2 e T CD4⁺ e baixos níveis de IFN- γ , sendo que esta infecção oportunista poderá ser considerada no âmbito do diagnóstico diferencial de co-morbididades em diabéticos.

Palavras-chave: Ciclofosfamida, Diabetes mellitus, *Encephalitozoon cuniculi*, Imunossupressão.

Abstract

Microsporidia are opportunist pathogens, mostly in immunocompromised individuals, such as HIV infected people, pregnant women, diabetics and the elderly. People with *Diabetes mellitus* (DM) have a decrease in T cells, neutrophils and a change in the humoral immunity, and thus are more susceptible to infections. However, the susceptibility of *Encephalitozoon cuniculi* infection in DM individuals was not established yet. We investigated the susceptibility of encephalitozoonosis in diabetic mice by streptozotocin (STZ) inoculation and *E. cuniculi* intra-peritoneal infection. We

also investigated if cyclophosphamide (Cy) could increase the susceptibility of infection. Flow cytometry was used to characterize the population of leukocytes and phagocytes in the peritoneal cavity and spleen and to measure the serum levels of *Th1*, *Th2* and *Th17* cytokines. Samples of spleen, liver, kidneys, lungs, brain and intestines were collected for microscopic evaluation and parasite burden was counted in the peritoneal lavage. Diabetic infected mice were more susceptible to encephalitozoonosis, with more severe parasite burden, lesions and symptoms compared to non-diabetic mice. B-1, B-2 and T CD4⁺ cells decreased in diabetic infected mice, which was associated with higher serum levels of IL-6 and TNF- α and lower levels of IFN- γ compared to the other groups. Infected, immunosuppressed/diabetic mice had a more severe encephalitozoonosis, associated with higher parasite load, symptoms (ascytis) and lesions. Therefore, the results suggest that DM increases the susceptibility to encephalitozoonosis by decreasing B-1, B-2 and T CD4⁺ lymphocytes as well as IFN- γ . Encephalitozoonosis should be included as a risk disease in DM individuals.

Keywords: Cyclophosphamide, Diabetes mellitus, *Encephalitozoon cuniculi*, Immunosuppression.

INTRODUÇÃO

O filo Microsporidia, constituído por mais de 1.200 espécies, pertence ao Reino Fungi e compreende patógenos intracelulares obrigatórios (Anane e Attouchi, 2010). Alguns representantes deste filo foram considerados emergentes com a pandemia da AIDS na década de 80, sendo as infecções associadas à diarreia e perda de peso em humanos (Hinney et al., 2016). As espécies do gênero *Encephalitozoon* são responsáveis por grande parte das microsporidioses prevalentes em humanos e nos outros animais (Anane e Attouchi, 2010; Weiss, 2014). Várias são as síndromes clínicas associadas com os gêneros *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, *Anncaliia*, *Vittaforma*, *Tubulinosema*, *Endoreticulatus* e *Microsporidium*, responsáveis por ceratoconjuntivite, infecções pulmonares, gastrintestinais, urinárias, musculares, neurológicas e infecção disseminada (Weiss, 2014).

A resposta imune contra o *Encephalitozoon* sp. é resultado da cooperação entre a imunidade adaptativa e a imunidade inata (Khan e Didier, 2004; Moretto et al., 2004). As células T são críticas para a proteção contra a infecção por *E. cuniculi*, em especial a atividade de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (Khan et al., 2001). Camundongos *knockout* para células T CD8⁺ morreram após inoculação do patógeno, mostrando sinais de doença grave, tais como ascite, letargia e perda de peso. Em contraste, a infecção pelo *E. cuniculi* de camundongos T CD4^{-/-} não resultou em qualquer mortalidade, da mesma forma que os controles, sem deficiência de linfócitos, fato que reforça a importância das células T CD8⁺ (Valencakova e Halanova, 2012).

Encephalitozoon sp. é considerado um patógeno oportunista para indivíduos imunossuprimidos pela terapia anti-TNF- α , por quimioterapia ou qualquer tratamento

imunomodulador, também para transplantados, idosos e crianças (Didier e Weiss, 2011). As microsporidioses não são limitadas ao *status* imunodeficiente, uma vez que infecções por estes patógenos são descritas em indivíduos imunocompetentes (Weiss, 2014). Um estudo recente, realizado para identificar parasitos nas fezes de 100 pacientes diabéticos revelou 3 casos positivos para microsporídios (3%), em contraste com o grupo controle sem diabetes que não teve positivos para microsporídios (Elnadi et al., 2015).

O Diabetes mellitus (DM) é uma síndrome clínica associada à deficiência na secreção e/ou na ação da insulina. É considerado um problema de saúde emergente do século 21 e se estima atualmente cerca de 422 milhões de diabéticos (OMS, 2016). Além das complicações clássicas, o DM tem sido associada a redução da resposta de células T, da função de neutrófilos, alteração da imunidade humoral e, como consequência, o DM aumenta a suscetibilidade às infecções (Delamaire et al., 1997; Geerlings e Hoepelman, 1999; Müller et al., 2005; Peleg et al., 2007; Martinez, 2016).

Algumas infecções são muito prevalentes em pessoas diabéticas, tais como as infecções respiratórias por *Streptococcus pneumoniae*, pelo vírus da influenza e pela tuberculose; infecções urinárias como a bacteriúria assintomática, a cistite fúngica e enfisematosa, e as infecções gastrintestinais por *H. pylori*, candidíase oral e esofágica. Além de serem potencialmente mais graves, as doenças infecciosas em pacientes diabéticos podem resultar em complicações metabólicas, tais como hipoglicemia, cetoacidose e coma (Kowalewska et al., 2016). Os pacientes com diabetes parecem ter risco aumentado de bacteriúria assintomática e infecção do trato urinário (Boyko et al., 2002; Hu et al., 2004), infecção de pele, pé e de mucosas, incluindo infecções por *Candida* (Calvet e Yoshikawa, 2001; Shah e Hux, 2003).

Considerando-se que indivíduos diabéticos podem apresentar deficiente resposta de células T e que são mais suscetíveis a certas infecções, foi objetivo do presente estudo avaliar a suscetibilidade de camundongos diabéticos, induzidos pelo uso da estreptozotocina (STZ), à encefalitozoonose determinada pela inoculação de *E. cuniculi*. Adicionalmente, foi estudada a encefalitozoonose em camundongos diabéticos e imunossuprimidos pelo tratamento com ciclofosfamida, considerando que a imunossupressão torna os indivíduos mais suscetíveis à encefalitozoonose e, portanto, constituem o controle de positivo da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. Foram utilizados camundongos isogênicos SPF (*specific pathogen free*), machos, da linhagem C57BL/6 com 8 semanas de idade, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil. Durante o período experimental de 35 dias, os animais foram divididos em grupos com 5 animais cada, e permaneceram no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista sob condições de temperatura e umidade controladas em microisoladores, em condições livres de patógenos, onde receberam ração *ad libitum* peletizada irradiada e água esterilizada por autoclavagem. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Paulista, sob número de protocolo 010/16.

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

Indução de Diabetes mellitus por estreptozotocina. O DM foi induzido pela administração intraperitoneal (IP) de estreptozotocina (STZ), na dose de 50 mg/kg/dia, durante 5 dias consecutivos, sendo que os animais foram mantidos em jejum durante 5h

antes de cada injeção (Chaudhry et al., 2013). Após 10 dias do término do tratamento, foram coletados 10 µL de sangue da veia da cauda de camundongos tratados, e os valores glicêmicos foram aferidos por glicosímetro Accu Chek Active – (Roche, Mannheim, Germany). A condição diabetes induzido foi considerada quando os animais apresentaram taxa glicêmica acima 250 mg/dL (Chaudhry et al., 2013), sendo esta data considerada o tempo zero para o início da infecção experimental.

Tratamento com ciclofosfamida (Cy). O protocolo adotado foi estabelecido por Lallo e Hirschfeld (2012), sendo que os camundongos tratados com Cy receberam duas doses semanais de 75 mg/kg de ciclofosfamida, diluída em solução fisiológica 0,9% esterilizada, por via intraperitoneal (Genuxal®, Asta Medica Oncologia, São Paulo), iniciada no dia da inoculação do patógeno (tempo 0) e mantida por todo o período experimental (35 dias).

Infecção experimental. Os animais foram divididos em grupos experimentais: camundongos inoculados com *E. cuniculi* (*Infectados*); camundongos tratados com Cy e infectados com *E. cuniculi* (*Cy-Infectados*); camundongos diabéticos e inoculados com *E. cuniculi* (*Diabéticos-Infectados*), e camundongos diabéticos tratados com Cy e infectados com *E. cuniculi* (*Diabéticos-Cy-Infectados*). A infecção foi realizada pela via intraperitoneal com 1×10^7 esporos de *E. cuniculi*. Para todos os grupos foram mantidos em caixas separadas, nas mesmas condições, controles não infectados com *E. cuniculi* (*Não-Infectados*, *Cy-Não-Infectados*, *Diabéticos-Não-Infectados*, *Diabéticos-Cy-Não-Infectados*). Semanalmente, durante todo o período experimental, o nível glicêmico, temperatura e o peso foram aferidos para cada animal, no período da manhã e sem jejum prévio. Estes dados foram transformados em médias por grupo para a realização da análise comparativa.

Necropsia e coleta de amostras. Aos 35 dias pós-infecção (DPI) experimental, os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico com a utilização de uma mistura de quetamina (50 mg/mL), xilazina (20 mg/mL) e fentanil (0,05 mg/mL). A necropsia foi iniciada com a coleta de aproximadamente 1 mL de sangue, por punção cardíaca. Posteriormente, as células da cavidade peritoneal (PerC) foram obtidas por sucessivas lavagens com 2 mL de tampão salina fosfatada (PBS) suplementado com 2% de SFB, até completar 10 mL. Em seguida, a metade do baço foi coletada e macerada em *cell strainer*. Fragmentos do baço, fígado, rins, pulmões, encéfalo e intestino delgado foram fixados em formol tamponado em PBS a 10% por 72 horas, sendo então transferidos para álcool 70% e para posterior processamento e análise histopatológica.

Carga parasitária. Para comparar quantitativamente o grau da infecção nos grupos experimentais foi realizada a quantificação de esporos de *E. cuniculi* presentes no lavado peritoneal de camundongos infectados. O lavado peritoneal foi realizado conforme descrito acima e foi centrifugado por 5 minutos a 500 g. O sobrenadante foi removido e acrescentado 2 mL de tampão hemolítico, por até duas vezes para eliminação das hemácias, à temperatura ambiente por 2 minutos. A seguir, foi acrescido de 10 mL de PBS e novamente as amostras foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos. Após desprezar o sobrenadante, o sedimento foi diluído em 3 mL de PBS com 2% de SFB e 10 µL foram separados para a contagem dos esporos. A visualização e contagem dos esporos foram feitas empregando-se o corante fluorescente Calcofluor. Aleatoriamente foram contados 10 campos microscópicos com aumento de 400x e as médias obtidas foram analisadas estatisticamente e representadas graficamente.

