

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**Influência da glicose e da linhagem celular na multiplicação de
esporos de *Encephalitozoon cuniculi* e *E. intestinalis***

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

Juliana Braga Gomes

SÃO PAULO

2026

**Dissertação apresentada no formato de Artigo a ser enviado
para o periódico Journal of Eukaryotic Microbiology**

**Influência da glicose e da linhagem celular na multiplicação de esporos de
Encephalitozoon cuniculi e *E. intestinalis***

**Influence of glucose and cell line on spore multiplication of
Encephalitozoon cuniculi and *E. intestinalis***

Juliana Braga Gomes¹, Elizabeth Cristina Peres¹, Anuska Marcelino Alvares Saraiva¹,
Maria Anete Lallo¹

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

Ficha catalográfica

Gomes, Juliana Braga.

A influência da glicose e da linhagem celular na multiplicação de esporos de *Encephalitozoon cuniculi* e *E. intestinalis* / Juliana Braga Gomes. - 2026.

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2026.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

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

1. Glicose. 2. Linhagens celulares tumorais. 3. Metabolismo glicolítico. 4. Microsporídios. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Título.

Juliana Braga Gomes

**Influência da glicose e da linhagem celular na multiplicação
de esporos de *Encephalitozoon cuniculi* e *E. intestinalis***

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

Banca Examinadora

_____/____/____

Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo (orientadora)

Universidade Paulista - UNIP

_____/____/____

Prof.^a Dr.^a Anuska Marcelino Alvares Saraiva

Universidade Paulista - UNIP

_____/____/____

Prof.^a Dr.^a Patricia Xander

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Agradecimentos

Sou imensamente grata à Professora Anete pela oportunidade que me foi concedida e pela confiança depositada em minha trajetória. Tive o privilégio de conhecer e me apaixonar pela Patologia Ambiental e Experimental, uma área tão rica e fascinante, que ampliou meus horizontes acadêmicos e profissionais. Cada ensinamento foi recebido com admiração, respeito e entusiasmo. Agradeço profundamente por sua generosidade em compartilhar conhecimentos, por sua imensa paciência, dedicação, incentivo constante . Minha gratidão será eterna.

Ao longo desta jornada, aprendi que nenhum sonho é construído sozinho. Para que esta conquista se tornasse realidade, contei com o apoio incondicional da minha família, que foi meu porto seguro nos momentos de dificuldade e minha maior alegria em cada conquista alcançada.

À minha querida irmã, Raquel, expresso meu mais profundo agradecimento. Seu amor, cuidado e presença constante foram fundamentais durante toda esta trajetória. Obrigada por me orientar, me acolher, me ouvir e me fortalecer com palavras de conforto, incentivo e esperança sempre que precisei. Sua dedicação e carinho foram essenciais para que eu nunca desistisse dos meus objetivos.

À minha mãe, Vania, agradeço por seu amor incondicional, pela escuta atenciosa, pelo carinho diário e pelo abraço acolhedor nos momentos de aflição e insegurança. Sua força, sabedoria e amor foram fontes inesgotáveis de inspiração e coragem para seguir em frente.

À equipe do laboratório — Suzana, Cleide, Leonardo e Wil — deixo meu sincero agradecimento pela convivência tão especial e enriquecedora. Obrigada

pelas boas risadas, pelos cafés compartilhados, pelas conversas, pela parceria diária, pelo apoio constante. Vocês contribuíram não apenas para minha formação acadêmica, mas também para meu crescimento pessoal.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, fizeram parte desta trajetória, compartilhando conhecimentos, apoio, incentivo, carinho e amizade. Cada gesto de apoio foi importante para que eu chegasse até aqui.

A todos, deixo meu mais profundo carinho, respeito e eterna gratidão.

Resumo

Microsporídios do gênero *Encephalitozoon* são patógenos intracelulares obrigatórios altamente dependentes do metabolismo da célula hospedeira, especialmente para obtenção de energia. Considerando as diferenças metabólicas na produção energética e utilização de glicose pelas células tumorais, este estudo teve como objetivo avaliar a multiplicação de *E. cuniculi* e *E. intestinalis* pela contagem de esporos em diferentes linhagens celulares tumorais cultivadas em condições de alta disponibilidade de glicose. Para isso, a linhagem RK-13 e as linhagens tumorais MCF-7, B16F10 e NCI-H292 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 5,5 mM ou 30 mM de glicose e infectadas com esporos nas proporções de 2:1, 4:1 e 6:1 (MOI 2, 4 e 6). Após 48 horas, a produção de esporos foi quantificada em câmara de Neubauer e a viabilidade celular avaliada. Os resultados demonstraram que a multiplicação de ambas as espécies foi influenciada de maneira dependente da linhagem celular, da concentração de glicose e da carga infecciosa. A suplementação com glicose promoveu aumento significativo da produção de esporos na linhagem H292, porém não reduziu a multiplicação de esporos na linhagem MCF-7. A linhagem MCF7 apresentou maior produção de esporos em condições basais de glicose, especialmente no MOI 2, sugerindo menor dependência de glicose elevada. As células RK13 apresentaram resposta dependente da espécie de microsporídio, com aumento do número de esporos de *E. cuniculi* e redução de *E. intestinalis* em meio enriquecido com glicose, indicando diferenças metabólicas entre os microsporídios. Já a linhagem B16F10 exibiu comportamento intermediário, com menor sensibilidade às variações de glicose e elevada taxa de necrose. Em relação ao número de esporos produzidos, o MOI 2 favoreceu consistentemente no aumento da produção de esporos, enquanto valores mais elevados não resultaram em aumento proporcional. A viabilidade celular manteve-se relativamente estável na maioria das condições e não se correlacionou diretamente com a produção de esporos. Além disso, foram observadas diferenças nos padrões de morte celular entre as linhagens, com maior necrose em B16F10, maior estabilidade em MCF7 e maior envolvimento de apoptose na

linhagem H292, especialmente em condições de alta glicose. Em conjunto, os dados sugerem a multiplicação de esporos de *E. cuniculi* e *E. intestinalis* foi modulada tanto pela disponibilidade de glicose quanto pelas características metabólicas intrínsecas de cada linhagem celular. Esses resultados destacam a importância das condições metabólicas de cultivo para a compreensão das interações parasita-hospedeiro.

Palavras-Chave: Glicose; Linhagens celulares tumorais; Metabolismo glicolítico; Microsporídios; Multiplicação de esporos

Abstract

Microsporidia of the genus *Encephalitozoon* are obligate intracellular pathogens highly dependent on host cell metabolism, particularly for energy acquisition. Considering the metabolic differences in energy production and glucose utilization among tumor cells, this study aimed to evaluate the multiplication of *E. cuniculi* and *E. intestinalis* by spore counting in different tumor cell lines cultured under conditions of high glucose availability. For this purpose, the RK-13 cell line and the tumor cell lines MCF-7, B16F10, and NCI-H292 were cultured in RPMI medium supplemented with 5.5 mM or 30 mM glucose and infected with spores at ratios of 2:1, 4:1, and 6:1 (MOI 2, 4, and 6). After 48 hours, spore production was quantified using a Neubauer chamber, and cell viability was assessed. The results demonstrated that the multiplication of both species was influenced in a cell line-, glucose concentration-, and infection load-dependent manner. Glucose supplementation significantly increased spore production in the H292 cell line, whereas it did not reduce spore multiplication in the MCF-7 cell line. MCF-7 cells exhibited higher spore production under basal glucose conditions, particularly at MOI 2, suggesting a lower dependence on elevated glucose levels. RK13 cells showed a species-dependent response, with increased numbers of *E. cuniculi* spores and reduced *E. intestinalis* spore production in glucose-enriched medium, indicating metabolic differences between the microsporidia. In contrast, the B16F10 cell line displayed an intermediate behavior, with lower sensitivity to glucose variations and a high rate of necrosis. Regarding spore production, MOI 2 consistently favored increased spore production, whereas higher MOI values did not result in proportional increases. Cell viability remained relatively stable under most conditions and was not directly correlated with spore production. In addition, differences in cell death patterns were observed among the cell lines, with greater necrosis in B16F10 cells, greater stability in MCF7 cells, and stronger involvement of apoptosis in the H292 cell line, especially under high-glucose conditions. Taken together, the data suggest that the multiplication of spores of *E. cuniculi* and *E. intestinalis* was modulated both by glucose availability and by

the intrinsic metabolic characteristics of each cell line. These results highlight the importance of metabolic culture conditions for understanding parasite–host interactions.

Keywords: Glucose; Tumor cell lines; Glycolitic metabolism; Microsporidia; Spore multiplication.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	13
2	Materiais e Metodos	16
2.1	Linhagens celulares	16
2.2	Patogenos	16
2.3	Delineamento experimental	17
2.4	Avaliação da Viabilidade Celular	18
2.5	Multiplicação dos esporos nas culturas de células	18
2.6	Análise estatística	18
3	Resultados	19
3.1	A glicose modulou a multiplicação de <i>Encephalitozoon</i> de forma dependente da linhagem de células	19
3.2	Análise comparativa da produção de esporos de <i>E.cuniculi</i> . e <i>E. intestinalis</i> nas diferentes células e condições de cultivo.....	25
3.3	A viabilidade e o tipo de morte celular variou em função da linhagem e da suplementação de glicose	27
3.4	Resumo dos principais resultados	30
4.	Discussão	31
5.	Conclusão	36
	Referências.....	36
	APÊNDICE A - Figuras Suplementares.....	40

1. Introdução

Os patógenos oportunistas *Encephalitozoon cuniculi* e *E. intestinalis* pertencem ao filo Microsporidia, um grupo de fungos atípicos, unicelulares e intracelulares obrigatórios e (Han and Weiss 2017). Os microsporídios são ubíquos na natureza e, entre os vertebrados, infectam mamíferos domésticos de produção (bovinos, caprinos, ovinos, suínos, bubalinos, equinos e lagomorfos), animais de companhia (caninos e felinos), animais de laboratório (camundongos e ratos) e animais selvagens (Han et al. 2020; Magalhães et al. 2022). Nos humanos, os microsporídios são frequentes em pacientes imunossuprimidos pelo HIV, por neoplasias ou por doenças autoimunes, assim como pelo uso de anticorpos imunomoduladores ou terapêutica contra a rejeição de transplantes, porém tem sido relatado em crianças, idosos e indivíduos imunocompetentes (Han et al. 2021; Seatamanoch et al. 2022).

A principal via de infecção ocorre pela ingestão de esporos. Após contato com a célula hospedeira, os esporos evertem o túbulo polar, promovendo a injeção do esporoplasma no citoplasma da célula hospedeira, com a formação de um vacúolo parasitóforo, no qual ocorre a multiplicação e formação de novos esporos (Han and Weiss 2017). Os microsporídios não possuem mitocôndrias e peroxissomos e dependem da célula hospedeira para obtenção de ATP necessário para sua proliferação (Wadi and Reinke 2020; Medeiros et al. 2021). Eles possuem uma organela mitocondrial altamente reduzida, o mitossomo, desprovida de capacidade respiratória (Seatamanoch et al. 2022). Durante sua evolução, esses organismos perderam vias metabólicas essenciais, incluindo componentes do ciclo do ácido tricarboxílico e da fosforilação oxidativa, tornando-se altamente dependentes da aquisição de energia e metabólitos do hospedeiro (Seatamanoch et al. 2022). Espécies do gênero *Encephalitozoon* apresentam transportadores de nucleotídeos que permitem a importação direta de ATP do citoplasma da célula infectada, caracterizando-os como

“parasitas energéticos” (Karnkowska et al. 2016). Seu metabolismo glicolítico é limitado e a disponibilidade de glicose no ambiente intracelular pode influenciar diretamente a replicação e o desenvolvimento desses fungos (Timofeev et al. 2020). Apesar do genoma reduzido, esses organismos apresentam mecanismos eficientes para explorar os recursos metabólicos da célula hospedeira (Corradi et al. 2010; Hacker et al. 2014).

