UNIVERSIDADE PAULISTA

INFECÇÃO OROFARÍNGEA pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos

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

MARIANA SOUZA SANTOS

SÃO PAULO

2022

UNIVERSIDADE PAULISTA

INFECÇÃO OROFARÍNGEA pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos

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

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

MARIANA SOUZA SANTOS

SÃO PAULO

2022

Santos, Mariana Souza.
Infecção orofaríngea por *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos / Mariana Souza Santos. - 2022.
49 f. : il.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.
Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria Anete Lallo.

1. Infecção oportunista. 2. Encefalitozoonosedimórficos. 3. Microsporidiose. 4. Pneumonia. I. Lallo, Maria Anete (orientadora). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

MARIANA SOUZA SANTOS

INFECÇÃO OROFARÍNGEA pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos

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

Aprovado em:____/___/_____

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof.ª Dr.ª Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

_____
Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

_____
Prof.ª Dr.ª Elizabeth Cristina Perez Hurtado
Universidade Paulista – UNIP

_____
Prof.ª Dr.ª Patrícia Xander Batista
UNIFESP – Diadema

_____
Prof.ª Dr.ª Ronalda Silva de Araújo
CETESB – Brasil

Dedicatória

Dedico esta conquista:

Aos meus pais João e Beth, por terem feito de nossas vidas um verdadeiro laboratório de amor, pelo exemplo de fé e persistência, por me ensinarem a lutar pelos meus ideais e estarem presentes em todos os momentos importantes de minha vida.

Áo meu esposo Claudinei, pelo companheirismo, por ter me apoiado nessa trajetória, conquista e realização pessoal.

Áo meu irmão Julhano e minha cunhada Karina, pelo apoio, nos momentos difíceis, pelo carinho e amor que tanto me incentivou, pela segurança de me proporcionarem um lar um aconchego durante todo o período de luta.

Á vovó Adelina, pelas orações contínuas, pelo companheirismo e palavras de incentivo, por ser minha companheira em tantas viagens, sempre me cuidando.

Agradecimentos

A Deus e Nossa Senhora, por terem guiado meus caminhos em todos os instantes, concedendo-me a paciência necessária para entender suas demoras, pela proteção divina e constante...

A professora Dra. Maria Anete Lallo, por aceitado me orientar, por ter me apoiado e acreditado, pela dedicação sempre constante, pelo carinho e paciência em todos os seus ensinamentos, pela humildade em compartilhar tamanho conhecimento com tanta empatia, docilidade e brilhantismo. Muito obrigado.

Aos professores do programa, por tornar possível a realização desta pesquisa e por todo conhecimento transmitido, em especial: Profª. Dra. Elizabeth Cristina e Prof. Dr. José Guilherme.

A Profª. Dra. Anuska, Prof. Dr. Rodrigo e Dra. Ronalda pelas orientações e colaborações nos experimentos.

Aos funcionários do centro de Pesquisa e do laboratório de Biologia celular da Unip, sempre prontos em ajudar com os materiais e pelo carinho e atenção dedicadas: Suzana, Cleide, Wilton e Dra. Joyce.

Ao Hospital Regional de Assis, por minha liberação e a Maria Paula por permitir minhas trocas de plantões, essenciais ao curso desta pós-graduação.

Ás minhas colegas, docentes do curso de Enfermagem da UNIP do Campus de Assis, pelas coberturas e palavras de incentivo.

A professora Raquel, pelas palavras e apoio e incentivo para seguir o caminho desta pós-graduação.

Á UNIP- Universidade Paulista, pela Bolsa a mim conferida.

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

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Senhor, vós me perscrutais e me conheceis, sabeis tudo de mim, quando me sento ou me levanto. De longe penetrais meus pensamentos. Quando ando e quando repouso, vós me vedes, observai todos os meus passos. A palavra ainda não me chegou à língua, e já, Senhor, a conheceis toda”.

(Salmo 138, 1-4)

PREFÁCIO

Este volume refere-se à Tese de Doutorado apresentada como requisito para 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 Immunobiology ISSN: 0171-2985, sob o título **Infecção orofaríngea pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos.**

INFECÇÃO OROFARÍNGEA pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos

SOUZA SANTOS, M.; da SILVA, R.A.; de SOUZA, L.N.; VICTORINO, N.R.; PEREIRA, R.C.B.; XAVIER, J.G.; da SILVA, R.A.; PÉREZ, E.C.; ALVARES-SARAIVA, A.M.; LALLO, M.A.

Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da UNIP-Universidade Paulista – Unip, São Paulo, Brasil

RESUMO

Microsporídios causam infecções oportunistas em indivíduos imunossuprimidos. Nos mamíferos, os esporos desses fungos são eliminados pelas fezes, urina ou secreções respiratórias e contaminam a água e alimentos. A via de infecção oral é a mais comum, embora experimentalmente, as vias intraperitoneal e intravenosa, determinem infecção e disseminação. A infecção pelas vias respiratórias ainda não foi demonstrada, embora seja admitida. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi demonstrar a infecção pelo microsporídio *Encephalitozoon cuniculi* pela via orofaríngea como modelo de pneumonia oportunista, aplicável como para o estudo das pneumonias oportunistas de forma geral, assim como para comprovar a transmissão pela via respiratória para ampliar o melhor entendimento da epidemiologia dessas zoonoses. Camundongos C57BL machos ou fêmeas, livres de patógenos específicos - SPF, com até 12 semanas de idade, imunossuprimidos com ciclofosfamida (Cy), foram inoculados com $1x10^7$ esporos da via orofaríngea de *E. cuniculi,* constituindo os grupos: *Infectado, Cy-Infectado, Não-Infectado, Cy-Não-Infectado, Sham, Cy-Sham*. Após 14 dias da infecção, os pulmões foram coletados para análise histopatológica, fenotipagem de células inflamatórias pulmonares por citometria de fluxo, mensuração da carga fúngica pela qPCR, dosagem de citocinas Th1, Th2 e Th17 no soro. Os animais infectados apresentaram pneumonia intersticial caracterizada por infiltração linfoplasmocítica em paredes alveoloares. Entretanto, a carga fúngica e a extensão do infiltrado inflamatório foram menores no grupo Cy-Infect, com predominância da população de linfócitos T $CD8^+$ nos pulmões. No grupo infectado não tratado com Cy houve aumento da população de macrófagos alveolares ($F4/80^+CD11b^-SiglecF^+$), maior carga fúngica e infiltrado inflamatório nos pulmões, caracterizando pneumonia por *cephalitozoon* mais pronunciada em comparação aos animais imunossuprimidos. Foi observado perfil de citocinas Th1 nos grupos infectados, aumento do perfil Th17 nos Cy- Infectados. Juntos os resultados permitem concluir que infecção pela via orofaríngea promoveu pneumonia por *E. cuniculi* em camundongos tratados ou não com ciclofosfamida, com mais gravidade em camundongos não imunossuprimidos, estabelecendo-se como modelo de pneumonia intersticial por via orofaríngea.

Palavras-chave: Infecção oportunista, Encefalitozoonose, Microsporidiose, Pneumonia.

ABSTRACT

Microsporidia cause opportunistic infections in immunosuppressed individuals. In mammals, the spores of these fungi are shed in feces, urine or respiratory secretions and contaminate water and food. The oral route is the most common, although experimentally, the intraperitoneal and intravenous routes determine spread infection. Respiratory tract infection has not yet been demonstrated, although it is considered. The objective of this study was to demonstrate the infection by the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* via the oropharyngeal route as a model of opportunistic pneumonia, applicable as for the study of opportunistic pneumonias in general, as well as to prove transmission by the respiratory route to expand the better understanding. The epidemiology of these zoonoses. C57BL male or female mice, free of specific pathogens - SPF, up to 12 weeks of age, immunosuppressed with cyclophosphamide (Cy), were inoculated with 1x107 spores from the oropharyngeal pathway of *E. cuniculi*, constituting the groups: *Infected, Cy-Infected, Non-Infected, Cy-Not-Infected, Sham, Cy-Sham*. After 14 days of infection, the lungs were collected for histopathological analysis, phenotyping of lung inflammatory cells by flow cytometry, measurement of fungal load by qPCR, measurement of Th1, Th2 and Th17 cytokines in serum. The infected animals presented interstitial pneumonia characterized by perialveolar inflammatory infiltrative lesions with a predominance of lymphocytes and plasma cells. However, the fungal load and the extent of the inflammatory infiltrate were lower in the Cy-Infect group, with a predominance of the CD8+ T lymphocyte population in the lungs. In the infected group not treated with Cy, there was an increase in the population of alveolar macrophages ($F4/80^{+}CD11b^{-}SiglecF^{+}$), higher fungal load and inflammatory infiltrate in the lungs, characterizing more pronounced Encephalitozoon pneumonia compared to immunosuppressed animals. Th1 cytokine profile was observed in infected groups, increase in Th17 profile in Cy-Infected. Together, the results allow us to conclude that oropharyngeal infection promoted pneumonia by *E. cuniculi* in mice treated or not with cyclophosphamide, with more severity in non-immunosuppressed mice, establishing itself as a model of interstitial pneumonia by aspiration.