Análise fenotípica dos componentes imunológicos. As células obtidas do baço e do lavado da cavidade peritoneal foram centrifugadas a 550g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e acrescentado 2 mL de tampão hemolítico, até duas vezes para eliminação das hemácias, à temperatura ambiente por 2 minutos. A seguir, foi acrescido 10 mL de PBS e novamente as amostras foram centrifugadas a 550 g por 5 minutos. Foram acrescidos 3 mL de PBS e separada uma alíquota de cada amostra para contagem celular em câmara de Neubauer e da carga parasitária. Então, após nova centrifugação, o *pellet* celular foi incubado por 20 minutos em banho de gelo com anticorpo anti-CD16/CD32 para bloqueio dos receptores anti-Fc, em tampão PBS acrescido de 1% de albumina sérica bovina (Sigma) (PBS-BSA 1%). Após este procedimento, as células foram lavadas, divididas em duas alíquotas e, em seguida, adicionou-se os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD19 de camundongo conjugado a *Peridinin Chlorophyll Protein* (PerCP) ou a *Allophycocyanin* (APC), anti-CD23 de camundongo conjugado a *Phycoerythrin* (PE), anti-F4/80 de camundongo conjugado a APC. anti-CD11b de camundongo conjugado APC-Cyano Dye 7 (APC-Cy7), anti-CD4 de camundongo conjugado PerCP e anti-CD8 de camundongo conjugado a *Fluorescein* (FITC) (BD-Pharmingen, San Diego, CA), adequados para determinação dos fenótipos celulares: macrófagos (CD19⁻CD11b⁺F4/80⁺), células B-1 (CD23⁻CD19⁺), B-2 (CD23⁺CD19⁺), pré-fagócitos derivados de células B-1 (Pré-B-1CDP) (CD19⁺CD11b⁺F4/80⁺) (Almeida et al., 2001), linfócitos T CD4⁺ (CD19⁻CD4⁺) e T CD8⁺ (CD19⁻CD8⁺). As células incubadas com os anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos ficaram sob refrigeração e protegidas da luz por 20 minutos. Finalmente, as células foram lavadas e ressuspensas em 300 µL de PBS para análise em citômetro de fluxo. Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA), alocado na disciplina de

Imunologia da UNIFESP e analisados utilizando-se o *software* FlowJo (FlowJo LLC, *Data Analysis Software*, Ashland, OR).

Quantificação das citocinas. O soro foi obtido após processamento do sangue de cada animal, adquirido por punção cardíaca e armazenado a -20°C para uso posterior. Após o descongelamento, os mesmos foram preparados de acordo com as normas técnicas determinadas pelo fabricante do “*CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*” (BD Biosciences, CA, USA) para detecção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF- α . Utilizou-se 25 μL de cada amostra que foram incubadas juntamente com as *beads* de captura, específicas para cada citocina, conjugadas à APC e com o anticorpo secundário conjugado a PE, por duas horas em temperatura ambiente protegidas da luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em tampão de lavagem, contido no kit, para análise de 2 cores por citômetro de fluxo Accuri C6 Plus (BD Biosciences, Mountain View, CA). Os resultados foram apresentados através do software de análise Fcap Array versão 3.0.

Análise estatística. As comparações estatísticas foram feitas por análise de variância (ANOVA) e pelo teste posterior de Tukey. Adotou-se nível de significância $\alpha=0,05$ e os resultados cuja chance de erro foi menor que 5% foram destacados ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Camundongos diabéticos foram mais suscetíveis à infecção pelo *E. cuniculi*

Glicemia, peso e carga parasitária. A infecção experimental de camundongos diabéticos foi realizada para avaliar suscetibilidade à encefalitozoonose em doenças metabólicas crônicas como o DM e, ainda, analisar o perfil da resposta imune nestas condições. Os animais tratados com STZ desenvolveram diabetes após 10 dias do término do tratamento, com índices glicêmicos variando entre 300 a 450 mg/dL (Figura 1A). Durante à infecção, a hiperglicemia se manteve alta nos animais diabéticos, infectados ou não, enquanto os animais não-diabéticos mantiveram índices glicêmicos dentro da normalidade. Em relação ao peso corporal, observamos que os animais diabéticos, infectados ou não, tiveram médias de peso corporal menores que os animais não-diabéticos, sendo a perda de peso progressiva e mais acentuada ao final do experimento (Figura 1B). Não observamos alterações na temperatura corporal dos animais experimentados (dados não mostrados).

Os animais do grupo *Diabéticos-Infectados* apresentaram discreto líquido peritoneal serosaguinto e esplenomegalia. Todos os controles não-infectados (*Não-Infectados e Diabéticos-Não-Infectados*) e o grupo *Infectados* não manifestaram quaisquer sintomas relacionados à infecção. O grupo *Diabéticos-Infectados* também mostrou maior carga parasitária quando comparado ao grupo *Infectados*, evidenciando que o quadro diabético favoreceu a progressão da infecção e determinou agravamento da doença (Figura 1C, 1D).

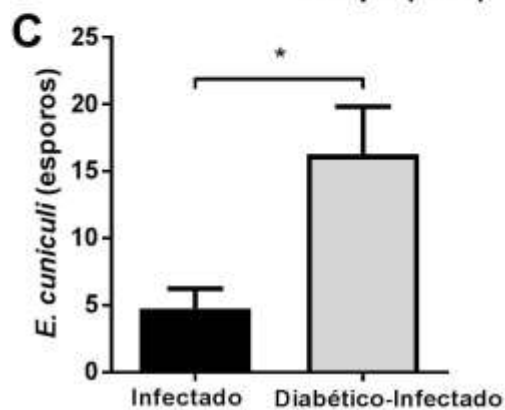
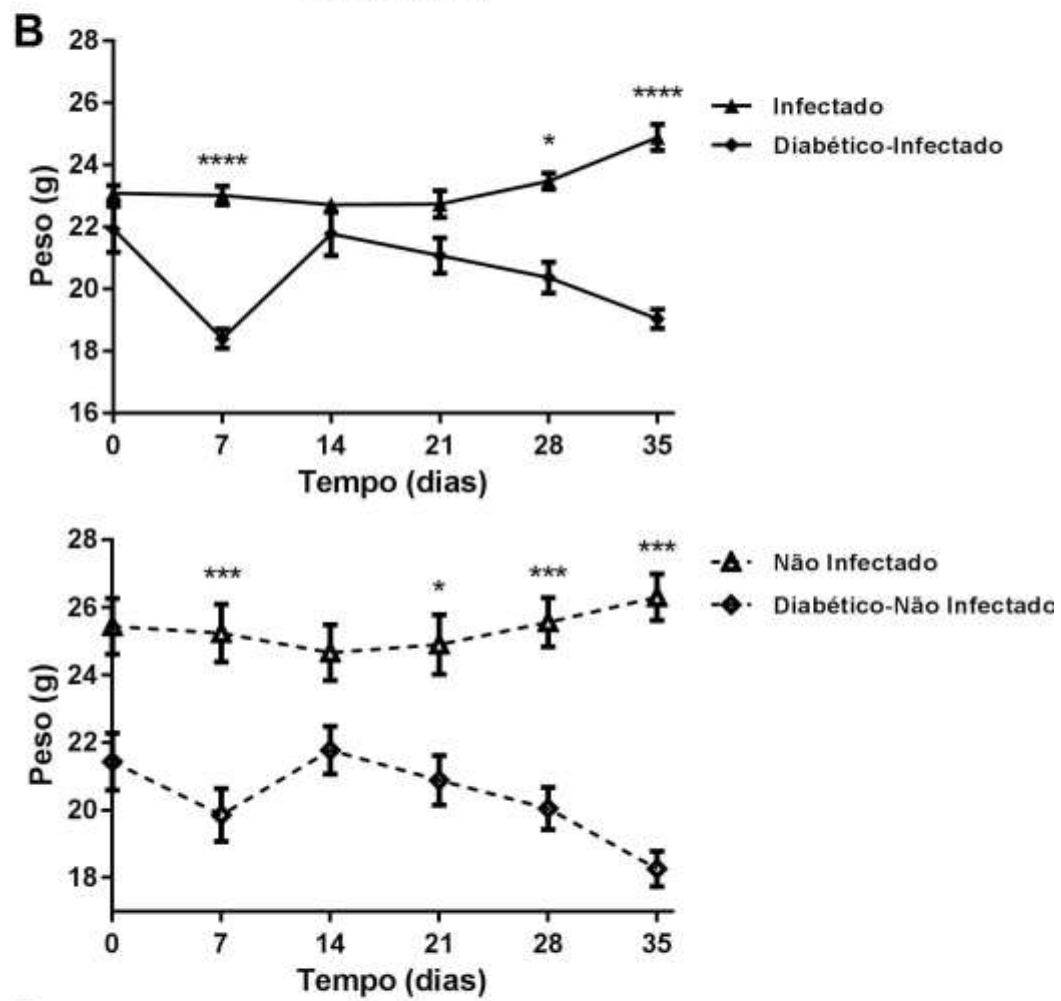
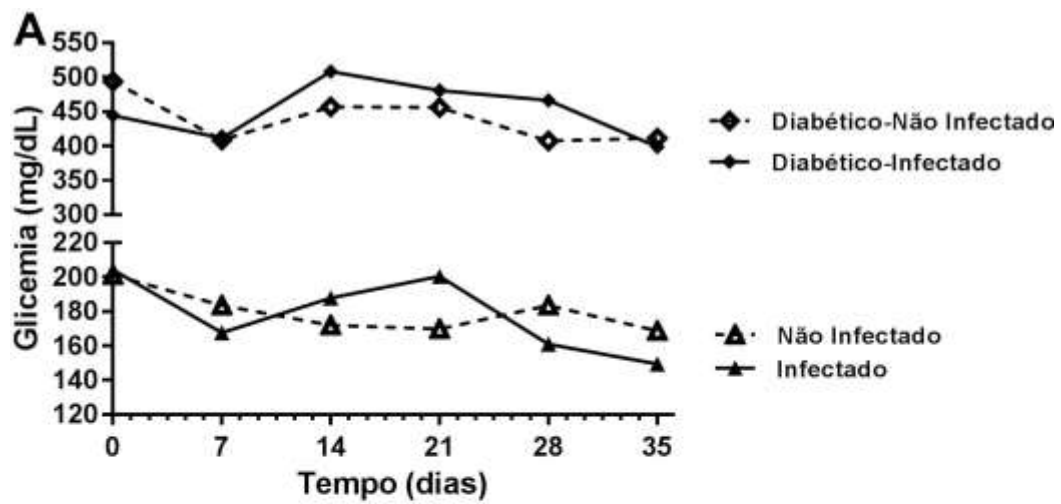


Figura 1. Parâmetros glicêmicos, peso e carga parasitária de camundongos dos grupos experimentais *Infectados*, *Não-Infectados*, *Diabéticos-Não-Infectados* e *Diabéticos-Infectados*. A) Variação da glicemia entre os grupos durante toda a fase experimental. B) Variação do peso de camundongos *Diabéticos-Infectados* e *Infectados* e seus controles saudáveis, durante o período experimental. A análise de variância de uma via ANOVA com pós teste Tukey revelou $p < 0,01^{***}$. C) Carga parasitária de camundongos *Infectados* e *Diabéticos-Infectados* pelo *E. cuniculi*. Teste t não pareado apresentando * $p < 0.01$, comparando os grupos em cada período, separadamente. D) Esporos observados no lavado peritoneal de camundongos *Diabéticos-Infectados* corados pelo corante fluorescente Calcofluor.