Estudos ultraestruturais demonstram que microsporídios do gênero *Encephalitozoon* obtêm ATP por meio da interação direta com a mitocôndria da célula hospedeira, tanto via vacúolo parasitóforo quanto pelos estágios proliferativos (Hacker et al. 2014; Luo et al. 2021; Luo et al. 2022). Canais aniônicos dependentes de voltagem (VDACs) participam da transferência de ATP da mitocôndria para o vacúolo parasitóforo (Hacker et al. 2014), e outros transportadores de nucleotídeos, como ATP e GTP, também foram identificados. Além disso, análises proteômicas e de expressão gênica indicam que a infecção pode modular positivamente as vias metabólicas do hospedeiro, incluindo fosforilação oxidativa e metabolismo de ácidos graxos (Li et al. 2018). Notavelmente, os níveis de ATP na célula hospedeira permanecem relativamente estáveis, sugerindo que os microsporídios são capazes de explorar recursos energéticos sem comprometer a viabilidade celular (Luo et al. 2021).

Além disso, patógenos intracelulares podem modular a dinâmica mitocondrial do hospedeiro para favorecer sua sobrevivência. Microsporídios como *E. cuniculi* e *E. hellem* promovem alterações na fosforilação da proteína DRP1, induzindo sua translocação para a membrana mitocondrial e resultando em fragmentação mitocondrial da célula hospedeira (Luo et al. 2022). Nesse contexto, alterações no metabolismo celular, incluindo a disponibilidade de glicose e o estado energético das células, desempenham papel central na infecção e multiplicação desses parasitas. Camundongos com diabetes mellitus induzido por estreptozotocina foram desafiados com *E. cuniculi* e apresentaram a maior suscetibilidade à infecção, quadro clínico mais grave e maior carga fúngica que dos animais não diabéticos (Francisco Neto et al. 2017). Nos animais infectados, foi observada a redução da

glicemia simultânea ao aumento da carga fúngica, portanto, a condição de hiperglicemia foi favorável à proliferação do patógeno (Francisco Neto et al. 2017). Considerando a dependência metabólica dos microsporídios em relação à célula hospedeira, nós hipotetizamos que o enriquecimento do meio de cultura com glicose poderia favorecer a multiplicação de *Encephalitozoon* em células tumorais, contribuindo para otimizar a obtenção de esporos em condições laboratoriais.

As células neoplásicas apresentam fisiologia distinta das células normais, caracterizada por alterações no metabolismo e na comunicação celular (Faubert et al. 2020). Essas células reprogramam seu metabolismo para sustentar o crescimento acelerado (Faubert et al. 2020), destacando-se a preferência pela glicólise mesmo na presença de oxigênio — o chamado efeito Warburg — associada ao aumento da atividade da fosforilação oxidativa (Jia et al. 2018; Farhadi et al. 2022). Essa reprogramação garante a produção contínua de energia e de metabólitos essenciais, permitindo a multiplicação em condições nutricionais limitantes e contribui para a manutenção do equilíbrio energético e redox celular (Martin and McGee 2019).

A glicólise é uma via metabólica citosólica independente de oxigênio responsável pelo catabolismo de carboidratos. Nesse processo, o piruvato pode ser convertido em lactato, resultando em baixa produção de ATP. Em contraste, a respiração mitocondrial, por meio do ciclo do ácido tricarboxílico, é responsável pela maior parte da produção energética em células normais sob condições aeróbicas. No entanto, células cancerígenas frequentemente utilizam glicólise como principal fonte de energia, compensando a menor eficiência energética por meio do aumento da captação de glicose (Farhardi et al. 2020).

O padrão metabólico e a flexibilidade energética variam entre os diferentes tipos de células tumorais (Moreno-Sánchez et al. 2007; Martínez-Reyes and Chandel 2021). As linhagens MCF7, B16F10 e NCI-H292 apresentam perfis metabólicos distintos: as células MCF7 apresentam maior dependência da fosforilação oxidativa e do metabolismo mitocondrial (Wang

et al. 2020), enquanto as células B16F10 exibem um perfil altamente glicolítico associado a maior agressividade (Zhuo et al. 2020); por sua vez, NCI-H292 apresentam maior flexibilidade metabólica, podendo alternar entre glicólise e respiração mitocondrial conforme as condições ambientais (Chanda et al. 2023).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a multiplicação de *E. cuniculi* e *E. intestinalis* nas linhagens tumorais MCF-7, B16F10 e NCI-H292 cultivadas em meio enriquecido com alta concentração de glicose.

2. Materiais e Métodos

2.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas 4 linhagens celulares, uma linhagem de células convencionais - RK13 (Rabbit Kidney, provenientes do epitélio renal de coelho) e considerada padrão-ouro para *Encephalitozoon*, e 3 linhagens de células tumorais, NCI-H292 ou H292 (derivada de carcinoma de células escamosas de pulmão humano), MCF-7 (linhagem derivada de adenocarcinoma mamário humano, hormônio-dependentes) e B16F10 (derivadas do melanoma murino de camundongo C57BL/6. Todas as células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 1% de penicilina e estreptomicina, incubadas a 37°C com 5% de CO₂, mantidas frascos de 25 cm².

2.2 Patógenos

Os esporos de *E. cuniculi* e de *E. intestinalis* foram cultivados em células RK-13 (*Rabbit Kidney*) no Laboratório de Culturas Celulares da Universidade Paulista. As culturas foram incubadas em meio R10 em atmosfera 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 1500 rpm para obtenção dos esporos contidos no sedimento, os quais foram armazenados a 4°C. Os esporos foram purificados em gradiente de Percoll (50%), lavados em PBS e contados em câmara de Neubauer.

2.3 Delineamento experimental

As linhagens tumorais MCF-7, B16F10, NCI-H292 e a linhagem RK13 foram cultivadas em placas com 24 poços na concentração de 1×10^5 células por poço. Placas distintas foram utilizadas para os diferentes microsporídios e para os tipos celulares empregados. Os experimentos com as diferentes linhagens e patógenos foram feitos separadamente, para evitar contaminação cruzada de células ou microsporídios. Os meios de cultura empregados foram o meio basal da célula, R10 conforme descrito no item 2.1, porém o desafio foi feito em meio RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose identificados como M5.5 ou suplementado com 30 mM de glicose, identificado como M30. Após 24 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e as culturas receberam os respectivos meios com diferentes concentrações de esporos de *E. cuniculi* ou *E. intestinalis* nas proporções de 2:1, 4:1, 6:1, esporos por célula, ou seja número de microrganismos infectantes (MOI) 2, 4 e 6, sendo incubadas por 48 horas (Fig. 1). A seguir, os esporos produzidos nas culturas foram contabilizados em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi testada.

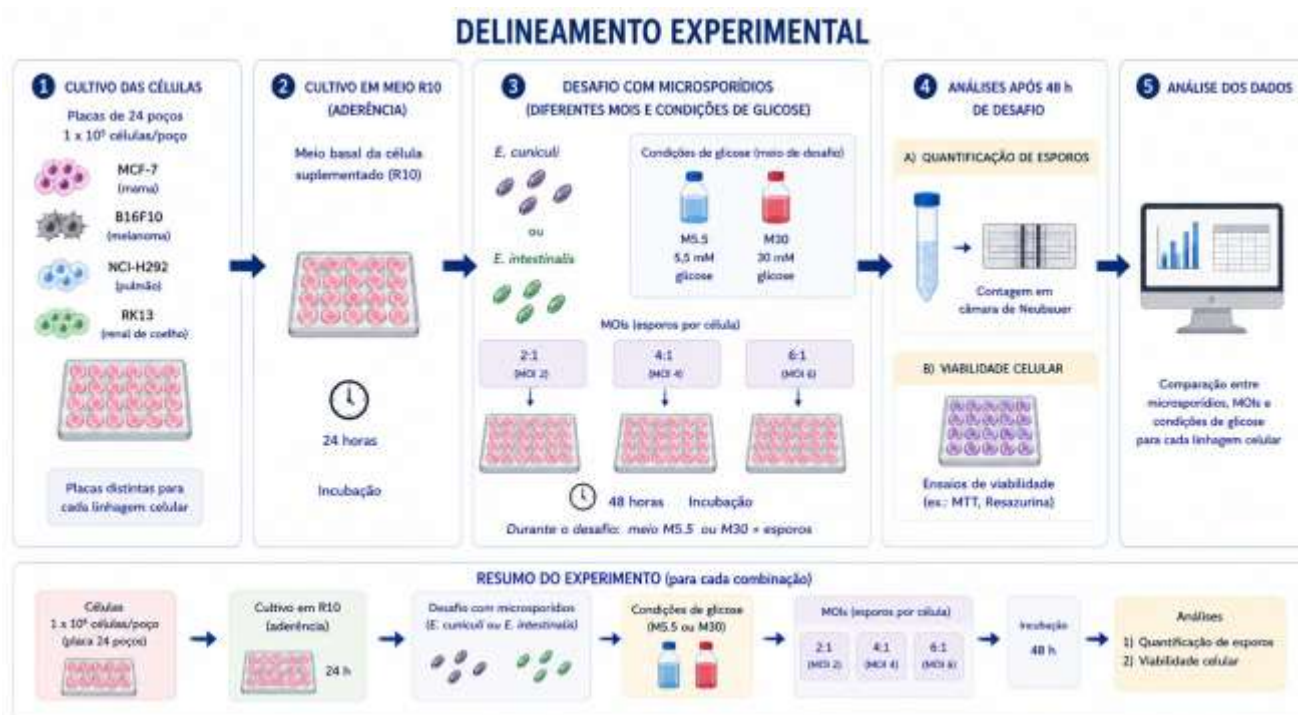


Figura 1. Delineamento experimental. Células das linhagens RK13, H292, B16F10 e MCF 7 foram cultivadas em placas em meio de cultura R10 por 24h. A seguir foram desafiadas com esporos de *E. cuniculi* ou *E. intestinalis* nas concentrações de 2, 4 e 6

esporos em meio RPMI enriquecido com 5,5 mM de glicose ou 30 mM de glicose por célula por 48 horas. Foram contabilizados os esporos produzidos em cada condição, assim como foi analisada a viabilidade das células nesse período. (Elaborado pela autora com auxílio de ferramentas de inteligência artificial generativa ChatGPT, OpenAI).

2.4 Avaliação da viabilidade celular

As células aderidas foram removidas com *cell scraper* e adicionadas às células do sobrenadante. Então foram lavadas com tampão Macs, sendo centrifugadas por 5 minutos com 1500 rpm a 4°C. Após descartar o sobrenadante, as células foram incubadas com 100 µL do tampão do Kit 7AAD/Anexina, 1 µL de 7AAD e 1 µL Anexina em cada amostra, seguindo as recomendações do fabricante, e foram incubadas por 15 minutos protegido da luz a temperatura ambiente. Logo após este período, adicionou-se 100 µL do tampão do kit e realizada a leitura no citômetro Acurri 6 imediatamente ao término da marcação.

2.5 Multiplicação dos esporos nas culturas de células

Após 48 de incubação, o sobrenadante de cada poço foi coletado e reservado. As células aderentes foram liberadas com auxílio do *cell scraper* e rompidas mecanicamente para liberação dos esporos, utilizando seringa de 10 mL acoplada a agulha 22G. A suspensão foi repetidamente aspirada e expelida sob pressão, promovendo a lise mecânica das células. O procedimento foi repetido várias vezes até que, sob observação microscópica, fosse confirmada a liberação eficiente dos esporos. As células rompidas foram reunidas com o sobrenadante e centrifugadas por 20 min a 500 x g. O sedimento foi diluído em 1 mL de PBS para a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Esses valores foram utilizados para a análise estatística.

2.6 Análise estatística

Os dados representativos de 3 experimentos distintos, independentes, em quadriplicatas foram analisados por meio do teste de Shapiro–Wilk para avaliação da normalidade e do teste ROUT para detecção de outliers entre os parâmetros analisados, como o MOI e o meio R10 ou R30. Posteriormente, os

dados foram comparados utilizando ANOVA de medidas repetidas, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, utilizando GraphPad Prism10. Para todos os testes, adotou-se nível de significância de 0,05.

3 Resultados

3.1 A glicose modulou a multiplicação de *Encephalitozoon* de forma dependente da linhagem celular

No presente estudo, a multiplicação de esporos de *E. cuniculi* e *E. intestinalis* foi avaliada em diferentes linhagens celulares, cultivadas em meio com concentração padrão (M5,5) ou elevada de glicose (M30). Inicialmente, comparou-se o comportamento de cada linhagem celular em relação ao MOI e à concentração de glicose (Fig. 2).

