

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**O TRATAMENTO COM CICLOFOSFAMIDA NÃO IMPEDE  
A RESPOSTA IMUNE CONTRA A INFECÇÃO ORAL  
PELO *ENCEPHALITOZOON INTESTINALIS***

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

**MARIA LUCIA COSTA DE MOURA**

**São Paulo**

**2016**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**O TRATAMENTO COM CICLOFOSFAMIDA NÃO IMPEDE  
A RESPOSTA IMUNE CONTRA A INFECÇÃO ORAL  
PELO *ENCEPHALITOZOON INTESTINALIS***

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

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

**MARIA LUCIA COSTA DE MOURA**

**São Paulo**

**2016**

Moura, Maria Lucia Costa de.

O tratamento com ciclofosfamida não impede a resposta imune contra a infecção oral pelo *encephalitozoon instinalis* / Maria Lucia Costa de Moura. - 2016.

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

Tese de Doutorado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Patologia Ambiental Experimental.

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

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Anuska Marcelino Alvares-Saraiva.

1. *Encephalitozoon intestinalis*. 2. Microsporidia. 3. Enterócitos.  
4. Inflamação intestinal. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Alvares-Saraiva, Anuska Marcelino (coorientadora). III. Título.

**MARIA LUCIA COSTA DE MOURA**

**O TRATAMENTO COM CICLOFOSFAMIDA NÃO IMPEDE  
A RESPOSTA IMUNE CONTRA A INFECÇÃO ORAL  
PELO *ENCEPHALITOZOON INTESTINALIS***

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

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

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Prof. Dr. James Venturini  
UNESP – Universidade do Estado de São Paulo

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

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

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

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

## **AGRADECIMENTOS**

Não é muito fácil escrever agradecimentos, até porque entendemos a significância das pessoas na nossa trajetória.

Até porque a vida nos coloca em situações difíceis, trajetórias que parecem impossíveis.

Metas que nos parecem intransponíveis.

Mas consegui!

Graças a Deus consegui.

Primeiro quero agradecer a minha fé, ao meu Deus, a minha família.

A minha mãe que me deixou num momento muito importante da minha vida e a falta que sinto dela é impossível explicar.

Quero agradecer também aos meus amigos, Katia, Sandra, Silvia Claudia, Carmen, Diva, Milda, Edvania, a todas as pessoas que me ajudaram a superar momentos difíceis.

Um agradecimento especial às colegas de curso Carla e Rossana que me apoiaram e sempre acreditaram que eu conseguiria.

A minha família, que me apoiou. A minha irmã Rose que sempre orava por mim.

As minhas filhas Karine e Daniella que sempre diziam você consegue. Você é capaz.

Ao meu marido Carlos que sempre falava segura na mão do senhor e caminha.

Aos meus netinhos que tanto amo, você Tito, que morro de saudade quando estou em São Paulo, e quando olho pra ele vejo que preciso ter forças pra continuar. A Jolie que está chegando e vai preencher ainda mais a minha vida.

Agradeço ao PROSUP ao imprescindível apoio para concluir meu curso, obrigada professora Sonia Ribeiro.

A minha orientadora Anete na condução do trabalho e que sempre dizia: “estude”, “estude”, “estude”. Não tenho palavras para agradecer suas orientações. Você é maravilhosa!

A minha querida Anuska por toda sua paciência e dedicação, meu muito obrigado.

A professora Bete meu docinho de coco pelo carinho e atenção, e palavras de incentivo.

Ao professor Guilherme pela ajuda sempre disposto a explicar as laminas.

A Cris maravilhosa da pós-graduação, sempre paciente e atenciosa. Um doce de pessoa.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir o doutorado.

Obrigado Senhor!

## RESUMO

Os microsporídios infectam vertebrados e invertebrados e são reconhecidos como agentes oportunistas em indivíduos com deficiências imunológicas. Embora a atividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> seja primordial para eliminar os microsporídios, na inoculação do agente por via oral os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células dendríticas adquirem papel mais crítico no desenvolvimento da imunidade. Estudos envolvendo camundongos *knockout* evidenciam a importância de certos tipos de células na imunidade contra microsporídios, entretanto poucos estudos mostram os efeitos imunossupressores de fármacos sobre os elementos da resposta imune mediante infecções. Com o objetivo de investigar a resposta imune intestinal frente à infecção oral por *E. intestinalis*, camundongos C57BL/6 foram infectados pela via oral com a dose de 5x10<sup>7</sup> esporos e tratados ou não com o agente imunossupressor ciclofosfamida (Cy) por via intraperitoneal. A infecção foi avaliada pela carga parasitária e pelas lesões histopatológicas observadas. Usando a citometria de fluxo, investigou-se a resposta do sistema imune quantificando fagócitos, linfócitos, células NKT e dendríticas no intestino, placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e cavidade peritoneal aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (DPI). Os animais infectados não tiveram sintomas da doença, porém tinham enterite linfoplasmocítica e alta carga parasitária, sendo esses achados mais abundantes aos 7 e 14 DPI. Os camundongos tratados com Cy tiveram maior carga parasitária em todos os períodos, mostrando maior suscetibilidade ao *E. intestinalis*. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> foram as células mais abundantes na mucosa intestinal de infectados. Os resultados evidenciam uma resposta imune no intestino efetiva contra a infecção oral por *E. intestinalis*, mesmo em camundongos imunossuprimidos com Cy.

**Palavras-Chave:** *Encephalitozoon intestinalis*, Microsporidia, Enterócitos. Inflamação intestinal.

## ABSTRACT

Microsporidia infect vertebrates and invertebrates and are intracellular opportunistic pathogens in immunocompromised individuals. Although activated T CD8<sup>+</sup> lymphocytes are crucial to eliminate microsporidia, T CD4<sup>+</sup> lymphocytes and dendritic cells are also important for the immune response. Investigations with *knockout* mice demonstrated the role of immune cells against microsporidiosis. However, few studies have focused on the effects of immunosuppressive drugs in the immune response against infection. The aim of the present study was to investigate the role of intestinal immune response against *Encephalitozoon intestinalis* oral infection in C57BL/6 mice immunosuppressed with cyclophosphamide (Cy) by intraperitoneal rout. Intestinal infection was counted by parasite burden and histopathologic lesions were described. Flow cytometry evaluated phagocytes, lymphocytes, NKT and dendritic cells in the small intestines; peyer's patches mesenteric lymph nodes and peritoneal cavity at 7, 14, 21 and 28 DPI. Clinical symptoms were not observed in infected animals, however, lymphoplasmocytic enteritis associated with a high parasite burden was observed, mostly between 7 and 14 DPI. Parasite burden was higher in immunosuppressed mice, indicating a higher susceptibility to *E. intestinalis* infection. TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> cells increased in the intestinal mucosa of infected animals. The present results showed an effective intestinal immune response against *E. Intestinalis* infection by oral rout in both immunocompetent and immunosuppressed mice.

**Keywords:** *Encephalitozoon intestinalis*. Microsporidia. Enterocytes. Intestinal inflammation.



**SUMÁRIO**

**ARTIGO.....8**

**INTRODUÇÃO .....10**

**MATERIAIS E MÉTODOS.....13**

**RESULTADOS .....17**

**DISCUSSÃO .....32**

**REFERÊNCIAS .....39**

## **O tratamento com ciclofosfamida não impede a resposta imune contra a infecção oral pelo *Encephalitozoon intestinalis***

Maria Lucia Costa de Moura<sup>1</sup>, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva<sup>1</sup>, Elizabeth Christina Perez Hurtado<sup>1</sup>, Carla Renata Serantoni Moyses<sup>1</sup>, José Guilherme Xavier<sup>1</sup>, Diva Denelle Spadacci-Morena<sup>2</sup>, Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha<sup>1</sup>, Maria Anete Lallo<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Departamento de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

### **Resumo**

Os microsporídios infectam vertebrados e invertebrados e são reconhecidos como agentes oportunistas em indivíduos com deficiências imunológicas. Embora a atividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> seja primordial para eliminar os microsporídios, na inoculação do agente por via oral os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células dendríticas adquirem papel mais crítico no desenvolvimento da imunidade. Estudos envolvendo camundongos *knockout* evidenciam a importância de certos tipos de células na imunidade contra microsporídios, entretanto poucos estudos mostram os efeitos imunossupressores de fármacos sobre os elementos da resposta imune mediante infecções. Com o objetivo de investigar a resposta imune intestinal frente à infecção oral por *E. intestinalis*, camundongos C57BL/6 foram infectados pela via oral com a dose de 5x10<sup>7</sup>

esporos e tratados ou não com o agente imunossupressor ciclofosfamida (Cy) por via intraperitoneal. A infecção foi avaliada pela carga parasitária e pelas lesões histopatológicas observadas. Usando a citometria de fluxo, investigou-se a resposta do sistema imune quantificando fagócitos, linfócitos, células NKT e dendríticas no intestino, placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e cavidade peritoneal aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (DPI). Os animais infectados não tiveram sintomas da doença, porém tinham enterite linfoplasmocítica e alta carga parasitária, sendo esses achados mais abundantes aos 7 e 14 DPI. Os camundongos tratados com Cy tiveram maior carga parasitária em todos os períodos, mostrando maior suscetibilidade ao *E. intestinalis*. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> foram as células mais abundantes na mucosa intestinal de infectados. Os resultados evidenciam uma resposta imune no intestino efetiva contra a infecção oral por *E. intestinalis*, mesmo em camundongos imunossuprimidos com Cy.

**Palavras-Chave:** *Encephalitozoon intestinalis*, microsporidia, enterócitos, inflamação intestinal

## Abstract

Microsporidia infect vertebrates and invertebrates and are intracellular opportunistic pathogens in immunocompromised individuals. Although activated T CD8<sup>+</sup> lymphocytes are crucial to eliminate microsporidia, T CD4<sup>+</sup> lymphocytes and dendritic cells are also important for the immune response. Investigations with *knockout* mice demonstrated the role of immune cells against microsporidiosis. However, few studies have focused on the effects of immunosuppressive drugs in the immune response against infection. The aim of the present study was to investigate the role of intestinal immune response against *Encephalitozoon intestinalis* oral infection in C57BL/6 mice immunosuppressed with cyclophosphamide (Cy) by intraperitoneal rout. Intestinal infection was counted by parasite burden and histopathologic

lesions were described. Flow cytometry evaluated phagocytes, lymphocytes, NKT and dendritic cells in the small intestines; peyer's patches mesenteric lymph nodes and peritoneal cavity at 7, 14, 21 and 28 DPI. Clinical symptoms were not observed in infected animals, however, lymphoplasmocytic enteritis associated with a high parasite burden was observed, mostly between 7 and 14 DPI. Parasite burden was higher in immunosuppressed mice, indicating a higher susceptibility to *E. intestinalis* infection. TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> cells increased in the intestinal mucosa of infected animals. The present results showed an effective intestinal immune response against *E. Intestinalis* infection by oral route in both immunocompetent and immunosuppressed mice.

**Keywords:** *Encephalitozoon intestinalis*, microsporidia, enterocytes, intestinal inflammation

## INTRODUÇÃO

Os microsporídios são patógenos intracelulares obrigatórios e fazem parte do filo Microsporidia, que pertence ao reino Fungi (Anane e Attouchi, 2010). Mais de 1.200 espécies de microsporídios já foram descritas, algumas identificadas como causas de doenças economicamente importantes em insetos (bicho-da-seda e abelhas) (Becnel e Andrealis, 1999), peixes (Lom, 2002) e em mamíferos (coelhos, roedores de laboratório, entre outros) (Hinney et al., 2016). Por serem patógenos oportunistas, a importância para a saúde humana e animal surgiu quando o advento da AIDS se tornou uma pandemia na década de 1980 (Weber et al., 2000, Didier, 2005, Didier e Weiss, 2006). Entretanto, hoje se sabe que além dos microsporídios acometem indivíduos imunossuprimidos pelo HIV, também afetam pacientes com neoplasias, ou submetidos a tratamentos quimioterápicos ou imunossupressivos em transplantados, como tem sido descrito em crianças, idosos e pessoas imunocompetentes (Didier e Weiss, 2011, Kicia et al., 2014).