Achados histopatológicos. Todos os animais infectados com *E. cuniculi* (*Diabéticos-Infectados* e *Infectados*) apresentaram infiltrado inflamatório misto distribuídos de forma difusa no parênquima hepático (Figura 2A), em localização periportal ou sinusoidal (Figura 2B) ou em região subcapsular (Figura 2C), tais localizações indicam disseminação hematogêna ou chegada do patógeno da cavidade peritoneal ao fígado pela cápsula hepática. Aglomerados de esporos foram observados junto aos infiltrados inflamatórios ou isolados sem qualquer reação inflamatória (Figura 2D), sendo estes encontrados somente no grupo *Diabéticos-Infectados*. Independentemente do grupo infectado avaliado, houve predomínio de infiltrado inflamatório mononuclear, de forma eventual havia polimorfonucleares infiltrados com predomínio de, em especial eosinófilos (dados não mostrados). Poucas áreas de necrose de liquefação e de calcificação distrófica foram identificadas, distribuídas difusamente no parênquima hepático, além da presença de megalócitos. Os animais *Infectados* apresentavam pneumonia intersticial crônica multifocal que variou de discreta (Figura 2E) a importante geralmente observada em *Diabéticos-Infectados* (Figura 2F), acompanhada de reação estromal leiofibroblástica e infiltrado inflamatório

peribronquiolar, por outro lado, poucos animais apresentavam pneumonia granulomatosa (dados não mostrados). Todos os animais infectados apresentaram nefrose. As lesões renais menos comuns foram pielonefrite (Figura 2G), nefrite (Figura 2H) e a presença de infiltrado inflamatório na gordura peri-renal (dados não mostrados). Embora as lesões observadas foram as mesmas, os animais diabéticos tinham geralmente mais lesões quando comparados aos não diabéticos. Os animais não infectados estavam livres de lesões teciduais.

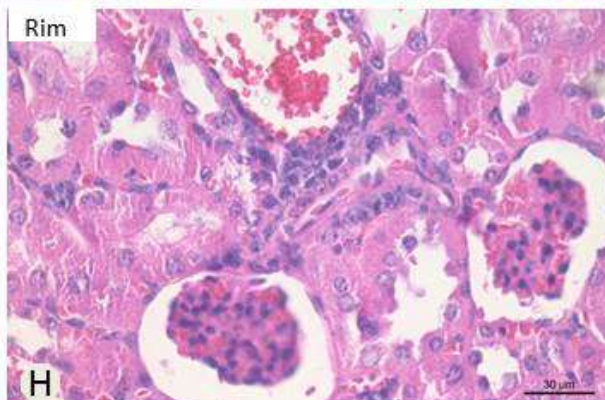
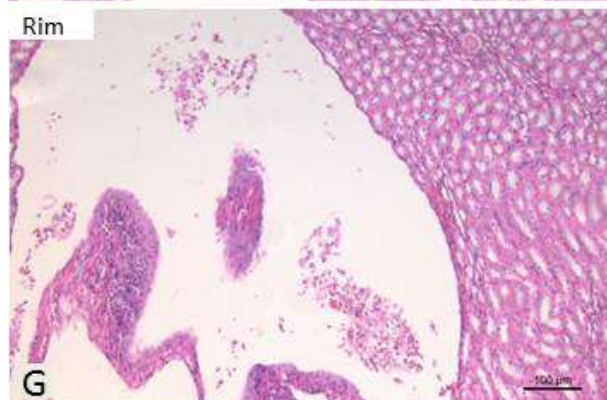
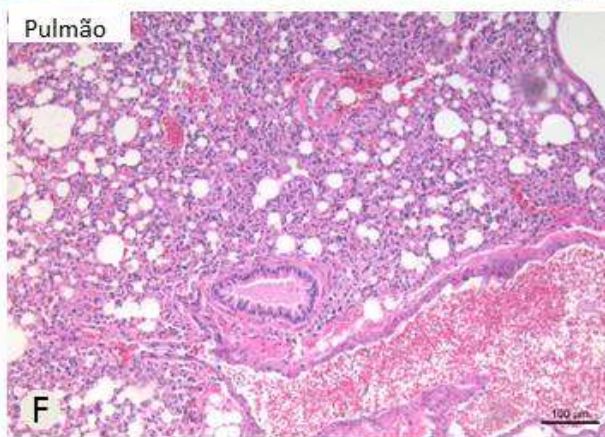
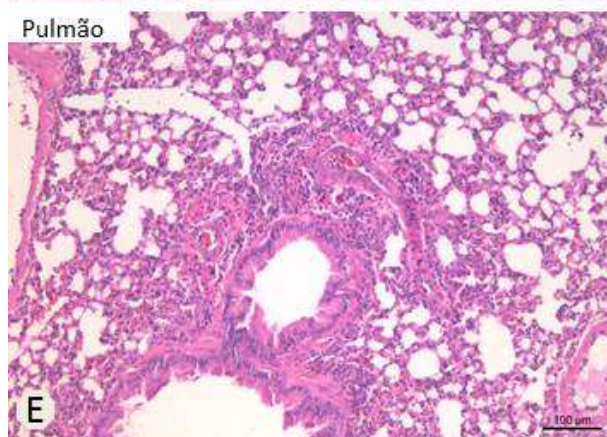
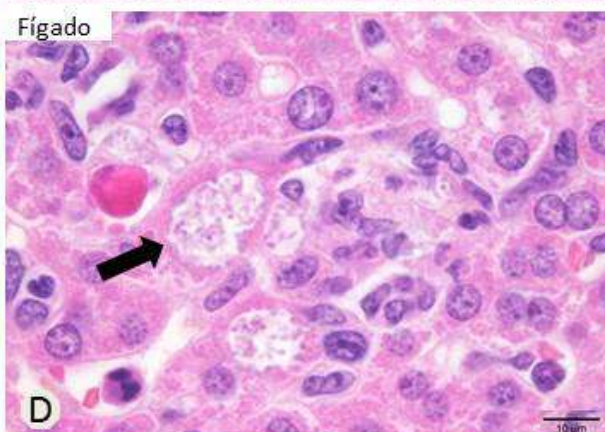
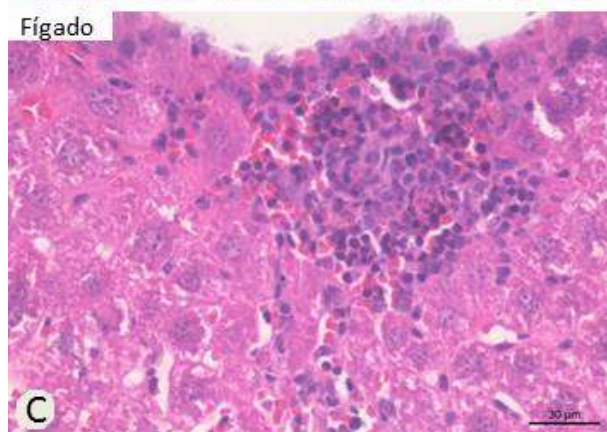
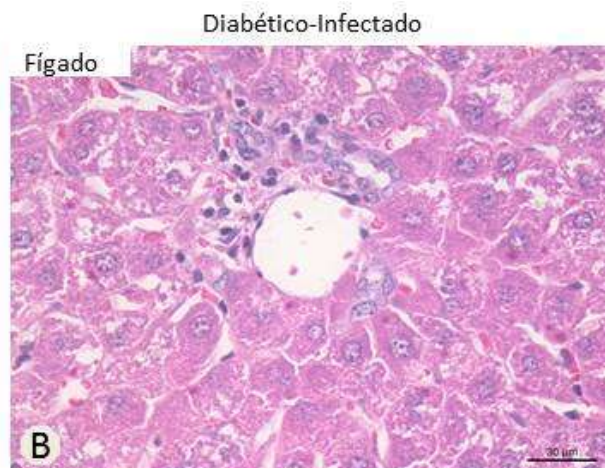
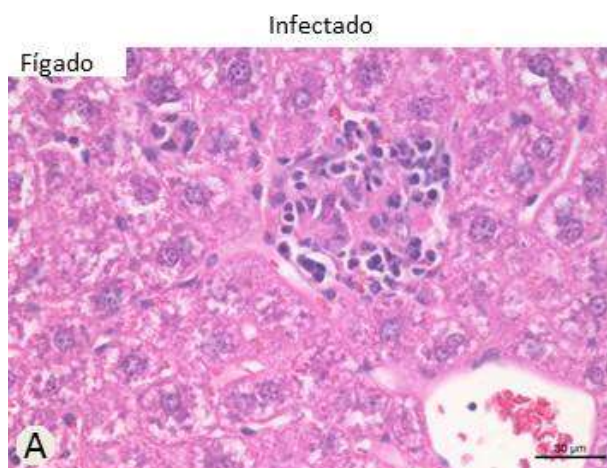


Figura 2. Fotomicrografias dos achados histopatológicos relativos à infecção pelo *E. cuniculi* empregando-se a coloração de H-E. Infiltrado inflamatório nodular com predominância de células mononucleares no parênquima hepático (A), em localização periportal hepática ou sinusoidal (B), na região subcapsular (C), e localizado no parênquima com a presença de esporos (D, seta). Pneumonia intersticial multifocal (E, F). Pielonefrite (G). Nefrite (H).

Componentes da resposta imune na cavidade peritoneal e baço. A análise fenotípica de células do peritônio incluiu a quantificação de macrófagos, células B-1, B-2, pré-B-1 CDP, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e revelou alterações significativas na comparação entre os grupos experimentais avaliados e seus respectivos controles, nos períodos de observação.

Houve diminuição significativa nas populações de células B-1, B-2 e T CD4⁺ mensuradas no peritônio dos animais *Diabéticos* e *Diabéticos-Infectedos* em relação aos não-diabético (*Infectedos* e *Não-Infectedos*) (Figura 3), evidenciando efeito relacionado com o DM induzido por STZ.

Na análise das populações de células imunitárias frente à infecção pelo *E. cuniculi*, observou-se que os animais dos grupos *Infectedos* e *Diabéticos-Infectedos* tiveram aumento das populações T CD4⁺ e T CD8⁺ na comparação com os grupos não infectados (*Não-Infectedo* e *Diabético-Não-Infectedo*) (Figura 3). Por outro lado, notou-se diminuição significativa na população de macrófagos nos grupos *Infectedos* e *Diabético-Infectedo* em comparação com os demais grupos (Figura 3). Em relação à infecção, não foi observada alteração nas populações de células B-1 e B-2. Os pré-fagócitos B-1 CDP não foram quantitativamente modificados tanto pelo efeito do DM induzido quanto pela infecção.