Para *E. cuniculi*, a linhagem RK13 considerada padrão para seu cultivo, apresentou maior multiplicação de esporos em meio com alta concentração de glicose (M30), especialmente no MOI 4 (Fig. 2A). Entre as linhagens tumorais, H292 (Fig. 2B) e B16F10 (Fig. 2C) apresentaram comportamento semelhante, com maior produção de esporos no MOI 2, sem diferenças relevantes nos demais MOIs ou concentrações de glicose (Fig. 2). Contudo para as células MCF7, houve uma tendência de menor produção de esporos em meio M30 (Fig. 2D).

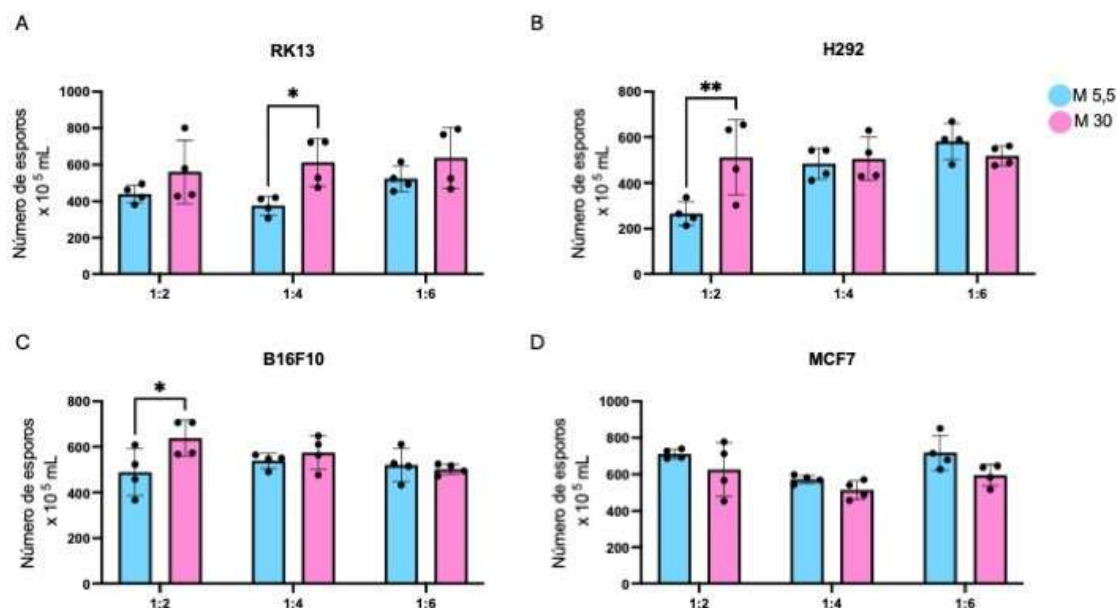


Figura 2. Carga fúngica mensurada nas linhagens celulares cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com diferentes MOIs (2, 4, 6) de esporos de *E. cuniculi*. (A) Linhagem RK13. (B) Linhagem NCI-H292. (C) Linhagem B16F10. (D) Linhagem MCF7. Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ($n=4$).

Em relação a *E. intestinalis*, verificou-se um padrão distinto (Fig. 3). Na linhagem RK13, houve redução da produção de esporos em meio M30, particularmente nos MOIs mais elevados (4 e 6) (Fig. 3A). Em contraste, as células H292 apresentaram aumento da produção de esporos com a suplementação de glicose, sendo o maior efeito observado no MOI 2 e 4 (Fig. 3B). O mesmo comportamento das células RK13 foi observado nas células tumorais B16F10 e MCF7, nas quais a suplementação com glicose também resultou em diminuição do número de esporos (Fig. 3C e 3D), exceto no MOI 6 para a B16F10 (Fig. 3C).

De modo geral, destaca-se que a suplementação com glicose favoreceu a proliferação de ambas as espécies de *Encephalitozoon* na linhagem H292, especialmente em condições de menor MOI 2.

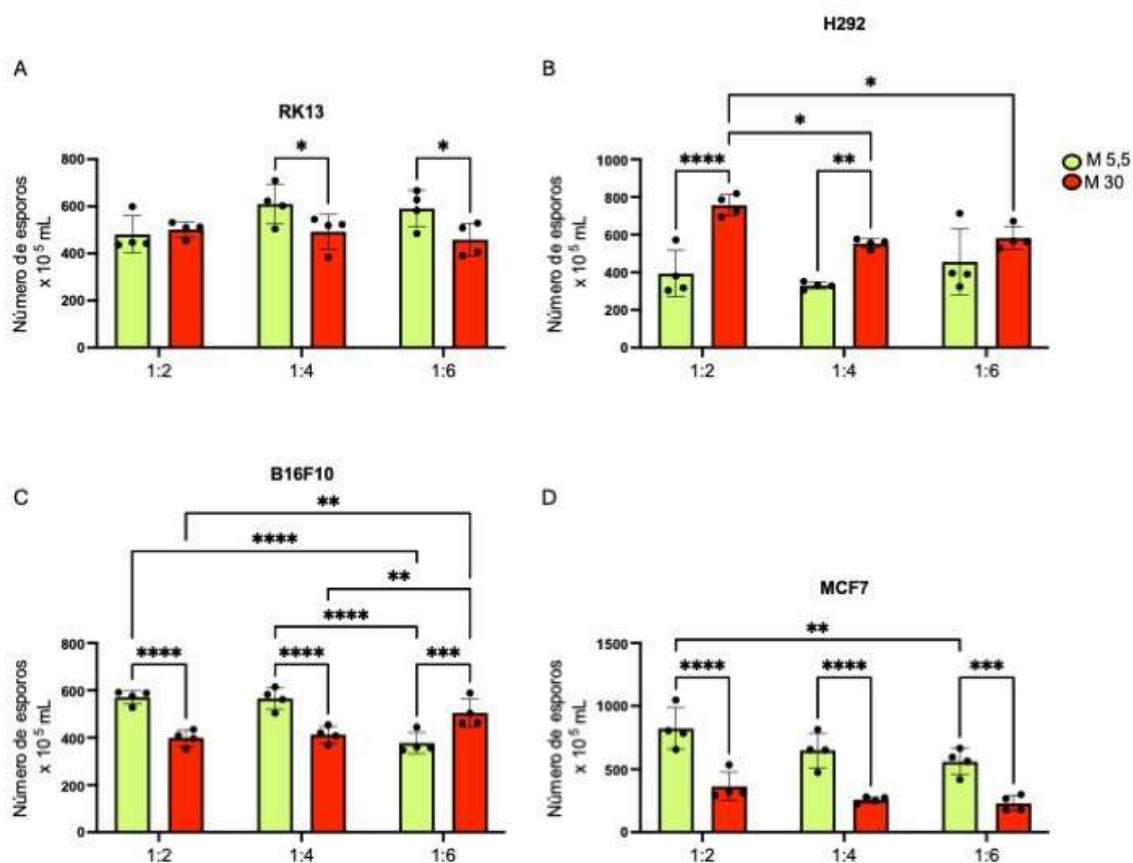


Figura 3. Carga fúngica mensurada nas linhagens celulares cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com diferentes MOIs (2, 4, 6) de esporos de *E. intestinalis*. (A) Linhagem RK13. (B) Linhagem NCI-H292. (C) Linhagem B16F10. (D) Linhagem MCF7. Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ($n=4$).

Na segunda análise, comparou-se a multiplicação de esporos entre todas as diferentes linhagens celulares sob as mesmas condições de glicose e MOI. Em meio M5,5, a linhagem H292 apresentou menor número de esporos de *E. cuniculi* no MOI 2 (Fig. 4A), diferença que se reduziu nos MOIs 4 e 6 (Fig. 4B e 4C). No entanto, a suplementação com glicose aumentou a produção de esporos nessa linhagem, igualando-se as demais (Fig. 4). Tendência semelhante foi observada para *E. intestinalis*, cuja multiplicação aumentou nas células H292 em meio enriquecido com glicose, independentemente do MOI (Fig. 5).

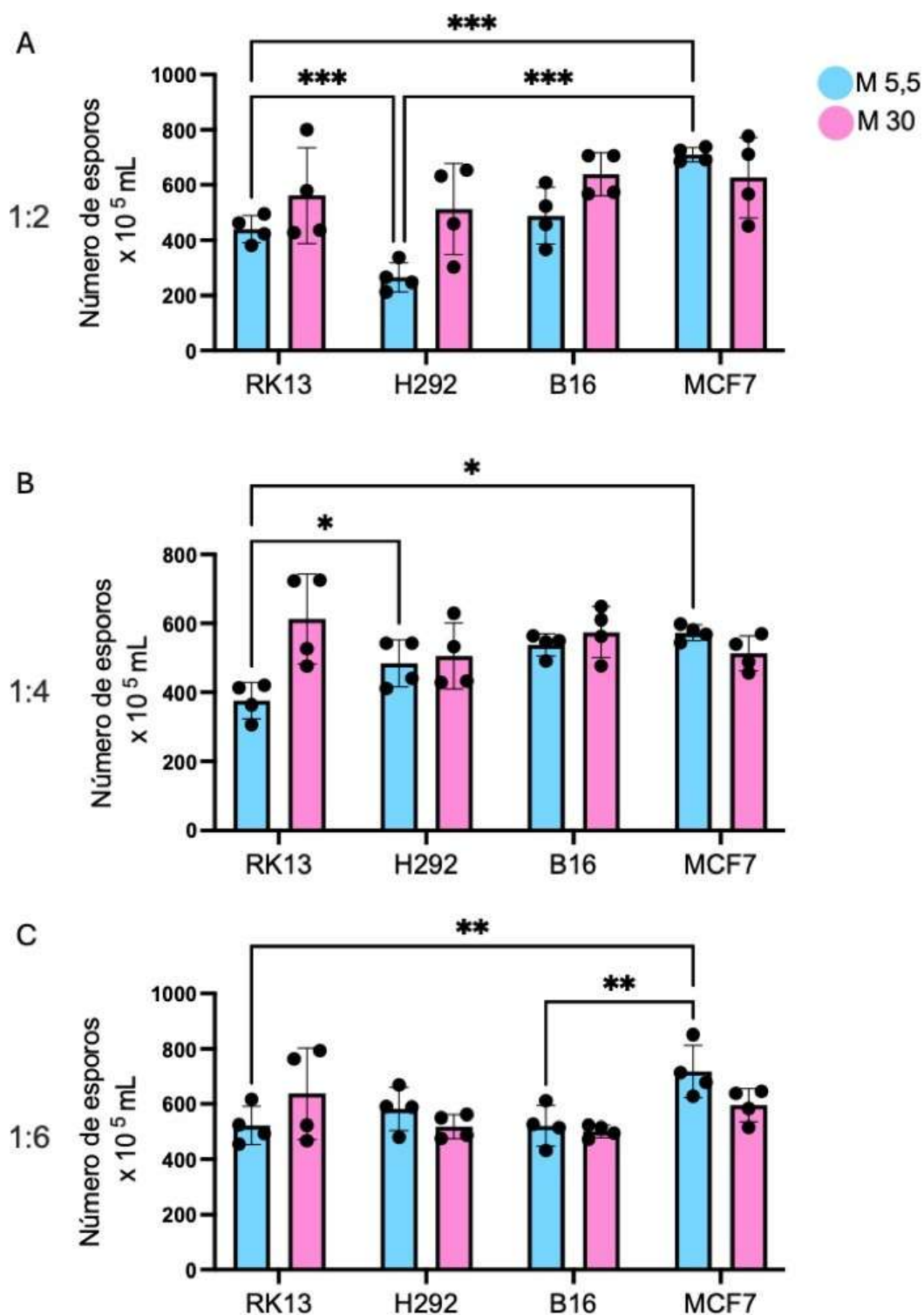


Figura 4. Carga fúngica mensurada nas diferentes células cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. cuniculi*. (A) MOI 1:2. (B) MOI 1:4. (C) MOI 1:6. Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ ($n=4$).

Adicionalmente, observou-se que a linhagem MCF7 apresentou maior multiplicação de esporos de ambas as espécies em meio M5,5 (Fig. 4 e 5). Para *E. cuniculi*, essa superioridade foi consistente em todos os MOIs, com destaque para o MOI 2 (Fig. 4A). De forma semelhante, *E. intestinalis* apresentou maior produção de esporos em MCF7 no MOI 2 em meio padrão (Fig. 5A), embora essa diferença tenha diminuído nos MOIs mais elevados, especialmente em comparação com a linhagem RK13 (Fig. 5B e 5C).