*Encephalitozoon intestinalis* é um dos microsporídios mais identificados como causa de diarreia em humanos. Entretanto, a evolução e a progressão da infecção e da doença, as alterações patológicas, assim como as respostas imunológicas relacionadas com esses agentes ainda não foram totalmente elucidadas. Após a inoculação intraperitoneal de *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos *knouckout* para linfócitos T CD8<sup>+</sup>, observa-se uma doença disseminada, aguda e letal (Valencakova e Halanova, 2012). Em contraste, a infecção de camundongos *knouckout* para linfócitos T CD4<sup>+</sup> com *E. Cuniculi* não causou mortalidade, da mesma forma que nos controles, sem deficiência de linfócitos (Valencakova e Halanova, 2012), fato que reforça a importância das células T CD8<sup>+</sup> na proteção contra a infecção por *E. cuniculi* (Khan et al., 2001). Estudos com *E. intestinalis* revelaram atividade compartilhada das populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 para garantir a resistência do hospedeiro, o que demonstra relações divergentes na patogenia de outros microsporídios (Salát et al., 2004, 2006).

Embora a infecção pelos microsporídios seja primariamente adquirida pela via oral, a maioria dos estudos já conduzidos descreve sua patogenia e resposta imune com a utilização da via intraperitoneal (Khan et al., 1999). Pesquisas realizadas com outros patógenos inoculados por via oral (Chardeset et al., 1994, Findly et al., 1993, Muller et al., 2000) indicam que a resposta imune da mucosa intestinal possui um papel crítico na proteção de hospedeiros, conforme já demonstrado na infecção oral por *E. Cuniculi* (Moretto et al., 2004), que apresenta uma rápida e importante resposta de linfócitos epiteliais a antígenos específicos de *E. cuniculi*. Nosso grupo tem demonstrado os aspectos patogênicos e imunológicos em infecções experimentais por *E. cuniculi*, pela via oral e intraperitoneal, em camundongos imunossuprimidos ou não, sendo observada maior suscetibilidade à infecção quando usada a via intraperitoneal (da Costa et al., 2016, Santos et al, artigo em preparação).

A maior parte dos estudos *in vivo* utiliza modelos murinos saudáveis com a depleção de uma determinada população de células imunes para observar as consequências da perda dessas populações na patogenia de agentes infecciosos (Didier e Khan, 2014). No entanto, para melhor investigar a resposta imune da microsporidiose nos grupos suscetíveis, é essencial estudar as interações entre patógeno e hospedeiro em modelos que mimetizem pacientes imunocomprometidos pelo uso de fármacos.

Nos últimos anos, a terapia com fármacos imunossupressores tem aumentado como consequência da elevada incidência de doenças neoplásicas e autoimunes, e tem sido utilizado no tratamento contra a rejeição de transplantes. A ciclofosfamida (Cy) é um fármaco amplamente usado e incluído na lista da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization - WHO) entre os medicamentos essenciais para os sistemas de saúde por sua eficácia, custo e segurança (World Health Organization, 2013). É um potente agente imunossupressor utilizado no tratamento de doenças autoimunes e aloimunes (Brodsky, 2010, DeZern et al., 2013), no tratamento de transplantados, como o de medula óssea (Colvin, 1999), também é uma das drogas de maior sucesso no tratamento anticâncer, por sua eficácia terapêutica e pela estimulação da resposta imune (Emadi et al., 2009, Sistigu et al., 2011).

A Cy é um alquilante citotóxico que, ao se ligar ao DNA, causa apoptose celular, atrasando e suprimindo a resposta de células T e B, causa mielosupressão, afeta as populações de neutrófilos, linfócitos, hemácias e plaquetas. Por outro lado, a Cy possui efeitos imunomoduladores ainda pouco esclarecidos. Entre eles descreve-se (i) o aumento homeostático da expansão de células T antígeno-específicas; (ii) a indução da expansão de células T e de seus fatores de sobrevivência como IFNs, IL-7 e IL-15, (iii) a eliminação de células T reguladoras (Treg) e (iv) o aumento da mobilização de células dendríticas da medula

óssea e ativação de sua maquinaria intracelular para o processamento de antígenos e apresentação antigênica (Sevko et al., 2013).

Considerando os efeitos dicotômicos da Cy em relação à imunidade e por se tratar de um fármaco muito empregado clinicamente, a avaliação de seus efeitos na infecção por *E. intestinalis* pode contribuir na compreensão dos mecanismos de ação desse patógeno. O presente estudo teve por objetivo avaliar a resposta imune e a patogenia da infecção experimental de camundongos tratados com Cy e inoculados por via oral com *E. intestinalis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Animais.** Camundongos C57BL/6, fêmeas, com 6-8 semanas de idade foram obtidos no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brasil. Durante o período experimental, os animais permaneceram no Biotério de Experimentação Animal da Universidade Paulista, em microisoladores, em condições livres de patógenos (*specificpathogenfree*). Os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Paulista (número do protocolo 313/15).

**Esporos de Microsporídios.** Esporos de *E. intestinalis* (obtidos do Waterborne Inc., New Orleans, LA, USA) foram cultivados em culturas de células de rim de coelho (RK-13, ATCC CCL-37) em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato, aminoácidos não-essenciais e gentamicina a 37°C em 5% CO<sub>2</sub>. Os esporos coletados do sobrenadante foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato-salina (PBS) e contados em câmara de Neubauer. Os camundongos foram infectados pela via oral (gavagem) na dose

de  $5 \times 10^7$  esporos de *E. intestinalis*. Camundongos não infectados foram mantidos como grupo controle.

**Infecção Experimental e Imunossupressão.** Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: *Infectado* – camundongos inoculados com *E. intestinalis*; *Não-Infectado* – camundongos não-inoculados; *Cy-Infectado* – camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e inoculados com *E. intestinalis*; *Cy-Não-Infectado* – camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida e não-inoculados. O protocolo de imunossupressão adotado foi estabelecido por Lallo, Hirschfeld (2012), e os camundongos dos Grupos Cy receberam duas doses semanais de 100 mg/kg de ciclofosfamida por via intraperitoneal (Genuxal®, Asta Medica Oncologia, São Paulo, Brasil), iniciada no dia da inoculação do patógeno e mantida por todo o período experimental.

**Microscopia de luz.** Aos 7, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (DPI) experimental, parte dos animais (n=5) de cada grupo foi submetida à eutanásia, pelo aprofundamento anestésico por via intraperitoneal com solução de quetamina (50 mg/mL), xilazina (20 mg/mL) e fentanil (0,05 mg/mL). A necropsia foi realizada e fragmentos teciduais (duodeno e íleo, fígado, rins e pulmões) foram coletados e fixados em formol tamponado a 10% por 72 horas, sendo então transferidos para álcool 70%. Os fragmentos teciduais foram rotineiramente preparados para análise histológica, sendo embebidos em parafina e corados com Hematoxilina-Eosina, Giemsa e Gram-Chromotrope.

**Microscopia eletrônica de transmissão.** Para a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), segmentos de íleo foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,2 M (pH 7,2) a 4°C durante 10h, pós-fixados em OsO<sub>4</sub> a 1% tamponado durante 2 h.. Os



fragmentos foram desidratados em uma série crescentes de etanol e embebidos em resina Epon. Os blocos foram submetidos a cortes semifinos, corados com Azul de Toluidina e fotografados em microscópio de luz. Os cortes ultrafinos foram duplamente corados com acetato de uranila aquoso e citrato de chumbo e, em então, observados em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109 operado a 80 kV.

**Determinação da carga parasitária.** Para comparar a evolução e gravidade da infecção, *clusters* de esporos de *E. intestinalis* presentes no íleo foram contados em 10 campos microscópicos com aumento de 400x, selecionados aleatoriamente. As médias obtidas por grupo foram empregadas para a análise estatística.

**Análise Fenotípica.** As células da cavidade peritoneal (PerC) foram obtidas por sucessivas lavagens com 2mL de solução de Hank's (HBSS) suplementada com 2% de SFB com pipeta de bulbo. Os linfonodos mesentéricos (LM) e as placas de Peyer (PP), estas últimas retiradas com lâmina de bisturi da parede do intestino delgado com auxílio de microscópio estereoscópio, foram macerados em *cell strainer* com 5mL de HBSS-SFB 2%. Os linfócitos intraepiteliais (LIE) foram obtidos de acordo com procedimentos descritos por Guy-Grand et al. (1978), com algumas modificações. O intestino delgado foi lavado com 20 mL de solução de HBSS-SFB 2%, incisos longitudinalmente e cortado em segmentos de 2 cm. A mucosa foi raspada e colocada em HBSS suplementado com EDTA 0,1M em banho-maria por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram agitadas em vórtex por 15 segundos, os detritos foram removidos pela passagem em *cell strainer* em HBSS-SFB 10%. Os linfócitos foram obtidos pela centrifugação em gradiente de Percoll (70% e 40%). As

suspensões de células PerC, LM, PP e LIE foram lavados com HBSS-SFB 2% e então ressuspensas em 100  $\mu$ L PBS suplementada com 1% de albumina do soro de bovino (BSA) (PBS-BSA 1%). Após centrifugação cada amostra foi incubada por 20 minutos a 4°C com anticorpo anti-CD16/CD32 para bloqueio dos receptores Fc. Então, as células foram lavadas e as amostras de PerC, LM e LIE foram divididas em 2 alíquotas e incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais na alíquota 1: anti- CD23 de camundongo obtido em rato e conjugado com *fluorescein-isothiocyanate*- (FITC), anti- CD19 de camundongo obtido em rato e conjugado com *peridinin Chlorophyll* - (PerCP) ou conjugado a *allophycocyanin* (APC), anti- CD11b de camundongo obtido em rato e conjugado com *allophycocyanin* (APC)-cyanine dye7 (Cy7); na alíquota 2: anti- CD19 de camundongo obtido em rato e conjugado com APC, anti- CD4 de camundongo obtido em rato e conjugado com PerCP; anti- CD8a de camundongo obtido em rato e conjugado com FITC. As amostras de PP foram incubadas com anti- CD11b de camundongo obtido em rato e conjugado com APC-Cy7 e anti- CD11c de camundongo obtido em rato e conjugado a *phycoerythrin* (PE)-Cy7 (BD-Pharmingen, San Diego, CA USA) para a análise das populações celulares, de acordo com seu fenótipo (Tabela 1). As células foram incubadas com os anticorpos marcados com fluorocromos por 20 minutos a 4°C e, posteriormente, lavadas com PBS-BSA 1%. Finalmente, as células foram lavadas e ressuspensas em 300  $\mu$ L de PBS para aquisição em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA). Os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo (FlowJo LLC, *Data Analysis Software*, Ashland, OR).

**Análise Estatística.** As comparações estatísticas foram feitas pela análise de variância com uma ou duas entradas, com teste posterior de Tukey. Todos os valores foram relatados como a média  $\pm$  erro padrão da média e considerados com significância estatística para valores menores que  $p < 0,05$ .

Tabela 1. Identificação fenotípica das células de peritônio, linfonodos, placas de Peyer e da mucosa intestinal, por citometria de fluxo, de acordo com a expressão de marcadores de superfície.