Esses dados sugerem um possível efeito supressor do estado diabético induzido por STZ nas populações de linfócitos B e T $CD4^+$ na cavidade peritoneal, que pode indicar uma resposta imune comprometida contra à infecção.

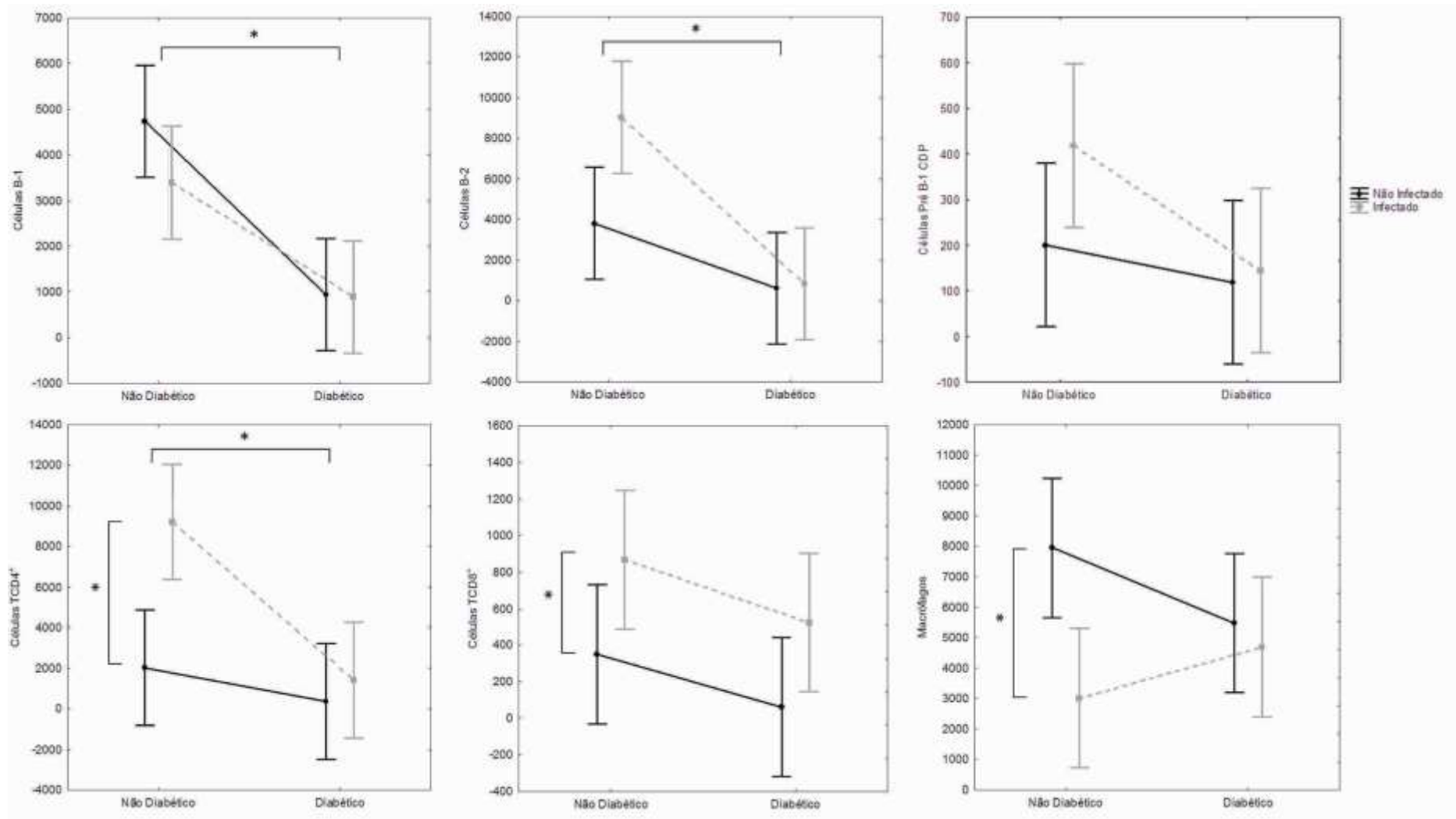


Figura 3. Avaliação das populações de células B-1 (CD23⁻CD19⁺), células B-2 (CD23⁺CD19⁺), pré-B-1 CDP (CD19⁺CD11b⁺F4/80⁺), linfócitos T CD4⁺ (CD19⁻CD8⁻CD4⁺), linfócitos TCD8⁺ (CD19⁻CD4⁻CD8⁺) e macrófagos (CD19⁻F4/80⁺CD11b⁺) presentes na cavidade peritoneal de camundongos com diabetes induzida por STZ ou não e inoculados ou não com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de duas vias revelou p<0,05*

No baço, observamos que os animais infectados (*Infectados* e *Diabéticos-Infectados*) apresentavam, em média, maiores quantidades de células B-2, T CD4⁺ e T CD8⁺ do que os animais não infectados (*Não-Infectados* e *Diabéticos-Não-Infectados*) (Figura 4). Por sua vez, o DM induzido por STZ determinou menores quantidades de células T CD4⁺ nos grupos *Diabéticos* e *Diabéticos-Não-Infectados* do que a observada nos grupos não-diabéticos (*Infectados* e *Não-Infectados*) (Figura 4). Para a população de macrófagos não foram observadas diferenças.

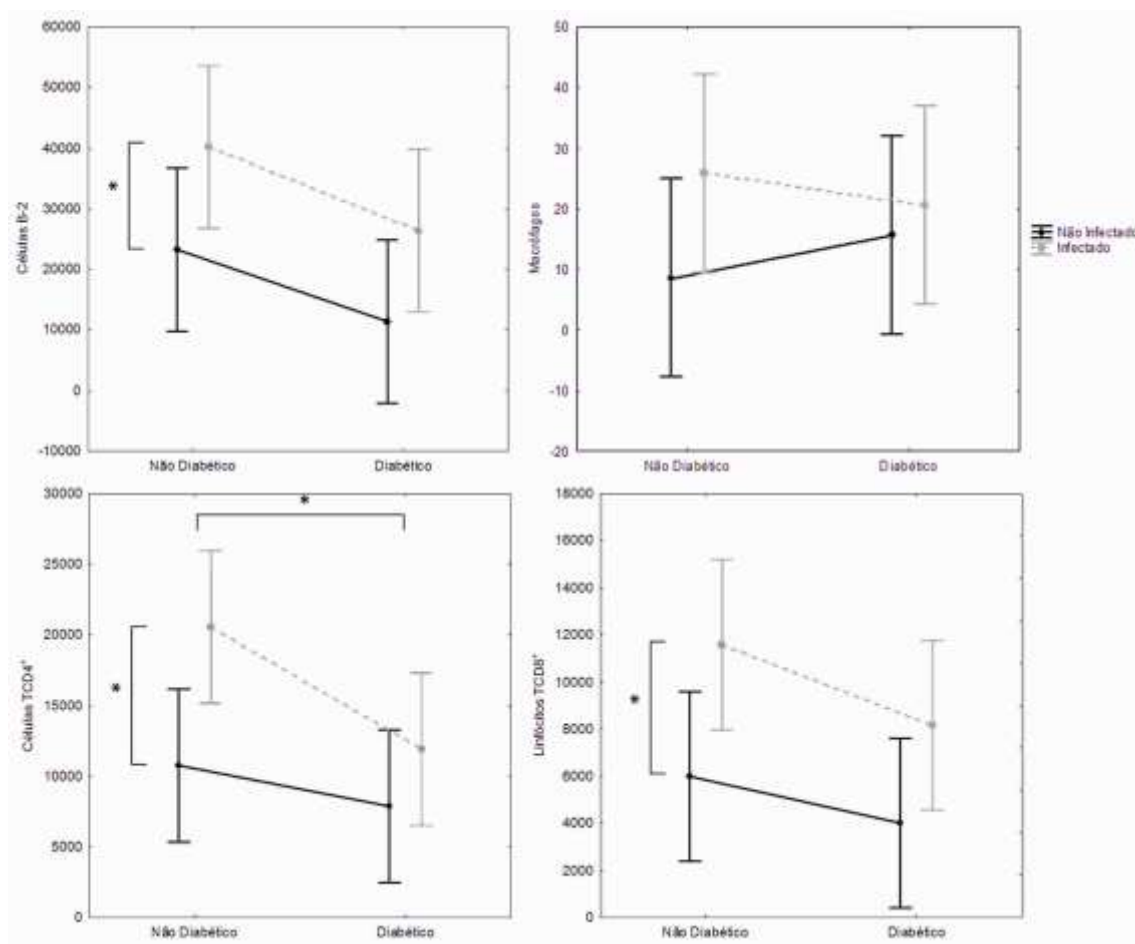


Figura 4. Avaliação das populações de células B-2 ($CD23^+CD19^+$), linfócitos T $CD4^+$ ($CD19^-CD8^-CD4^+$), linfócitos T $CD8^+$ ($CD19^-CD4^-CD8^+$) e macrófagos ($CD19^-F4/80^+CD11b^+$) presentes no baço de camundongos com diabetes induzido por STZ ou não e inoculados ou não com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de duas vias revelou $p < 0,05^*$.

Perfil de citocinas séricas de camundongos diabéticos após a infecção por *E.*

cuniculi. Foi observado que a infecção com *E. cuniculi* induziu aumento significativo nos níveis de citocinas pró-inflamatória Th1. Em relação ao IFN- γ , a citocina mais amplamente descrita na resolução da encefalitozoonose, houve aumento no grupo *Infectados*, em relação aos demais grupos (Figura 5). Já os animais *Diabéticos-Infectados* apresentaram altos níveis de IL-6 e TNF- α nos animais (Figura 5). Não

foram detectadas as citocinas IL-10 e IL-2 no soro dos camundongos e as citocinas IL-4 e IL-17A não mostraram alterações significativas (dados não mostrados).

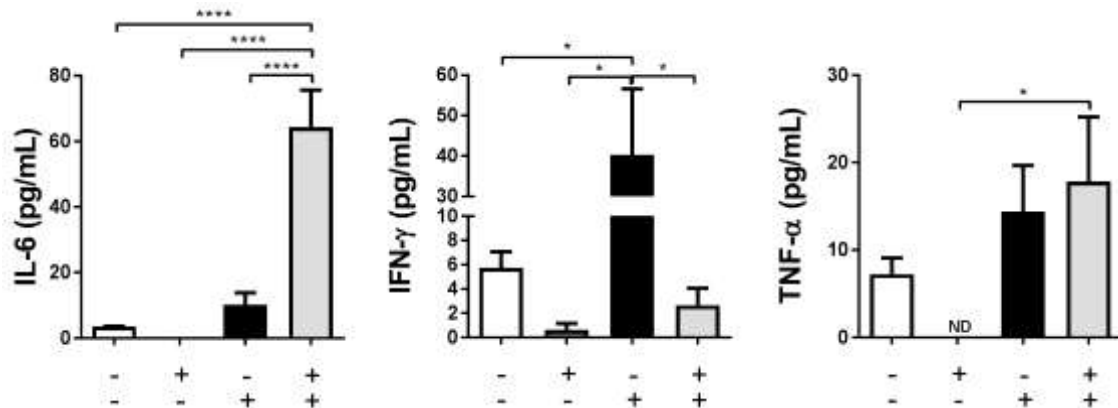


Figura 5. Níveis de citocinas IL-6, IFN- γ e TNF- α detectados no soro de camundongos com diabetes induzida por STZ (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05^*$ e $p < 0,0001^{****}$.