Em conjunto, os resultados indicam que em condições de glicose basal a linhagem MCF7 favoreceu a maior produção de esporos, particularmente no MOI 2, enquanto a linhagem H292 apresentou maior responsividade ao aumento da concentração de glicose no meio.

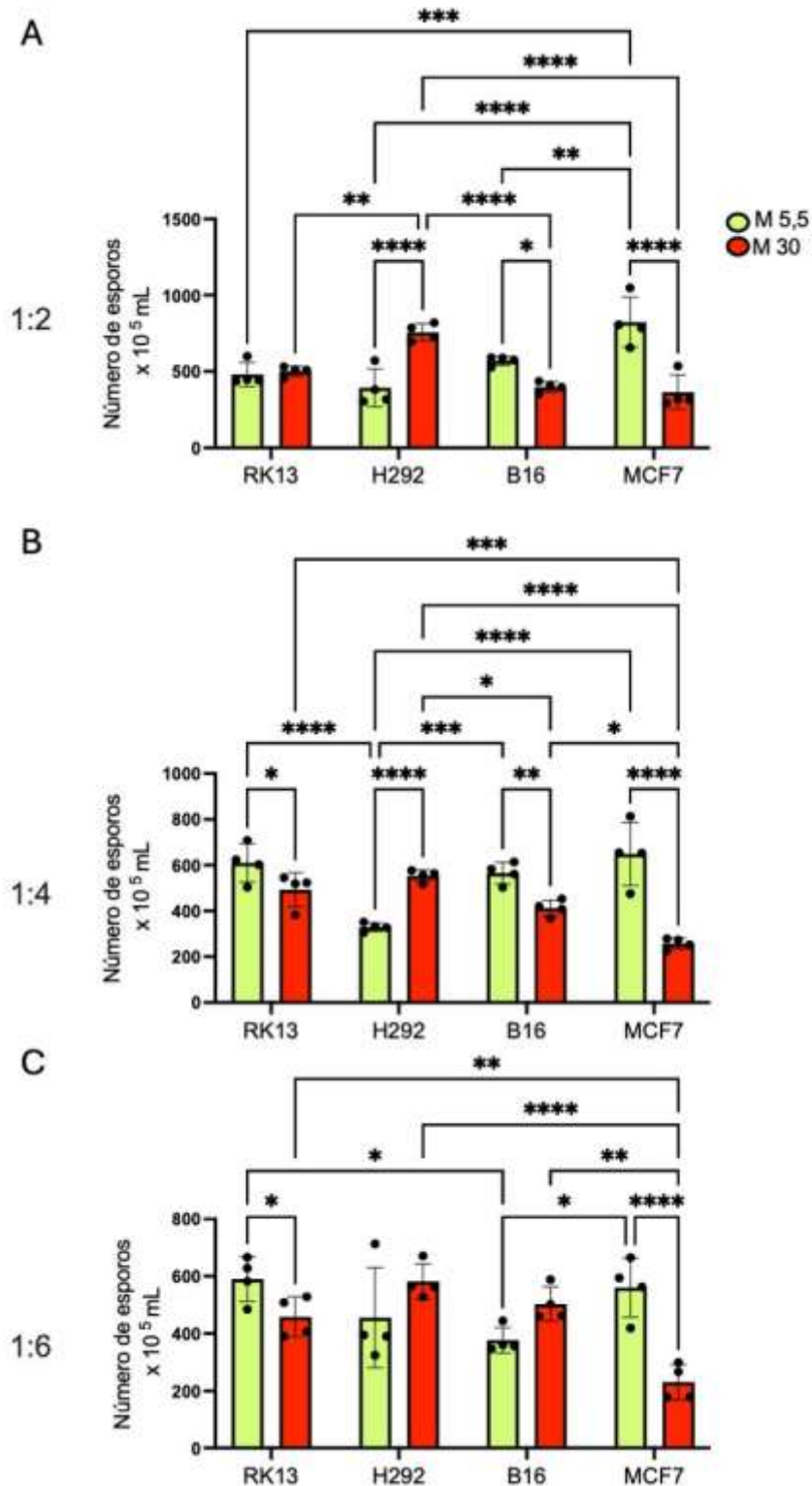


Figura 5. Carga fúngica mensurada nas diferentes células cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. intestinalis*. (A) MOI 1:2. (B) MOI 1:4. (C) MOI 1:6. Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ ($n=4$).

3.2 Análise comparativa da produção de esporos de *E. cuniculi* e *E. intestinalis* nas diferentes células e condições de cultivo

A multiplicação de esporos das duas espécies de *Encephalitozoon* nas células RK13 apresentou-se em média entre 400 a 600 $\times 10^5$ esporos/mL, com duas diferenças expressivas, no meio M5,5 a carga fúngica foi maior para *E. intestinalis* em MOI 4 e, no meio M30, a produção de esporos foi maior para *E. cuniculi* em MOI 6 (Fig. 6A). Ao avaliar a produção de esporos em células H292 constatamos maior variação nas médias de esporos contabilizados, entre 200 a 800 $\times 10^5$ esporos/mL (Fig. 6B). A maior produção de esporos (800 $\times 10^5$ esporos/mL) foi observada para *E. intestinalis* em MOI 2 e em meio M30. Para a linhagem B16F10, a multiplicação de esporos das duas espécies de *Encephalitozoon* foi em média de 400 a 600 $\times 10^5$ esporos/mL, sendo no meio M30 a produção de *E. cuniculi* foi maior nos MOIs 2 e 4 (Fig. 6C). No caso das células MCF7, a suplementação de glicose afetou negativamente a produção de esporos de *E. intestinalis* com produções em média de 200 a 300 $\times 10^5$ esporos/mL, nas demais condições a carga fúngica foi superior a 500 $\times 10^5$ esporos/mL (Fig. 6D).

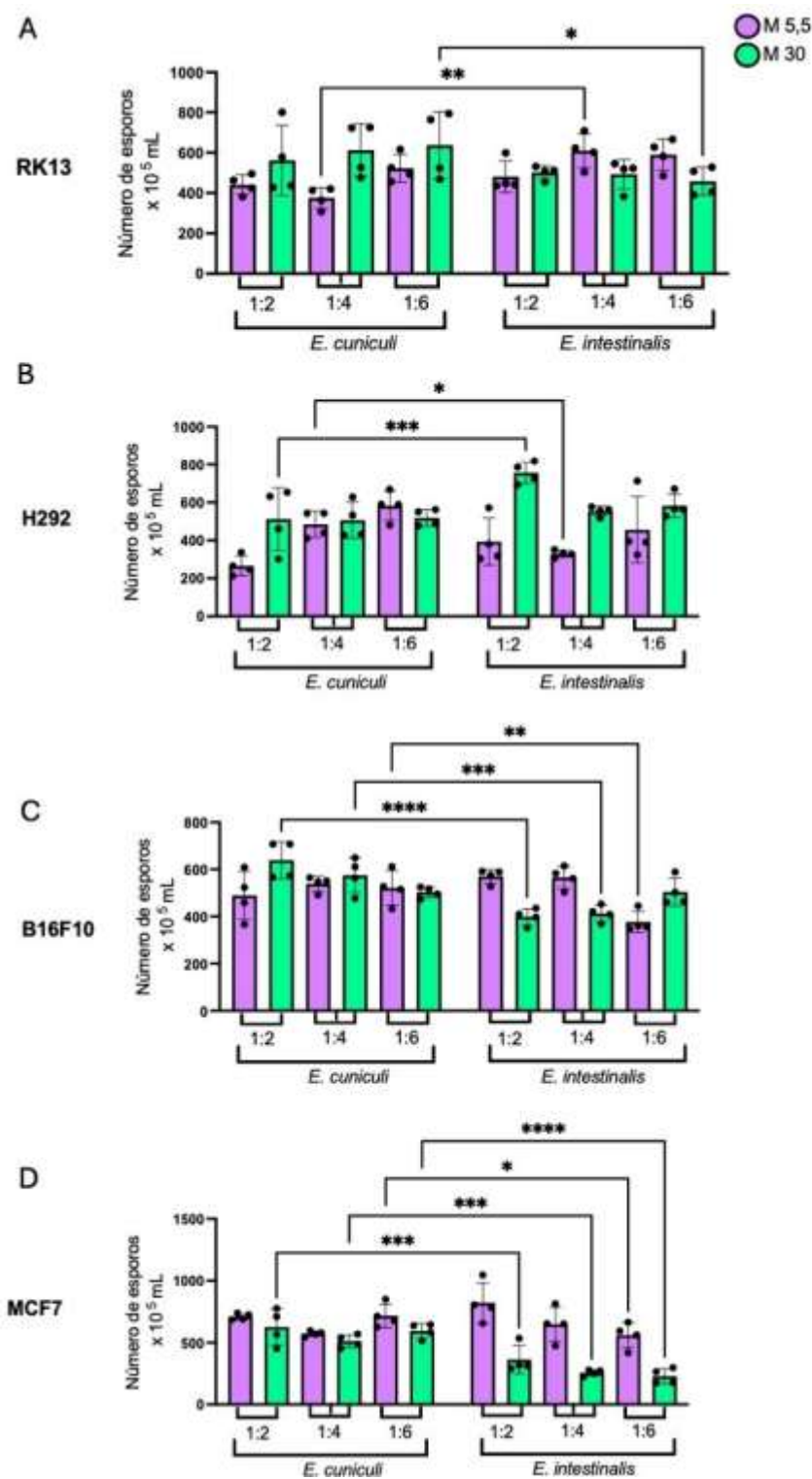


Figura 6. Comparação da carga fúngica mensurada nas diferentes células cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. cuniculi* ou *E. intestinalis*. (A) RK13. (B) NCI-H292. (C) B16F10. (d) MCF7. Análise de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ ($n=4$).

3.3 A viabilidade e o tipo de morte celular variou em função da linhagem e da suplementação de glicose

A linhagem RK13 apresentou os maiores índices de viabilidade, entre 60% e 90%, especialmente em meio M5,5 no MOI 6. As células H292 (Fig. 7B) e B16F10 (Fig. 7C) exibiram viabilidade média em torno de 50%. Já a linhagem MCF7 apresentou padrão semelhante ao de RK13, com valores entre 60% e 80%; contudo, observou-se redução da viabilidade em meio M30 no MOI 6 (Fig. 7D).

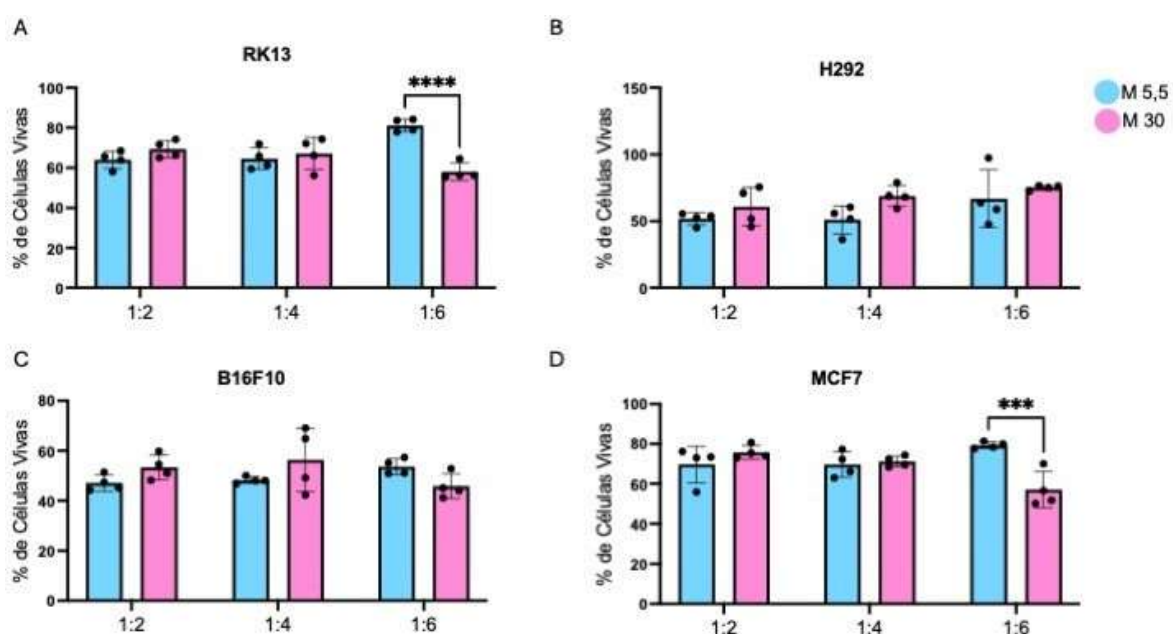


Figura 7. Análise de viabilidade das diferentes células cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. cuniculi*. (A) Linhagem RK13. (B) Linhagem NCI-H292. (C) Linhagem B16F10. (D) Linhagem MCF7. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ ($n=4$).