População celular	Fenótipo
Células B-1	CD23 <sup>-</sup> CD19 <sup>+</sup>
Células B-2	CD23 <sup>+</sup> CD19 <sup>+</sup>
Células CD4 <sup>+</sup>	CD19 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>
Células CD8 <sup>+</sup>	CD19 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>
Macrófagos	CD19 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>
Células NKT	CD19 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> NK1.1 <sup>+</sup>
Células Dendríticas	CD11c <sup>+</sup>

## RESULTADOS

**Evolução da infecção experimental pela avaliação clínica e carga parasitária.** A infecção experimental dos diferentes grupos de camundongos foi realizada para se esclarecer a evolução da infecção e o padrão de resposta imune após a inoculação oral de *E. intestinalis*. Todos os camundongos, tratados ou não com Cy, sobreviveram à infecção pelo *E. intestinalis* e não demonstraram sinais aparentes de doença, tais como diarreia e piloereção, até os 28 DPI. Foram observados focos de esporos do patógeno nos intestinos formando pequenos *clusters* (Figura 1A, 1C). Esses focos não foram observados nos animais controles - *Não-Infestado* e *Cy-Não-Infestado*. Os animais do grupo *Cy-Infestado* tiveram maior carga parasitária que os animais do grupo *Infestado* (Figura 1D) e a carga parasitária diminuiu progressivamente do 7º para o 28º DPI (Figura 1D).

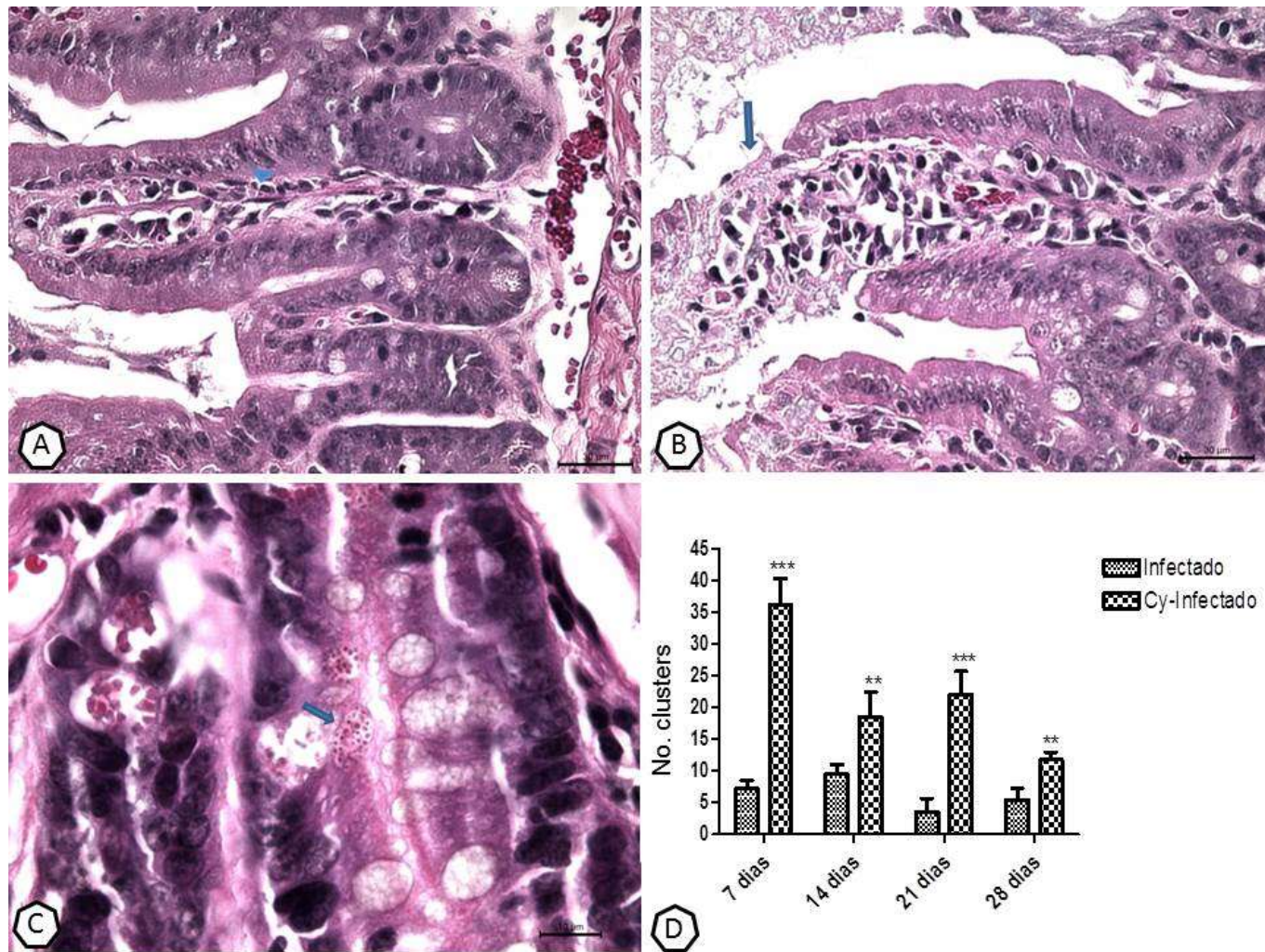


Figura 1. A) Fotomicrografia do intestino delgado apresentando infiltrado inflamatório linfoplasmocítico (cabeça de seta) em camundongo *Infectado*. B) Ulceração (seta) da mucosa e infiltrado inflamatório mononuclear em camundongo *Cy-Infectado*. C) Presença de *clusters* de esporos (seta) na região glandular do íleo de camundongos *Cy-Infectado*. D) Carga parasitária detectada nos animais dos grupos *Infectado* e *Cy-Infectado*, de acordo com o período de observação. Coloração H-E. Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Tukey revelou  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ . Dados representativos de 2 experimentos independentes.

**Achados histopatológicos.** Os animais do grupo *Infectado* (sem Cy) apresentaram enterite linfoplasmocítica, sendo mais frequente no duodeno do que no íleo e com infiltrado eosinofílico leve (Figura 1A, 1B). Também foi observada a perda de revestimento da lâmina própria em poucos segmentos, necrose apical e mural, ulceração da mucosa (Figura 1B) e proliferação epitelial. Os *clusters* de esporos do patógeno foram encontrados na região de transição de vilosidade e mais abundantemente em região glandular do duodeno e principalmente do íleo (Figura 1C). Este grupo apresentava placas de Peyer exuberantes na parede intestinal (Figura 2A) com expansão difusa do tecido linfóide e marcada reação do centro germinativo. Espleno e linfadenomegalia também foram observados em animais infectados (dados não mostrados).

Nos animais tratados com Cy e infectados (*Cy-Infectado*) demonstrou-se maior carga parasitária (Figura 1D), porém, o infiltrado inflamatório foi mais discreto. Este grupo tinha placas de Peyer e linfonodos mesentéricos menores e o tecido linfóide das placas de Peyer estava rarefeito (Figura 2B), e na proximidade das placas havia grande quantidade de *clusters* de microsporídios associados à distensão de vasos linfáticos (dados não mostrados).

Observamos a progressão das lesões intestinais nos grupos *Infectado* e *Cy-Infectado* entre 7 e 14 DPI seguida por redução aos 21 e 28 DPI. Nos estágios mais tardios da infecção (21 e 28 DPI), houve maior ativação de enterócitos, com células jovens e aumento de mitoses, indicando a resolução do processo inflamatório e início da remodelação tecidual.

No fígado identificou-se infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear em localização periportal e sinusoidal ou com distribuição difusa no parênquima (Figura 2C), associado ou não com esporos de *E. intestinalis*. Poucas áreas de necrose de liquefação foram observadas (dados não apresentados).



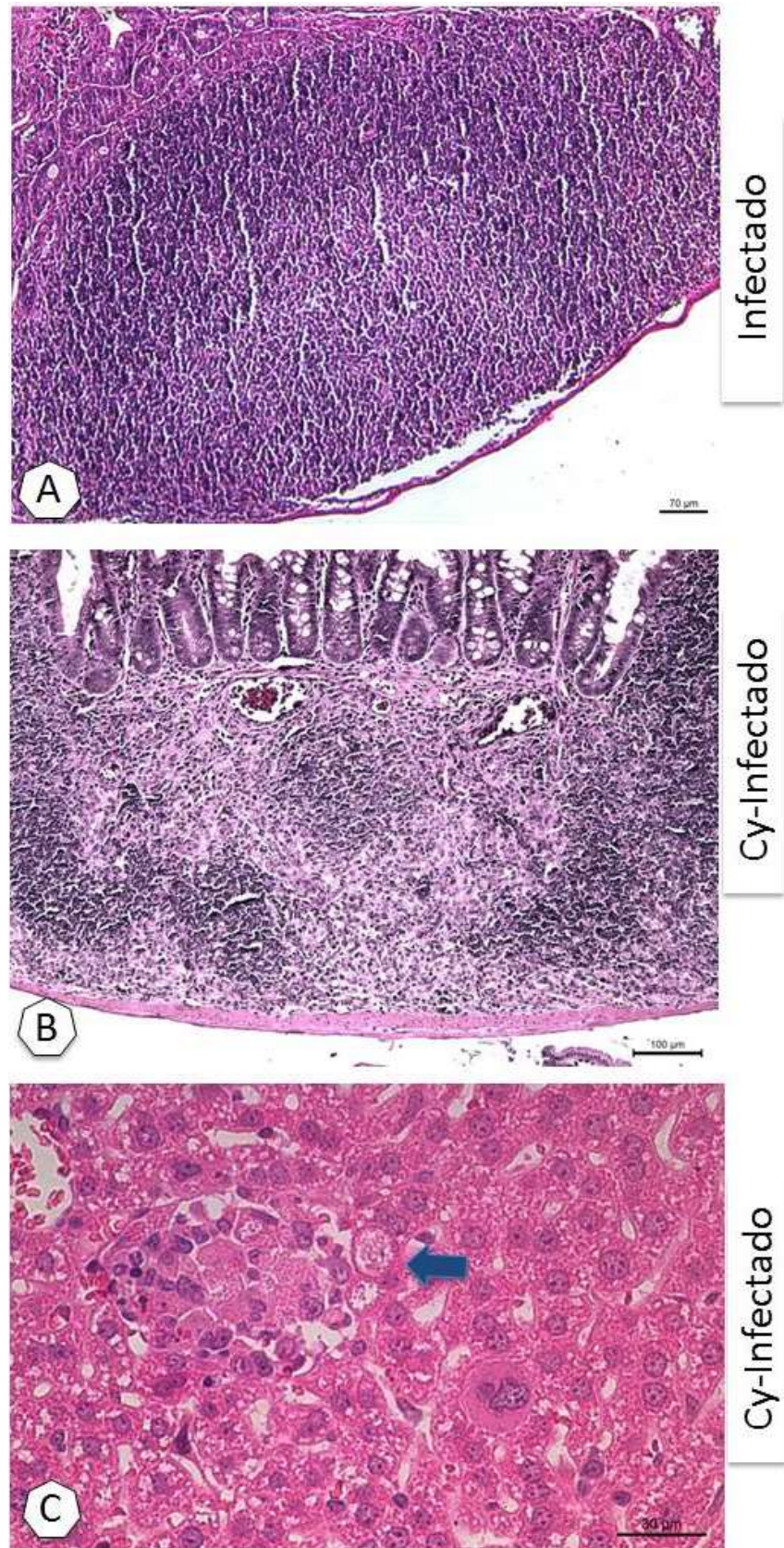


Figura 2. A) Fotomicrografia de Placa de Peyer com expansão linfoide. B) Placa de Peyer com tecido linfoide rarefeito. C) Infiltrado inflamatório nodular com predominância de células mononucleares no parênquima hepático e presença de vacúolos de esporos (seta). (Coloração H-E).