Camundongos diabéticos imunossuprimidos com Cy foram mais suscetíveis à encefalitozoonose causada por *E. cuniculi*

Glicemia, peso e carga parasitária. Nos animais diabéticos tratados com Cy e infectados (*Diabéticos-Cy-Infectados*) observou-se que os níveis glicêmicos se mantiveram altos durante o período de experimentação. Porém, ao final do experimento, aos 35 DPI, houve redução significativa da glicemia no grupo *Diabéticos-Cy-Infectados* (313 mg/dL) em comparação ao *Diabéticos-Cy-Não-Infectados* (459 mg/dL) (Figura 6). O mesmo foi evidenciado nos animais não diabéticos, sendo que o grupo *Cy-Infectados* ao final do experimento tinha média glicêmica de 142 mg/dL e o grupo *Cy-Não-*

Infectados tinha 210 mg/dL (Figura 6A). Estes dados revelaram que a encefalitozoonose associada à imunossupressão com Cy determinou, provavelmente, uma mudança metabólica que diminuiu os níveis glicêmicos dos camundongos diabéticos indicando, aparentemente, melhora na glicemia. Por outro lado, estes animais estavam mais doentes e tinham maior carga parasitária (Figura 6C), conforme será detalhado abaixo. Diferentemente do observado anteriormente, em camundongos não imunossuprimidos, aqui, não houve diferença no peso corporal de camundongos diabéticos ou não (Figura 6B), porém constatou-se uma ascite mais pronunciada, fato que poderia justificar a ausência na perda de peso apesar do estado doente mais evidente.

Os animais do grupo *Cy-Infectados* apresentaram discreta coleção de líquido peritoneal serosaguinolento e esplenomegalia. Porém quando os animais diabéticos foram tratados com Cy (*Diabéticos-Cy-Infectados*) a infecção determinou a ocorrência de sintomas mais graves, com grande distensão abdominal, presença abundante de líquido peritoneal serosaguinolento e esplenomegalia. Estes animais também tinham letargia e apatia. Embora nenhuma morte tenha sido observada neste período, como a condição clínica era muito precária foi realizada a eutanásia aos 35 DPI. Todos os controles não-infectados (*Cy-Não-Infectados* e *Diabéticos-Não-Cy/Não-Infectados*) não manifestaram quaisquer sintomas relacionados à infecção. Os animais imunossuprimidos (*Cy-Infectados*) tiveram carga parasitária 5 vezes maior que os animais do grupo *Infectado* (Figura 6C), semelhante a observada nos animais *Diabético-Infectado*. Por outro lado, os animais *Diabéticos-Cy-Infectados* tiveram a maior carga parasitária nos lavados peritoneais (Figura 6C), indicando que a associação das condições diabetes e imunossupressão tornou os animais mais suscetíveis à infecção.

Achados histopatológicos. As lesões histopatológicas observadas nos animais imunossuprimidos e infectados foram semelhantes as observadas nos animais não-imunossuprimidos, com infiltrado inflamatório menos expressivo (dados não mostrados). Adicionalmente, os camundongos tratados com Cy (*Diabéticos-Cy-Infectados* e *Cy-Infectados*) tinham áreas de degeneração hepatocelular leves (dados não mostrados).

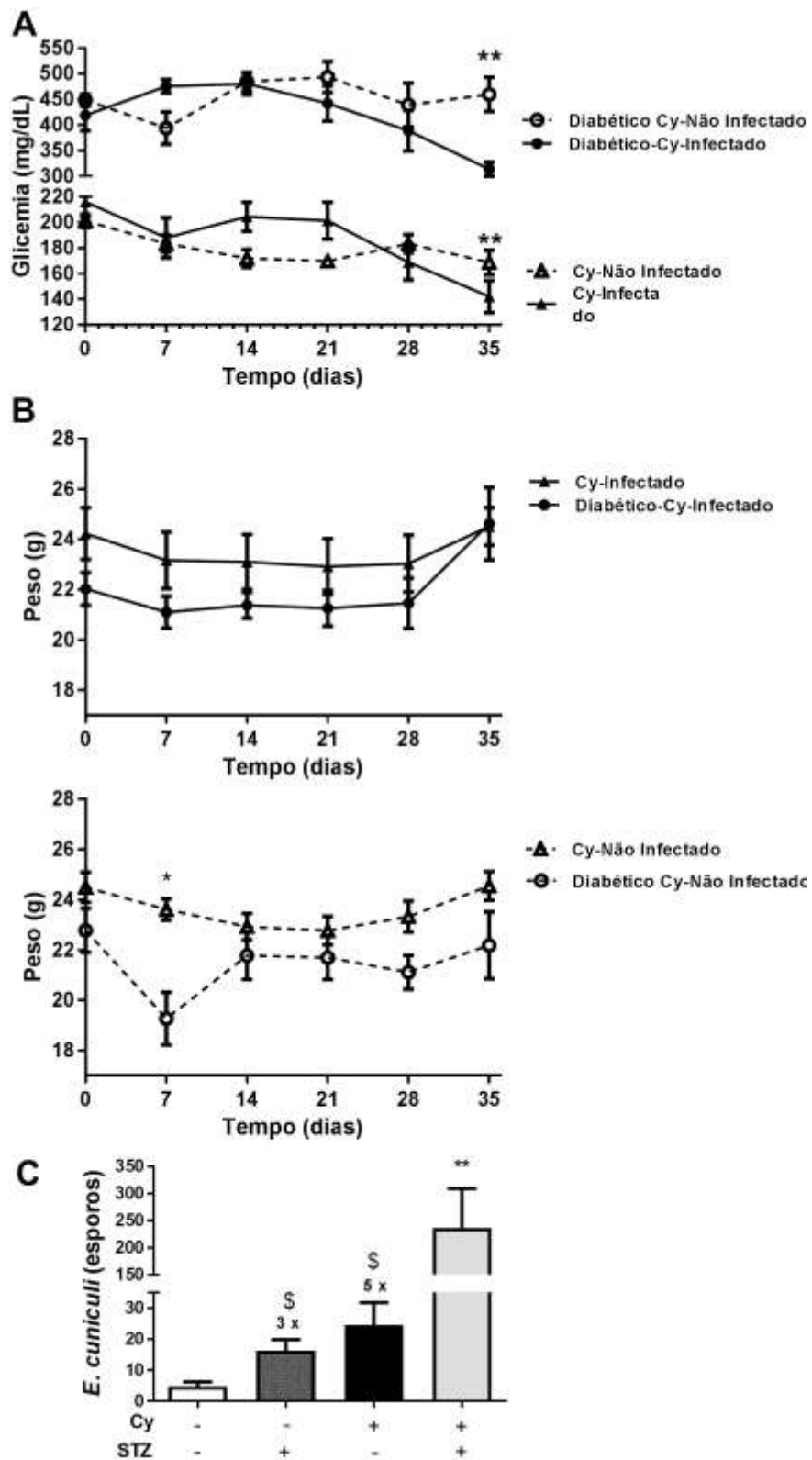


Figura 6. Parâmetros glicêmicos, peso e carga parasitária de camundongos tratados com Cy, diabéticos e não-diabéticos, infectados ou não com *E. cuniculi*. A) Variação da glicemia entre os grupos imunossuprimidos durante toda a fase experimental. B)

Variação do peso durante o período experimental. C) Carga parasitária do lavado peritoneal dos animais infectados com *E. cuniculi*, diabéticos induzidos por STZ (+) ou não (-) e tratado com Cy (+) ou não (-). Teste t não pareado apresentando $p < 0,05^*$ e $p < 0,01^{**}$ (A e B) e análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey revelou $p < 0,05^{\$}$ comparado ao grupo Não-Infectados e $p < 0,01^{**}$ comparado aos demais grupos.

Componentes da resposta imune na cavidade peritoneal e baço. Como era esperado, o tratamento com Cy reduziu significativamente as populações de células B-1, B-2, pré-B-1 CDP, T CD4⁺ e T CD8⁺ no peritônio nos camundongos *Cy-Não-Infectados* comparando com camundongos saudáveis *Não-Infectados*, revelando seu efeito supressor da resposta imune mediada por linfócitos B e T ($p < 0,05$, diferenças não apontadas em gráficos). O mesmo efeito imunossupressor foi observado no baço, contudo a população de macrófagos esplênicos aumentou em virtude do tratamento com Cy ($p < 0,05$, diferenças não apontadas em gráficos).

Nos grupos imunossuprimidos foi observada diminuição significativa nas populações de células B-2 mensuradas no peritônio dos animais *Diabéticos-Cy-Infectados* e *Diabéticos-Cy-Não-Infectados* em relação aos não-diabéticos (*Cy-Infectados* e *Cy-Não-Infectados*) (Figura 7), evidenciando efeito do DM induzido por STZ.

Apesar das populações celulares peritoneais estarem menores pelo uso da Cy, a infecção com *E. cuniculi* determinou em média aumento nas populações de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e de macrófagos de camundongos *Cy-Infectados* e *Diabéticos-Cy-Infectados* em relação aos grupos não infectados (*Cy-Não-Infectados* e *Diabéticos-Cy-Não-Infectados*), evidenciando a importância destas células na resposta imune contra os microsporídios, apesar da imunossupressão (Figura 7). Na análise do baço, somente

houve diferença significativa nos perfis das células analisadas (B-2, macrófago, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺) (Figura 8).

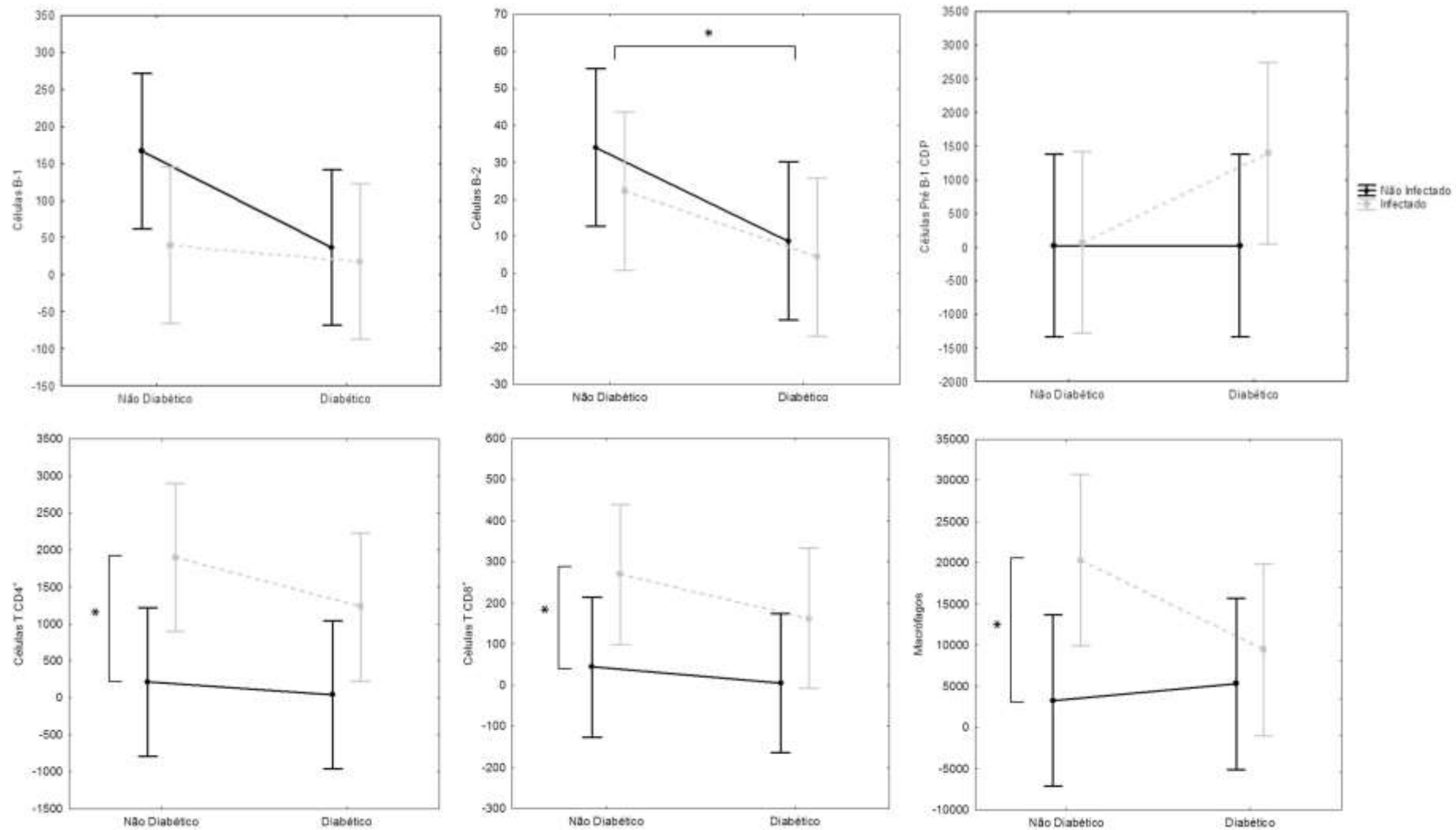


Figura 7. Avaliação das populações de células B-1 ($CD23^-CD19^+$), células B-2 ($CD23^+CD19^+$), pré-B-1 CDP ($CD19^+F4/80^+CD11b^+$), linfócitos T $CD4^+$ ($CD19^-CD8^-CD4^+$), linfócitos T $CD8^+$ ($CD19^-CD4^-CD8^+$) e macrófagos ($CD19^-F4/80^+CD11b^+$) presentes na cavidade peritoneal de camundongos imunossuprimidos, diabéticos induzidos por STZ ou não e inoculados ou não com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de duas vias revelou $p < 0,05^*$.

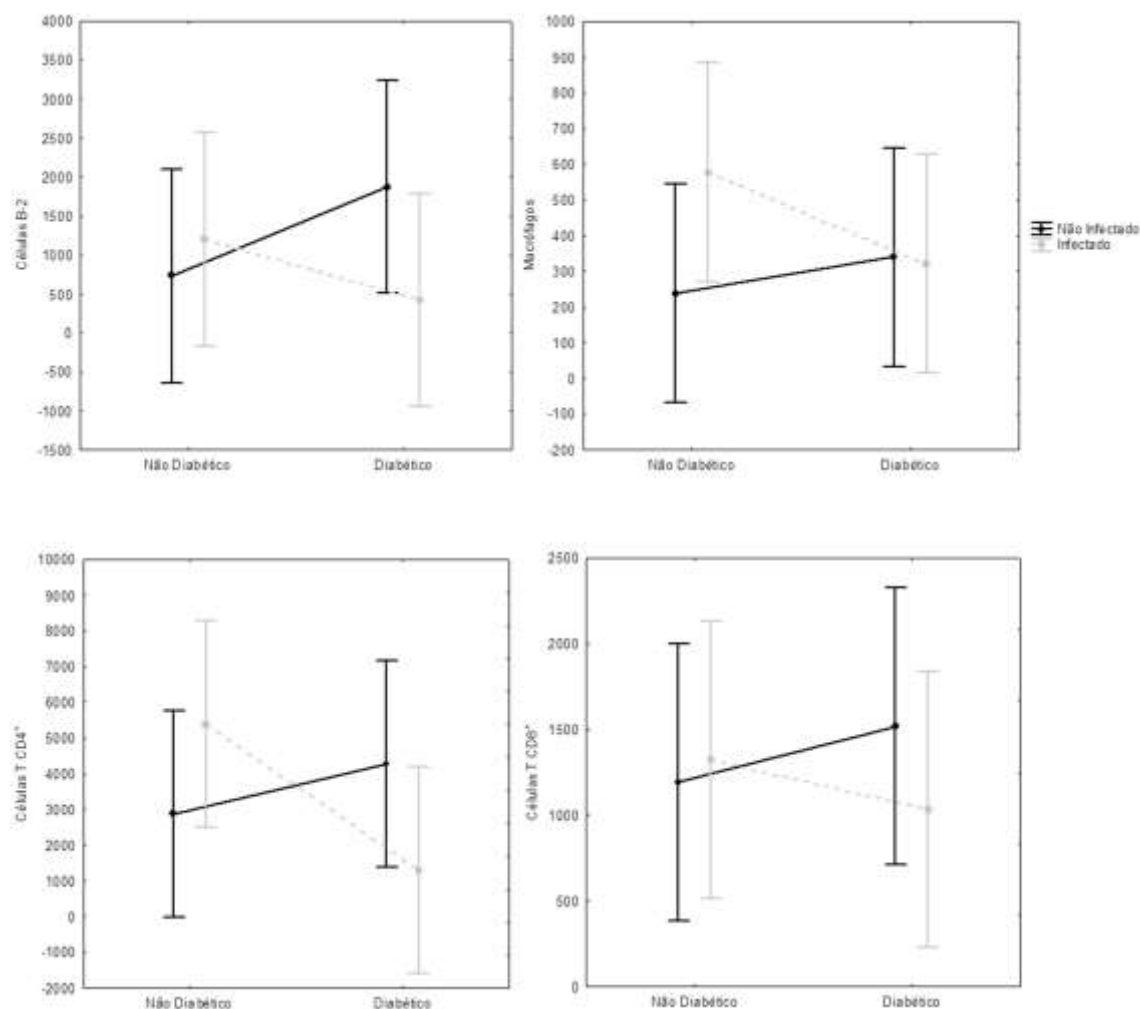


Figura 8. Avaliação das populações de células B-2 ($CD23^+CD19^+$), linfócitos T $CD4^+$ ($CD19^-CD8^-CD4^+$), linfócitos T $CD8^+$ ($CD19^-CD4^-CD8^+$) e macrófagos ($CD19^-F4/80^+CD11b^+$) presentes no baço de camundongos imunossuprimidos, diabéticos induzidos por STZ ou não e inoculados ou não com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de duas vias revelou $p < 0,05^*$.

Perfil de citocinas séricas de animais diabéticos tratados com Cy após a infecção por *E. cuniculi*. A infecção pelo *E. cuniculi* aumentou os níveis séricos de IFN- γ e TNF- α nos animais *Cy-Diabéticos-Infectados* em relação aos demais grupos (Figura 9). Os níveis de IL-6 e IFN- γ aumentaram em animais *Diabéticos-Não-Infectados* (Figura 9), evidenciando efeito particular do DM induzido nestas citocinas. Não foram detectadas as citocinas IL-2 e IL-10 nos soros dos camundongos avaliados e as citocinas IL-4 e IL-17A não apresentaram mudanças significativas (dados não mostrados).

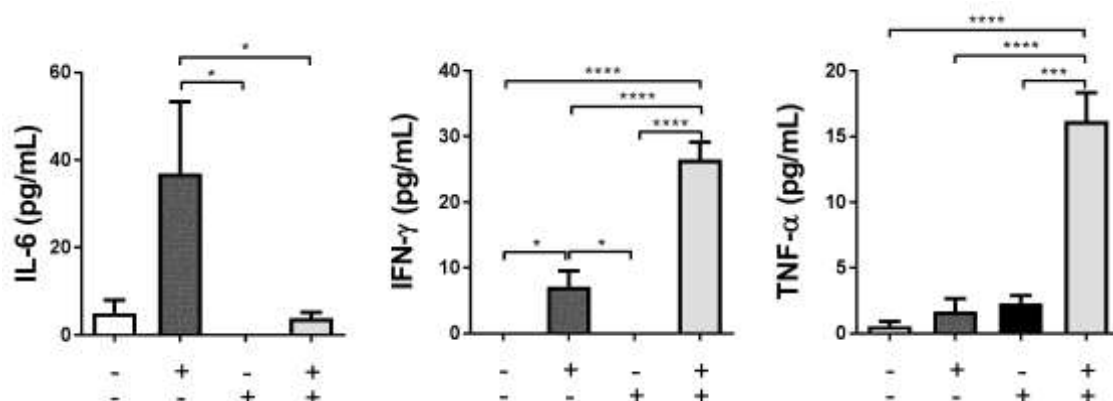


Figura 9. Níveis de citocinas IL-6, IFN- γ e TNF- α detectados no soro de camundongos imunossuprimidos com Cy e com diabetes induzida por STZ (+) ou não (-) e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A análise de variância ANOVA de uma via com pós teste de Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05^*$, $p < 0,001^{***}$ e $p < 0,0001^{****}$.

DISCUSSÃO

Tem sido demonstrado que pacientes diabéticos apresentam várias anormalidades funcionais e podem ter resposta imune insuficiente frente às infecções bacterianas e micóticas (Boyko et al., 2002; Müller et al., 2005; Peleg et al., 2007; Martinez, 2016). Muitas alterações imunológicas estão relacionadas com os níveis de insulina/glicose no sangue, consequentemente hipoinsulinemia e hiperglicemia alteram o funcionamento de órgãos linfoides (Delamaire et al, 1997). O timo de diabéticos sofre atrofia, perda da relação córtico-medular, aumento da matriz extracelular e tem menor expressão de quimiocinas CCL25 e CXCL12 (Nagib et al., 2010). Aparentemente estas alterações são transitórias e sua real importância para a evolução de infecções em diabéticos ainda não estão totalmente esclarecidas. No presente estudo, foi inoculado *E. cuniculi* em camundongos com DM induzido por STZ e observamos que a carga parasitária, as alterações clínicas e as lesões histopatológicas foram mais importantes neles que nos animais não diabéticos, mostrando pela primeira vez que diabetes tipo I tornou os animais mais suscetíveis à encefalitozoonose.