No cultivo de *E. intestinalis*, a viabilidade celular apresentou maior variação entre as linhagens (Fig. 8). As células RK13 exibiram viabilidade entre 30% e 60%, com redução nos MOIs 2 e 6 em meio M30 (Fig. 8A). As células H292

mantiveram viabilidade em torno de 40%, independentemente do meio ou do MOI (Fig. 8B). Na linhagem B16F10, a viabilidade variou entre 40% e 50%, com redução associada à suplementação com glicose (Fig. 8C). Em contraste, as células MCF7 apresentaram maior viabilidade em meio M30 em todos os MOIs, mantendo valores entre 60% e 80% (Fig. 8D).

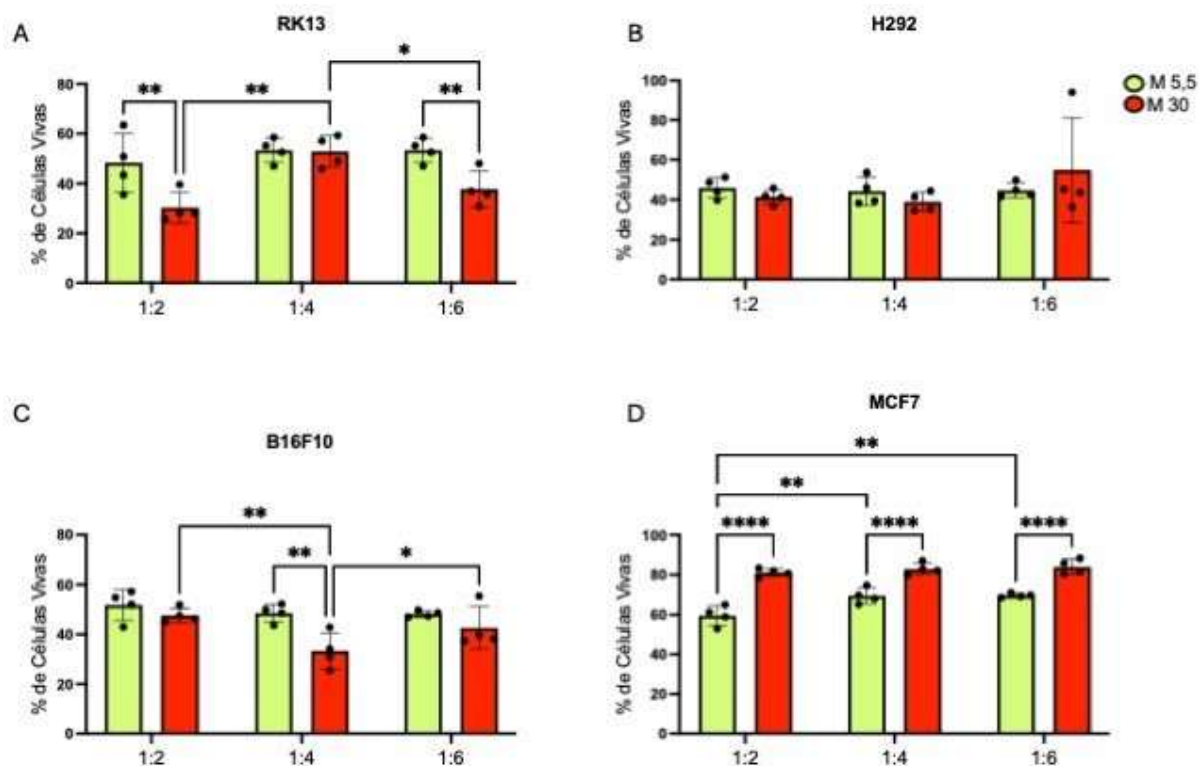


Figura 8. Análise de viabilidade das diferentes células cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. intestinalis*. (A) Linhagem RK13. (B) Linhagem NCI-H292. (C) Linhagem B16F10. (D) Linhagem MCF7. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ ($n=4$).

Também mensuramos a morte das linhagens celulares frente ao cultivo com M5,5 ou M30 e o desafio com as duas espécies de microsporídios. Ao desafiar as linhagens com *E. cuniculi* observou-se que os percentuais de necrose das células RK13 ficaram em torno de 30%, com redução expressiva no grupo cultivado com M5,5 desafiados com MOI 6, cerca de 10% (Fig. 9A). Na linhagem H292, os maiores percentuais de necrose ocorreram frente ao cultivo com M30,

atingindo 30% de necrose, ao passo que em meio M5,5 ficaram em torno de 10% (Fig. 9B). Para a linhagem B16F10, os percentuais de necrose ficaram acima de 40% sem diferenças entre o emprego dos meios M5,5 ou M30 e os MOIs (Fig. 9C). No caso das células MCF7, os percentuais de necrose ficaram abaixo de 15% em todas as condições, com diferença no MOI 6 em relação ao meio, sendo maior a necrose mediante o uso de meio M30 (Fig. 9D). Em geral, as porcentagens de apoptose e a apoptose tardia foram baixas com destaque para a linhagem H292, que apresentou percentual de apoptose e apoptose tardia entre 10 e 30% em meio M5,5 (Fig. Supl. 1, 2). Também identificou-se maiores percentuais de apoptose tardia nas células MCF7 (Fig. Supl. 1, 2).

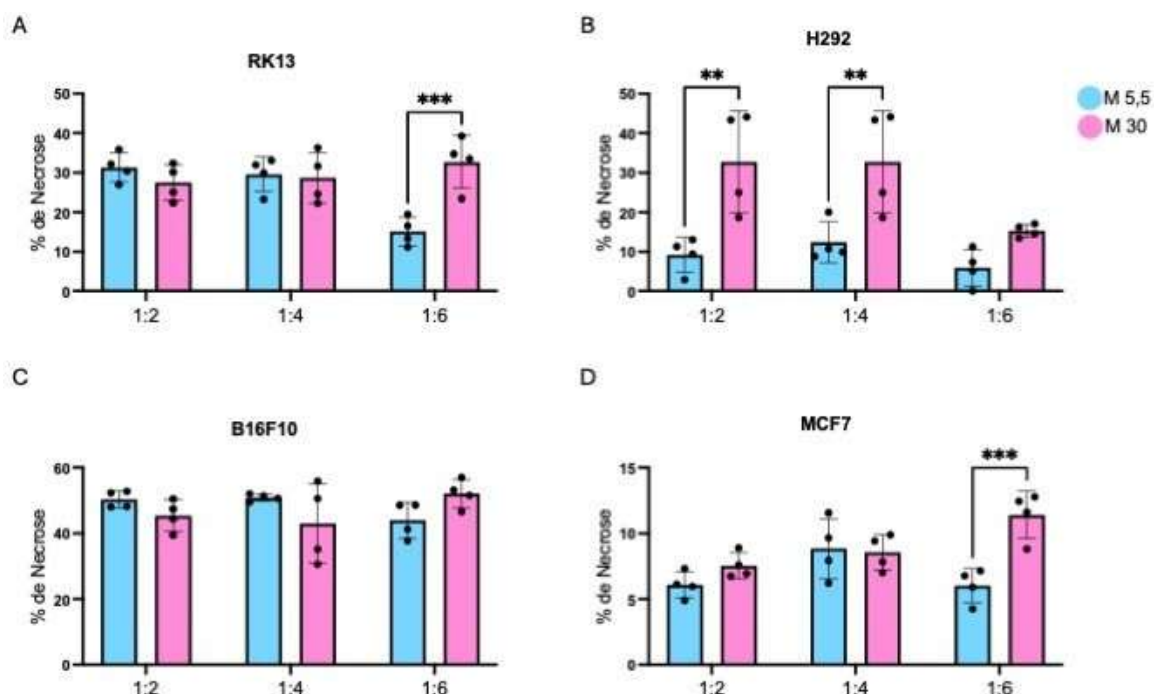


Figura 9. Análise de morte por necrose das diferentes células cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. cuniculi*. (A) Linhagem RK13. (B) Linhagem NCI-H292. (C) Linhagem B16F10. (D) Linhagem MCF7. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ ($n=4$).

Os percentuais de necrose ficaram abaixo de 15% nas células RK13 desafiadas com *E. intestinalis* (Fig. 10A). Para a linhagem H292, a suplementação de glicose reduziu o percentual de necrose em todos os MOIs

(Fig. 10B), permanecendo abaixo de 15%, enquanto que na condição M5,5 os percentuais foram superiores a 20%. Entretanto, essa linhagem apresentou aumento de morte por apoptose e apoptose tardia, especialmente no cultivo com meio M30 (Fig. Supl. 3, 4). Já nas células B16F10, o percentual de necrose variou de 20 a 45%, com maior necrose nas células cultivadas com M30 no MOI 6 (Fig. 10C). Para a linhagem MCF7, os percentuais de necrose foram inferiores a 10% com registros menor percentual nos cultivos com meio M30 (Fig. 10D). Os percentuais de apoptose e apoptose tardia para as demais linhagens, RK13, B16F10 e MCF7, foram inferiores a 10% (Fig. Supl. 3, 4).

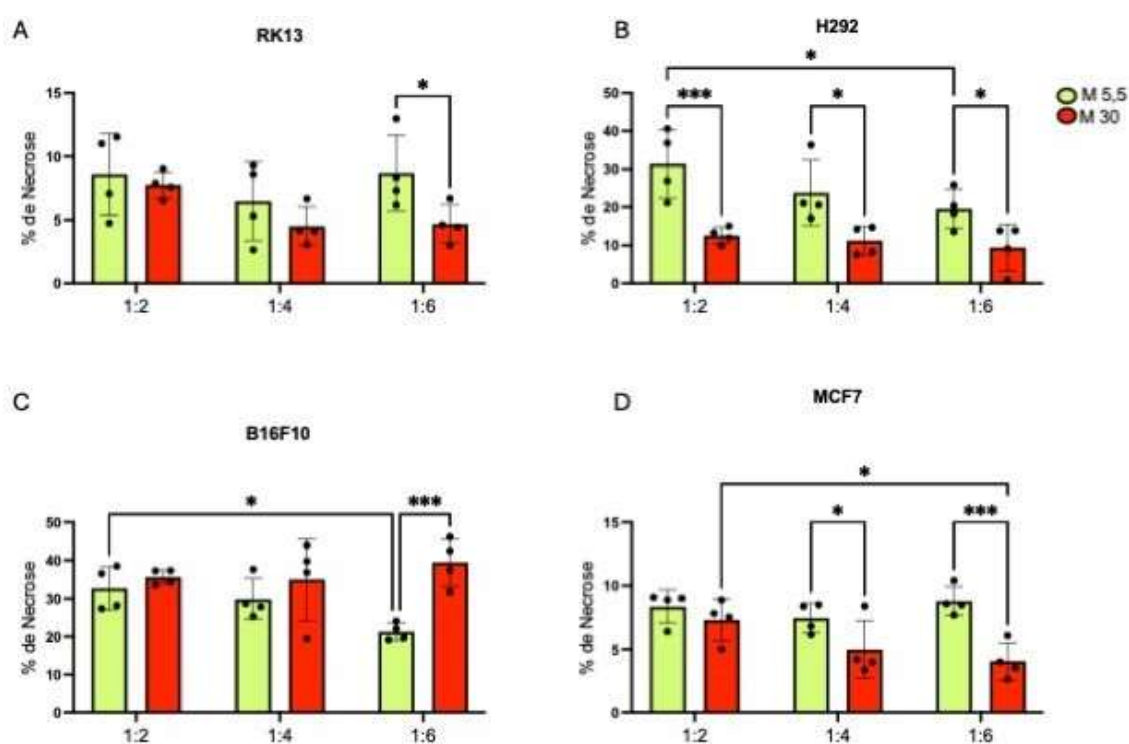


Figura 10. Análise de morte por necrose das diferentes células cultivadas com RPMI suplementado com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. intestinalis*. (A) Linhagem RK13. (B) Linhagem NCI-H292. (C) Linhagem B16F10. (D) Linhagem MCF7. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$ ($n=4$).

