

UNIVERSIDADE PAULISTA

**MODELO DE PNEUMONIA INTERSTICIAL
CAUSADA PELO *Encephalitozoon cuniculi*
EM CAMUNDONGOS**

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

IRAMIRTON FIGUERÊDO MOREIRA

**São Paulo
2019**

UNIVERSIDADE PAULISTA

**MODELO DE PNEUMONIA INTERSTICIAL
CAUSADA PELO *Encephalitozoon cuniculi*
EM CAMUNDONGOS**

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

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

IRAMIRTON FIGUERÊDO MOREIRA

São Paulo

2019

Moreira, Iramirton Figuerêdo.

Modelo de pneumonia intersticial causada pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos / Iramirton Figuerêdo Moreira. - 2019.

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

Tese de Doutorado apresentada Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Patogenia das Enfermidades Infecciosas e Parasitárias.

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

1. Ciclofosfamida. 2. *Encephalitozoon cuniculi*. 3. Linfócitos B. 4. Linfócitos T. 5. Macrófagos alveolares. 6. Pneumonia intersticial. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Título.

IRAMIRTON FIGUERÊDO MOREIRA

**MODELO DE PNEUMONIA INTERSTICIAL
CAUSADA PELO *Encephalitozoon cuniculi*
EM CAMUNDONGOS**

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

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Anete Lallo
Universidade Paulista - UNIP

Prof^a. Dr^a. Diva Denelle Spadacci-Morena
Instituto Butantã

Prof. Dr. Adriano Pereira
Centro Universitário São Camilo

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado
Universidade Paulista - UNIP

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista:

Aos meus pais Manoel (*in memorian*) e Perpétua (*in memorian*), base da minha vida, através de seus exemplos, me ensinaram a acreditar e a lutar pelos meus ideais.

À minha esposa Rossana, por ter me apoiado em todos os momentos nessa trajetória, conquista e realização pessoal.

Aos meus filhos, Gabriel, Guilherme e Gustavo, por compreenderem minha ausência em momentos difíceis de aceitar.

Aos meus irmãos Patrício, José Joel e José Maria pelas palavras de apoio e brio.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva maior, a vida, e me guia no dia a dia...

A Professora. Dra. Maria Anete Lallo, por ter aceitado me orientar, acreditado, apoiado, dedicação sempre constante, paciência e brilhantismo inspirador. Muito obrigado.

Aos professores do programa, por tornar possível a realização deste trabalho e por todo conhecimento transmitido; em especial: Prof^a. Dra. Elizabeth Cristina; Prof. Dr. José Guilherme e a Prof^a. Dra. Selene Dall'Acqua.

À Dra. Anuska e Dra. Ronalda pelas orientações e colaboração nos experimentos.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa e do laboratório de Biologia Celular da UNIP que auxiliaram com ideias, conselhos e boas energias: Dra. Fabiana Toshie, Suzana, Cleide, Wilton, Anderson e Sr. Osvaldo.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, em especial à Christina Rodrigues, por ter me ouvido e aconselhado nos momentos difíceis vividos no curso.

Aos meus colegas alunos da UNIP, muito obrigado por toda a força e incentivo: Rodrigo, Jessica, Luciane, Michele, Paloma, Renato Piccolo, Rodrigo, Thiago e Ulisses, um eterno abraço.

Às colegas plantonistas do Hospital Nossa Senhora da Guia, pelas trocas de plantões e palavras de apoio, proporcionando conseguir esta conquista, muito obrigado.

Ao Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares – PROSUP/CAPES, pela Bolsa a mim conferida.

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e à Faculdade de Medicina (FAMED), por minha liberação, essencial ao curso desta pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, pela oportunidade oferecida para concretização deste sonho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Feliz de quem entende que é preciso
mudar muito pra ser sempre o mesmo”.*

(Dom Helder Câmara)

PREFÁCIO

Este volume refere-se à Tese de Doutorado apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor e apresentada à banca examinadora no Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista.

Segundo as normas do Programa, esta tese é apresentada na forma de artigo científico de autoria do aluno e organizado de acordo com as exigências do veículo de publicação científica escolhido.

O periódico escolhido para a submissão foi a *Infection and Immunity* ISSN: 1098-5522, sob o título **Modelo de pneumonia intersticial causada pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos.**

MODELO DE PNEUMONIA INTERSTICIAL CAUSADA PELO *Encephalitozoon cuniculi* EM CAMUNDONGOS

Iramirton Figuerêdo Moreira¹, Anuska Marcelino Alvares-Saraiva¹, Fabiana Toshie de Camargo Konno¹, Elizabeth Cristina Perez Hurtado¹, José Guilherme Xavier¹, Diva Denelle Spadacci-Morena², Ronalda Silva de Araújo³, Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha¹, Maria Anete Lallo^{1*}

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

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

³. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

***Autor correspondente:** Endereço para correspondência: Universidade Paulista, R. Dr. Bacelar 1212, 4^o andar, CEP: 04026-002. São Paulo, SP, Brasil. Telefone: 55. 11.5586.4093, E-mail: anetelallo@hotmail.com

RESUMO

As pneumonias são afecções importantes que impactam na sobrevivência de pacientes imunossuprimidos e imunodeprimidos. *Encephalitozoon cuniculi* é um patógeno intracelular obrigatório que infecta hospedeiros vertebrados, incluindo o homem, sendo oportunista na maioria das infecções. A ocorrência de pneumonia associada à encefalitozoonose tem sido relatada de forma rara. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar pneumonia em camundongos tratados ou não com ciclofosfamida (Cy) e experimentalmente infectados com *Encephalitozoon cuniculi*, para instituir um modelo animal de pneumonia fúngica oportunista. Camundongos C57BL/6, machos, com 6 a 8 semanas, foram infectados com esporos de *E. cuniculi* por via intravenosa e tratados com Cy (75 mg/kg/semana, por via intraperitoneal), sendo mantidos controles não infectados e não tratados. Aos trinta dias pós-infecção, a partir do tecido pulmonar avaliou-se a carga fúngica (qPCR), as lesões histopatológicas, a produção de citocinas e o fenótipo das células inflamatórias presentes no parênquima por meio de citometria de fluxo. Histologicamente, nos animais infectados foi observada pneumonia intersticial com infiltrado linfocítico. Este infiltrado foi constituído majoritariamente por linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ e com populações de linfócitos B e de macrófagos totais reduzidas. A carga fúngica foi maior nos animais tratados com Cy, sendo confirmada pela imuno-histoquímica, com a visualização de esporos no tecido pulmonar. Esses resultados demonstram que camundongos C57BL/6, tratados ou não com Cy, e infectados com *E. cuniculi* apresentaram pneumonia intersticial linfocítica, agravada pela imunossupressão, sendo este um modelo que pode ser empregado no estudo de pneumonias fúngicas oportunistas.

Palavras-chave: ciclofosfamida, *Encephalitozoon cuniculi*, linfócitos B, linfócitos T, macrófagos alveolares, pneumonia intersticial.

ABSTRACT

Pneumonias are important conditions that impact the survival of immunosuppressed and immunocompromised patients. *Encephalitozoon cuniculi* is an obligate intracellular pathogen that infects vertebrate hosts, including humans, and is opportunistic in most infections. The occurrence of encephalitozoonosis-related pneumonia has been rarely reported. Thus, the aim of this study was to characterize pneumonia in mice treated or not with cyclophosphamide (Cy) and experimentally infected with *Encephalitozoon cuniculi*, to establish an animal model of opportunistic fungal pneumonia. C57BL/6 mice, males, aged 6-8 weeks, were infected intravenously with *E. cuniculi* spores and treated with Cy (75 mg/kg/week, intraperitoneally). Controls were uninfected and untreated. Thirty days post-infection, fungal load (qPCR), histopathological lesions, cytokine production, and the phenotype of the immune cells present in the parenchyma were evaluated from lung tissue by flow cytometry. Histologically, interstitial pneumonia with lymphocytic infiltrate was observed in the infected animals. This infiltrate consisted mainly of T CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes, and B lymphocyte and macrophage populations were reduced. Fungal load was higher in the Cy-treated animals, which was confirmed by immunohistochemistry, with visualization of spores in lung tissue. These results demonstrate that C57BL/6 mice treated or not with Cy and infected with *E. cuniculi* had lymphocytic interstitial pneumonia, aggravated by immunosuppression. This model may be used to study opportunistic fungal pneumonias.

Key words: cyclophosphamide, *Encephalitozoon cuniculi*, B lymphocytes, T lymphocytes, alveolar macrophages, interstitial pneumonia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos infectado ou não com <i>E. cuniculi</i> e tratados ou não com ciclofosfamida.....	24
Figura 2 - Quantificação da carga fúngica pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) no parênquima pulmonar de camundongos infectados com <i>E. cuniculi</i> e tratados ou não com ciclofosfamida	25
Figura 3 - Fotomicrografias de cortes histológicos do parênquima pulmonar incluídos em parafina e corados com IHQ para <i>E. cuniculi</i>	26
Figura 4 - Avaliação dos linfócitos presentes no parênquima pulmonar de camundongos C57BL/6, infectados com <i>E. cuniculi</i> e tratados ou não com ciclofosfamida.....	28
Figura 5 - Avaliação dos macrófagos presentes no parênquima pulmonar de camundongos C57BL/6 infectados com <i>E. cuniculi</i> e tratados ou não com ciclofosfamida.....	28
Figura 6 - Níveis de TNF- α detectados no parênquima pulmonar (A) e no soro (B) de camundongos C57BL/6 infectados com <i>E. cuniculi</i> e tratados ou não com ciclofosfamida.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
APC	Allophycocyanin
Cy	Ciclofosfamida
DAB	Diaminobenzidina
DPI	Dias pós-infecção
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HE	Hematoxilina & Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IHQ	Imuno-histoquímica
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PFA	Paraformaldeído
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1	Animais.....	17
2.2	Cultura de <i>E. cuniculi</i>	17
2.3	Tratamento com Cy.....	17
2.4	Delineamento experimental.....	18
2.5	Análise histológica e morfométrica.....	18
2.6	Imuno-histoquímica.....	19
2.7	Carga fúngica.....	19
2.8	Caracterização fenotípica dos componentes imunológicos do parênquima pulmonar.....	21
2.9	Quantificação das citocinas.....	22
2.10	Análise estatística.....	22
3.	RESULTADOS.....	23
3.1	<i>E. cuniculi</i> induz pneumonia intersticial em camundongos C57BL/6	23
3.2	Tratamento com Cy determinou maior carga fúngica pulmonar.....	25
3.3	Infiltrado inflamatório intersticial foi caracterizado pelo predomínio de linfócitos T.....	27
3.4	Discreto aumento de TNF- α no pulmão e soro de camundongos com pneumonia causada pelo <i>E. cuniculi</i>	29
4.	DISCUSSÃO.....	30
5.	REFERENCIAS.....	35
APÊNDICES		
	Figura Suplementar 1.....	43
	Figura Suplementar 2.....	44
ANEXO		
	Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais...	45