Microsporídios são patógenos oportunistas predominantemente associados a pacientes gravemente imunossuprimidos pelo HIV (Didier e Weiss, 2011). Além disso, nos últimos anos, há relatos de microsporidiose associados com pacientes receptores de transplantes de órgãos sólidos (Kicia et al., 2014), crianças e idosos (Müller et al., 2001; Lores et al., 2002; Didier e Weiss, 2011). Até o momento, a única relação patológica estabelecida entre microsporídios e diabetes foi o relato de um abscesso cerebral causado por *Encephalitozoon cuniculi* genótipo I juntamente com *Streptococcus intermedius* que ocorreu em um paciente sem imunossupressão e com diabetes tipo II. O microsporídio foi confirmado no aspirado do abscesso e pela PCR de fezes e urina, e o paciente foi tratado com albendazol e mebendazol com sucesso (Ditrich et al., 2011), assim a

demonstração neste estudo de encefalitozonose mais grave em diabéticos coloca este agente oportunista no espectro das co-morbidades que podem acometer os diabéticos.

Os principais mecanismos patogênicos relacionados com a suscetibilidade de indivíduos com DM às doenças infecciosas incluem - aumento da virulência de alguns patógenos por causa do ambiente hiperglicêmico presente em tecidos de pacientes diabéticos; menor produção de interleucinas em resposta à infecção; redução da quimiotaxia e da atividade fagocítica, falta de mobilização de leucócitos polimorfonucleares, glicosúria, dismotilidade gastrointestinal e urinária (Casqueiro et al., 2012).

No DM, a resposta imune inata contra infecções tem sido mais estudada que a resposta imune adaptativa. Recentemente, foi demonstrado que camundongos com diabetes tipo I (induzido por STZ) e tipo II (decorrente de obesidade), tiveram infecção por *S. aureus* mais grave que seus controles, sendo esta relacionada com defeito na resposta humoral (Farnsworth et al, 2015). O aumento de taxas de infecção em diabéticos também foi associado com diminuição da resposta imune mediada por células T (Calvet e Yoshikawa, 2001; Shah e Hux, 2003).

Em nosso estudo, os animais infectados tiveram aumento das populações de células T na cavidade peritoneal e no baço acompanhada por redução de macrófagos no peritônio. Estudos prévios mostram que a resposta imune protetora contra a encefalitozonose é mediada por linfócitos T CD8⁺ (Braunfuchsová et al., 2001; Khan et al., 2001), corroborando os achados de nossa pesquisa e reforçando que a forte resposta das linhagens de células T. Nosso grupo também demonstrou aumento das populações celulares de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células B-1 em resposta à inoculação intraperitoneal de *E. cuniculi*, evidenciando a importância dos linfócitos na imunidade

adquirida na encefalitozoonose. (da Costa et al., 2016). Entretanto, observamos que o DM induzido por STZ reduziu as populações de células B-1, B-2 e T CD4⁺ no peritônio e de linfócitos T CD4⁺ no baço sendo estas falhas as prováveis responsáveis por tornar estes animais mais suscetíveis à encefalitozoonose. Assim, apesar da atividade imune T dependente estar presente nos animais infectados diabéticos ou não, a encefalitozoonose mais intensa evidenciada pela carga parasitária indica que a participação das células B-1, B-2 e macrófagos é importante para a perfeita comunicação entre os elementos da imunidade.

O efeito da glicose sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa in vivo* foi testado utilizando camundongos com hiperglicemia induzida por estreptozotocina, que têm significativamente maior índice de glicose das vias aéreas. A carga bacteriana em animais hiperglicêmicos foi maior do que nos animais controle quando infectados com o tipo selvagem da bactéria. O pré-tratamento com metformina em animais hiperglicêmicos reduziu tanto a glicose das vias aéreas como a carga bacteriana. Estes dados mostram que a presença de glicose nas vias aéreas é um determinante crítico no aumento da carga bacteriana em animais diabéticos (Gill et al., 2016). Uma vez que os animais diabéticos tiveram maior suscetibilidade à encefalitozoonose e maior carga parasitária talvez os altos níveis glicêmicos possam ter contribuído com a sobrevivência e desenvolvimento de microsporídios, porém de forma diferente ao que é atribuído às bactérias, já que são obrigatoriamente intracelulares. Estudos futuros deverão ser realizados com intuito de analisar esta possibilidade.

Observamos que o DM induzido com STZ diminuiu a população de células B-1 e B-2 do peritônio. Em estudo anterior, nosso grupo demonstrou maior resistência à encefalitozoonose em camundongos BALB/c e esta foi atribuída em parte ao aumento

de células B-1 (da Costa et al. 2016). Os resultados encontrados sugerem que a diminuição de células B-1 também pode ter contribuído para a maior suscetibilidade dos animais diabéticos à encefalitozoonose. Embora, as células B-2 não tenham papel primordial na encefalitozoonose, os níveis de anticorpos encontrados em animais infectados por *E. cuniculi* são muito altos (Hinney et al., 2016), indicando sua participação na resposta imune adquirida. Corroboram estas informações a diminuição dessas células observada em animais com DM, sendo estes os mais suscetíveis à encefalitozoonose.

As citocinas inflamatórias desempenham um papel importante na infecção pelo *E. cuniculi* pela ativação de macrófagos e células T CD8⁺ (Lawlor et al, 2010; Didier e Khan, 2014). Em nosso estudo, os animais *Infectados* apresentaram um perfil de citocinas *Th1*, destacando-se os altos níveis de IFN- γ e TNF- α . O papel das citocinas na resposta imunitária às infecções por microsporídios foi examinado em vários modelos animais e em estudos *in vitro* (Salát et al., 2004; Jelinek et al., 2007). As citocinas *Th1* (principalmente IFN- γ) desempenham um papel importante durante às infecções por microsporídios em camundongos imunodeficientes (Salát et al, 2006), reforçando os resultados desse estudo. Os camundongos *knockout* para IFN- γ não conseguem eliminar a infecção pelo *E. cuniculi* (Khan e Moretto, 1999), mas a transferência adotiva de esplenócitos aumenta a sua taxa de sobrevivência, sugerindo que o IFN- γ produzido por células NK é importante para eliminação de *E. cuniculi* (Salát et al., 2004).

Anteriormente, foi descrito que as células mononucleares de pessoas com DM secretam mais IL-1 e IL6 frente à estimulação com lipopolissacarídios - LPS (Peleg et al., 2007). Os nossos resultados mostraram que os camundongos com diabetes induzido tiveram níveis maiores de IL-6 frente a infecção com *E. cuniculi*, corroborando essas

informações. Nos animais diabéticos e tratados com Cy também foi evidenciada uma maior produção de IL-6 na ausência de infecção, o que reforça a possibilidade de que um perfil mais pró-inflamatório se estabelece pela indução do quadro diabético.

Por outro lado, descreve-se uma tendência à baixa secreção de interleucinas como consequência dos defeitos intrínsecos das células de pacientes com DM (Geerlings e Hoepelman, 1999; Geerlings et al, 2000). Entretanto, o aumento da glicação pode inibir a produção de IL-10 pelas células mieloides, assim como a produção de IFN- γ e TNF- α por linfócitos T (Price et al., 2010). Os baixos níveis de expressão de IL-10 privam os macrófagos do efeito anti-inflamatório desta citocina, durante o Diabetes. Além disso, os níveis aberrantemente elevados de IL-12 apontam para um perfil *Th1* pró-inflamatório, assim os precursores de macrófagos em ambiente hiperglicêmico ficam previamente direcionados para uma resposta *Th1*, mesmo antes da sua entrada em tecidos infectados ou nos locais inflamados (Mohammad et al., 2006).

Observamos que os animais *Diabéticos-Infectados* tiveram baixa produção de IFN- γ , ao contrário do que foi visto nos animais não diabéticos, concordando com as observações de Price et al. (2010). Nós especulamos que este defeito na resposta imune de camundongos diabéticos, associado à diminuição das populações peritoneais de linfócitos seja responsável pela maior suscetibilidade deste grupo. Por sua vez, o tratamento com Cy em camundongos diabéticos e infectados reverteu esta condição, pois os animais diabéticos, infectados ou não, tiveram maior produção de IFN- γ , sugerindo um papel imunomodulador de Cy. Entretanto, a população de células T CD8⁺, principais efectoras da citotoxicidade contra *E. cuniculi*, estava muito reduzida e este grupo estava mais doente que os outros infectados.

Martinez et al. (2016) demonstram mortalidade mais rápida em camundongos com diabetes induzido por STZ após a infecção intra-traqueal de *Klebsiella pneumoniae*. Os animais recrutaram menos granulócitos para o espaço aéreo alveolar e produziram menores quantidades de quimiocinas e citocinas CXCL1, CXCL2, IL-1 β e TNF- α . Este resultado indica que a falha de recrutar rapidamente granulócitos para o local da infecção é um mecanismo para a suscetibilidade de diabéticos à infecção respiratória por *K. pneumoniae* (Martinez et al., 2016). Ao contrário, nossos resultados mostraram aumento de TNF- α em camundongos diabéticos infectados, porém como apontado acima, esta não é a citocina mais importante na resposta imune contra a microsporidiose.

Em trabalhos anteriores demonstramos que camundongos imunossuprimidos com fármacos constituem modelos biológicos adequados para o estudo de encefalitozoonose murina, uma vez que a supressão da imunidade favorece a encefalitozoonose (Lallo et al., 2002, Lallo e Bondan, 2005, Lallo e Hirschfeld, 2012). A Cy é um alquilante citotóxico que se liga ao DNA e causa apoptose, assim atrasa e suprime a resposta de células T e B, causa mielossupressão, afetando neutrófilos, linfócitos, hemácias e plaquetas (Brodsky, 2010). Observamos que as populações de células B e T reduziram significativamente com o tratamento imunossupressor pela Cy, adicionalmente, os animais imunossuprimidos tiveram maior carga parasitária que os animais não tratados com Cy, confirmando os resultados anteriores. O tratamento com Cy tem um efeito diferencial em compartimentos de linfócitos, podendo rapidamente esgotar as células B e T, sendo seguido pela recuperação, proliferação e mobilização extensiva da medula óssea (Brode e Cooke, 2008; Emadi et al., 2009). Observamos que a inoculação de *E. cuniculi* resultou em aumento de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e macrófagos, fato que poderia ser explicado por este efeito rebote e pela estimulação

produzida pelo patógeno, porém estas populações eram muito menores que as observadas em animais não imunossuprimidos, fato que justifica sua maior suscetibilidade à encefalitozoonose.

A somatória dos efeitos produzidos pelo diabetes e o tratamento com Cy determinou um quadro de encefalitozoonose bem mais grave, com grande carga parasitária, sintomas como ascite acentuada e muitas lesões histopatológicas, à semelhança do que foi observado por outros autores em animais *atímicos* e *SCID*, os quais possuem deficiência pronunciada de células T (Koudela et al., 1993, Didier et al., 1994). Estes resultados reforçam que o diabetes induzido por STZ pode modular as células do sistema imune e, em associação com drogas imunossupressoras torna mais os indivíduos mais suscetíveis.