Key words: encephalitozoonosis, microsporidiosis, opportunistic pathogen, pneumonia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Delineamento experimental. A) Primeiro experimento: camundongos foram distribuídos em 3 grupos e infectados em *E. cuniculi*. B) Segundo experimento: camundongos foram distribuídos em 3 grupos, tratados por duas semanas com ciclofosfamida (Cy) e infectados em *E. cuniculi* 17

Figura 2- Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão e fígado de camundongos infectados ou não pela via orofaríngea 22

Figura 3- Quantificação de linfócitos presentes nos pulmões ou lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos infectados (+) ou não (-) com *E. cuniculi.* 23

Figura 4- Avalição dos macrófagos presentes nos pulmões de camundongos inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. 25

Figura 5- Avalição dos macrófagos presentes nos lavados broncoalveolares de camundongos inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* 26

Figura 6- Mensuração de citocinas Th1, Th2 e Th17 no soro de camundongos..... 28

Figura 7- Carga fúngica dos animais infectados com *E. cuniculi* e tratados ou não com ciclofosfamida. 29

Figura 8- Fotomicrografias de cortes histológicos e análise morfométrica de pulmão de camundongos tratados com ciclofosfamida e infectados pela via orofaríngea 30

Figura 9- Quantificação de linfócitos presentes nos pulmões ou lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos tratados com ciclofosfamida e infectados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*..... 32

Figura 10- Avalição dos macrófagos presentes nos pulmões de camundongos tratados com ciclofosfamida e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* 46

Figura 11- Avalição dos macrófagos presentes nos lavados broncoalveolares de camundongos inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* 47

Figura 12- Mensuração de citocinas Th1, Th2 e Th17 no soro de camundongos tratados com ciclofosfamida. 48

Fig.Suplementar 1- Presença de linfócitos T e B no sangue de camundongos após infecção. 49

Fig.Suplementar 2- Avalição dos macrófagos presentes no sangue camundongos inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*..... 33

Fig.Suplementar 3- Presença de linfócitos T e B no sangue de camundongos tratados com ciclofosfamida. 34

Fig.Suplementar 4- Avalição dos macrófagos presentes no sangue camundongos tratados com ciclofosfamida e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi* 35

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	13
2. Materiais e Métodos	15
2.1 Declaração Ética	15
2.2 Animais	15
2.3 Esporos de *E. cuniculi*	15
2.4 Inoculação orofaríngea dos camundongos	15
2.5 Delineamento Experimental	16
2.6 Necropsia e coleta de amostras	17
2.7 Análise histopatológica e morfometria	18
2.9 Fenotipagem dos componentes imunológicos do pulmão	18
2.10 Quantificação das citocinas	19
2.11 Mensuração da carga fúngica	19
2.12 Análise estatística	20
3. Resultados	21
3.1 Camundongos infectados apresentaram pneumonia intersticial.	21
3.2 Animais infectados mostraram menor percentual de linfócitos e aumento de macrófagos.	25
3.3 Perfil misto de citocinas Th1, Th2 e Th17 no grupo Infectado.	27
3.4 Camundongos tratados com ciclofosfamida apresentaram menor carga parasitária e lesões histopatológicas	29
. 3.5 Aumento de linfócitos TCD8^{+} foi associado a menor infecção no grupo imunossuprimido e infectado com *E. cuniculi*.	31
4. Discussão	37
5. Referências	41
6. Anexo I- Material suplementar	46