1. INTRODUÇÃO

As pneumonias infecciosas são consideradas as condições patológicas mais agressivas que acometem as vias aéreas inferiores (HARRIS et al, 2011; SCOTT et al, 2012). Como causadores de pneumonias, bactérias, vírus, fungos e protozoários estão entre os micro-organismos mais descritos, sendo que, a grande maioria dos casos resulta da infecção por *Streptococcus pneumoniae* (BRADLEY et al, 2011). A etiologia das pneumonias muitas vezes permanece não detectada apesar dos extensos testes diagnósticos (JAIN et al, 2015). A incidência, o diagnóstico e a gravidade clínica das pneumonias aumentaram nos últimos anos, em especial nos imunocomprometidos como receptores órgãos, portadores doenças autoimunes, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV e uso de drogas imunossupressoras (GUILLAMET et al, 2018; HIJANO et al, 2018). Entre os pacientes acometidos por pneumonia adquirida na comunidade, 17,6% destes apresentam algum fator de risco que compromete a imunidade, dentre eles uso crônico de esteroides, doenças hematológicas malignas e quimioterapia (DI PASQUALE et al, 2018). Nesse grupo de paciente aumentou significativamente a incidência de infecções fúngicas (BAKER et al, 2019; LIMPER et al, 2011).

O filo Microsporidia compreende mais de 170 gêneros, 1300 espécies, sendo que pelo menos 16 espécies descritas em seres humanos (RAMANAN & PRITT, 2014). São fungos unicelulares, intracelulares obrigatórios que infectam uma gama de hospedeiros vertebrados e invertebrados (SAK et al, 2011; DIDIER et al, 2004). As microsporidioses são reconhecidas como infecções oportunistas, que ocorrem em todo o mundo e afetam indivíduos portadores do HIV, receptores de transplantes de órgãos, pacientes com câncer submetidos à quimioterapia, assim como crianças, idosos, viajantes e pessoas que usam lentes de contato que também estão entre as populações mais suscetíveis (DIDIER et al, 2004; DIDIER & WEISS, 2006; DIDIER et al, 2009; GHOUYOUNCHI et al, 2017).

A espécie *Encephalitozoon cuniculi* determina doença sistêmica grave e letal em indivíduos imunodeficientes e para a qual não existe tratamento eficaz. Os relatos de encefalitozoonose associados a sintomas pulmonares ou a pneumonia

tem sido observados em pacientes HIV+ (WEITZEL et al, 2001; DIDIER & WEISS, 2011; SOKOLOVA et al, 2011), receptores de transplante renal (KICIA et al, 2019) e em paciente que recebeu transplante alogênico de medula óssea (ORENSTEIN et al, 2005). Tais relatos geralmente demonstram grandes dificuldades no diagnóstico e na terapêutica dos pacientes, com evolução letal e, portanto, prognóstico ruim. Em estudos experimentais, verifica-se comprometimento das vias aéreas inferiores caracterizados por diferentes graus de degeneração, necrose, desprendimento do epitélio bronquiolar e presença de infiltrados inflamatórios constituídos por células mononucleares no parênquima pulmonar, com esporos associados ou não a células inflamatórias em camundongos BALB/c inoculados com *E. cuniculi*, por via intraperitoneal (LALLO et al, 2013). Outros estudos evidenciaram que a infecção por *E. cuniculi* pode determinar pneumonia granulomatosa e pneumonia multifocal intersticial, com infiltrado peribronquiolar e esporos livres, nas paredes dos alvéolos (da COSTA et al, 2017; dos SANTOS et al, 2017).

Em decorrência da importância das pneumonias na clínica de pacientes imunossuprimidos ou imunodeprimidos, o desenvolvimento de modelos animais que permitam entender e avaliar o papel das células imunitárias na defesa contra agentes oportunista é fundamental para a tomada de decisões terapêuticas. 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). É também uma das drogas de maior sucesso no tratamento anti-câncer, por sua eficácia terapêutica e pela estimulação da resposta imune (EMADI et al., 2009, SISTIGU et al., 2011), sendo o uso desse fármaco uma ferramenta importante para mimetizar as condições clínicas que ocorrem na prática médica (SEVKO et al., 2013).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um modelo de pneumonia em camundongos tratados ou não com ciclofosfamida e

experimentalmente infectados com *Encephalitozoon cuniculi*. Adicionalmente, foi realizada a caracterização fenotípica do infiltrado inflamatório presente no parênquima pulmonar desses animais, assim como foi determinada a carga fúngica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, livres de patógenos específicos - SPF, com 06 a 08 (seis a oito) semanas de idade, adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Estes animais foram alojados em microisoladores, durante todo o período experimental no Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Paulista, sob condições de temperatura (22 a 24°C) e umidade controladas (45 a 55%), com ciclo de claro e escuro (12/12 horas). Foram alimentados *ad libitum* com ração peletizada, esterilizadas por irradiação e água esterilizada por autoclavagem. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (Protocolo 024/2018).

2.2 Cultura de *E. cuniculi*

Os esporos de *Encephalitozoon cuniculi* utilizados para a infecção foram cultivados em células renais de coelho (RK-13, ATCC CCL 34), em meio Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato, aminoácidos não-essenciais e gentamicina (20 mg/mL). As culturas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO₂ no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Paulista. A cada 7 dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 30 minutos a 500 g para obtenção dos esporos contidos no sedimento. Os esporos coletados do sobrenadante foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato-salina (PBS) e armazenados a 4°C. Para contagem dos esporos *Encephalitozoon cuniculi* foi utilizada a câmara de Neubauer (HORNITZKY, 2008).

2.3 Tratamento com Cy

O protocolo de tratamento adotado foi o estabelecido por Lallo e Hirschfeld (2012) com modificação para esse projeto. Os camundongos receberam uma dose semanal de 75 mg/kg de ciclofosfamida (Cy) por via intraperitoneal (Genuxal®, Asta

Médica Oncologia, São Paulo, Brasil), iniciada no dia da inoculação do patógeno e mantida por todo o período experimental.

2.4 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos: *Infectado* – camundongos inoculados com *E. cuniculi*; *Cy-Infectado* – camundongos tratados com ciclofosfamida e inoculados com *E. cuniculi*; *Cy-Não-Infectado* – camundongos tratados com ciclofosfamida e não-inoculados; e *Não-Infectado* – camundongos não inoculados com *E. cuniculi* e não tratados com ciclofosfamida. Nos grupos infectados foi realizada a inoculação de 1×10^7 esporos por animal esporos por via intravenosa (veia da cauda).

Aos 30 dias pós-infecção (DPI), os animais foram submetidos à eutanásia pelo aprofundamento anestésico por via intraperitoneal, utilizando-se mistura de quetamina (100 mg/Kg), xilazina (2,5 mg/Kg) e acepromazina (2,5 mg/Kg). A cavidade torácica foi aberta e foram infundidos 10 mL de PBS através do átrio direito, para perfusão dos pulmões e coleta de materiais para as análises.

2.5 Análise histológica e morfométrica

A partir de cada animal, um fragmento padronizado dos pulmões foi coletado e fixado em formol tamponado a 10% por 72 horas e, então, processado rotineiramente para análise histopatológica. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro, corados pelas técnicas de Hematoxilina & Eosina (HE) e examinados pela microscopia de luz (Leica DMLD, Greenville, SC, USA). O infiltrado inflamatório dos cortes teciduais foi analisado em microscópio óptico, obtendo-se imagens digitalizadas de "hot spots", capturadas pelo fotomicroscópio OPTICAN, a partir de 5 campos de grande aumento (40x) por amostra. A espessura das paredes alveolares foi mensurada, em pixels, com o emprego do software *Metamorph Software* (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

2.6 Imuno-histoquímica

Cortes histológicos dos pulmões com aproximadamente 3 µm foram dispostos em lâminas silanizadas. Após a desparafinização, foi realizada a recuperação antigênica realizada com Tripsina (enzima proteolítica) em estufa a 37°C por 15 minutos, com posterior bloqueio da peroxidase endógena pela incubação das lâminas por 10 minutos em peróxido de hidrogênio a 3% / metanol (meio a meio) por duas vezes. O anticorpo (Ac) policlonal primário foi utilizado na diluição de 1:10.000, com IgG de coelho contra *E. cuniculi* (Cod. 18-4001-100, MEDICAGO, UPPSALA, SUÉCIA) durante 18 horas a 4°C. O Ac secundário anti-coelho foi aplicado por 30 minutos em estufa a 37°C (ImmPRESS™ Universal Reagent Anti-Mouse/Rabbit IgG, Vector Laboratories, N. MP-7500) e foi visualizado pela reação com 3', 3' - diaminobenzidina (DAB) como cromógeno e contracolorados com Hematoxilina. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio de luz (Leica DMLD, Greenville, SC, USA).

2.7 Carga Fúngica

A determinação da carga fúngica foi determinada pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) a partir da quantificação do DNA genômico do fungo presente no tecido pulmonar. Após a eutanásia, os pulmões foram pesados e um fragmento pulmonar padronizado com 25 a 30 mg foi coletado para extração de DNA, sendo congelado em RNAlater a -20°C por no máximo por 30 dias. Os fragmentos pulmonares foram descongelados e cortados em pedaços menores e então submetidos à extração do DNA, empregando-se o kit Qiagen-DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante e segundo MORETTO et al (2015). O DNA extraído foi armazenado a -20°C para avaliação do desempenho da PCR quantitativa em tempo real.