3.4 Resumo dos principais resultados

Os principais resultados estão reunidos na figura 11. Em conjunto, esses resultados demonstram que a interação entre concentração de glicose, linhagem

celular e espécie de *Encephalitozoon* determina de forma complexa a eficiência da multiplicação fúngica, destacando o papel central do metabolismo da célula hospedeira nesse processo.

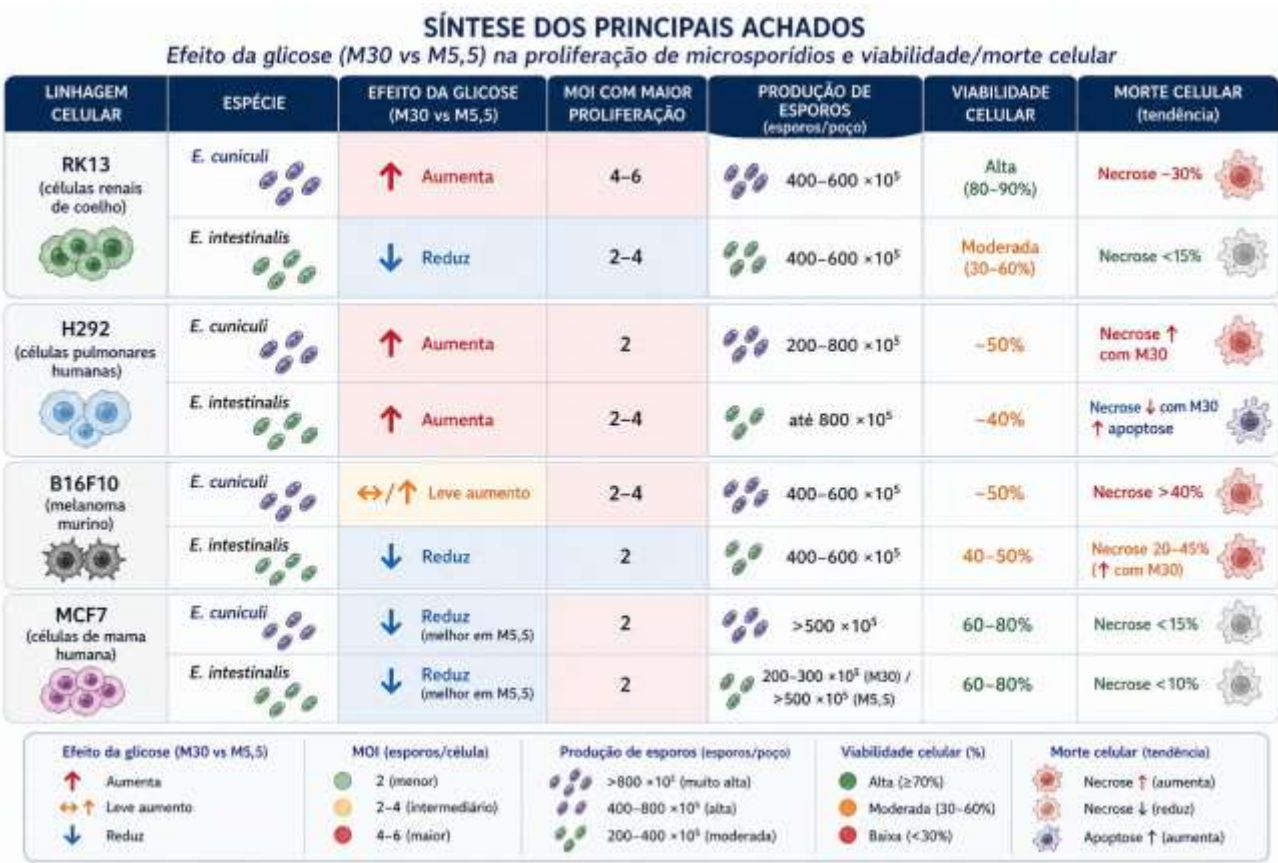


Figura 11. Síntese dos principais resultados observados nesse estudo. (Elaborado pela autora com auxílio de ferramentas de inteligência artificial generativa ChatGPT, OpenAI).

4. Discussão

Os microsporídios são fungos intracelulares que apresentam maquinaria metabólica extremamente reduzida, sendo incapazes de produzir seu próprio ATP, assim para sustentar seu crescimento e a produção de esporos sequestram as vias energéticas e os nutrientes da célula hospedeira (Timofeev et al. 2020). Os resultados do presente estudo demonstraram que a disponibilidade de glicose no meio de cultura exerce influência direta sobre a multiplicação de *E. cuniculi* e *E. intestinalis*, de forma dependente da linhagem celular. Observou-se

que a linhagem H292 apresentou aumento consistente na produção de esporos em condições de alta concentração de glicose, enquanto outras linhagens, como MCF7, apresentaram resposta oposta, com melhor desempenho em concentrações basais de glicose. Ao contrário da nossa hipótese inicial, o presente estudo mostrou que a maior oferta de glicose não resultou diretamente em maior multiplicação de esporos.

A linhagem H292 apresentou aumento consistente na produção de esporos em condições de alta concentração de glicose para espécie *E. intestinalis*, independente do MOI, sugerindo que o acréscimo desse substrato poderia intensificar o fluxo glicolítico e a disponibilidade de intermediários metabólicos, criando um ambiente intracelular mais permissivo à replicação fúngica. Esse comportamento também poderia ser atribuído a um fenótipo metabólico predominantemente glicolítico, frequentemente associado ao efeito de *Warburg*, no qual a elevada captação de glicose sustenta a produção de ATP (Chanda et al. 2023).

Por sua vez, a linhagem MCF7 apresentou melhor desempenho em condições de glicose basal, em especial para *E. intestinalis*, indicando que a suplementação glicídica não se traduz necessariamente em maior suporte energético aos fungos. A linhagem MCF7 apresenta um perfil metabólico caracterizado por elevada flexibilidade bioenergética, no qual a fosforilação oxidativa desempenha papel central na produção de ATP, complementada por uma glicólise moderada e altamente regulada (Wang et al. 2020). Diferentemente de linhagens com predominância glicolítica, a MCF7 mantém mitocôndrias funcionalmente ativas e depende significativamente da oxidação de substratos alternativos, como glutamina e ácidos graxos, para sustentar seu metabolismo energético e biossintético (Drabovicha and Pavlou 2012). Além disso, *E. intestinalis* atua remodelando as mitocôndrias da célula hospedeira, promovendo sua fragmentação e estreita associação com os vacúolos parasitóforos, o que é consistente com um intenso intercâmbio metabólico (Antão et al. 2023). Assim, esses resultados sugerem que em células com metabolismo mais equilibrado e eficiente, a permissividade à infecção está mais associada à organização interna do metabolismo do que à simples abundância de substratos energéticos.

A linhagem B16F10 apresenta um perfil metabólico caracterizado por intensa atividade glicolítica, associada a elevada captação de glicose e produção de lactato, típico de tumores altamente agressivos (Zhuo et al. 2020). No entanto, esse metabolismo é frequentemente acompanhado por menor eficiência bioenergética e maior instabilidade celular, com aumento de estresse oxidativo e morte celular (Fischer et al. 2018). Os resultados desse estudo mostraram que as células B16F10 exibiram um perfil intermediário, com menor responsividade às variações na concentração de glicose e elevada taxa de necrose, o que pode comprometer a eficiência da replicação parasitária. A alta taxa de morte celular sugere um ambiente intracelular menos estável, possivelmente associado a estresse metabólico ou inflamatório, limitando a capacidade do parasita de completar seu ciclo replicativo (Fernandes and Zamboni et al. 2024). Nesse contexto, mesmo na presença de substratos energéticos adequados, a integridade funcional da célula hospedeira parece ser um fator limitante para a multiplicação de *Encephalitozoon*. Assim, os resultados sugerem que a eficiência do sistema hospedeiro-parasita depende não apenas da disponibilidade de nutrientes, mas também da estabilidade metabólica e estrutural da célula infectada, particularmente em linhagens com maior propensão à necrose.

A linhagem RK13 apresentou um comportamento claramente dependente da espécie de *Encephalitozoon*, com aumento da multiplicação de *E. cuniculi* em condições de alta glicose e redução para *E. intestinalis*, indicando diferenças intrínsecas na forma como essas espécies exploram o metabolismo da célula hospedeira. *E. cuniculi* e *E. intestinalis* têm genomas extremamente compactos e muito semelhantes no “núcleo” cromossômico, compartilhando praticamente o mesmo conjunto básico de genes. Contudo, *E. intestinalis* perdeu grandes blocos subteloméricos presentes no *E. cuniculi*, resultando em um genoma cerca de 20% menor, mas sem repercussão no repertório funcional básico (Sobottka et al. 1999; Corradi et al. 2010). *E. cuniculi* perdeu a maior parte das vias de produção de ATP e depende diretamente da importação de nucleotídeos energéticos por meio de transportadores especializados localizados na sua superfície, tornando-se altamente sensível à disponibilidade energética da célula infectada (Tsaousis et al. 2008). Além disso, *E. cuniculi* é capaz de reorganizar o

ambiente intracelular, recrutando mitocôndrias do hospedeiro para regiões próximas ao vacúolo parasitóforo, onde a presença de proteínas como VDAC favorece a transferência de ATP (Hacker et al. 2014).

Não existem informações sobre as variações metabólicas entre as duas espécies de *Encephalitozoon*, porém é plausível supor as diferenças genéticas possam refletir no metabolismo, pois esses fungos têm genomas muito reduzidos e qualquer ganho ou perda de genes pode ter impacto metabólico e funcional. Assim, as diferenças observadas na multiplicação de *E. intestinalis* e *E. cuniculi* nas linhagens celulares cultivadas sob diferentes concentrações de glicose, como observado na H292 e RK13, também possam ser decorrentes de diferenças no metabolismo do microsporídio.

Nesse contexto, o aumento da concentração de glicose no meio poderia intensificar o metabolismo celular, elevando a produção de ATP e de intermediários metabólicos derivados da glicólise, que são então explorados pelo parasita. Dessa forma, em uma linhagem permissiva como RK13, o aumento da glicose provavelmente amplia a disponibilidade de recursos metabólicos acessíveis ao parasita, favorecendo sua replicação e resultando em maior produção de esporos. Em contraste, a redução do número de esporos de *E. intestinalis* em alta glicose sugere que essa espécie requer um ambiente metabólico mais restrito ou finamente regulado, sendo mais sensível a alterações no equilíbrio energético e redox da célula. Esse padrão reforça a hipótese de que *E. intestinalis* apresenta maior dependência de interações metabólicas específicas (Corradi et al. 2010), como aquelas envolvendo mitocôndrias, e pode não se beneficiar de forma direta do aumento indiscriminado de substratos energéticos.

Em relação ao MOI, os resultados indicam que cargas infecciosas mais baixas favorecem a multiplicação de *Encephalitozoon*, uma vez que o MOI 2 promoveu consistentemente maior produção de esporos, especialmente nas linhagens NCI-H292 e MCF7. Em contraste, o aumento do MOI não resultou em incremento proporcional da replicação parasitária, sugerindo a existência de um limiar ótimo de infecção. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de

que cargas infecciosas elevadas impõem maior demanda metabólica à célula hospedeira, levando a um desequilíbrio energético e ao esgotamento de recursos essenciais, como ATP e precursores biossintéticos, dos quais os microsporídios são altamente dependentes (Luo et al. 2021; Luo et al. 2022) . Além disso, infecções mais intensas podem desencadear estresse celular, incluindo disfunção mitocondrial, acúmulo de metabólitos tóxicos e ativação de vias de morte celular, comprometendo a capacidade do parasita de completar seu ciclo replicativo (Li et al. 2018; Silva et al. 2025). Dessa forma, os dados sugerem que a produção de esporos de *Encephalitozoon* depende de um equilíbrio entre carga infecciosa e capacidade metabólica da célula hospedeira, no qual níveis moderados de infecção permitem a exploração otimizada dos recursos celulares, enquanto cargas elevadas resultam em um ambiente menos permissivo ao desenvolvimento do patógeno.