1. Introdução

Os microsporídios são fungos parasitas intracelulares obrigatórios, pertencentes ao filo Microsporidia, formadores de esporos, com tamanho variando entre 1 a 12 µm, uma parede espessa e com um túbulo polar espiralado, responsável pela infecção celular, uma característica única desse filo (Wadi, Reinke, 2020). Esses patógenos eucariotas primitivos, desprovidos de mitocôndrias são responsáveis por infecções oportunistas, ou sejam, aproveitam-se do comprometimento do sistema imunológico para se estabelecer em seus hospedeiros (Han et al., 2021).

A microsporidioses humanas descritas envolvem 16 espécies, dentre as mais de 1.700 já identificadas nesse grupo de fungos, destacando-se *Enterocytozoon bieneusi, Encephalitozoon intestinalis, Encephalitozoon cuniculi* e *Encephalitozoon hellem* (Han & Weiss, 2017; Han et al., 2021). As infecções intestinais e sistêmicas são as mais relatadas, sendo os aspectos patogênicos dessas infecções variáveis de acordo com a espécie envolvida e a qualidade da resposta imune do hospedeiro (Moretto, Khan, 2022).

As infecções respiratórias oportunistas constituem um fator importante no prognóstico de um paciente, colaborando para o aumento do tempo de internação e aumentando drasticamente o risco de morte em pacientes imunocomprometidos (Elango et al., 2022). As coinfecções bacterianas podem ser tratadas com antibióticos e podem reduzir a gravidade da doença e a duração da permanência de pacientes graves em Unidades de Terapia Intensiva, entretanto os dados sobre prevalência, tipo de patógenos e sua associação com a gravidade da doença infecciosa pulmonar ainda são limitados (Wiegers *et al.,* 2019). Esporos destes micro-organismos são adquiridos por ingestão, inalação, contato diretocom a conjuntiva, contato com animais ou por transmissão de pessoa a pessoa, causando a infecção (Berkow *et al.,* 2005). O primeiro diagnóstico ante-mortem de infecção disseminada por *E. cuniculi* foi realizado a partir da análise do lavado broncoalveolar de umreceptor de células-tronco hematopoiéticas alogênicas (Ambrosioni *et al.,* 2010).

Acredita-se que os esporos de microsporídios quando inalados com ar e poeira, podem invadir células do epitélio respiratório, causando infecções respiratórias. Até o momento, foram evidenciadas apenas em pacientes imunossuprimidos. Recente estudo que trata dos sinais de infecção respiratória sintomática por *Encephalitozoon cuniculi* em receptores de transplante renal concluiu que a imunossupressão ao longo da vida aumenta o risco de infecção por microsporidioses respiratórias nesses pacientes (Kicia *et al.,* 2019).

Embora sejam observados casos de pneumonia por *E. cuniculi* em imunocomprometidos, em especial receptores de transplantes, a via de infecção ainda não está totalmente esclarecida. É possível que nas infecções disseminadas, os microsporídios atinjam os pulmões pela via hematógena, porém considera-se a possibilidade de transmissão aerógena, a qual não está comprovada. Assim, o presente estudo objetivou não somente constituir um novo modelo de pneumonia oportunista pela via aerógena que seja aplicável como modelo para o estudo das pneumonias oportunistas de forma geral, como também buscou possibilitar o melhor entendimento da epidemiologia das microsporidioses respiratórias.

2. Materiais & Métodos

2.1. Declaração de Ética

A autorização para a realização de todos os procedimentos foi submetida a Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA/UNIP, tendo parecer consubstanciado favorável de número 1528190220 (ID 000467) em 02/04/2020.

2.2. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL machos e fêmeas, livres de patógenos específicos - SPF, com 12 (doze) semanas de idade, adquiridos do Biotério Central do Universidade Federal de São Paulo (CEDEME - 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 24ºC) e umidade controladas (45 a 55%), com ciclo de claro e escuro (12/12 horas). Os animais foram alimentados *ad libitum* com ração peletizada, esterilizadas por irradiação e água esterilizada por autoclavagem.