Para amplificação do fragmento-alvo foram utilizadas reações com volume final contendo 20 µL de reação total com reagentes e tampões otimizados (SsoAdvanced Universal SYBR®Green Supermix 2X, Sso7D fusion polymerase, dNTPs, Rox referência passiva). As amostras foram amplificadas em triplicata para monitorar a precisão durante a etapa de detecção, conforme condições descritas no

Quadro 1. Após extensão final, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50 a 95°C, com aumento gradual de 0,5°C/s para se obter a especificidade do ensaio por meio da curva de dissociação (*melting*) (Fig. suplementar 1). Os resultados foram obtidos e analisados com auxílio do equipamento Step One Plus – Real Time PCR System (Applied biosystems™). As análises dos dados e gráficos foram feitas através do software fornecido pelo sistema em conjunto com um controle positivo e o controle negativo da reação (NTC).

Quadro 1. Parâmetros utilizados para a realização da PCR em tempo real.

Parâmetros de Ciclagem		Tempo
Pré-PCR		60°C por 30 segundos
Desnaturação inicial para ativação da enzima		95°C por 10 minutos
40 ciclos	Desnaturação	95°C por 15 segundos
	Anelamento e extensão	60°C por 1 minuto

Para a quantificação dos esporos de *E. cuniculi* presentes no tecido pulmonar foi criada primeiramente uma curva padrão absoluta com diluições em série de 10/6 a 10/1 a partir do DNA extraído de 1×10^8 esporos/mL purificados, obtidos de cultura celular e quantificados por espectrofotometria (BioDrop μ Lite, Biochrom). Para cada reação, o software procurou o melhor ajuste entre os pontos, calculou e forneceu o coeficiente de regressão linear (R^2) e o slope (inclinação da curva). O R^2 mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear e a curva padrão e os valores individuais de Ct (cycle threshold) das amostras padrão. O slope indica a eficiência da amplificação do ensaio onde um valor de 3,33 representa 100% de eficiência, entretanto, a eficiência de amplificação entre 90 e 110% e o R^2 maior ou igual a 0,99 são utilizados como parâmetros e descritos como ideal. (LIFE TECHNOLOGIES, 2012). Neste estudo, o limite de detecção foi de 10 esporos, o coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,998 com eficiência de amplificação de 93,5% e CTs de 15 a 33 obtidos por meio da curva absoluta. Todo o procedimento foi realizado de

acordo com o Guia de Informação Mínima para Publicação de PCR quantitativo - MIQE (BUSTIN et al., 2009).

2.8 Caracterização fenotípica dos componentes imunológicos do parênquima pulmonar

Os pulmões perfundidos e removidos na necropsia foram imersos em solução de Hank's (HBSS) suplementada com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1,5 mg/ml de Colagenase A (Roche) e 10mM de HEPES, sendo incubados a 37°C, em banho-maria, durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram dissociadas mecanicamente (BD Medimachine, Bruino, TO, ITALY) e as suspensões celulares resultantes foram filtradas em *cell strainer* de 70 µm e tratadas com tampão hemolítico. Para efetuar o bloqueio dos receptores Fc, as amostras foram incubadas por 20 minutos em banho de gelo com anticorpo anti-CD16/CD32, em solução PBS acrescido com 1% de albumina sérica bovina - PBS-BSA 1% (20 µL). Posteriormente, as células foram lavadas e, incubadas por 30 (trinta) minutos a 4°C com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD19 de camundongo conjugado a *Allophycocyanin* – APC (Ebioscience), anti-CD45 de camundongo conjugado a *Phycoerythrin* - PE (Bio Albra), anti-CD4 de camundongo conjugado a *Peridinin Chlorophyll Protein Complex* - PerCP, anti-CD8 de camundongo conjugado a *Fluorescein Isothiocyanate* - FITC, anti-F4/80 de camundongo conjugado – PE Cy7a (Ebioscience), anti- CD11b de camundongo conjugado – APC Cy7 (BD Biosciences). Então, as células foram lavadas e ressuspendidas em 100 µL de PBS, centrifugadas a 4°C por 5 minutos com 500g, o sobrenadante descartado e as células fixadas em solução tamponada de paraformaldeído (PFA) 1% para leitura posterior. Para remover o PFA, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 5 minutos com 2000 rpm, e ressuspendidas em PBS (200 µL) para realização da leitura em citometro de Fluxo BD Accuri™ C6 (Biosciences).

Fenotipicamente os macrófagos foram assim caracterizados: totais (F4/80⁺CD11b⁺), macrófagos intersticiais (F4/80⁺CD11b⁺SIGLEC-F⁻) e macrófagos alveolares (F4/80⁺CD11b⁻SIGLEC-F⁺) (HUSSELL & BELL, 2014). Adicionalmente, as

demais células foram identificadas de acordo com o fenótipo a seguir: linfócitos T CD4⁺ (CD45⁺CD4⁺), linfócitos T CD8⁺ (CD45⁺CD8⁺) e linfócitos B (CD45⁺CD19⁺).

2.9 Quantificação das citocinas

Metade do pulmão obtida na necropsia foi armazenada com inibidor de proteases (Protease Inhibitor Cocktails, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) sob refrigeração e, posteriormente, submetida a dissociação em PreCellis. Após trituração, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi armazenado a -80°C. Posteriormente, foi descongelado e preparado de acordo com as normas técnicas determinadas pelo fabricante do kit “CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit” (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) para detecção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 e IFN- γ . Brevemente, 20 μ L de cada amostra foram incubadas juntamente com as *beads* de captura, específicas para cada citocina, conjugadas a APC e com o anticorpo secundário conjugado a PE, por duas horas em temperatura ambiente protegidas por luz. Posteriormente, as amostras foram lavadas com *wash buffer*, centrifugadas e ressuspensas no mesmo tampão para análise de 2 cores por citômetro de fluxo BD AccuriTMC6 (BD Biosciences, Mountain View, CA). As análises foram realizadas usando o software de análise FCAP Array software versão 3.0 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

2.10 Análise Estatística

As comparações estatísticas foram feitas pela análise de variância (ANOVA) com uma entrada, com teste posterior de Tukey, Bonferroni ou t de Student. Os valores utilizados como média $\pm$ erro padrão, padrão com significância para valores menores que $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Prism for Windows, GraphPad software, San Diego, California USA).

3. RESULTADOS

3.1 *E. cuniculi* induz pneumonia intersticial em camundongos C57BL/6

Os camundongos C57BL/6 infectados com *E. cuniculi*, tratados ou não com ciclofosfamida, não apresentaram sinais clínicos de infecção, como também não foi observada nenhuma morte até os 30 DPI. Nos pulmões dos animais dos grupos *Infectado* e *Cy-Infectado* observou-se pneumonia intersticial assim caracterizada. Os cortes histológicos dos pulmões de camundongos infectados demonstraram preservação da compartimentalização pulmonar com redução das áreas de troca associadas a espessamento de paredes alveolares, confirmada por análise morfométrica da área alveolar pulmonar, inexistindo diferença estatisticamente significativa entre eles (Fig. suplementar 2). Destaca-se a ocorrência de múltiplos sítios de infiltração leucocitária em parede alveolar, com predomínio linfoplasmocítico. A presença de congestão vascular, eventual hemorragia e pneumócitos histologicamente preservados completaram o quadro observado mediante infecção experimental (Fig. 1).

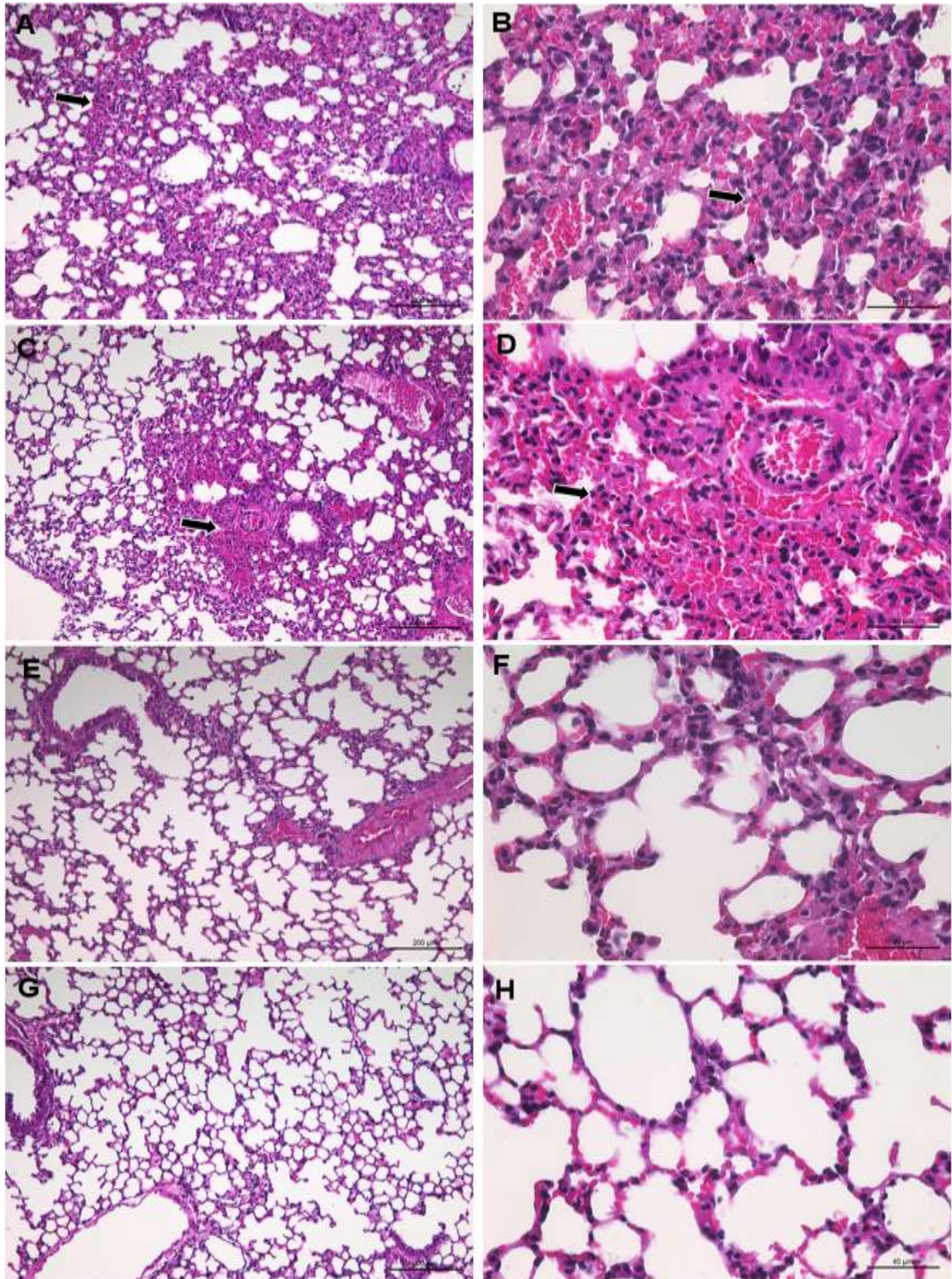


FIG. 1. Fotomicrografias do parênquima pulmonar de camundongos infectado ou não com *E. cuniculi* e tratados ou não com ciclofosfamida. Notar a presença de pneumonia intersticial nos animais dos grupos *Infectado* e *Cy-Infectado*, evidenciada por infiltrado leucocitário e espessamento de paredes alveolares (seta). A e B) *Infectado*; C e D) *Cy-Infectado*; E e F) *Cy-Não-Infectado*; G e H) *Não-infectado*. Coloração HE.