Foi observada dissociação entre viabilidade celular e produção de esporos, o que sugere que a replicação de *Encephalitozoon* não está diretamente condicionada apenas à sobrevivência global da célula hospedeira, mas sim à sua competência metabólica e funcional durante a infecção. Embora a viabilidade tenha se mantido relativamente estável na maioria das condições, os diferentes padrões de morte celular entre as linhagens indicam que a qualidade do ambiente intracelular exerce papel mais relevante do que a simples integridade celular. Nesse contexto, a elevada necrose observada na linhagem B16F10 pode comprometer a replicação parasitária ao gerar um ambiente desorganizado, com perda de homeostase metabólica, liberação de conteúdo citoplasmático e redução da disponibilidade controlada de recursos energéticos. Para *T. gondii*, foi observada redução da carga parasitária em macrófagos após indução de necroptose (Erazo and Knoll, 2025). A necrose por estresse metabólico está ligada a perda de homeostase energética (crise de ATP/NAD⁺) e desorganização de organelas (Lee et al. 2018).

A linhagem MCF7 é conhecida por apresentar deficiência de caspase-3, o que compromete a execução da apoptose clássica e favorece a ativação de mecanismos alternativos de morte celular, como processos do tipo “cell-in-cell”

(Wang et al. 2016). Como consequência, a morte celular tende a ocorrer de forma mais lenta e menos eficiente, permitindo a manutenção da integridade estrutural e metabólica da célula por períodos mais prolongados. Esse perfil pode contribuir para a criação de um ambiente intracelular mais estável e funcional, favorecendo a replicação de parasitas intracelulares. Tal interpretação é consistente com os resultados observados no presente estudo, nos quais a linhagem MCF7 apresentou maior viabilidade e sustentou elevada produção de esporos em condições basais, reforçando que não apenas o metabolismo, mas também os mecanismos de morte celular da célula hospedeira desempenham papel importante na modulação da multiplicação de *Encephalitozoon*.

Já a linhagem NCI-H292 apresentou maior envolvimento de apoptose, especialmente em condições de alta glicose, o que pode refletir um estado de estresse metabólico associado à intensa atividade glicolítica. Diferentemente da necrose, a apoptose é um processo mais controlado, podendo inicialmente preservar a integridade estrutural da célula e permitir a continuidade da replicação parasitária em fases iniciais da infecção (Fernandes and Zamboni 2024). No entanto, sua progressão pode limitar a produção de esporos em estágios tardios. Em conjunto, esses dados indicam que diferentes modalidades de morte celular impactam de forma distinta a replicação de microsporídios, sendo a estabilidade metabólica e estrutural da célula hospedeira um fator crítico para a eficiência do ciclo parasitário.

5. Conclusão

Os resultados demonstram que a multiplicação de *E. cuniculi* e *E. intestinalis* foi modulada de forma dependente da linhagem celular hospedeira e da disponibilidade de glicose no meio de cultura. A linhagem NCI-H292 apresentou maior responsividade à suplementação de glicose, com aumento consistente na produção de esporos, enquanto a linhagem MCF7 favoreceu a multiplicação em condições basais de glicose. Além disso, foram observadas diferenças relevantes entre as espécies de *Encephalitozoon*, especialmente na

resposta à glicose. O MOI 2 mostrou-se a condição mais favorável para a replicação parasitária, independentemente da linhagem.

Declaração de uso de IA Generativa

Durante a preparação do texto final, os autores utilizaram OpenAI e Elicit com o objetivo de organizar a apresentação final do trabalho e ampliar alcance das buscas de artigos e publicações científicas.

Referências

- Antão, N. V., Lam, C., Davydov, A., et al. 2023. 3D reconstructions of parasite development and the intracellular niche of *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat Commun* 14:7662. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43215-0>
- Chanda, M., Anuntasomboon, P., Ruangritchankul, K., Cheepsunthorn, P., & Cheepsunthorn, C. L. 2023. Inhibition of NSCLC proliferation through targeting G6PD. *PeerJ* 11:e16503. <https://doi.org/10.7717/peerj.16503>
- Corradi, N., Pombert, J. F., Farinelli, L., Didier, E. S., & Keeling, P. J. 2010. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat Commun* 1:77. <https://doi.org/10.1038/ncomms1082>
- Drabovich, A. P., Pavlou, M. P., Dimitromanolakis, A., & Diamandis, E. P. 2012. Quantitative analysis of energy metabolic pathways in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 11:422–434. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015214>
- Erazo, B. J., & Knoll, L. J. 2025. Induced necroptosis limits *Toxoplasma gondii* replication in a RIPK3/MLKL-dependent manner. *Infect Immun* 93:e00479-25. <https://doi.org/10.1128/iai.00479-25>
- Farhadi, P., Yarani, R., Dokaneheifard, S., Mansouri, K. 2020. The emerging role of targeting cancer metabolism for cancer therapy. *Tumour Biol. Oct* 42(10):1010428320965284. doi: 10.1177/1010428320965284.

- Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. 2020. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science* 368:eaaw5473. <https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>
- Fernandes, J. C. R., & Zamboni, D. S. 2024. Mechanisms regulating host cell death during *Leishmania* infection. *mBio* 15:e01980-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.01980-23>
- Fischer, G. M., Vashisht Gopal, Y. N., McQuade, J. L., Peng, W., DeBerardinis, R. J., & Davies, M. A. 2018. Metabolic strategies of melanoma cells: mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. *Pigment Cell Melanoma Res* 31:11–30. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12661>
- Francisco Neto, A., Dell'Armeline Rocha, P. R., Perez, E. C., Xavier, J. G., Peres, G. B., Spadacci-Morena, D. D., Alvares-Saraiva, A. M., & Lallo, M. A. 2017. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *PLoS One* 12:e0186954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186954>
- Hacker, C., Howell, M., Bhella, D., & Lucocq, J. 2014. Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Cell Microbiol* 16:565–579. <https://doi.org/10.1111/cmi.12240>
- Han, B., & Weiss, L. M. 2017. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiol Spectr* 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016>
- Han, B., Pan, G., & Weiss, L. M. 2021. Microsporidiosis in humans. *Clin Microbiol Rev* 34:e00010-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-20>
- Han, Y., Gao, H., Xu, J., Luo, J., Han, B., Bao, J., Pan, G., Li, T., & Zhou, Z. 2020. Innate and adaptive immune responses against microsporidia infection in mammals. *Front Microbiol* 11:1468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01468>
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., et al. 2016. A eukaryote without a mitochondrial organelle. *Curr Biol* 26:1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.053>

- Lee, S. Y., Ju, M. K., Jeon, H. M., Jeong, E. K., Lee, Y. J., Kim, C. H., Park, H. G., Han, S. I., & Kang, H. S. 2018. Regulation of tumor progression by programmed necrosis. *Oxid Med Cell Longev* 2018:3537471. <https://doi.org/10.1155/2018/3537471>
- Li, Z., Wang, Y., Wang, L., & Zhou, Z. 2018. Molecular and biochemical responses in the midgut of the silkworm *Bombyx mori* infected with *Nosema bombycis*. *Parasit Vectors* 11:147. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2755-2>
- Luo, J., He, Q., Xu, J. Z., Xu, C., Han, Y. Z., Gao, H. L., Meng, X. Z., Pan, G. Q., Li, T., & Zhou, Z. Y. 2021. Microsporidia infection upregulates host energy metabolism but maintains ATP homeostasis. *J Invertebr Pathol* 186:107596. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107596>
- Luo, J., Xu, J., Xie, C., Zhao, Z., Guo, J., Wen, Y., Li, T., & Zhou, Z. 2022. Microsporidia promote host mitochondrial fragmentation by modulating DRP1 phosphorylation. *Int J Mol Sci* 23:7746. <https://doi.org/10.3390/ijms23147746>
- Magalhães, T. R., Pinto, F. F., & Queiroga, F. L. 2022. A multidisciplinary review about *Encephalitozoon cuniculi* in a One Health perspective. *Parasitol Res* 121:2463–2479. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07562-z>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. 2021. Cancer metabolism: looking forward. *Nat Rev Cancer* 21:669–680. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00378-6>
- Martin, S.D., McGee, S.L. 2019. A systematic flux analysis approach to identify metabolic vulnerabilities in human breast cancer cell lines. *Cancer Metab*. 7:12. doi: 10.1186/s40170-019-0207-x.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., & Saavedra, E. 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J* 274:1393–1418. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>
- Seatamanoch, N., Kongdachalert, S., Sunantaraporn, S., Siriyasatien, P., & Brownell, N. 2022. Microsporidia: a highly adaptive organism and its host expansion to humans. *Front Cell Infect Microbiol* 12:924007. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.924007>

Silva, L. M., Vallat, A., & Koella, J. C. 2025. Mechanisms of host exploitation by a microsporidian parasite. *Proc Biol*

*Sci*292:20251123. <https://doi.org/10.1098/rspb.2025.1123>

Sobottka, I., Albrecht, H., Visvesvara, G. S., Pieniazek, N. J., Deplazes, P., Schwartz, D. A., Laufs, R., & Elsner, H. A. 1999. Inter- and intra-species karyotype variations among microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Scand J Infect Dis*31:555–558. <https://doi.org/10.1080/00365549950164427>

Timofeev, S., Tokarev, Y., & Dolgikh, V. 2020. Energy metabolism and its evolution in Microsporidia. *Parasitol Res*119:1433–1441. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06657-9>

Tsaousis, A. D., Kunji, E. R., Goldberg, A. V., Lucocq, J. M., Hirt, R. P., & Embley, T. M. 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 453:553–556. <https://doi.org/10.1038/nature06903>

Wang, S., He, M., Li, L., Liang, Z., Zou, Z., & Tao, A. 2016. Cell-in-cell death is not restricted by caspase-3 deficiency in MCF-7 cells. *J Breast Cancer* 19:231–241. <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.3.231>

Wang, W., Liparulo, I., Rizzardi, N., Bolignano, P., Calonghi, N., Bergamini, C., & Fato, R. 2020. Coenzyme Q depletion reshapes MCF-7 cell metabolism. *Int J Mol Sci* 22:198. <https://doi.org/10.3390/ijms22010198>

Zhuo, M., Gorgun, F. M., Tyler, D. S., & Englander, E. W. 2020. Hypoxia potentiates the capacity of melanoma cells to evade cytotoxicity via glycolytic shift. *FEBS Open Bio* 10:789–801. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12830>