2.3. Esporos de *E. cuniculi*

Os esporos de *E. cuniculi* utilizados para a infecção foram cultivados em células RK-13 (ATCC CCL 34), em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (20 µg/mL). As culturas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO_2 no Laboratório de Cultura Celular da Universidade Paulista. A cada 7 dias, o sobrenadante da cultura foi coletado e centrifugado por 20 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 de *E. cuniculi* utilizou-se a câmara de Neubauer.

2.4. Inoculação orofaríngea dos camundongos

Os camundongos foram anestesiados com sevoflurano por dispersão em câmara, até que os animais perdessem os movimentos e permitissem administração do patógeno pela

via eleita. Os animais foram suspensos, a língua foi tracionada lateralmente e o inóculo foi administrado na orofaringe, com micropipeta. Como ação reflexiva autônoma o camundongo inalou a solução inoculada (Nielsen *et al.,* 2018). Após a inalação a língua foi solta e o camundongo colocado em uma gaiola e monitorizado até acordar da anestesia.

Os camundongos foram infectados com $1x10^7$ esporos de *E. cuniculi* em 50 µl de solução tampão fosfato-salina (PBS) esterilizado, pela aspiração orofaríngea. O grupo controle Sham, de camundongos tratados ou não com Cy receberam pela mesma via apenas solução de NaCl a 0,9% esterilizado 50 µl.

2.5. Delineamento experimental

Os camundongos em um total de 30 animais, foram distribuídos em 2 experimentos. No primeiro formaram 3 grupos: *Controle* (n=5) – camundongos sem qualquer inoculação*, Infectado* (n=5) – camundongos inoculados com 50 µl de solução PBS esterilizado contendo esporos de *E. cuniculi* e *Sham* (n=5) – camundongos que receberam 50 µl de solução de NaCl a 0,9% esterilizado. No segundo experimento, os grupos constituídos foram: *Cy-não-Infectado* (n=5) – camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida (Cy) e não-inoculados com o patógeno, *Cy-Infectado* (n=5) – camundongos imunossuprimidos com Cy e inoculados com 50 µl de solução PBS esterilizado contendo esporos de *E. cuniculi* e *Cy-Sham* (n=5) – camundongos imunossuprimidos com Cy e inoculados com 50 µl de solução de NaCl a 0,9% esterilizado. Após 14 dias de infecção, os animais foram submetidos à eutanásia para análise histopatológica dos pulmões, baço e fígado, fenotipagem das células inflamatórias dos pulmões e lavado broncoalveolar (BAL), dosagem de citocinas no sangue e mensuração da carga fúngica nos pulmões (Fig. 1A).

No segundo experimento, os camundongos receberam uma dose semanal de 200 mg/kg de Cy por via intraperitoneal (Genuxal®, Asta Médica Oncologia, São Paulo, Brasil), uma vez por semana, tendo sido iniciada com 14 dias antes da inoculação do patógeno e mantida uma aplicação semanal por todo o período experimental (Lallo, Hirschfeld; 2012) (Fig. 1B).