3.2 Tratamento com Cy determinou maior carga fúngica pulmonar

A quantificação dos esporos pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) possibilitou observar maior carga fúngica nos pulmões dos animais tratados com Cy (*Cy-Infectado*) em relação aos animais do grupo *Infectado* (Fig 2). A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) permitiu a observação de esporos de *E. cuniculi* no interstício pulmonar (esporos livres) e, possivelmente, dentro dos macrófagos e células epiteliais, dos animais do grupo *Cy-Infectado* e *Infectado* (Fig. 3).

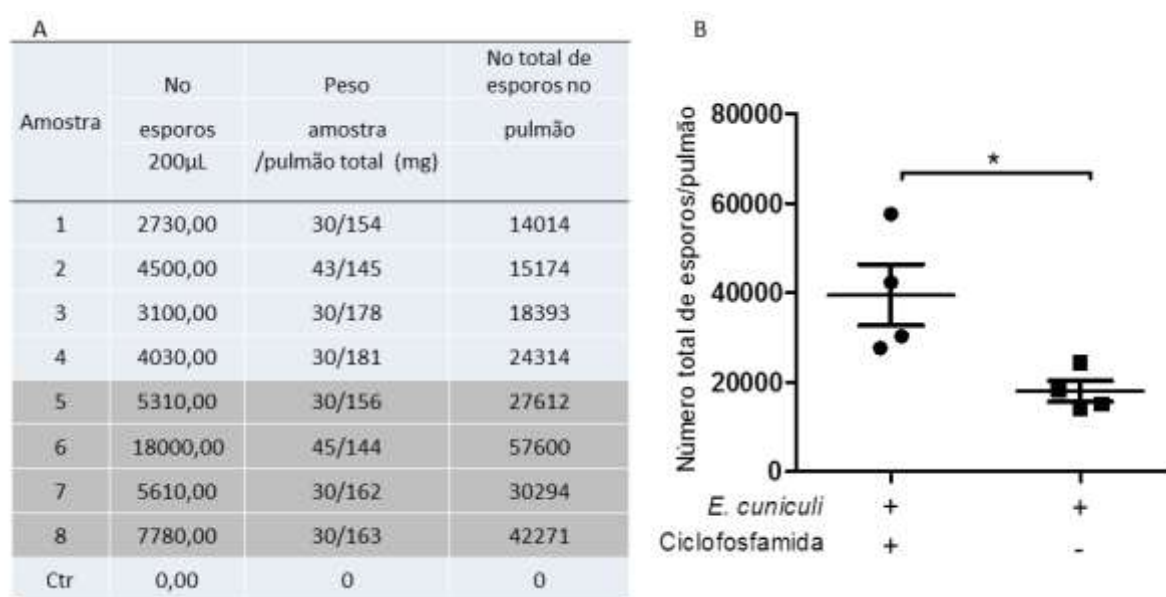


FIG. 2. Quantificação da carga fúngica pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) no parênquima pulmonar de camundongos infectados com *E. cuniculi* e tratados ou não com ciclofosfamida. A) Resultados observados por amostra por animal de 1 a 4 animais infectados e 5 a 8 animais tratados ciclofosfamida e infectados, 9 controle não infectado; B) Maior carga fúngica observada em animais tratados com ciclofosfamida. Teste t de Student, $p < 0,05^*$

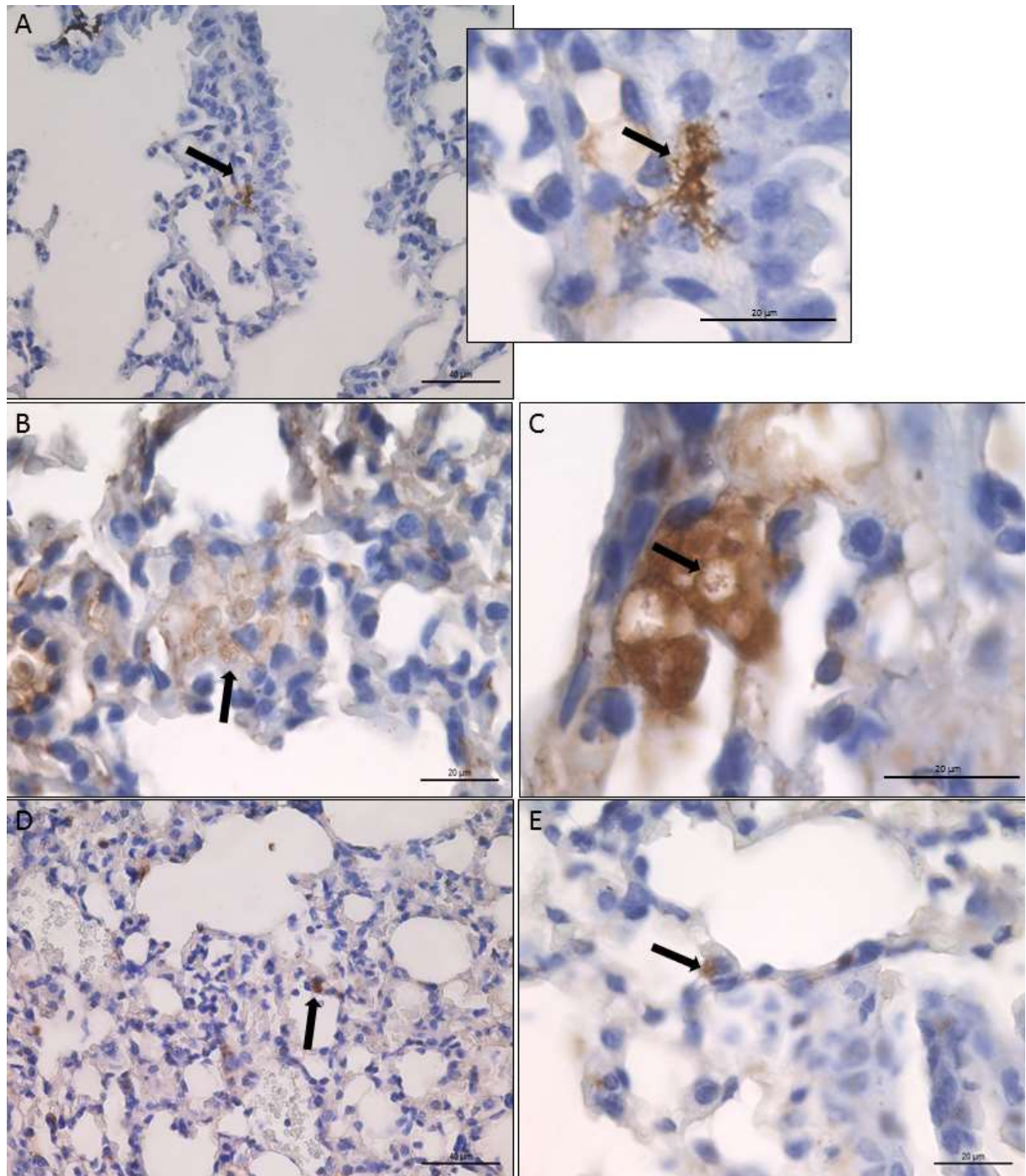


FIG. 3. Fotomicrografias de cortes histológicos do parênquima pulmonar incluídos em parafina e corados com IHQ para *E. cuniculi*. Camundongos infectado com *E. cuniculi* (grupo *Infectado*) e tratados com ciclofosfamida e infectado (grupo *Cy-Infectado*). Notar a presença de esporos em maior número, nos animais do grupo *Cy-Infectado*. A, B e C) *Cy-Infectado*; D e E) *Infectado*. Coloração com cromógeno DAB, contra-corado com hematoxilina.

3.3 Infiltrado inflamatório intersticial foi caracterizado pelo predomínio de linfócitos T

Identificou-se aumento da população de linfócitos T CD8⁺ nos pulmões de animais dos grupos *Infectado* em relação ao grupo *Cy-Infectado* (Fig. 4A). Quanto ao número de linfócitos T CD4⁺, observou-se que a redução dessa população estava predominantemente ligada com o uso da Cy, uma vez que o grupo *Cy-Não-Infectado* tinha menor população que os grupos *Infectado* e *Não-Infectado* (Fig. 4B). A relação linfócitos T CD4⁺/linfócitos T CD8⁺ foi maior no grupo *Infectado* (Fig. 4C). Sugerindo assim que o aumento da população de T CD4 está diretamente relacionado com a presença de *E. cuniculi*, como demonstrado em estudo anterior (da COSTA et al, 2017).

Em relação à população de linfócitos B (CD45⁺CD19⁺) presente no pulmão, observou-se diminuição em todos os animais infectados (*Infectado* e *Cy-Infectado*) e no grupo *Cy-Não-Infectado* em relação ao controle *Não-Infectado*. Ressaltando-se ainda que no grupo *Cy-Infectado*, o número de linfócitos B foi menor que nos grupos *Cy-Não-Infectado* e *Infectado* (Fig. 4D).

Quanto a população macrófagos, verificou-se que os macrófagos pulmonares totais (F4/80⁺ CD11b⁺) diminuiu em todos os animais infectados (*Infectado* e *Cy-Infectado*) e no grupo *Cy-Não-Infectado* em relação ao controle *Não-Infectado* (Fig. 5A). Ao diferenciar fenotipicamente as populações de macrófagos presentes nos pulmões em intersticiais (F4/80⁺CD11b⁺SIGLEC-F⁻) e alveolares (F4/80⁺CD11b⁻SIGLEC-F⁺), observou-se que as duas subpopulações seguiam o mesmo padrão de comportamento, ou seja, houve redução desta população em animais infectados (*Infectado* e *Cy-Infectado*) e no grupo *Cy-Não-Infectado* em relação ao controle *Não-Infectado* (Figs. 5B e C).