Inesperadamente, observamos que a encefalitozoonose associada à imunossupressão com Cy determinou, provavelmente, uma mudança metabólica que derrubou os níveis glicêmicos de camundongos diabéticos e não diabéticos. Está claro que microsporídios podem fortemente influenciar o ambiente bioquímico do hospedeiro, sabe-se que existe um custo energético para o mesmo. Os microsporídios utilizam ATP, já que frequentemente eles aparecem rodeados por mitocôndrias da célula do hospedeiro, presumivelmente para utilizar o ATP celular (Weidner et al., 1999). Já foi visto que os microsporídios possuem uma mitocôndria remanescente, chamado mitossoma. Existem 4 transportadores responsáveis pelo transporte de ATP, um deles fica localizado na membrana dos mitossomas, assim o ATP produzido pela célula hospedeira é transportado das mitocôndrias para o citoplasma dos microsporídios ou para o seu mitossoma (Tsaousis et al., 2008). Além disso, tem sido relatado que a infecção por microsporídios causa diminuição de glicogênio no hospedeiro e uma rápida

absorção de glicose (Metenier e Vivares, 2001), eventos que podem ser promovidos pela colocação da hexoquinase do parasita nas células hospedeiras. A hexoquinase catalisa o primeiro passo na glicólise, na via da pentose fosfato. Por conseguinte, a atividade da hexoquinase de microsporídios dentro da célula hospedeira pode aumentar a síntese de nucleotídeos, aminoácidos e lipídios, necessária para o rápido crescimento destes parasitas (Cuomo et al., 2012). É provável que as mudanças metabólicas provocadas pelos microsporídios tenham sido favorecidas pelo tratamento com Cy. Essas hipóteses serão avaliadas futuramente em nosso laboratório.

Em conclusão, os nossos resultados indicaram que camundongos diabéticos induzidos pela STZ foram mais suscetíveis à infecção por *E. cuniculi*, provavelmente, por apresentarem diminuição das populações de células B-1, B-2 e T CD4⁺ e baixos níveis de IFN- γ , indicando uma condição de imunossupressão. Adicionalmente, a imunossupressão com Cy tornou os animais diabéticos ainda mais suscetíveis à encefalitozoonose, com possíveis alterações metabólicas importantes.

REFERÊNCIAS

- Almeida L, Aroeira S, Frymuller E, Dias MA, Bogsan CS, Lopes JD, Mariano M. 2001. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int Immunol* 13:1193-1201.
- Anane S, Attouchi H. 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol Clin Biol* 34:450-464.
- Atkins RC, Zimmet P. 2010. Diabetic kidney disease: Act now or pay later. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 21:217–221.
- Boyko EJ, Fihn SD, Scholes D, Chen CL, Normand EH, Yarbro P. 2002. Diabetes and the risk of urinary tract infection among postmenopausal women. *Diabetes Care* 25:1778–1783.
- Braunfuchsová, P., Salát, J., Kopecký, J., 2001. CD8⁺ T-lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Int. J. Parasitol.* 15: 681-686.
- Brode S, Cooke A. 2008. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev Immunol* 28:109-126.
- Brodsky RA. 2010. High-dose cyclophosphamide for autoimmunity and alloimmunity. *Immunol Res* 47:179–184.
- Calvet HM, Yoshikawa TT. 2001. Infections in diabetes. *Infect Dis Clin North Am* 15:407–421.
- Casqueiro J, Casqueiro J, Alves, C. 2012. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab.* 1:S27-36.

Chaudhry ZZ, Morris DL, Moss DR, Sims EK, Chiong Y, Kono T, Evans-Molina C. 2013. Streptozotocin is equally diabetogenic whether administered to fed or fasted mice. *Lab Anim.* 472:57-65.

Cuomo CA, Desjardins CA, Bakowski MA, Goldberg J, Ma AT, Becnel JJ, Didier ES, Fan L, Heiman DI, Levin JZ, Young S, Zeng Q, Troemel ER. 2012. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *Genome Res* 22:2478-2488.

da Costa LF, Alvares-Saraiva AM, Dell'Armeline Rocha PR, Spadacci-Morena DD, Perez EC, Mariano M, Lallo MA. 2016. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *Immunobiology* 217:1-12.

Delamaire M, Maugendre D, Moreno M, Le Goff M-C, Allannic H, Genetet B. 1997. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med* 14:29-34.

Didier ES, Varner PW, Didier PJ, Aladras AM, Millichamp NJ, Murphey-Corb M, Bofm R, Shaddock JA. 1994. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasit* 41:1-11.

Didier ES, Weiss LM. 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis* 24:490-495.

Didier ES, Khan IA. 2014. The immunology of microsporidiosis in mammals. In: Weiss, LM, Becnel JJ. (Eds.). *Microsporidia*. John Wiley & Sons, New York, p. 307-325.

- Ditrich O, Chrdle A, Sak B, Chmelík V, Kubále J, Dyroková I, Kvác M. 2011. *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. J Clin Microbiol 49:2769-2771.
- Elnadi NA, Hassanien HA, Ahmad AM, Abd Ellah AK. 2015. Intestinal parasites in diabetic patients in Sohag University Hospitals, Egypt. J Egypt Soc Parasitol 45:443-449.
- Emadi AI, Jones RJ, Brodsky RA. 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nat Rev Clin Oncol 6:638–647.
- Farnsworth CW, Shehatou CT, Maynard R, Nishitani K, Kates SL, Zuscik MJ, Schwarz EM, Daiss JL, Mooney RA. 2015. A humoral immune defect distinguishes the response to *Staphylococcus aureus* infections in mice with obesity and type 2 diabetes from that in mice with type 1 diabetes. Infect Immun 83: 2264-74.
- Geerlings SE, Hoepelman AI. 1999. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM) FEMS Immunol Med Microbiol. 26:256–265.
- Geerlings SE, Brouwer EC, Van Kessel KC, Gastra W, Stolk RP, Hoepelman AI. 2000. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. Eur J Clin Invest 30:995–1001.
- Gill SK, Hui K, Farne H, Garnett JP, Baines DL, Moore LSP, Holmes AH, Filloux A, Tregoning JS. 2016. Increased airway glucose increases airway bacterial load in hyperglycaemia. Sci Rep 8:27636.
- Hinney B, Sak B, Joachim A, Kváč M. 2016. More than a rabbit's tale e *Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. Int J Parasitol. Parasites and Wildlife

5, 76-87.

Hu KK, Boyko EJ, Scholes D, Normand E, Chen CL, Grafton J, Fihn SD. 2004. Risk factors for urinary tract infections in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 164:989-993.

Jelinek J, Salat J, Sak B, Kopecký J. 2007. Effects of interferon gamma and specific polyclonal antibody on the infection of murine peritoneal macrophages and murine macrophage cell line PMJ2-R with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol.* 54:172-176.

Khan IA, Moretto M. 1999. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 67:1887–1893.

Khan IA, Moretto M, Weiss LM. 2001. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect* 3:401-405.

Kicia M, Wesolowska M, Jakuszko K, Kopacz Z, Sak B, Květonova D, Krajewka M, Kváč M. 2014. Concurrent infection of the urinary tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in a renal transplant recipient. *J Clin Microbiol* 52:1780-1782.

Koudela B, Vitovec J, Kucerov Z, Ditrich O, Tránicek J. 1993. The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasit.* 40: 279–286.

Kowalewska B, Katarzyna Zorena K, Szmigiero-Kawko M, Wąż P, Myśliwiec M. 2016. Higher diversity in fungal species discriminates children with type 1 diabetes mellitus from healthy control. *Patient Preference and Adherence* 10:591-599.

Lallo MA, Santos MJ, Bondan EF. 2002. Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona. Rev Saúde Pub 36:621-626.

Lallo MA, Bondan EF. 2005. Experimental meningoencephalomyelitis by *Encephalitozoon cuniculi* in cyclophosphamide-immunosuppressed mice. Arq Neuro-Psiq 63:246-251.

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

Lawlor EM, Moretto MM, Khan IA. 2010. Optimal CD8 T-cell response against *Encephalitozoon cuniculi* is mediated by Toll-like receptor 4 upregulation by dendritic cells. Infect Immun 78:3097-3102.

Lores B, López-Miragaya I, Arias C, Fenoy S, Torres J, del Aguila C. 2002. Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* in elderly human immunodeficiency virus--negative patients from Vigo, Spain. Clin Infect Dis 34:918-921.

Martinez N, Ketheesan N, Martens GW, West K, Lien E, Komfeld H. 2016. Defects in early cell recruitment contribute to the increased susceptibility to respiratory *Klebsiella pneumoniae* infection in diabetic mice. Microbe Intect. 18:649-655.

Metenier G, Vivares CP. 2001. Molecular characteristics and physiology of microsporidia. Microbes Infect 3: 407–415.

Moretto M, Weiss LM, Khan IA. 2004. Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. J Immunol, 172:4402-4409.

Mohamad MK, Morran M, Slotterbeck B, Leaman DW, Sun Y, Grafenstein HV, Hog SC, Mcinmey MF. 2006. Dysregulated Tol-like receptor expression and signaling in boné marrow-derived macrophages at the onset of diabtes in the non-obese diabetic mouse. Inr Immunol.18:1101-1113.

Müller A, Bialek R, Kämper A, Fätkenheuer G, Salzberger B, Franzen C. 2001. Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. J Clin Microbiol 39:1630-1632.

Müller LM, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AI, Rutten GE. 2005. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. Clin Infect Dis 41:281–288.

Nagib PR, Gameiro J, Stivanin-Silva LG, de Arruda MS, Villa-Verde DM, Savino W, Verinaud L. 2010. Thymic microenvironmental alterations in experimentally induced diabetes. Immunobiology 215:971-979.

OMS 2016. <http://www.who.int/diabetes/en/>

Peleg AY, Weeraratna T, McCarthy JS, Davis TM. 2007. Common infections in diabetes: Pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. Diabetes Metab Res Rev 23:3–13.

Price CL, Al Hassi HO, English NR, Blakemore AI, Stagg AJ, Knight SC. 2010. Methylglyoxal modulates immune responses: relevance to diabetes. J Cell Mol Med 14:1806–1815.

Salát J, Sak B, Le T, Kopecky J. 2004. Susceptibility of IFN- gamma or IL-12 knock-out and SCID mice to infection with two microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi* and *E. intestinalis*. Folia Parasitol 51: 275-282.

- Salát J, Horká H, Sak B, Kopecký J, 2006. Pure CD4⁺ T-lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. Parasitol Res 99:682–686.
- Shah BR, Hux JE. 2003. Quantifying the risk of infectious diseases for people with diabetes. Diabetes Care 26:510-513.
- Tsaousis AD, Kunji ER, Goldberg AV, Lucocq JM, Hirt RP, Embley TM. 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. Nature 22:553-556.
- Valencakova A, Halanova M. 2012. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 35:1-7.
- Weidner E, Canning EU, Rutledge CR, Meek CL. 1999. Mosquito (Diptera:Culicidae) host compatibility and vector competency for the human myositis parasite *Trachipleistophora hominis* (Phylum Microspora). J. Med Entomol. 36:422-525.
- Weiss LM. 2014. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: Weiss LM, Becnel JJ. (Eds). Microsporidia – pathogens of opportunity. Wiley Blackwell, Oxford. 371-401pp.