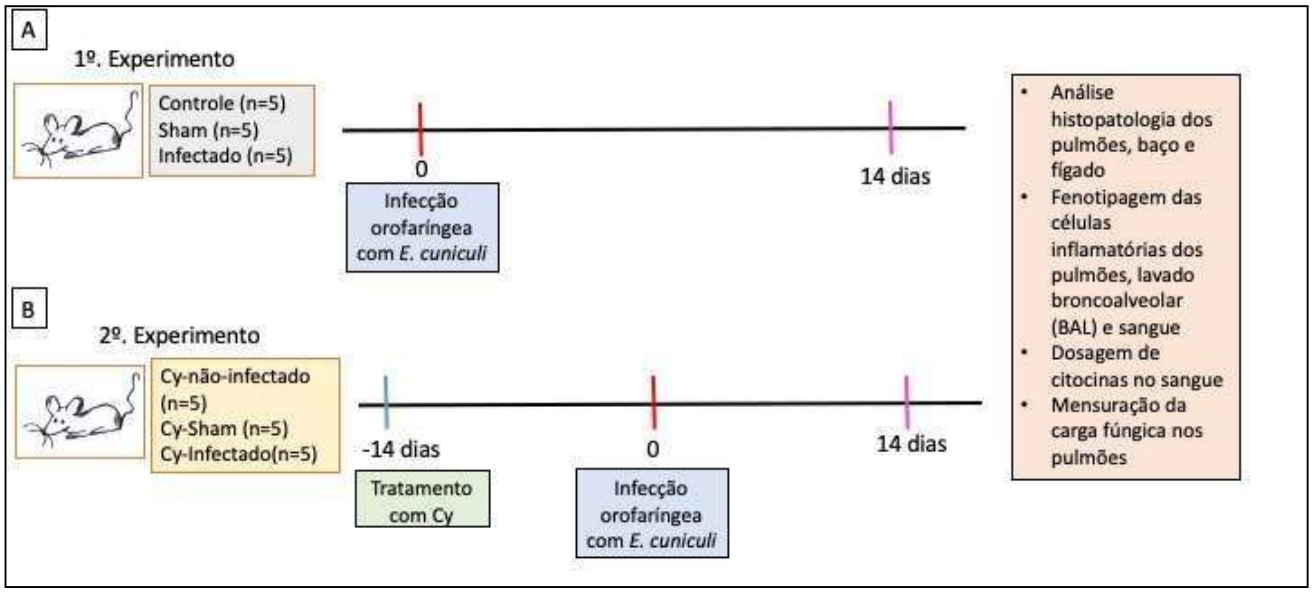


Figura 1. Delineamento experimental. A) Primeiro experimento: camundongos foram distribuídos e 3 grupos e infectados com *E. cuniculi*. Após 14 dias foram submetidos às análises histopatológica, fenotipagem das células imunes, dosagem de citocinas e da carga fúngica. B) Segundo experimento: camundongos foram distribuídos e 3 grupos, tratados por duas semanas com ciclofosfamida (Cy) e infectados em *E. cuniculi*. Após 14 dias foram submetidos às análises histopatológica, fenotipagem das células imunes, dosagem de citocinas e da carga fúngica.

2.6. Necropsia e coleta de amostras

Imediatamente após a eutanásia com aprofundamento anestésico com a utilização das drogas quetamina (100 mg/Kg), xilazina (2,5 mg/Kg) e acepromazina (2,5 mg/Kg) administradas por via intraperitoneal, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca. O sangue foi colocado em frasco de hemograma com EDTA, centrifugado para separação do plasma, e o plasma foi congelado em -80 ºC.

A cavidade torácica foi aberta para realização do BAL, sendo a traquéia isolada e fixada para infusão de 1 ml de HBSS com 2% SFB, que foi aspirado seguidamente. Este procedimento foi realizado por duas vezes consecutivas e o material coletado foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm, e o sedimento contendo as células foi distribuído em placa com 96 poços e fundo em V.

O pulmão foi retirado, pesado e o lobo pulmonar esquerdo, foi separado para a dosagem da carga fúngica, sendo esse mantido a -80 ºC. Um lobo pulmonar esquerdo foi fixado em formol tamponado a 10% para histopatologia, e o restante dos pulmões foram dissociadas mecanicamente (BD Medimachine, Bruino, TO, Itália) e as suspensões celulares

resultantes foram filtradas em *cell strainer* de 70 µm e tratadas com tampão hemolítico. Os sedimentos contendo células obtidos por estes processos foram também distribuídos em placa com 96 poços e fundo em V e utilizados para fenotipagem. Adicionalmente, o fígado e o baço foram coletados e fixados em formol tamponado a 10%, sendo processados rotineiramente para histopatologia.

2.7. Análise histopatológica e morfometria

Fragmentos de pulmões foram fixados em formol tamponado a 10% por 72 horas e processados rotineiramente para análise histopatológica. Os cortes de 5 µm dos tecidos emblocados foram dispostos em lâminas de vidro e corados pela técnica de Hematoxilina & Eosina (HE) e examinados à microscopia de luz (Leica DMLD, Greenville, SC, USA). A área tecidual perialveolar do pulmão foi avaliada a partir de imagens digitalizadas e mensuradas por análise morfométrica com MetaMorph Software (Molecular Devices, Califórnia, EUA). Mensuramos os *hotspots* em pixels das lesões de quatro animais de cada grupo experimental, e as médias das áreas de cada grupo experimental foram utilizadas para análise estatística.