**Microscopia eletrônica de transmissão.** Foram observados esporos em aproximação ou aderidos à borda em escova dos enterócitos ou em localização intracitoplasmática (Figura 3A, 3B). O formato dos esporos foi bastante variável, apresentando aspecto ovalado, redondo ou piriforme. Foram observados 2 padrões de invasão celular no intestino delgado: fagocitose-*like* (Figura 3A, 3B) e injeção do esporoplasma pelo túbulo polar (Figura 3C, 3D). No local da membrana celular dos enterócitos onde o esporo aderiu, as microvilosidades desapareceram e a membrana apresentava invaginações para envolver o esporo, o que permitiu a sua entrada por fenômeno semelhante à fagocitose, porém não foi observada a formação de vacúolo fagocítico (Figura 3A, 3B, 3C). No citoplasma próximo ao local de entrada observou-se uma área eletrodensa do citoplasma e acúmulo de grande quantidade de mitocôndrias, evidentemente relacionados à presença do patógeno (Figura 3A, 3B, 3C). No caso de injeção do esporoplasma observaram-se as seguintes alterações: perda das microvilosidades no local de adesão do esporo (Figura 3D), projeções da membrana citoplasmática envolvendo o túbulo polar extrudado, formando um aparente canal para a entrada do túbulo polar e eletrodensidade aumentada no citoplasma junto à região onde estes fenômenos ocorriam com a aparente injeção do esporoplasma (Figura 3D).

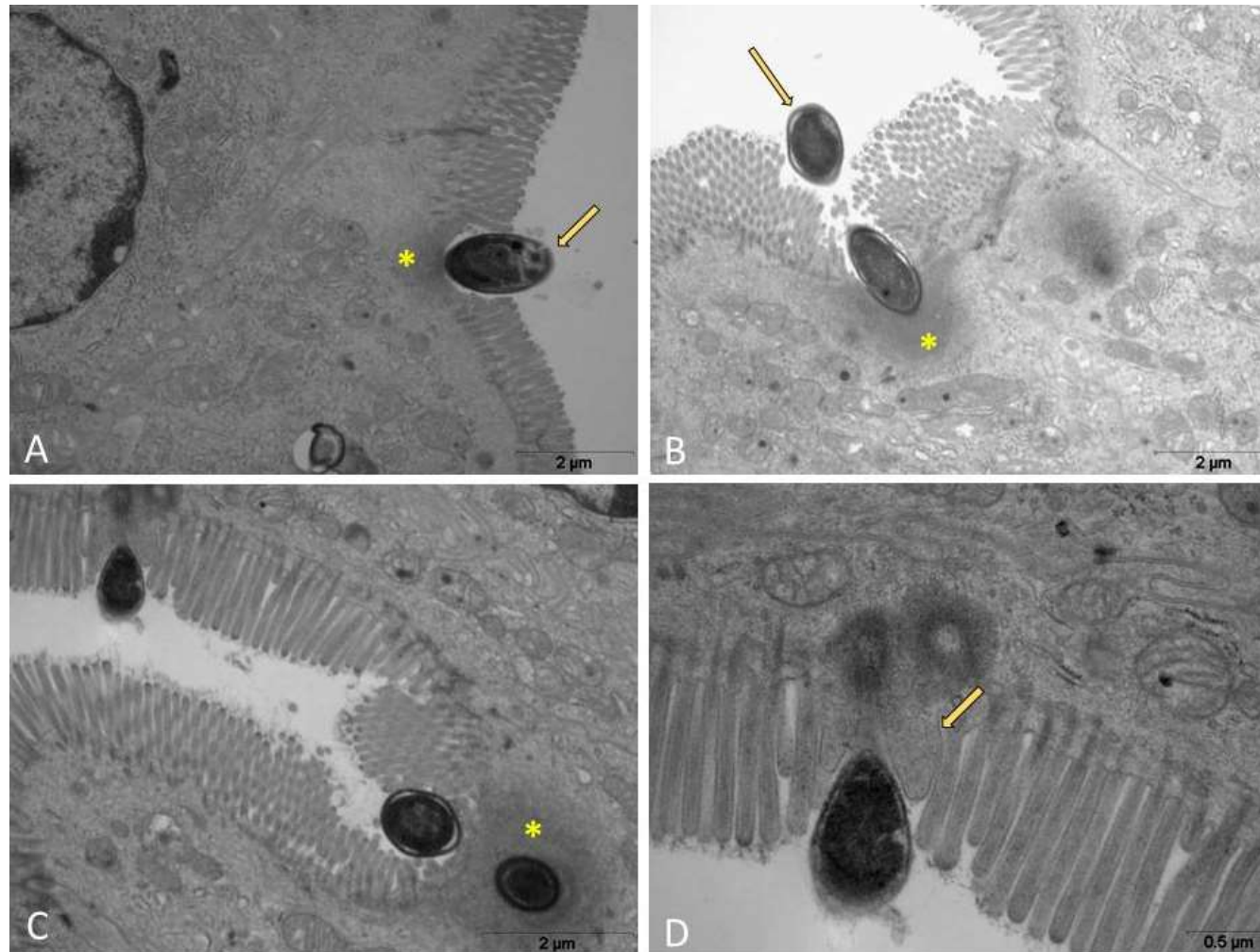


Figura 3. Fotomicrografia eletrônica de transmissão do intestino de camundongos *Cy-Infestado*. A, B e C) Esporos aderidos à membrana de enterócitos em processo de fagocitose-like (\*). Notar que as microvilosidades desapareceram, a membrana apresenta invaginações e no citoplasma há uma área eletrodensa (\*) junto ao esporo. D) Injeção do esporoplasma em área com perda das microvilosidades (seta). Observar a projeções da membrana citoplasmática envolvendo o túbulo polar extrudado (seta).



## Avaliação da Resposta Imune

**Componentes celulares da mucosa intestinal envolvidos na resposta contra *E. intestinalis*.** Houve aumento significativo nas populações TCD8<sup>+</sup> nos grupos *Infectado* e *Cy-Infectado* em relação ao controle *Não-Infectado* no 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>. e 28<sup>o</sup> DPI. Além disso, observou-se que o tratamento com Cy (Figura 4) não evitou um aumento na população de células T CD8<sup>+</sup> em comparação aos controles não tratados (*Cy-Não-Infectado*), no 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup>. DPI. Nos animais infectados houve diminuição de células T CD8<sup>+</sup> gradativamente do 7<sup>o</sup>. para o 28<sup>o</sup> DPI, evidenciando-se redução de cerca de 10x nas porcentagens observadas inicialmente (Figura 5). Assim, analisando em conjunto essas informações, houve um pico na população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no 7<sup>o</sup>. DPI, fase em que também foram observadas grandes quantidades de esporos no intestino delgado e muitas lesões histológicas associadas ao agente patogênico, conforme supracitado. Porém, simultaneamente houve redução gradual da população de células T CD8<sup>+</sup>, da carga parasitária e das lesões histológicas observadas nos animais infectados (*Infectados* e *Cy-Infectados*) entre 14, 21 e 28 DPI.

A população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> aumentou nos animais *Cy-Não-Infectado* em relação aos demais grupos, no 7<sup>o</sup>. DPI (Figura 4), indicando efeito imunomodulador da Cy. Porém, posteriormente (14 e 28 DPI), notou-se que os grupos *Infectados*, *Cy-Infectados* e *Cy-Não-Infectado* tinham maior quantidade de T CD4<sup>+</sup> do que o controle *Não-Infectado* (Figura 4).

As células NKT também estavam diminuídas de forma significativa nos animais dos grupos *Infectado*, *Cy-Infectado* e *Cy-Não-Infectado* em relação ao controle *Não-Infectado* ao 7<sup>o</sup>. e 14<sup>o</sup>. DPI (Figura 4). Entretanto, observou-se aumento dessa população nos períodos mais tardios nos grupos *Infectado* e *Cy-Infectado* (Figura 5).

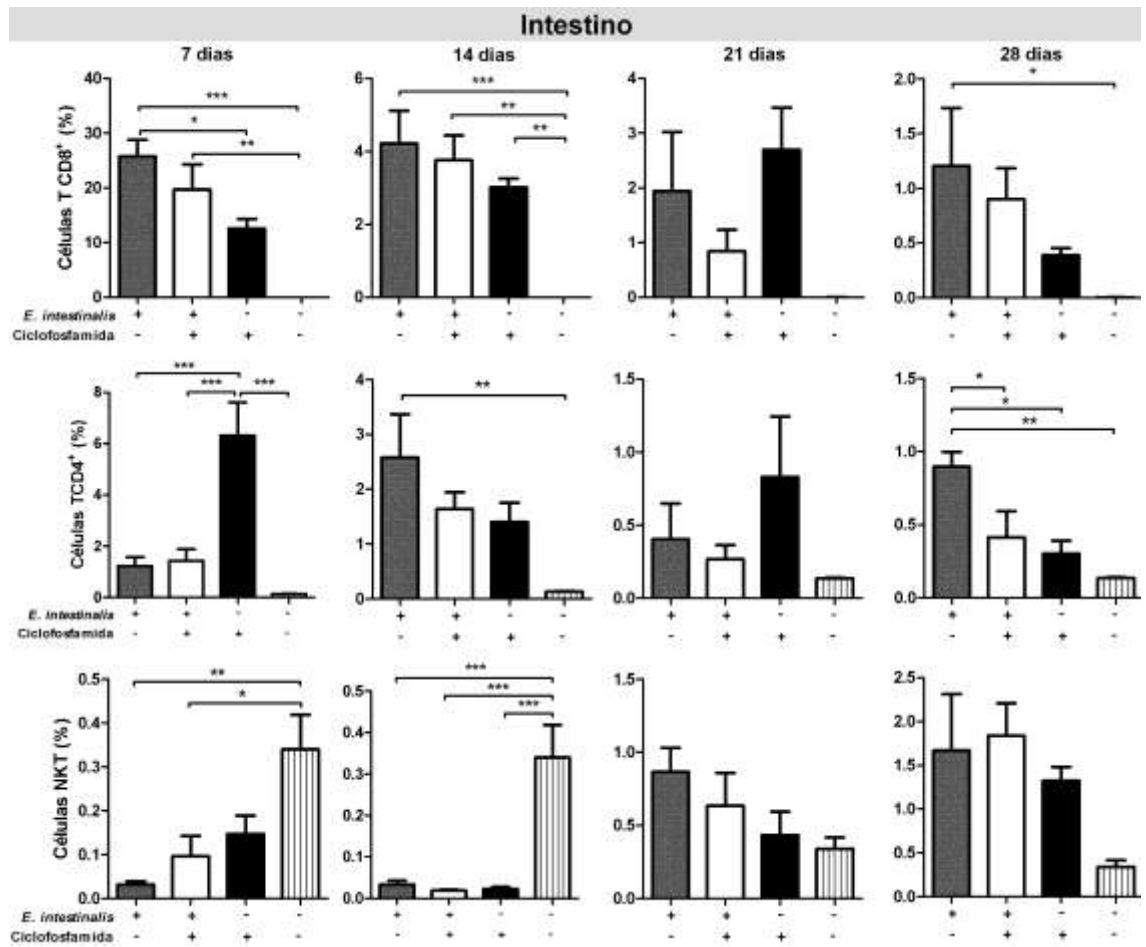


Figura 4. Avaliação das populações de células T presentes na mucosa intestinal de camundongos inoculados (+) ou não (-) com *E. intestinalis* e tratados (+) ou não (-) com Cy. Porcentagem de linfócitos T CD8 (CD19<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), T CD4 (CD19<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>) e de células NKT (CD19<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>). A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ . Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