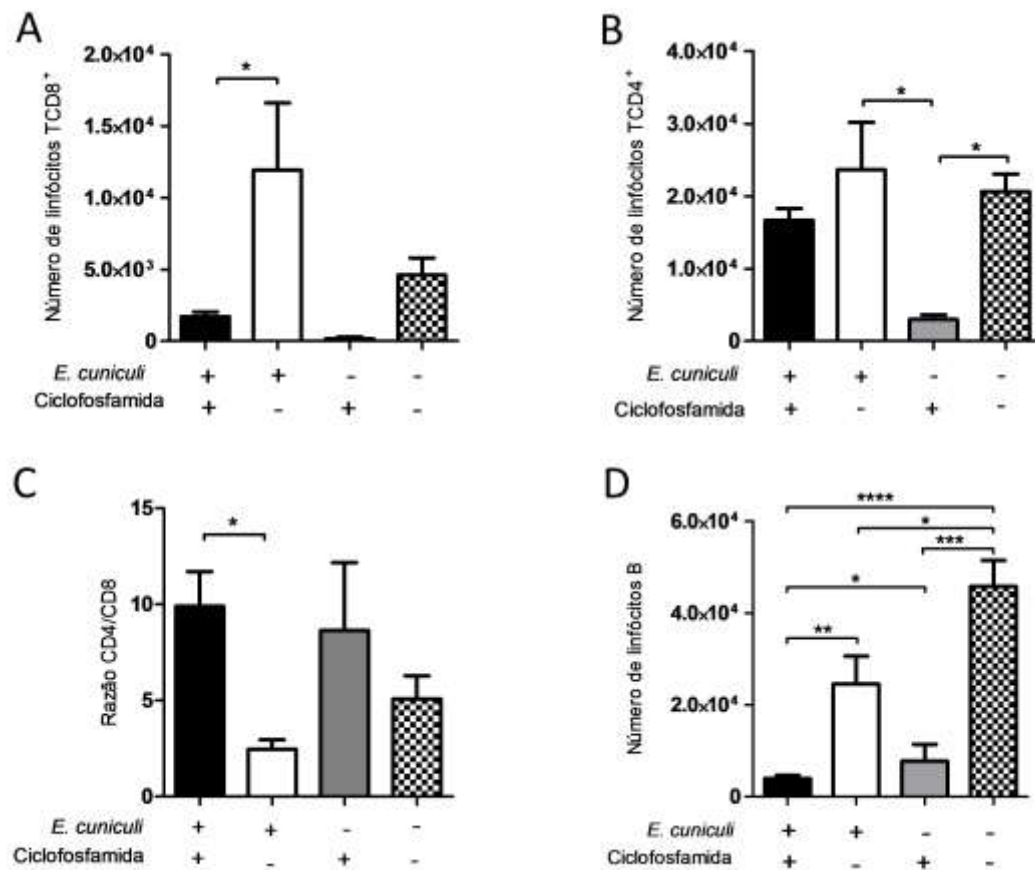


FIG. 4. Avaliação dos linfócitos presentes no parênquima pulmonar de camundongos C57BL/6, inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* e tratados (+) ou não (-) com Ciclofosfamida. A) Linfócito T CD45⁺CD8⁺. B) Linfócito T CD45⁺CD4⁺. C) Relação CD45⁺CD4⁺/CD45⁺CD8⁺. D) Linfócitos B CD45⁺CD19⁺. A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***, p<0,0001****.

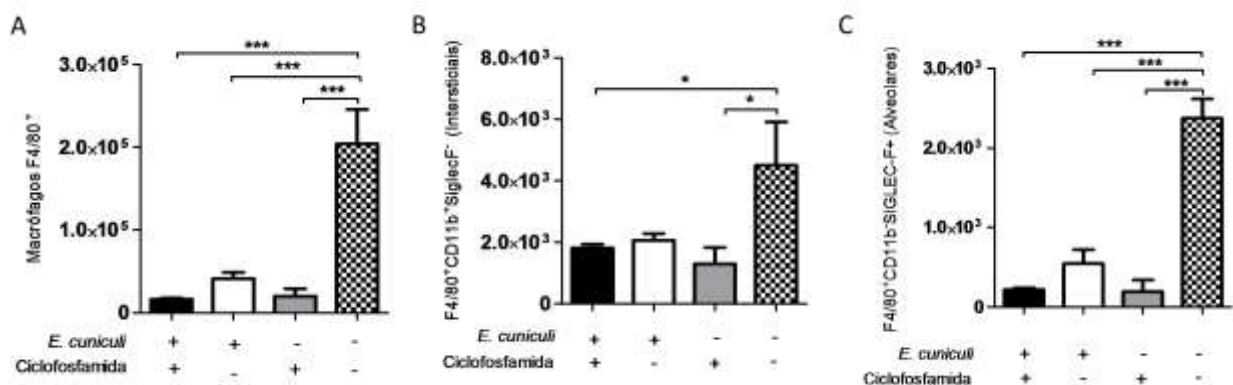


FIG. 5. Avaliação dos macrófagos presentes no parênquima pulmonar de camundongos C57BL/6, inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* e tratados (+) ou não (-) com Ciclofosfamida. A) População total de macrófagos pulmonares (F4/80⁺). B) População de macrófagos intersticiais expressando (F4/80⁺CD11b⁺SIGLEC-F⁻). C) População de macrófagos alveolares (F4/80⁺CD11b⁺SIGLEC-F⁺). A análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou p<0,05*, p<0,001***.

3.4 Discreto aumento de TNF- α no pulmão e soro de camundongos com pneumonia causada pelo *E. cuniculi*.

Observou-se que a infecção pelo *E. cuniculi* em animais tratados com Cy determinou discreto aumento nos níveis de TNF- α do tecido pulmonar em relação aos demais grupos (Fig. 6A). No soro, detectou-se aumento TNF- α nos animais infectados, porém com significância estatística apenas no grupo *Cy-Infectado* em relação aos grupos *Cy-Não-Infectado* e *Não-Infectado* (Fig. 6B). Não foram detectadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A e IFN- γ no soro e no tecido pulmonar dos camundongos (dados não mostrados).

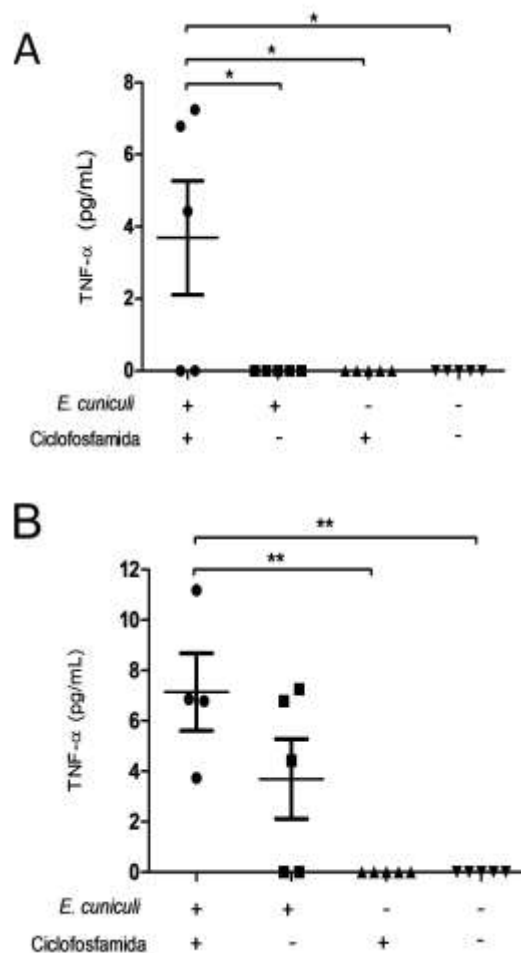


FIG. 6. Níveis de TNF- α detectados no parênquima pulmonar (A) e no soro (B) de camundongos C57BL/6 inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* e tratados (+) ou não (-) com Ciclofosfamida. A análise de variância ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni revelou diferenças estatisticamente significantes, $p < 0,05^*$ e $p < 0,01^{**}$.

4. DISCUSSÃO

As pneumonias causadas por fungos constituem na atualidade uma importante preocupação na saúde pública, visto que as terapias disponíveis são longas e muitas vezes tóxicas (LIMPER et al, 2011; GIRMENIA & IOR, 2012). A descrição de casos de microsporidioses em pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes tem aumentado nos últimos anos (KOTKOVA et al, 2013; KICIA et al, 2016; KICIA et al. 2018). Nesse sentido, é importante ressaltar que os microsporídios, como fungos oportunistas, podem determinar pneumonia e o tratamento disponível contra esses patógenos é ineficaz, fato que agrava muito a condição do hospedeiro acometido (KOTKOVA et al, 2013; ÖZKOÇ et al, 2016; KICIA et al, 2019). Em muitas ocasiões ficará por conta do sistema imune a função de controle e eliminação desses patógenos do organismo.

Dentro desse contexto, no presente estudo, camundongos C57BL foram infectados com esporos do patógeno oportunista *E. cuniculi* e tratados com Cy para mimetizar as condições de imunossupressão observadas mediante os tratamentos utilizados para receptores de transplantes, portadores de doenças autoimunes ou na terapia anticâncer. Todos os animais infectados apresentaram pneumonia intersticial com infiltrado inflamatório especialmente caracterizado pela presença de linfócitos T, porém a administração da Cy reduziu essas populações.

Por se tratar de um patógeno intracelular, estudos identificaram que a resposta imune protetora contra a encefalitozoonose é mediada principalmente pelos linfócitos T CD8⁺, os quais podem atuar de forma direta secretando as perforinas e granzimas, induzindo a apoptose das células infectadas, cuja ativação é dependente de linfócitos T CD4⁺ (BRAUNFUCHSOVÁ et al., 1999; MORETTO et al., 2001). Nossos achados evidenciaram o aumento da população de T CD8⁺ nos pulmões de animais do grupo *Infectado*, corroborando os dados da literatura. O aumento do número de células T CD8⁺ nos pulmões e da expressão de perforinas por essas células foi evidenciado em modelo murino de infecção pulmonar com *M. tuberculosis* por via inalatória e intravenosa, após 4 semanas de infecção, sugerindo que a liberação de grânulos citotóxicos por células T CD8 durante a infecção explica o mecanismo de morte de *M. tuberculosis* (SERBINA et al, 2000). Como descrito

anteriormente, o aumento na população de células T CD8 nos pulmões de camundongos infectados corrobora seu papel efetor e citotóxico, aqui reforçado pela menor carga fúngica identificada neste grupo e, de forma inédita caracteriza a população de linfócitos T CD8 no infiltrado inflamatório pulmonar.