Apendice

Figuras Suplementares

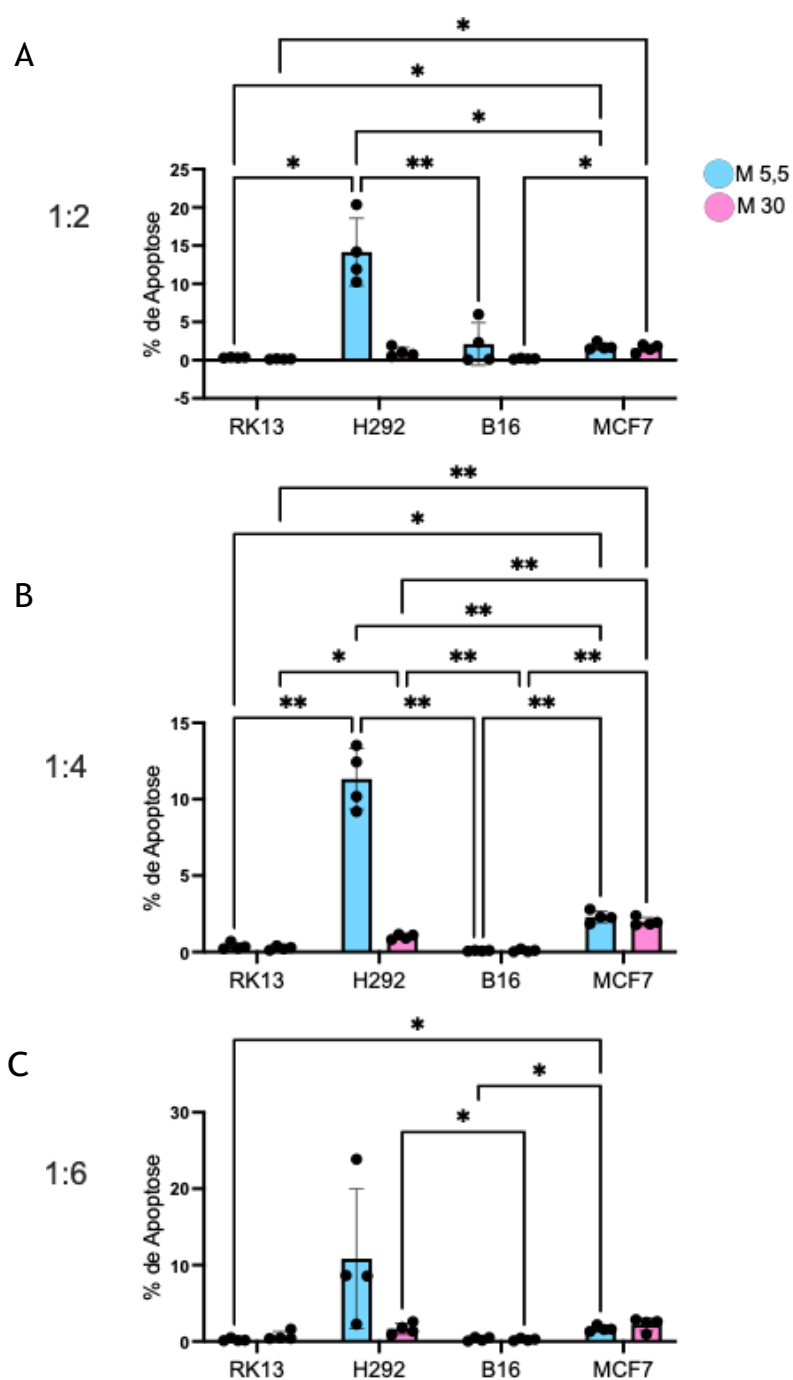


Figura Suplementar 1. Análise de morte por apoptose das diferentes células cultivadas com RPMI suplementados com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. cuniculi*. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$.

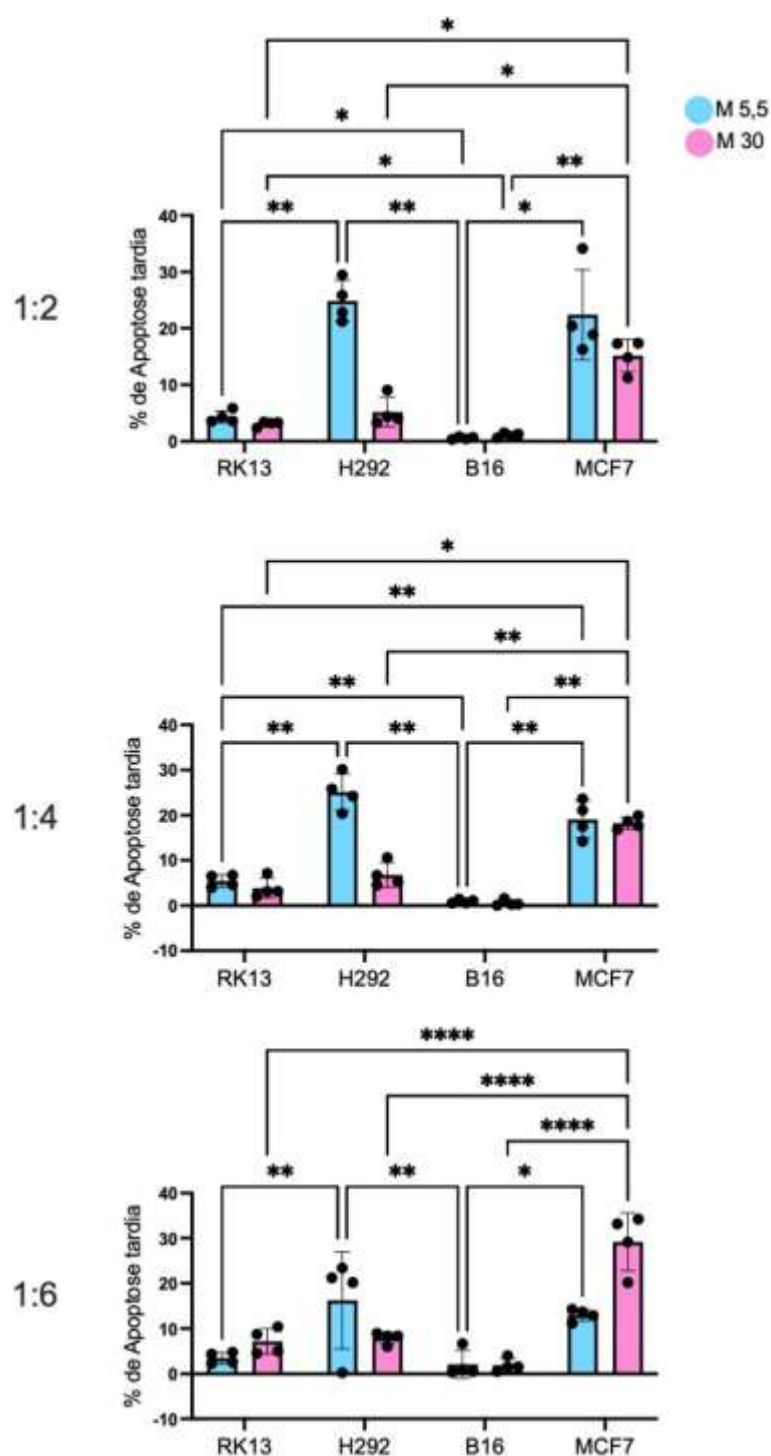


Figura Suplementar 2. Análise de morte por apoptose tardia das diferentes células cultivadas com RPMI suplementados com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. cuniculi*. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$.

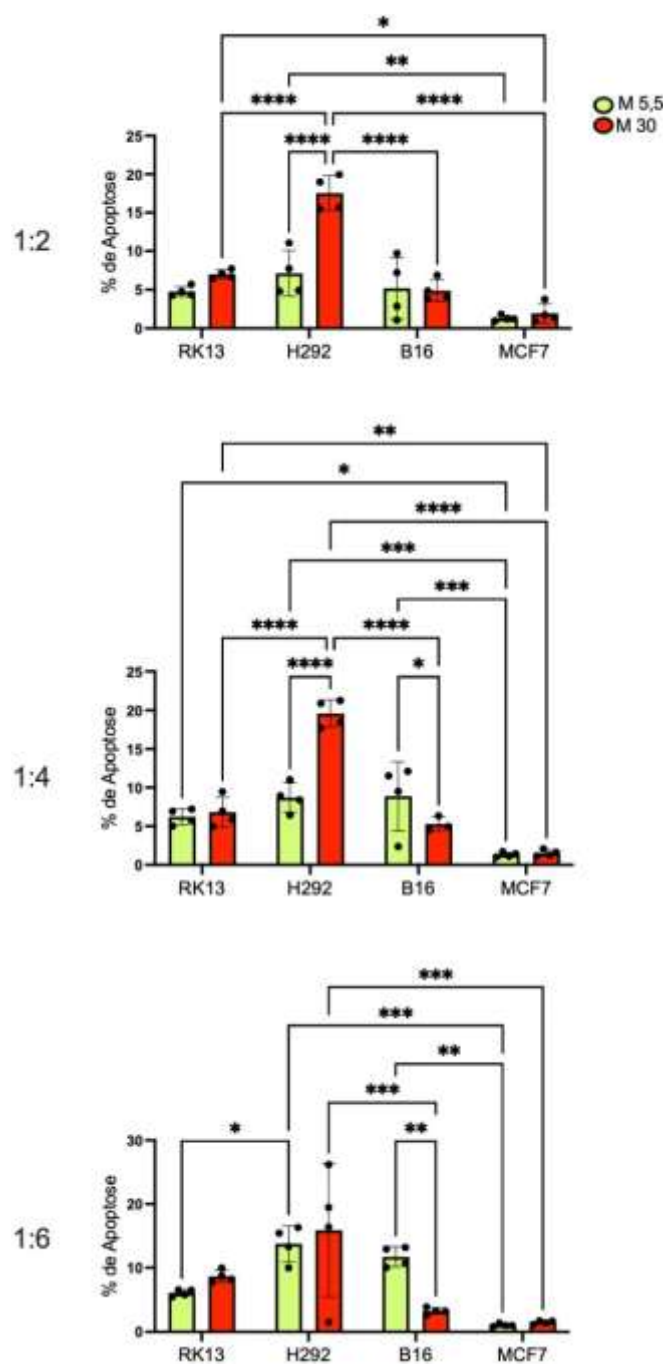


Figura Suplementar 3. Análise de morte por apoptose das diferentes células cultivadas com RPMI suplementados com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. intestinalis*. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$.

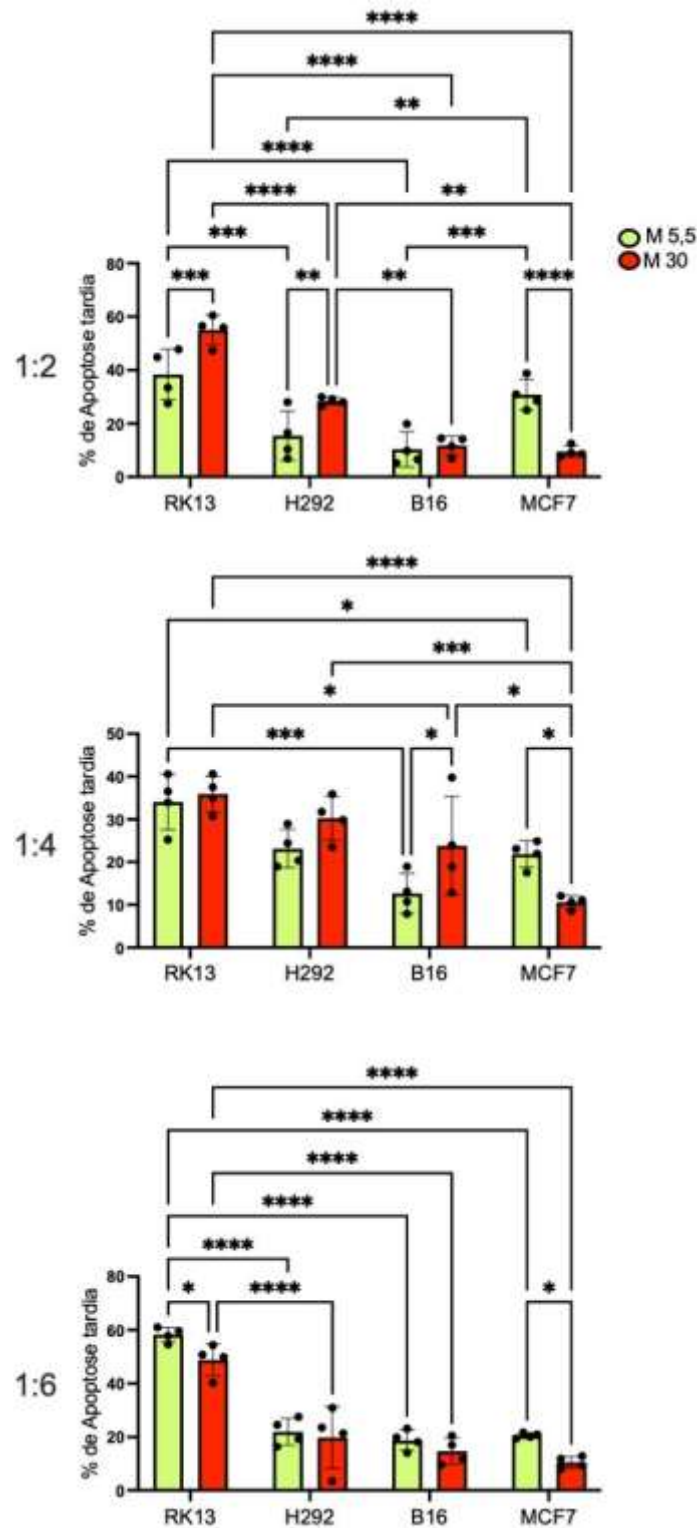


Figura Suplementar 4. Análise de morte por apoptose tardia das diferentes células cultivadas com RPMI suplementados com 5,5 mM de glicose (M5,5) ou com 30 mM de glicose (M30) e desafiadas com esporos de *E. intestinalis*. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$.