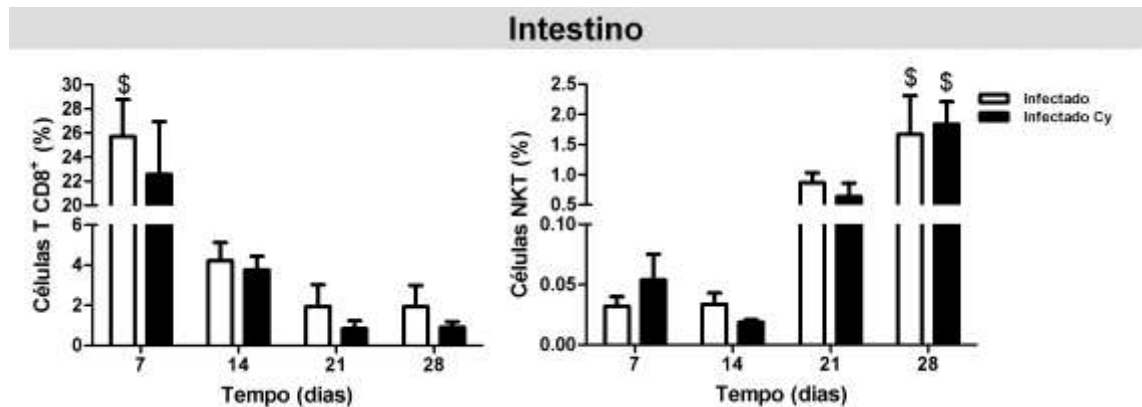
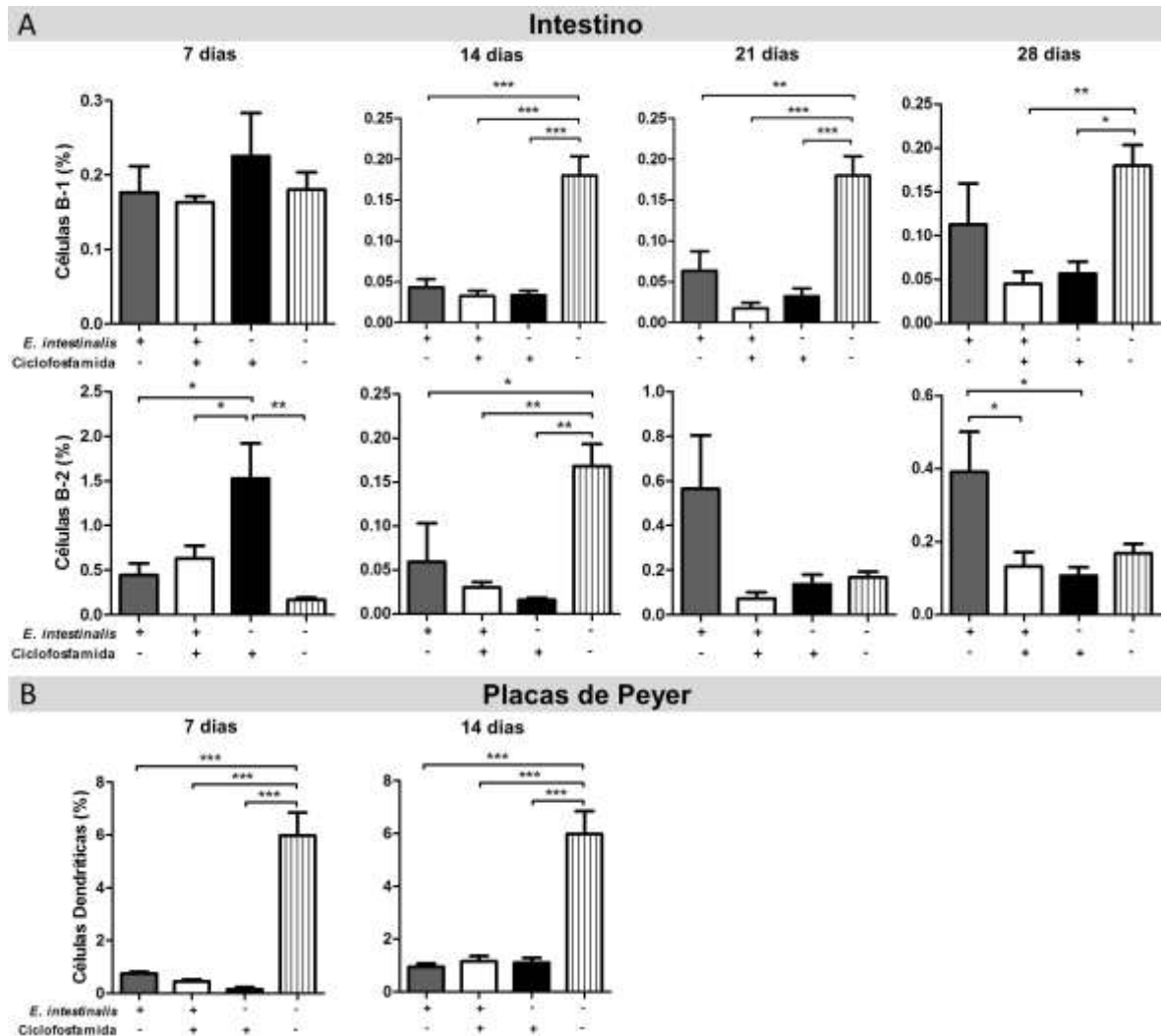


Figura 5. Avaliação das populações de células T presentes na mucosa intestinal de camundongos infectados com *E. intestinalis* (*Infetado*) e tratado com Cy (*Cy-Infetado*) de acordo com os tempos de observação pós-infecção (7, 14, 21 e 28 DPI). Porcentagem de linfócitos T CD8 (CD19<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) e células NKT (CD19<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>): Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey revelou  $p < 0,05$  \$, quando comparado o mesmo grupo ao longo do tempo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

As células B-1 diminuíram de forma significativa nos animais dos grupos *Infetado*, *Cy-Infetado* e *Cy-Não-Infetado* em relação aos controles *Não-Infetado* aos 14, 21 e 28 DPI (Figura 6A). Já as células B-2 aumentaram no grupo *Cy-Não-Infetado* em relação aos demais grupos aos 7 DPI, indicando um efeito pontual da ciclofosfamida nessa população e localização, uma vez que o mesmo não foi visto no peritônio e linfonodos. Posteriormente, houve redução dessa população em relação ao controle *Não-Infetado* aos 14 DPI, seguida por aumento em animais *Infetados*, de forma significativa aos 28 DPI (Figura 6A).

**Resposta das células dendríticas presentes nas Placas de Peyer à infecção por *E. intestinalis*.** A análise fenotípica de células dendríticas das placas de Peyer revelou diminuição significativa nos grupos *Infetado*, *Cy-Infetado* e *Cy-Não-Infetado* em relação ao grupo controle *Não-Infetado* nas duas primeiras semanas da infecção (7<sup>o</sup>. e 14<sup>o</sup>. DPI) (Figura

6B). Aos 21 e 28 DPI não foram observadas diferenças entre os grupos avaliados (dados não



mostrados).

Figura 6. Avaliação das populações de células B presentes na mucosa intestinal e de células dendríticas em Placas de Peyer de camundongos infectados com *E. intestinalis* e/ou imunossuprimidos com Cy aos 7, 14, 21 e 28 dias após a infecção. A) Porcentagem de células B-1 (CD23<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) e células B-2 (CD23<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) na mucosa intestinal. B) Porcentagem de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> nas placas de Peyer. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste de Tukey revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ . Dados representativos de 2 experimentos independentes.

**Componentes Peritoneais da Resposta Imune.** A análise fenotípica do peritônio revelou, de modo geral, diminuição significativa nas populações de células TCD4<sup>+</sup>, TCD8<sup>+</sup> e NKT, tanto nos grupos infectados como nos grupos tratados com Cy comparados aos controles não infectados e não tratados (Figura 7). Diferentemente dos achados da mucosa intestinal, células TCD8<sup>+</sup> peritoneais foram afetadas com o tratamento com Cy, embora esse feito tenha sido mais evidenciado aos 7 e 28 DPI (Figura 7).

O mesmo foi observado para células B-1 e B-2, uma diminuição dessas populações nos grupos *Infectados*, *Cy-Infectados* e *Cy-Não-Infectado* em relação ao controle *Não-Infectado* em todos os períodos de observação (Figura 8). No entanto, no 14º DPI, foi observado maior número de células B-1, B-2 e macrófagos no grupo *Infectado* comparado ao grupo *Cy-Infectado* (Figura 8). Ainda, os grupos *Infectado*, *Cy-Infectado* e *Cy-Não-Infectado* apresentaram diminuição de macrófagos no último período de análise, aos 28 DPI.

Além disso, ao analisar separadamente os animais infectados, dos grupos *Infectado* e *Cy-Infectado*, observamos que os animais tratados com Cy tinham quantidades menores de células B-1 e B-2, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, com diferença estatística detectável no 14º DPI (Figura 8). Essa diferença se manteve aos 21 e 28 DPI para células B, mas o mesmo não se manteve quando observamos as células T. Também ficou evidente a diminuição gradativa das populações celulares para ambos os grupos, simultaneamente com a melhoria das lesões histopatológicas e a redução da contagem de esporos nos períodos mais tardios de observação.

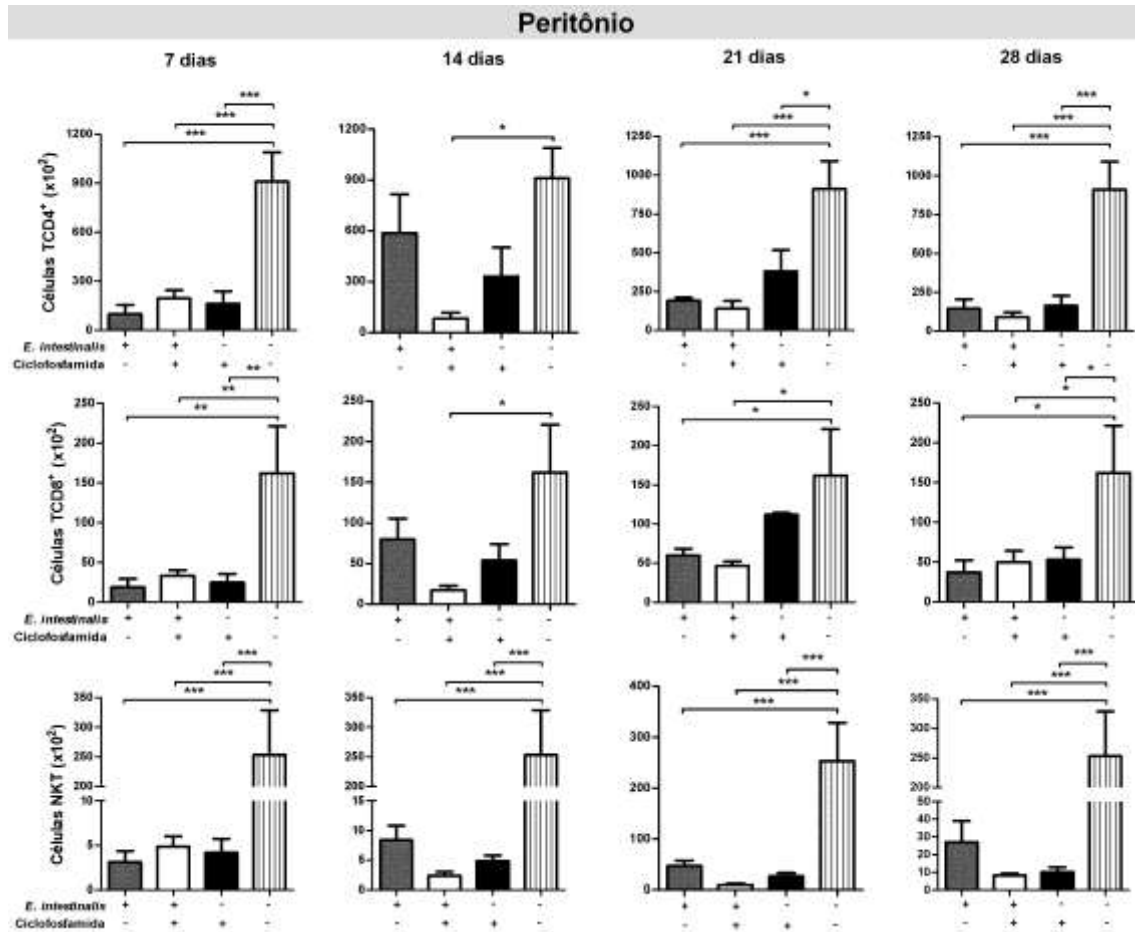


Figura 7. Avaliação das populações de células T presentes no peritônio de camundongos, inoculados (+) ou não (-) com *E. intestinalis* e tratados (+) ou não (-) com Cy, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a infecção. Número de linfócitos T CD8 (CD19<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), T CD4 (CD19<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>), e de células NKT (CD19<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>NK1.1). A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ . Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