Anteriormente, foi identificado que o aumento nas populações de células T CD8 na mucosa intestinal estava relacionado à eliminação do patógeno e maior resistência à infecção (MORETTO et al, 2004, dos SANTOS et al. 2018). Assim, a redução da população de linfócitos T CD8 em camundongos do grupo *Cy-Infectado* estava associada a maior carga fúngica, o que reforça o papel dos linfócitos citotóxicos no controle da microsporidiose tecidual.

Quanto ao perfil das citocinas avaliadas no nosso experimento, verificou-se apenas produção discreta de TNF- α nos pulmões de animais do grupo *Cy-Infectado* e no soro dos grupos *Cy-Infectado* e *Infectado*. Na infecção pelo *C. neoformans* por via aerógena, os macrófagos alveolares podem produzir TNF- α (HUFFNAGLE et al, 1985; LEVITZ et al, 1994; HERRING et al, 2002). Outras células da resposta imune inata também podem produzir TNF- α , como neutrófilos e células *natural killer* (UEZU et al, 2004). Segundo HERRING et al. (2002) o TNF- α é expresso durante a primeira semana de infecção pelos macrófagos alveolares, via mecanismo independente de célula T, sem aumentar a atividade antifúngica de fagócitos pulmonares, talvez o que explique a baixa quantidade dessa citocina demonstrada nesse estudo.

Estudo com *C. neoformans* em camundongos CBA descreveu aumento no número de linfócitos TCD4⁺, após a segunda semana de infecção sem alteração no número de linfócitos TCD8⁺ e aumento da produção IFN- γ nos pulmões (LINDELL et al, 2006). Estudos anteriores demonstram o papel dos linfócitos TCD4⁺ na infecção criptocócica, nos quais as citocinas *Th1*: IFN- γ , IL-12, IL-18 e TNF- α , são essenciais para a proteção do hospedeiro (KAWAKAMI et al, 2000; GORDON, 2002). No presente estudo observou-se que a população de linfócitos T CD4⁺ apresentou redução apenas no grupo *Cy-Não-Infectado*, como resultado direto da ação do fármaco. Nos grupos *Cy-Infectado* e *Infectado* as populações foram semelhantes aos *Não-Infectado*. Estudos anteriores demonstraram que a imunidade protetora contra a infecção pelo *E. cuniculi* por via intraperitoneal é exclusivamente

dependente da imunidade das células T CD8⁺, porém quando inoculado por via oral, a participação de linfócitos T CD8 e CD4 é igualmente importante para conferir resistência à infecção (GHOSH & WEISS, 2012; MORETTO et al, 2004). Os resultados aqui demonstrados sugerem que os linfócitos T CD8 são predominantemente na resposta imune no tecido pulmonar.

A Cy é um alquilante citotóxico, biotransformada pelo citocromo P450, que impede a divisão celular, facilita a apoptose, retarda e suprime a resposta de células T, B e macrófagos pulmonares, favorece a mielossupressão, afeta a função e o número dos neutrófilos, linfócitos, hemácias e plaquetas (LE VINE et al, 1999; BRODSKY, 2010; EMADI et al, 2009). No presente estudo, observou-se diminuição dos linfócitos B em todos grupos em relação ao *Não-Infectado*, achado que pode ser atribuído aos efeitos esperados com o uso de Cy. Entretanto, o grupo *Infectado* tinha mais linfócitos B que os grupos *Cy-Infectado* e *Cy-Não-Infectado*, sugerindo que a infecção por *E. cuniculi* mobilizou a resposta de linfócitos B. Foi observado que camundongos XID, deficientes em células B-1 e B-2, infectados com *E. cuniculi*, via intraperitoneal (da COSTA et al, 2017) ou por via oral (dos SANTOS et al, 2018), apresentaram menor resistência à infecção, fato que reforça nossos achados, já que os camundongos *Cy-Infectado* tiveram maior carga fúngica. A infecção de coelhos e raposas com *E. cuniculi* estimulou a produção de altos níveis de anticorpos e reação inflamatória, fato que ressalta a importância desses linfócitos nas microsporidioses (LEIPIG et al, 2013; AKERSTEDT et al, 2002). Na infecção pulmonar em camundongos por *M. pulmonis* observou-se maior infiltrado de linfócitos B e grande quantidade de imunoglobulinas específicas contra o micoplasma (XU et al, 2006). Portanto, a função das células B devem ser melhor explorada em estudos futuros que permitam a diferenciação de seus subtipos e a mensuração de imunoglobulinas.

Os macrófagos são fundamentais para a ligação da resposta imune inata e adquirida, daí sua importante presença nas portas de entrada do organismo (macrófagos residentes), como nos alvéolos pulmonares. Após o reconhecimento antigênico ocorre a liberação de quimiocinas, citocinas, óxido nítrico, radicais livres entre outros produtos e subprodutos da atividade dessas células. No controle natural destas pneumonias, os macrófagos alveolares e intersticiais têm um papel fundamental na imunidade inata e nas respostas imunes adaptativa, modulando a

expressão de células T CD4⁺, que quando ativado atua no controle da infecção e participam da formação de granulomas (VOELZ et al, 2009). Também desempenham papel importante na manutenção da homeostase do pulmão, removendo patógenos e partículas nocivas sem induzir inflamação ou recrutar monócitos e neutrófilos (LEE, 2012). Nas infecções bacterianas, os macrófagos constituem um indicador importante da resposta inflamatória, sendo a primeira linha de defesa contra infecção (WEISS & SCHAIBLE, 2015; STOREK & MONACK, 2015).

Em modelos experimentais com infecção respiratória por *Mycoplasma pneumoniae*, evidenciou-se aumento no número de células dendríticas e de macrófagos pulmonares após 14 dias de infecção, predominando no processo inflamatório (SUN et al, 2013). No entanto, nesse estudo, a população pulmonar de macrófagos totais, intersticiais e alveolares apresentou redução mediante a infecção pelo *E. cuniculi* e pelo tratamento com Cy. Em modelos experimentais de pneumonia viral, induzida pelo vírus da influenza, a deficiência de macrófagos alveolares favoreceu a ocorrência de danos alveolares difusos e graves, com comprometimento respiratório letal, evidenciando o papel protetor dos macrófagos alveolares (CARDANI et al, 2017). Esses resultados corroboram os achados observados no presente estudo, uma vez que a redução de macrófagos foi associada à presença de lesões histológicas compatíveis com pneumonia pelo *E. cuniculi*, pela presença de múltiplos sítios de infiltração leucocitária em parede alveolar, com predomínio linfoplasmocítico.

Estudo realizado com camundongos infectados com *C. albicans* por via intratraqueal, tratados com Cy (150 mg/kg/dia, por 4 dias, por via intraperitoneal) e infectado no 5º. dia, evidenciou aumento de suscetibilidade à infecção pulmonar, com diminuição do número de macrófagos no lavado broncoalveolar, disseminação da infecção com consequente morte dos animais. *In vitro*, os macrófagos alveolares de camundongos do mesmo estudo, do grupo controle, foram capazes de eliminar, aproximadamente, 70% de *C. albicans* em 3 horas, no grupo de animais tratados com Cy, apenas 20%, evidenciando que o número e função dos macrófagos pulmonares são necessárias para a completa eliminação da *C. albicans* do tecido pulmonar (SAWYER & HARMSE, 1989).

Estudo realizado com camundongos C57BL, tratados com Cy por 5 dias, por via subcutânea, na dose de 150 mg/kg no primeiro dia e 100 mg/kg no demais dias, observou associação entre leucopenia no sangue periférico e diminuição do número de macrófagos alveolares no pulmão, porém não houve associação entre o aumento do número de leucócitos no sangue periférico e macrófagos alveolares, após tratamento com fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). A administração de Cy não afetou a produção de TNF- α e NO, assim como, ou a fagocitose bacteriana, sugerindo que a Cy tem uma ação direta e persistente no número de macrófagos, mas não na função (SANTOSUOSSO et al, 2002). Dessa forma, nós especulamos que a diminuição das populações de macrófagos possa ser atribuída à atividade citotóxica dos linfócitos T CD8 sobre os mesmos, uma vez que os macrófagos realizam intensa fagocitose de esporos e constituem células apresentadoras de antígenos importantes nos pulmões, sendo alvos dessa atividade.

Os resultados aqui obtidos permitiram concluir que a infecção pelo *E. cuniculi* de camundongos C57BL/6 tratados ou não com Cy possibilitou o desenvolvimento de pneumonia intersticial caracterizada por infiltrado linfocítico predominante. A imunossupressão agravou a pneumonia e aumentou a carga fúngica. O infiltrado inflamatório foi predominantemente constituído por linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, portanto esse modelo pode ser empregado para entendimento dos diferentes aspectos patológicos, imunológicos e terapêuticos das pneumonias intersticiais linfocíticas.

5. REFERÊNCIAS

Akerstedt J, Nordstoga K, Mathis A, Smeds E, Deplazes P. 2002. Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. J Vet Med 49, 400-405. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2002.00588>

Applied Biosystems. Real-time PCR handbook, 3rd Edition, 68 p: 2014. Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/real-time-pcr-handbook.html> Acesso em 05/2019.

Baker AW, Maziarz EK, Arnold CJ, Johnson MD, Workman AD, Reynolds JM, Perfect JR, Alexander BD. Invasive Fungal Infection After Lung Transplantation: Epidemiology in the Setting of Antifungal Prophylaxis. Clinical Infectious Diseases, ciz156. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz156>

Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, Kaplan SL, Mace SE, McCracken Jr MGH, Peter MRMSS, Stockwell JA, Swanson JT. 2011. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 53:e25-e76. <https://doi.org/10.1093/cid/cir531>

Braunfuchsová P, Kopecký J, Ditrich O, Koudela B. 1999. Cytokine response to infection with the microsporidian, *Encephalitozoon cuniculi*. Folia Parasitol 46:91-95.