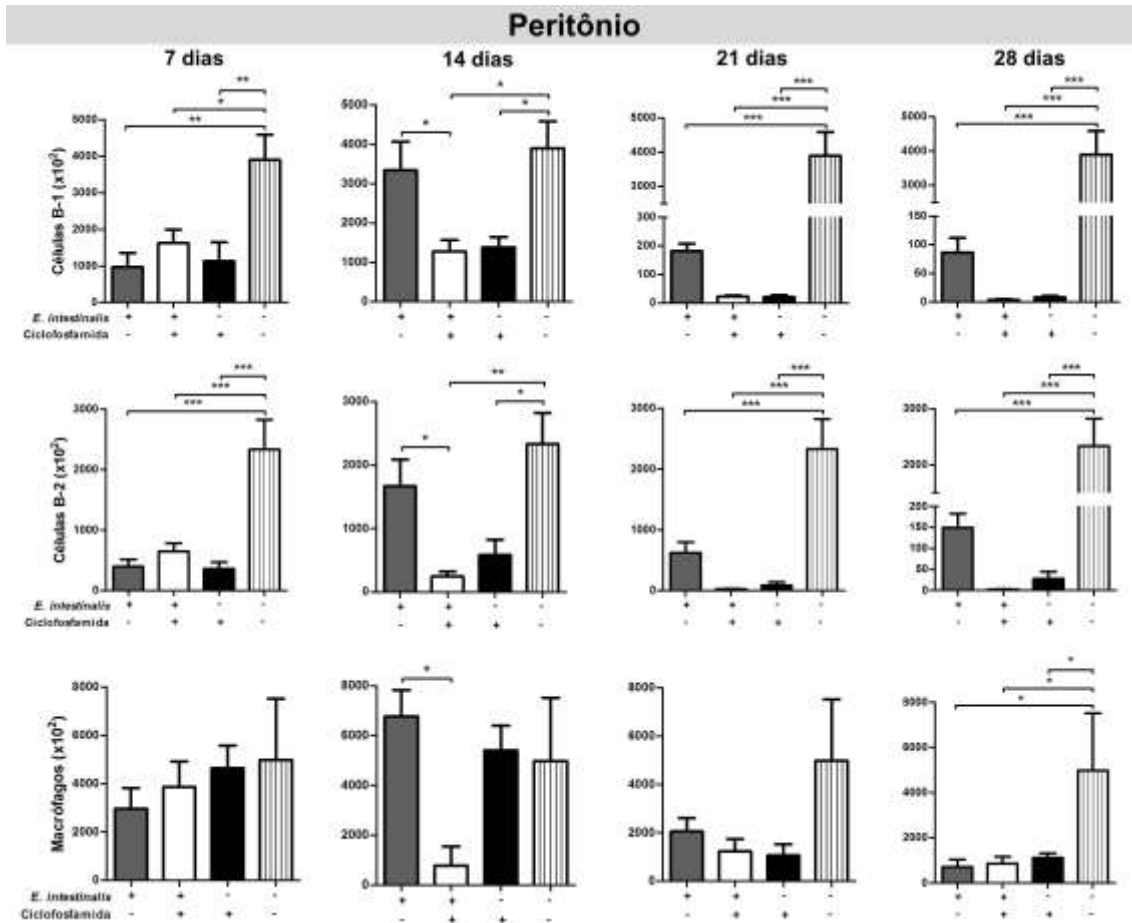


Figura 8. Avaliação das populações de células B e macrófagos presentes no peritônio de camundongos, inoculados (+) ou não (-) com *E. intestinalis* e tratados (+) ou não (-) com Cy, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a infecção. Número de células B-1 ( $CD23^-CD19^+$ ), células B-2 ( $CD23^+CD19^+$ ) macrófagos  $CD19^-CD11b^+$ . A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste de Tukey revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ . Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

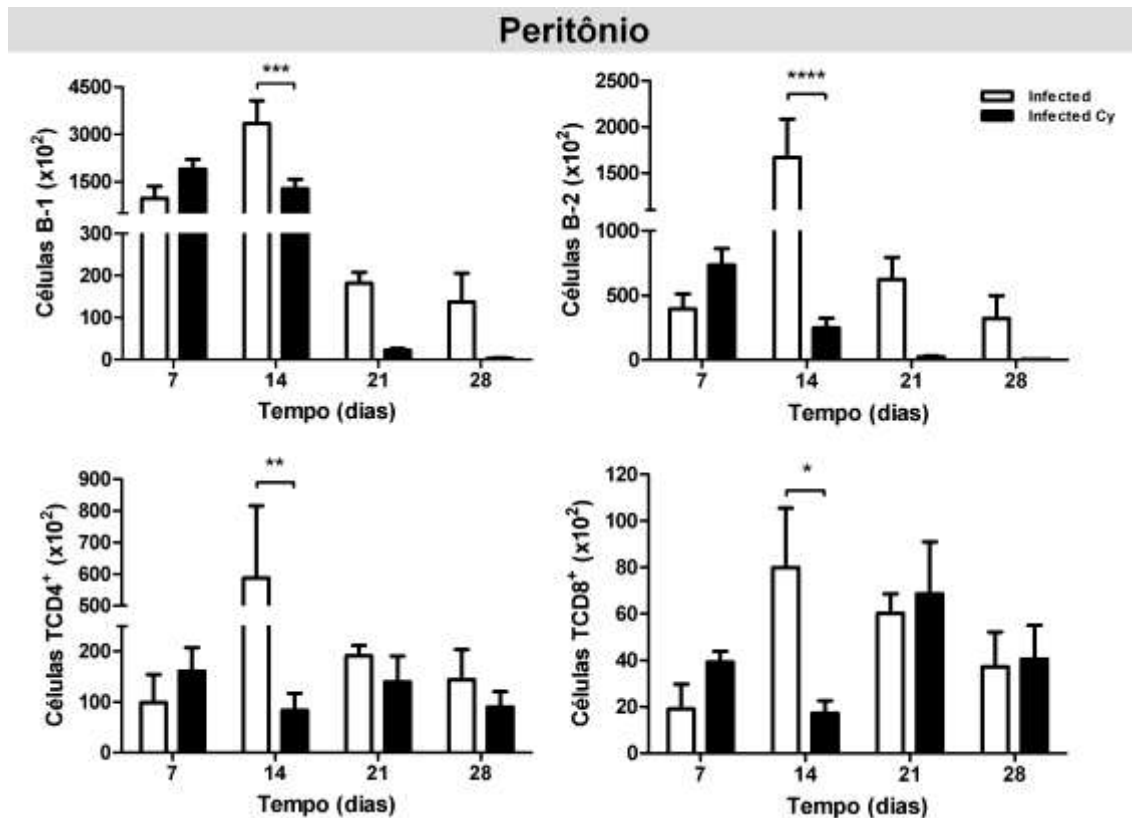


Figura 9. Avaliação das populações de células B e T presentes no peritônio de camundongos infectados com *E. intestinalis* (*Infectado*) e camundongos infectados, tratados com Cy (*Cy-Infectado*), ao longo dos períodos de observação após a infecção (7, 14, 21 e 28 dias). Número de células B-1CD23<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>, número de células B-2 CD23<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>, número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> e número de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste Tukey revelou  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$  e  $p < 0,0001^{****}$ . Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

**Linfonodos mesentéricos.** Não houve alteração nas porcentagens celulares de células B-2, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e células NKT nos linfonodos mesentéricos nos períodos iniciais de observação (7 e 14 DPI), porém verificamos um maior percentual dessas células no grupo *Infectado* em relação ao grupo *Cy-Infectado* no 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> DPI. Por outro lado, os macrófagos apresentaram maior percentual no grupo *Cy-Infectado* em relação ao grupo *Infectado*, no 14<sup>o</sup> DPI e nos períodos mais tardios, o percentual de macrófagos diminuiu. Não identificamos células B-1 nos linfonodos.



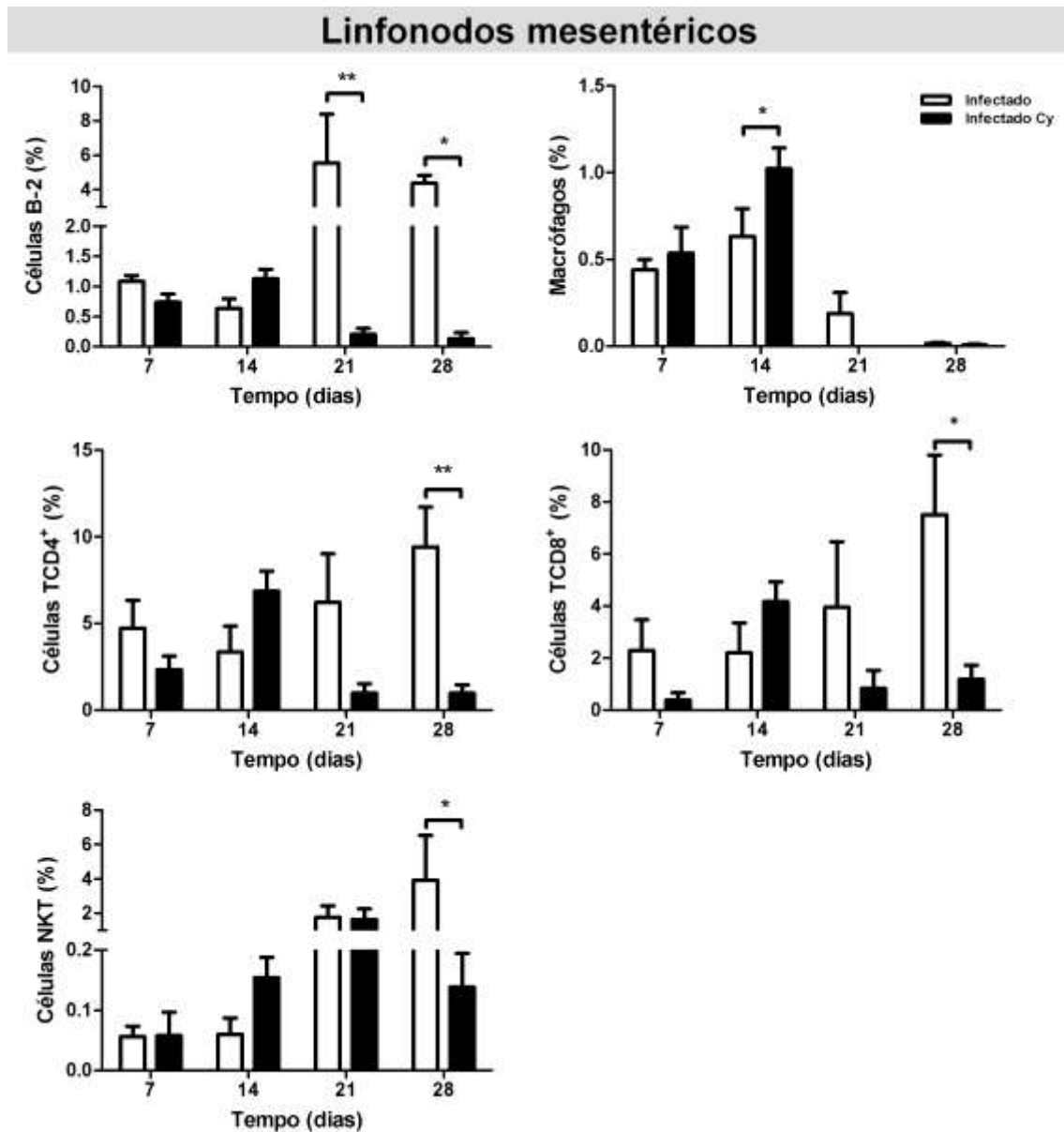


Figura 10. Avaliação das populações celulares presentes nos linfonodos mesentéricos de camundongos infectados com *E. intestinalis* (*Infectado*) e camundongos infectados e tratado com Cy (*Cy-Infectado*), ao longo do período de observação após a infecção (7, 14, 21 e 28 dias). Porcentagem de células B-2 ( $CD23^+CD19^+$ ), macrófagos ( $CD19^-CD11b^+$ ), linfócitos T CD4 ( $CD19^-CD8^-CD4^+$ ), T CD8 ( $CD19^-CD4^-CD8^+$ ) e decélulas NKT ( $CD19^-CD4^+NK1.1^+$ ). A análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós teste de Tukey revelou  $p < 0,05^*$  e  $p < 0,01^{**}$ . Dados representativos de 2 experimentos independentes.

## DISCUSSÃO

O trato gastrointestinal representa a maior mucosa e compartimento imunológico do organismo, sendo continuamente exposto aos antígenos alimentares e microbianos. Portanto, o hospedeiro deve manter um ambiente compatível com a microbiota comensal e, ainda, protegido contra patógenos (Mangan e Fung, 2012). Patógenos adquiridos pela rota intestinal podem induzir diretamente a produção de citocinas e quimiocinas pelos enterócitos, iniciando um processo inflamatório da mucosa intestinal e aumentando a atração de outras células do sistema imune (Buzoni-Gatelet al., 2006).

*E. intestinalis* invade e se desenvolve no interior de enterócitos, causando em pacientes com AIDS uma diarreia persistente (Didier, 2005). Esse microsporídio também é capaz de infectar macrófagos da lâmina própria e pode se disseminar para os rins e trato hepatobiliar (El Fakhry et al., 2001). No presente estudo, a inoculação de *E. intestinalis* pela via oral não determinou manifestações clínicas compatíveis com a doença em animais tratados ou não com Cy. Contudo, todos os animais infectados apresentaram lesões histopatológicas relacionadas com o patógeno, caracterizada por enterite linfoplasmocitária associada à observação de esporos de *E. intestinalis*. Em estudos anteriores, nós demonstramos que a imunidade do intestino se dá de maneira diferente e é mais efetiva em modelo de infecção pelo *E. cuniculi*. Observamos que camundongos infectados pela rota intraperitoneal apresentaram sintomas mais graves da encefalitozoonose (da Costa, 2016) que aqueles inoculados pela via oral (dos Santos et al., artigo em preparação).

Foi observado, em nosso estudo, que animais infectados tinham grande número de mitoses no intestino associado à presença do processo inflamatório. Esse fato pode contribuir para a remodelação tecidual que se dá no intestino constantemente, em condições fisiológicas ou de doença (Fusset al., 2004). Essa manutenção do epitélio intestinal é essencial, já que os

enterócitos consistem na primeira barreira física contra os patógenos, impedindo o acesso do conteúdo luminal ao hospedeiro. As células epiteliais também atuam como fonte de quimioatraentes para células do sistema imune (Goodman e Pizarro, 2013). No epitélio intestinal há uma população de linfócitos T, chamado linfócitos intraepiteliais (IEL), que tem sido implicada na homeostase do tecido. No entanto, essas células podem também contribuir para o processo inflamatório, como observado durante a toxoplasmose intestinal. Subjacente ao epitélio, a lâmina própria abriga subpopulações de células dendríticas com papel central no controle da toxoplasmose. Ainda, células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  também são componentes desse compartimento, assim como os linfócitos B especializados na produção de IgA secretória (Cohen e Denkers, 2015).

A importância da imunidade adaptativa na proteção contra os microsporídios, que acometem os vertebrados, tem sido demonstrada. Camundongos com deficiência de células T, como atímicos e SCID, são incapazes de controlar a infecção e morrem de encefalitozoonose, ao contrário de camundongos imunocompetentes (Gannon, 1980; Didier et al., 1994). Camundongos *knockout* para  $IFN-\gamma$  inoculados pela via oral com *E. intestinalis* apresentaram hepatomegalia, colecistite, esplenomegalia, dilatação intestinal e ascite entre a 3<sup>o</sup>. e 4<sup>o</sup>. semana pós-infecção e permaneceram vivos por até 6 semanas (El Fakhry et al., 2001). Diante dessas evidências é importante ressaltar que a deleção de células imunitárias por manipulação física, genética ou da resposta de citocinas representa uma situação particular que não corresponde às condições clínicas observadas em indivíduos imunossuprimidos por fármacos. Aqui, utilizamos o tratamento com Cy para mimetizar, de forma experimental, essa situação tão importante clinicamente.

Camundongos tratados com Cy e infectados (*Cy-infectados*) apresentaram maior carga parasitária, evidenciando que o tratamento determinou maior suscetibilidade ao patógeno.

Anteriormente, nós demonstramos que camundongos BALB/c tratados com a mesma dose de Cy apresentavam maior suscetibilidade à encefalitozoonose por *E. cuniculi* inoculado por via intraperitoneal (Lallo e Hirschfeld, 2012), corroborando os resultados aqui descritos. Contudo, nós observamos que os animais tratados com Cy apresentaram redução expressiva da carga parasitária e das lesões histopatológicas nos períodos mais avançados de observação, indicando processo de resolução da infecção, semelhante ao observado em camundongos não tratados com Cy.

O tratamento com Cy tem um efeito diferencial em compartimentos de linfócitos, podendo rapidamente esgotar as células B e T. Porém, em seguida, ocorre uma fase de recuperação caracterizada por proliferação e mobilização extensiva da medula óssea e outros órgão linfoides (Sistiguet al., 2011). Nós observamos um aumento expressivo na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e células B-2 no intestino, causado pelo tratamento com Cy, após uma semana de tratamento. Particularmente, deve-se ressaltar que a utilização de Cy não interferiu na resposta de células T no intestino, tanto T CD4<sup>+</sup> como T CD8<sup>+</sup>, frente à infecção pelo *E. intestinalis*.

A imunidade contra os microsporídios envolve principalmente as células T CD8<sup>+</sup> como população efetora (Khan et al., 1999, Braunfuchsová et al., 2001). Uma observação interessante é o papel dicotômico das células T CD4<sup>+</sup> com base na via de infecção. Durante a infecção intraperitoneal pelo *E. cuniculi*, a resposta de T CD4<sup>+</sup> é dispensável para a proteção do hospedeiro e o desenvolvimento da imunidade é dependente de T CD8<sup>+</sup> (Khan et al., 1999, Moretto et al., 2000). Por outro lado, as células T CD4<sup>+</sup> possuem um papel sinérgico com as células T CD8<sup>+</sup> durante a infecção por via oral (Moretto et al., 2004). A população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> também estava maior nos intestinos de animais infectados, contribuindo

para mostrar o sinergismo entre as subpopulações de células T na infecção oral pelo *E. intestinalis*.

Alguns estudos mostram que as populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> assim como a produção de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 são essenciais para conferir resistência à infecção por *E. intestinalis*, um dos microsporídios mais comum em humanos (Salát et al., 2004, 2006). Nossos resultados reforçam essa premissa, uma vez que identificamos aumento expressivo na população linfócitos T CD8<sup>+</sup> no intestino dos animais infectados, tratados ou não com Cy. Adicionalmente, a população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> diminuiu gradual- e coincidentemente com a redução da carga parasitária e dos achados histopatológicos, compatíveis com a encefalitozoonose causada pelo *E. intestinalis*.

Os IEL, localizados na mucosa intestinal, desempenham importante papel nas infecções pela rota oro-fecal. Frente à inoculação oral com *E. cuniculi*, a população de IEL CD8<sup>+</sup> se prolifera e libera grandes quantidades de IFN- $\gamma$ , exibindo propriedades citolíticas que impedem a proliferação do patógeno (Moreto et al., 2004). Em nosso estudo, também observamos um aumento particular da população de linfócitos T CD8<sup>+</sup> presentes na mucosa intestinal, após a infecção pelo *E. intestinalis*. Adicionalmente, identificamos diminuição nas populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na cavidade peritoneal de animais infectados. Esse dado pode sugerir a migração dessa população para o intestino, órgão-alvo do patógeno. Outros trabalhos já demonstraram que células do peritônio podem migrar para um foco inflamatório distante desse sítio (Paloset al., 2012).

Nosso grupo tem demonstrado a resposta de células da cavidade peritoneal frente à microsporidiose causada pelo *E. cuniculi* (da Costa et al., 2016), particularmente, o papel de células B-1 em conferir maior resistência à infecção e manutenção da encefalitozoonose (da Costa, 2016, dos Santos, *em preparação*). As células B-1 são a chave para a produção precoce

de anticorpos contra patógenos, tornando-as aptas á montagem de uma resposta independente de células T (Choi and Baumgarth, 2008). Por outro lado, autores demonstraram que as células B-1 atuam de forma importante mediando a resposta imune dependente de células T, como a hipersensibilidade tardia ou imediata (De Lorenzo et al., 2007, Szczepanik et al., 2003) e rejeição aos aloenxertos (Nogueira-Martins e Mariano, 2010). Também, após a transferência adotiva de células B-1 foi observada ativação de células T produtoras de IFN- $\gamma$  (Margryet al., 2013). Aqui, observamos diminuição da frequência de células B-1 no intestino de animais infectados, comparados aos controles. A população de B-1 também diminuiu na cavidade peritoneal desses animais. Embora o papel de células B-1 na infecção por *E. intestinalis* não seja bem esclarecido, esses dados podem sugerir o envolvimento dessas células na patogenia em questão. Estudos futuros devem elucidar essa relação.

Também observamos uma redução inicial na população de células NKT, no intestino e linfonodos de animais infectados. No entanto, ao longo da infecção, essa população celular aumentou nesses animais, tratados ou não com Cy. Autores têm demonstrado que células NKT podem apresentar efeito citotóxico para as células epiteliais em modelo de colite, numa resposta Th-2 atípica mediada por IL-13 produzida pelas células NKT (Fusset al., 2004). Já na infecção pelo *T. gondii*, as células NKT possuem um papel protetor, mas são suscetíveis à invasão direta pelo parasito (Perssom et al., 2009). Na infecção oral por *T. gondii* foi demonstrado que células NKT infectadas desenvolvem um fenótipo de hipermotilidade *in vivo*, sustentando a ideia de que *T. gondii* manipula a motilidade de células imunitárias para se espalhar no hospedeiro (Harkeet al., 2013, Seipel et al., 2010), como foi demonstrado em macrófagos (Harker et al., 2013).

Para microsporídios, foi demonstrado por Leicht et al. (2005) que a fagocitose de esporos em culturas celulares é pouco evidenciada, ao contrário, há grande prevalência de injeção do

esporoplasma pelo túbulo polar. Por outro lado, uma variedade de linhagens celulares é capaz de fagocitar esporos de microsporídio (Couzinet et al., 2000, Franzen et al., 2005), sugerindo que um processo de endocitose pode ser importante na microsporidiose intestinal. Os microrganismos desenvolveram um rico repertório de mecanismos para subverter processos de endocitose da célula hospedeira, permitindo que a invasão ocorra mesmo em células que geralmente não fagocitam (Cossart e Sansonetti, 2004). Schottelius et al. (2000) sugeriram que a membrana celular da célula hospedeira sofre invaginações no sítio de contato com os esporos *Encephalitozoon* sp. junto ao túbulo polar, um processo semelhante a endocitose e, posteriormente, o esporoplasma é injetado na célula. Nossas observações de microscopia eletrônica mostraram esse fenômeno ocorrendo de forma eventual enquanto o fenômeno de fagocitose-like foi encontrado mais frequentemente.