Brodsky RA. 2010. High-dose cyclophosphamide for autoimmunity and alloimmunity. Immunol Res, 47:179–184. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8149-y>

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Muller R, Nolan T, Pfaffl M, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chemis 55:611-622. <https://doi: 10.1373/clinchem.2008.112797>

Cardani A, Boulton A, Kim ST, Braciale TJ. 2017. Alveolar macrophages prevent lethal influenza pneumonia by inhibiting infection of type-1 alveolar epithelial cells. Plos Pathog 13:01-25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006140>

Colvin OM. 1999. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. *Curr. Pharm Des* 5:555–560.

da Costa LFV, Alvares-Saraiva AM, Rocha PRDA, Spadacci-Morena DD, Perez EC, Mariano M, Lallo MA. 2017. B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *Immunobiology* 222:218-227. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.09.018>

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 ES, Vossbrinck CR, Stovall ME, Green LC, Bowers L, Fredenburg A, Didier PJ. 2004. Diagnosis and epidemiology of microsporidia infections in humans. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 35:65-81.

Didier ES, Weiss LM. 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* 19:485-492. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244055.46382.23>

Didier ES, Weiss LM, Cali A, Marciano-Cabral F. 2009. Overview of the presentations on microsporidia and free-living amebae at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists. *Eukaryotic Cell* 6:441–445. <https://doi.org/10.1128/EC.00302-08>

Didier ES, Weiss LM. 2011. Microsporidiosis: Not just in AIDS patients. *Curr Opin Infect Dis* 24:490-495. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834aa152>

dos Santos DL, Xavier JG, Alvares-Saraiva AM, Rocha PRD, Spadacci-Morena DD, Hurtado DCP, Lallo MA. 2017. Immune cell profile in mice infected orally with *Encephalitozoon cuniculi*. *J Comp Pathol* 156:98-98. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.11.140>

Emadi A, Jones RJ, Robert A, Brodsky RA. 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* 6:638-647. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.146>.

Ghosh K, Weiss LM. 2012. T cell response and persistence of the microsporidia. *FEMS Microbiol Rev* 36:748-760. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00318.x>.

Ghoyounchi R, Ahmadpour E, Spotin A, Mahami-Oskouei M, Rezamand A, Aminisani N, Ghojzadeh M, Berahmat R, Mikaeili-Galeh T. 2017. Microsporidiosis in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Trop Med* 10:341-350. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.03.017>.

Girmenia C, Iori AP. 2012. Safety and interactions of new antifungals in stem cell transplant recipients. *Expert Opin Drug Saf* 11:803–818. <https://doi.org/10.1517/14740338.2012.712111>.

Gordon S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01201-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01201-1).

Guillamet CV, Hsu JL, Dhillon G, Guillamet RV. 2018. Pulmonary infections in immunocompromised hosts. *J Thorac Imaging* 33:295-305. <https://doi.org/10.1097/RTI.0000000000000351>

Harty JT, Schreiber RD, Bevan MJ. 1992. CD8 T cell can protect against an intracellular bacterium in an interferon g-independent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11612-11616. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.23.11612>

Herring AC, Lee J, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. 2002. Induction of Interleukin-12 and Gamma Interferon requires Tumor Necrosis Factor Alpha for Protective T1-Cell-Mediated Immunity to Pulmonary *Cryptococcus neoformans* Infection. *Infect Immun* 70:2959–2964. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.2959-2964.2002>

Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, McKean M, Thomson A. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 66:ii1-ii23. <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200598>

Hijano DR, Maron G, Hayden RT. 2018. Respiratory viral infections in patients with cancer or undergoing hematopoietic cell transplant. *Front Microbiol* 9:3097. <https://doi:10.3389/fmicb.2018.03097>

HORNITZKY, M. 2008. Nosema disease – literature review and three surveys of beekeepers – Part 2. Rural Industries Research and Development Corporation. Pub 08:006.

Huffnagle GB, Chen GH, Curtis JL, McDonald RL, Strieter RM, Toews GB. 1985. Downregulation of the afferent phase of T cell-mediated pulmonary inflammation and immunity by a high melanin-producing strain of *Cryptococcus neoformans*. J Immunol 155:3507-3516.

Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, Reed C, Grijalva CG, Anderson EJ, Courtney DM, Chappell JD, Qi C, Hart EM, Carroll F, Trabue C, Donnelly HK, Williams DJ, Yuwei Zhu Y, Arnold SR, Ampofo K, Waterer GW, Levine M, Lindstrom S, Winchell JM, Katz JM, Erdman D, Schneider E, Hicks LA, McCullers JA, Pavia A T, Edwards KM, Lyn Finelli L. 2015. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. N Engl J Med 373:415-427. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500245>

Hussell T, Bell TJ. 2014. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. Nat Rev Immunol 14:81-93. <https://doi.org/10.1038/nri3600>

Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Miyazato A, Yara S, Kinjo Y, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Kurimoto M, Saito A. 2000. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN γ production by NK cells. J Immunol 165:941-947. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.2.941>

Kicia M, Wesolowska M, Kopacz Z, Jakuszko K, Sak B, Květonová D, Krajewska M, Kváč M. 2016. Prevalence and molecular characteristics of urinary and intestinal microsporidia infections in renal transplant recipients. Clin Microbiol Infect 22:462.e5-462.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.014>

Kicia M, Wesolowska M, Kopacz Z, Kváč M, Sak B, Sokulska M, Cebulski K, Hendrich AB, Pozowski A. 2018. Disseminated Infection of *Encephalitozoon cuniculi* associated with osteolysis of hip periprosthetic tissue. Clin Infect Dis 67:1228–1234. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy256>

Kicia M, Wesolowska M, Cebulski K, Jakuszko K, Piesiak P, Kowalc A, Sak B, Krajewska M, Hendrich AB, Kváč M, Kopacz Z. 2019. Symptomatic respiratory *Encephalitozoon cuniculi* infection in renal transplant recipients. Int J Infect Dis 79:21–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.10.016>

- Kotkova M, Sak B, Kvetonova D, Kvac M. 2013. Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. PLoS One 8:e60941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060941>
- Lallo MA, da Costa LFV, de Castro JM . 2013. Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed mice. Antimicrobial Agents Chemother 57:3067-3071. <https://doi.org/10.1128/AAC.00157-13>
- Lampe MF, Wilson CB, Bevan MJ, Starnbach MN. 1998. Gamma Interferon production by cytotoxic T lymphocytes is required for resolution of *Chlamydia trachomatis* infection. Infect Immun 66:54575461.
- Lee JS. 2012. Heterogeneity of lung mononuclear phagocytes in chronic obstructive pulmonar disease. J Innate Immun 4:489-497. <https://doi.org/10.1159/000337434>
- Leipig M, Matiassek K, Rinder H, Janik D, Emrich D, Baiker K, Hermanns W. 2013. Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chainreaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. J Vet Diagn Invest 25:16-26. <https://doi.org/10.1177/1040638712466394>
- LeVine AM, Reed JA, Kurak KE, Cianciolo E, Whitsett JA. 1999. GM-CSF–deficient mice are susceptible to pulmonary group B streptococcal infection. J Clin Invest 103:563-569. <https://doi.org/10.1172/JCI5212>
- Levitz SM, Tabuni A, Kornfeld H, Reardon CC, Golenbock DT. 1994. Production of tumor necrosis factor alpha in human leukocytes stimulated by *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun 62:1975-1981.
- Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, Ampel NM, Bennett JE, Catanzaro A, Davies SF, Dismukes WE, Hage CA, Marr KA, Mody CH, Perfect JR, Stevens DA. 2011. An official American Thoracic Society statement: treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. Am J Respir Crit Care Med 183:96–128. <https://doi.org/10.1164/rccm.2008-740ST>
- Lindell DM, Moore TA, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. 2006. Compartmentalization of CD4⁺ T-Cell Effector Function Versus Proliferative Capacity

during Pulmonary Cryptococcosis. Am J Pathol 168:847-855.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050522>

Moretto MM, Durell B, Schwartzman JD, Khan IA. 2001. $\gamma\delta$ T cell-deficient mice have a down-regulated CD8⁺ T cell immune response against *Encephalitozoon cuniculi* infection. J Immunol 166:7389-7397. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7389>

Moretto MM, Weiss LM, Khan IA. 2004. Induction of a rapid and strong antigen-specific intraepithelial lymphocyte response during oral *Encephalitozoon cuniculi* infection. J Immunol 172:4402-4409. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4402>

Moretto MM, Harrow DI, Hawley TS, Khan IA. 2015. Interleukin-12-producing CD103⁺ CD11b⁻ CD8⁺ dendritic cells are responsible for eliciting gut intraepithelial lymphocyte response against *Encephalitozoon cuniculi*. Infect Immun 83:4719-4730. <https://doi.org/10.1128/IAI.00820-15>

Pasquale MFD, Sotgiu G, Gramegna A, Radovanovic D, Terraneo S, Reyes LF, Rupp J. 2018. Prevalence and Etiology of Community-acquired Pneumonia in Immunocompromised Patients. Clin Infect Dis XX: 1-12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy723>

Orenstein JM, Russo P, Didier ED, Bowers C, Bunin N, Teachey DT. 2005. Fatal Pulmonary Microsporidiosis Due to *Encephalitozoon cuniculi* Following Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia. J Microsc Ultrastruct 29:269-276. <https://doi.org/10.1080/01913120590951257>

Özkoç S, Delibaş SB, Akisü C. 2016. Evaluation of pulmonary microsporidiosis in iatrogenically immunosuppressed patients. Tuberk Toraks 64:9–16. <https://doi.org/10.5578/tt.10207>

Ramanan P, Pritt BS. 2014. Extraintestinal microsporidiosis. J Clin Microbiol 52:3839-3844. <https://doi.org/10.1128/JCM.00971-14>

Sak B, Brady D, Pelikánová M, Květoňová D, Rost M, Kostka M, Tolarová V, Hůzová Z, Kváč M. 2011. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. J Clin Microbiol 49:1064-1070. <https://doi.org/10.1128/JCM.01147-10>

Santosuosso M, Divangahi M, Zganiacz A, Xing Z. 2002. Reduced tissue macrophage population in the lung by anticancer agent cyclophosphamide: restoration by local granulocyte macrophage–colony-stimulating factor gene transfer. *Blood* 99:1246-1252. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.4.1246>

Sawyer RT, Harmse AG. 1989. The relative contribution of resident pulmonary alveolar macrophage and inflammatory polymorphonuclear neutrophils in host resistance to pulmonary infection by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 108:95-105.