Embora a proteção contra os microsporídios seja predominantemente realizada por células T, as células dendríticas (DCs) possuem papel importante e crítico na estimulação dessas células. As DCs presentes na mucosa intestinal são conhecidas como as células apresentadoras de antígenos (APC) mais efetivas, capazes de primar células T *naïve* em células efectoras e de memória (Steinman e Hemmi, 2006). A secreção de citocinas e quimiocinas a partir de enterócitos infectados resulta em migração dessas células das placas de Peyer para a mucosa (Goodman e Pizarro, 2013). Por outro lado, foi demonstrado, *in vitro*, que *E. intestinalis* inibe a diferenciação de DCs (Bernal et al., 2016). Neste estudo, observamos uma redução na população de DCs das placas de Peyer nos animais infectados nos primeiros períodos de observação (7 e 14 DPI), coincidentemente com os períodos de encontro das maiores cargas parasitárias e maior prevalência de lesões histopatológicas.

No trato gastrointestinal, as DCs desempenham papel importante na supressão do desenvolvimento de colite, induzindo o tráfego de células T reguladoras no intestino, além de

contribuir para a secreção de IgA a partir de células B no intestino delgado (Goodman e Pizarro, 2013). As DCs da mucosa intestinal também estão envolvidas na indução da tolerância oral, em que são responsáveis por suprimir a resposta inflamatória excessiva provocada pela microflora e antígenos ingeridos (Goodman e Pizarro, 2013). A quebra dessa tolerância pode diminuir a frequência de células T reguladoras e aumentar a de células Th1 e Th17 (Goodman e Pizarro, 2013). Se a menor frequência de DCs observada em nosso estudo durante o curso da doença está relacionada à maior carga parasitária observada ou uma possível migração dessas células para a mucosa intestinal, o que poderia contribuir para a apresentação antigênica, ainda não foi esclarecido. Deve-se, ainda, considerar que a Cy possui papel imunomodulador sobre as DCs, que podem ser mobilizadas e ativadas, desempenhando sua função como APC, já que após 14 DPI observamos o início da resolução da infecção, também em animais tratados com Cy.

Em conjunto, nossos resultados evidenciam uma resposta imune no intestino efetiva contra a infecção pelo *E. intestinalis*, mesmo em camundongos imunossuprimidos com Cy. Nossos achados podem contribuir para a melhor compreensão da resposta imune contra as infecções intestinais em condições em que o sistema imune sofre os efeitos de imunossupressores.



## REFERÊNCIAS

- Anane, S., H. Attouchi, H., 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 34, 450-464.
- Becnel, J. J.; Andrealis, T. G., 1999. Microsporidia in insects. In: Wittner, M. The microsporidia and microsporidiosis. ASM Press: Washington. p. 1-6.
- Bernal, J.A., Andrés, M., Palmero, M.F., 2016. Bruton's tyrosine kinase inhibitors could induce rheumatoid arthritis-like manifestations: A comment on the article by Nyhoff et al. *Arthritis Rheumatol.* 16. doi: 10.1002/art.39956
- Braunfuchsová, P., Salát, J., Kopecký, J., 2001. CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Int. J. Parasitol.* 15, 681-686.
- Brodsky, R.A., 2010. High-dose cyclophosphamide for autoimmunity and alloimmunity. *Immunol. Res.* 47, 79–84.
- Buzoni-Gatel, D., Schulthess, J., Menard, L.C., Kasper, L.H., 2006. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell. Microbiol.* 8, 535–544.
- Chardes, T., Buzoni-gatel D., Lepage, A., Berard, F., Bout, DT., 1994. *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Thy-1<sup>+</sup> gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite infected enterocytes. *J. Immunol.* 153, 4596-4603.
- Choi, Y.S., Baumgarth, N., 2008. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* 205, 3053-3064.
- Cohen, S.B., Denkers, E.Y., 2015. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 37, 108-117.
- Colvin, O.M., 1999. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr. Pharm. Des.* 5, 555–560.
- Cossart, P., Sansonetti, P. J., 2004. Bacterial invasion: the paradigms of entero invasive pathogens. *Science* 304, 242–248.

- Couzinet, S., E. Cejas, J. Schittny, P. Deplazes, R. Weber, and S. Zimmerli., 2000. Phagocytic up take of *Encephalitozoon cuniculi* by non professional phagocytes. Infect. Immun. 68, 6939–6945.
- da Costa, .L.F.,Alvares-Saraiva, A.M., Dell' Armelina Rocha, P.R.,Spadacci-Morena, D.D.,Perez, E.C.,Mariano, M.,Lallo, M.A. 2016. B-1cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice.Immunobiology, 28, S0171-2985(16)30387-4
- De Lorenzo, B.H., Brito, R.R., Godoy, L.C., Lopes, J.D., Mariano, M., 2007. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. Immunol.Lett. 114, 110-118.
- Dezern, AE.,Styler, MJ., Drachman, DB., Hummers, LK., Jones, RJ., Brodsky, RA., 2013. Repeated treatment with high dose cyclophosphamide for severe autoimmune diseases. Am. J. Blood. Res. 3,84–90.
- Didier, E.S.; Varner, P.W.; Didier, P.J.; Aladras, A. M.; Millichamp, N.J.; Murphey-Corb, M.; Bofm, R.; Shaddock, J.A., 1994. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys.Folia Parasit. 41, 1-11.
- Didier, E.S., 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in human and animals. Acta Trop. 94, 61-76.
- Didier, E.S.,Weiss, L.M., 2006. Microsporidiosis: current status. Curr.Opin. Infect. Dis. 19, 485-492.
- Didier, E.S.,Weiss, L.M., 2011. Microsporidiosis: not just in AIDS patients. Curr.Opin. Infect. Dis. 24, 490-495.
- Didier, E.S., Khan, I.A., 2014. The immunology of microsporidiosis in mammals. In: Louis, M., Weiss, Becnel, J.J. (Eds.). Microsporidia. John Wiley & Sons, NewYork, p. 307-325.
- El Fakhry, Y., Achbarou, A., Franetich, J.F., Desportes-Livage, I., Mazier, D., 2001.Dissemination of *Encephalitozoon intestinalis*, a causative agent of human microsporidiosis, in IFN-gamma receptor knockout mice.Parasite Immunol. 23, 19-25.
- Emadi, A.L., Jones, R.J., Brodsky, R.A., 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. Nat. Rev. Clin. Oncol. 6, 638–647.

- Findly, R.C., Roberts, J., Hayday, A.C., 1993. Dynamic response of murine gut intraepithelial T cells after infection by coccidian parasite *Eimeria*. *Eur. J. Immunol.* 23, 2557-2564
- Franzen, C., Muller, A., Hartmann, P., Salzberger, B., 2005. Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitol.* 130, 285–292.
- Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R.S., Mannon, P., Strober, W., 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* 114, 1490–1497.
- Gannon, J., 1980. The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab. Anim.* 14, 189-192.
- Goodman, W.A., Pizarro, T.T. 2013. Regulatory cell populations in the intestinal mucosa. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 29, 614-620.
- Guy-Grand, D., Griscelli, C., Vassalli, P., 1978. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell: nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J. Exp. Med.*, 148, 1661- 1677.
- Harker, K.S., Ueno, N., Wang, T., Bonhomme, C., Liu, W., Lodoen, M.B., 2013. *Toxoplasma gondii* modulates the dynamics of human monocyte adhesion to vascular endothelium under fluidic shear stress. *J. Leukoc. Biol.* 93, 789–800.
- 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.* 5, 76-87.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H., Moretto, M., 1999. CD8<sup>+</sup>CTLs are essential for protective against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J. Immunol.* 162, 6086-6091.
- Khan, I.A., Moretto M., Weiss L.M., 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.

- Lallo, M.A., Hirschfeld, M.M.P., 2012. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. *Exp. Parasitol.* 131, 339–343.
- Leitch, G.J., Ward, T.L., Shaw, A.P., Newman, G., 2005. Apical sporephagocytosis not a significant route of infection of differentiated enterocytes by *Encephalitozoon intestinalis*. *Infect. Immun.* 73, 7697-7704.
- Lom, J., 2002. A catalogue of described genera and species of microsporidians parasitic in fish. *Syst. Parasitol.* 53, 81-99.
- Mangan, N.E., Fung, K.Y., 2012. Type I interferons in regulation of mucosal immunity. *Immunol Cell Biol.* 90, 510-519.
- Margry, B., Wieland, W.H., van Kooten, P.J., van Eden, W., Broere, F., 2013. Peritoneal cavity B-1 a cells promote peripheral CD4<sup>+</sup> T-cell activation. *Eur. J. Immunol.* 43, 2317-2326.
- Moretto, M., Casciotti, L., Durell, B., Khan, I.A., 2000. Lack of CD4<sup>+</sup> T cells does not affect induction of CD8<sup>+</sup> T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun.* 68, 6223–6232.
- Moretto, M., Weiss, L.M., Khan, I.A., 2004. Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J. Immunol.* 172, 4402–4409.
- Müller, S., Buhler-Jungo, M., Mueller, C., 2000. Intestinal intraepithelial lymphocytes exert potent protective cytotoxic activity during an acute virus infection. *J Immunol* 164, 1986–1994.
- Nogueira-Martins, M.F., Mariano, M., 2010. B-1 cell participation in T-cell-mediated alloimmune response. *Immunobiology.* 215, 264-274.
- Palos, M.C., Azevedo, M.C., Thies, F.G., Osugui, L., Alvares, A.M., Laurindo, M.F., Russo, R.T., Popi, A.F., Mariano, M., 2012. Different inflammatory stimuli in the footpad of mice influence the kinetics of resident peritoneal cells. *Inflamm Res.* 61:1187-1194.

Persson, C.M., Lambert, H., Vutova, P.P., Dellacasa-Lindberg, I., Nederby, J., Yagita, H. et al., 2009. Transmission of *Toxoplasma gondii* from infected dendritic cells to natural killer cells. *Infect Immun.* 77, 970–976.

Salat, 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<sup>+</sup> T-lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol. Res.* 99, 682–686.

Schottelius, J., Schmetz, C., Kock, N.P., Schüler, T., Sobottka, I., Fleischer, B.. 2000.

Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Microbes Infect.* 2, 1401-1406.

Seipel, D., Oliveira, B.C., Resende, T.L., Schuindt, S.H., Pimentel, P.M., Kanashiro, M.M. Arnhold, A.C., 2010. *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and alpha v beta 3 integrin. *Vet Parasitol.* 169, 312–319.

Sistigu, A., Viaud, S., Chaput, N., Bracci, L., Proietti, E., Zitvogel, L., 2011. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol.* 33, 369–383.

Steinman, R.M., Hemmi, H., 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311, 17–58.

Szczepanik, M., Akahira-Azuma, M., Bryniarski, K., Tsuji, R.F., Kawikova, I., Ptak, W., Kiener, C., Campos, R.A., Askenase, P.W., 2003. B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* 171, 6625-6635.

Weber, R., P. Deplazes., and D. Schwartz., 2000. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib. Microbiol.* 6, 166-192.

Valencakova, A., Halanova, M., 2012. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 35, 1-7.

World Health Organization, 2013. WHO Model list of Essential Medicine.  
[http://www.who.int/medicines/publications/essential\\_medicines/18th\\_EML.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/essential_medicines/18th_EML.pdf)