Scott JAG, Wonodi C, Moïsi JC, Deloria-KnollAndrea M, DeLuca NA, Karron RA, Bhat N, Murdoch DR, Crawley J, O'Brien OSLKL, Feikin DR. 2012. The definition of pneumonia, the assessment of severity, and clinical standardization in the Pneumonia Etiology Research for Child Health study. *Clin Infect Dis* 54:S109-S116. <https://doi.org/10.1093/cid/cir1065>

Serbina NV, Liu CC, Scanga CA, Flynn JL. 2000. CD8⁺ CTL from Lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Mice Express Perforin In Vivo and Lyse Infected Macrophages. *J Immunol* 165:353-363. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.1.353>

Sevko A, Sade-Feldman M, Kanterman J, Michels T, Falk CS, Umnsky L, Ramacher M, Kato M, Schadendorf D, Baniyash M, Umansky V. 2013. Cyclophosphamide promotes chronic inflammation-dependent immunosuppression and prevents antitumor response in melanoma. *J Invest Dermatol* 133:1610-1619. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.444>.

Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. Sistigu, A. et al. 2011. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol* 33:369-383. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0245-0>

Sokolova OL, Demyanov AV, Bowers LC, Didier ES, Yakovlev AV, Skarlato SO, Sokolova Y Y. 2011. Emerging Microsporidian Infections in Russian HIV-Infected Patients. *J Clin Microbiol* 49:2102-2108. <https://doi:10.1128/JCM.02624-10>

Storek KM, Monack DM. 2015. Bacterial recognition pathways that lead to inflammasome activation. *Immunol Rev* 265:112–129.

<https://doi.org/10.1111/imr.12289>

Sun X, Jones HP, Dobbs N, Bodhankar S, Simecka JW. 2013. Dendritic cells are the major antigen presenting cells in inflammatory lesions of murine mycoplasma respiratory disease. *PLoS One* 8:e55984.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055984>

Uezu K, Kawakami K, Miyagi K, Kinjo Y, Kinjo T, Ishikawa H, Saito A. 2004. Accumulation of T Cells in the Lungs and Their Regulatory Roles in Th1 Response and Host Defense against Pulmonary Infection with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 172:7629–7634. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7629>

Voelz K, Lammas DA, May RC. 2009. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77:3450–3457. <https://doi.org/10.1128/IAI.00297-09>

Xu X, Zhang D, Lyubynska N, Wolters PJ, Killeen NP, Baluk P, McDonald DM, Hawgood S, Caughey GH. 2006. Mast Cells Protect Mice from Mycoplasma Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 173:219–225.

<https://doi.org/10.1164/rccm.200507-1034OC>

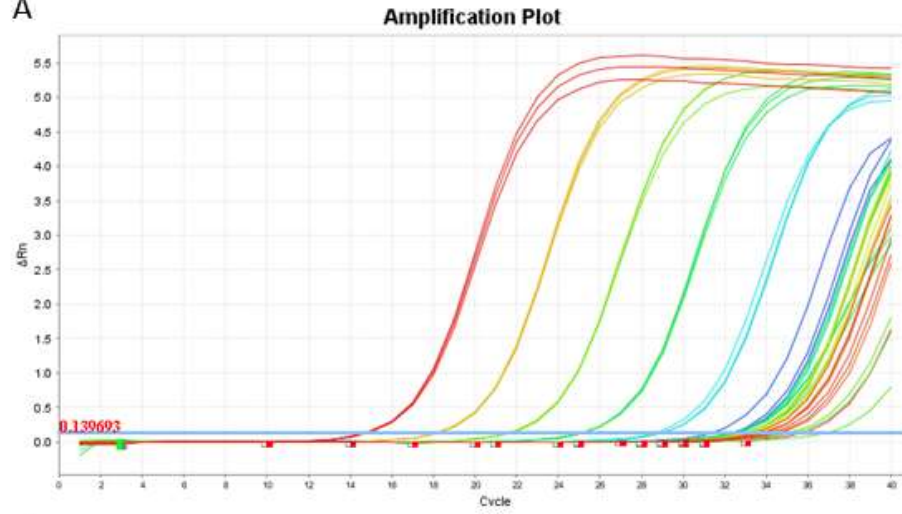
Weitzel T, Wolff M, Dabanch J, Levy I, Schmetz C, Visvesvara GS, Sobottka I. 2001. Dual Microsporidial Infection with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in an HIV-Positive Patient. *Infect* 29: 237–239.

<https://doi.org/10.1007/s15010-001-1164-0>

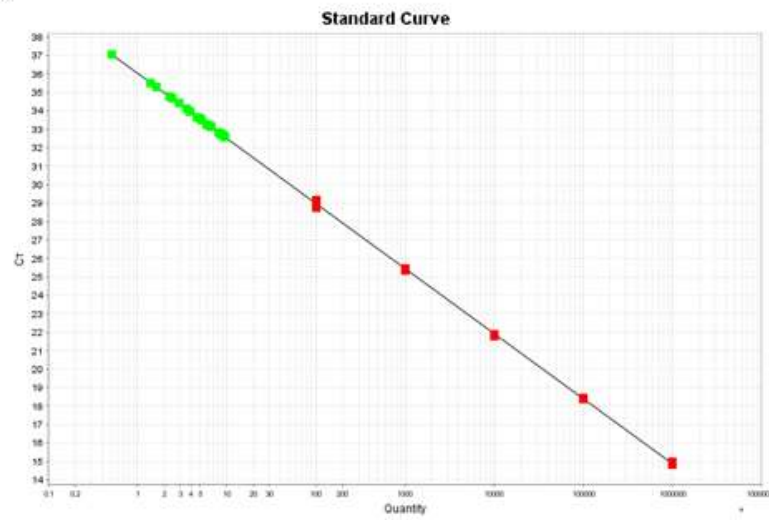
World Health Organization. 2013. WHO Model list of Essential Medicine. http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/18th_EML.pdf.

APÊNDICE

A



B



C

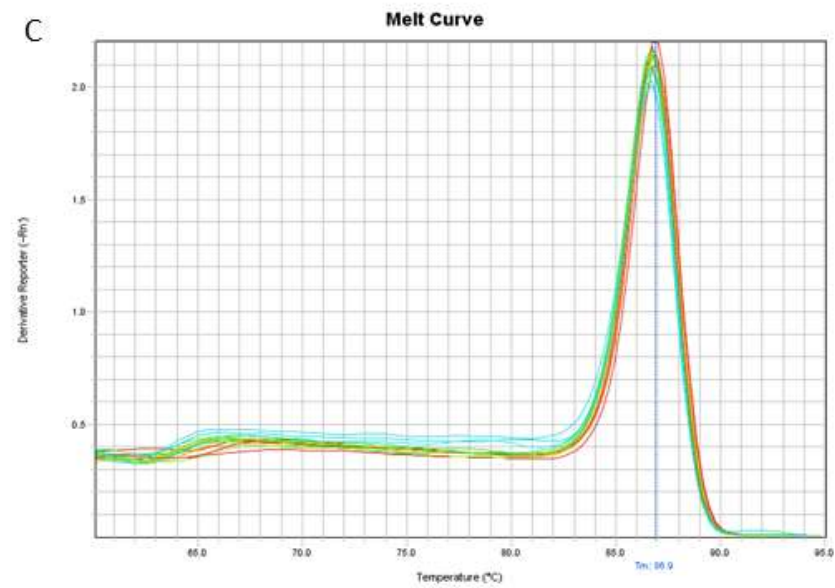


Figura suplementar 1. A) Representação gráfica linear utilizada na qPCR. O eixo X está representado pela quantidade de ciclos na reação e o eixo Y os valores da magnitude do sinal gerado (ΔRn) nas condições da qPCR. **B)** Gráfico da curva padrão representando a curva de regressão linear utilizada na qPCR. No eixo X são apresentados os valores de quantificação e no eixo Y os valores de Cts. Na legenda a cor vermelha representa as amostras positivas da curva, e a cor verde DNA extraído das amostras positivas. **C)** Curva de dissociação (*melting*). O pico principal representa o ponto de dissociação dos produtos amplificados pela curva padrão.

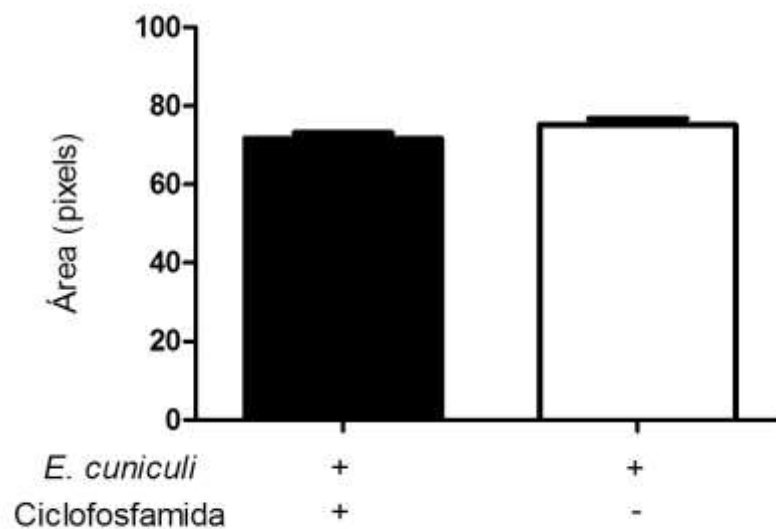


Fig suplementar 2. Análise morfométrica das áreas (em pixels) de lesão pulmonar dos grupos infectados. Teste t de Student, $p < 0,05$.

ANEXO



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

C E R T I F I C A D O

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE LOCAL SISTÊMICA NA PNEUMONIA GRANULOMATOSA DA ENCEFALITIZOONOSE MURINA ", registrada com o nº 024/18, sob responsabilidade " PAULO RICARDO DELL' ARMELINA ROCHA e IRAMIRTON FIGUERÊDO MOREIRA" de que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais(CEUA) da UNIP, em reunião de 16 /05/ 2018.

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização		01/05/2018 30/06/2019
Espécie / linhagem/ raça		CAMUNDONGO C57BL/6
Nº de animais		60
Peso / idade		19G/56 DIAS
Sexo		MACHO
Origem		CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DE MODELOS EXPERIMENTAIS PARA BIOLOGIA E MEDICINA DA UNIFESP

Juliana Guizi

Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade Paulista – UNIP