2.8. Fenotipagem dos componentes imunológicos do pulmão

As amostras obtidas do pulmão e do BAL 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), para bloqueio dos receptores Fc. 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 *Phycoerithrin* - 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 µLde PBS, centrifugadas a 4°C por 5 minutos com 500g, o sobrenadante descartado e as células fixadas em solução tamponada de paraformoldeído (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$^+$). Adicionalmente, as demais células foram identificadas de acordo com ofenótipo a seguir: linfócitos T CD4$^+$ (CD45$^+$CD4$^+$), linfócitos T CD8$^+$ (CD45$^+$CD8$^+$) e linfócitos B (CD45$^+$CD19$^+$), (HUSSELL; BELL, 2014).

2.9. Quantificação das citocinas

O plasma sanguíneo 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, TNF-α e IFN-γ. Brevemente, 20 µL 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 ressuspendidas no mesmo tampão para análise de 2 cores por citômetro de fluxo BD Accuri™C6 (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. Mensuração da Carga fúngica

Determinamos a carga fúngica pela 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 lobo pulmonar constante, também pesado, foi coletado para extração de DNA, sendo congelado em RNAlater a -20ºC por 30 dias. Utilizamos o kit de extração Qiagen-DNeasy Blood &Tissue (Qiagen®) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos pulmonares foram então descongelados e cortados em pedaços menores, com posterior adição do tampão ATL e da proteinase K, na proporção de 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K por 25 mg de tecido pulmonar. Cada tubo foi misturado com vórtex vigorosamente por 20 a 30 segundos e incubados a 56°C em banho-maria. A cada 15 minutos, realizamos a homogeneização até que o tecido ficasse completamente lisado. Posteriormente, transferimos 1 mL do material lisado para um novo

tudo e adicionado 200 µL de tampão ATL, que foi misturado no vórtex por 30 segundos e incubados no banho maria a 70°C por 10 minutos, sendo adicionado a seguir 200 µL de etanol a 100% e homogeneizado novamente no vórtex.

O DNA extraído foi transferido para outro tubo com adição de 500 µL do Buffer AW1e centrifugado por 1 min a 6000 g, a coluna foi transferida para outro tubo de 2 mL e adicionado 500 µL do Buffer AW1. Em seguida foi armazenado a -20ºC para avaliação do desempenho da PCR quantitativa em tempo real.

Para a 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.

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 $1x10^7$ esporos/mL purificados, obtidos de cultura celular e quantificados por espectrofotometria (BioDrop µLite, Biochrom). Para cada reação, o software procurou o melhor ajuste entre os pontos, calculou e forneceu o coeficiente de regressão linear (R2) e o slope (inclinação da curva). O R2 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 R2 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 (R2) 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.

2.11. Análise estatística

As comparações estatísticas foram feitas mediante o teste T ou teste de variância ANOVA de uma via, seguido pelos pós teste de Tukey. Os valores utilizados como média ± erro padrão, padrão com significância para valores menores que $p<0,05$. Todas as análises estatísticas forma realizadas no programa Graph Pad Prism.

3. Resultados

3.1. Camundongos infectados apresentaram pneumonia intersticial

Pela análise histopatológica, os animais infectados com o patógeno apresentaram infiltrados inflamatórios alveolares com predomínio linfoplasmocítico (Fig. 2A). No grupo *Sham* em sua maioria apresentavam histologicamente pulmões preservados (Fig. 2B), porém também se observou descamação de pneumócitos sugestivas de pneumonia broncoaspirativa, sendo essa atribuída à administração de solução estéril de cloreto de sódio. Eventualmente, denso infiltrado mononuclear em forma nodular foi observado nos animais infectados (Fig. 2C, D). A presença de esporos de *E. cuniculi* no interior de células foi rara. No fígado foram observados infiltrados leucocitários (Fig. 2E, F) compatíveis com a presença do patógeno, sugerindo a disseminação da infecção adquirida pela via orofaríngea.

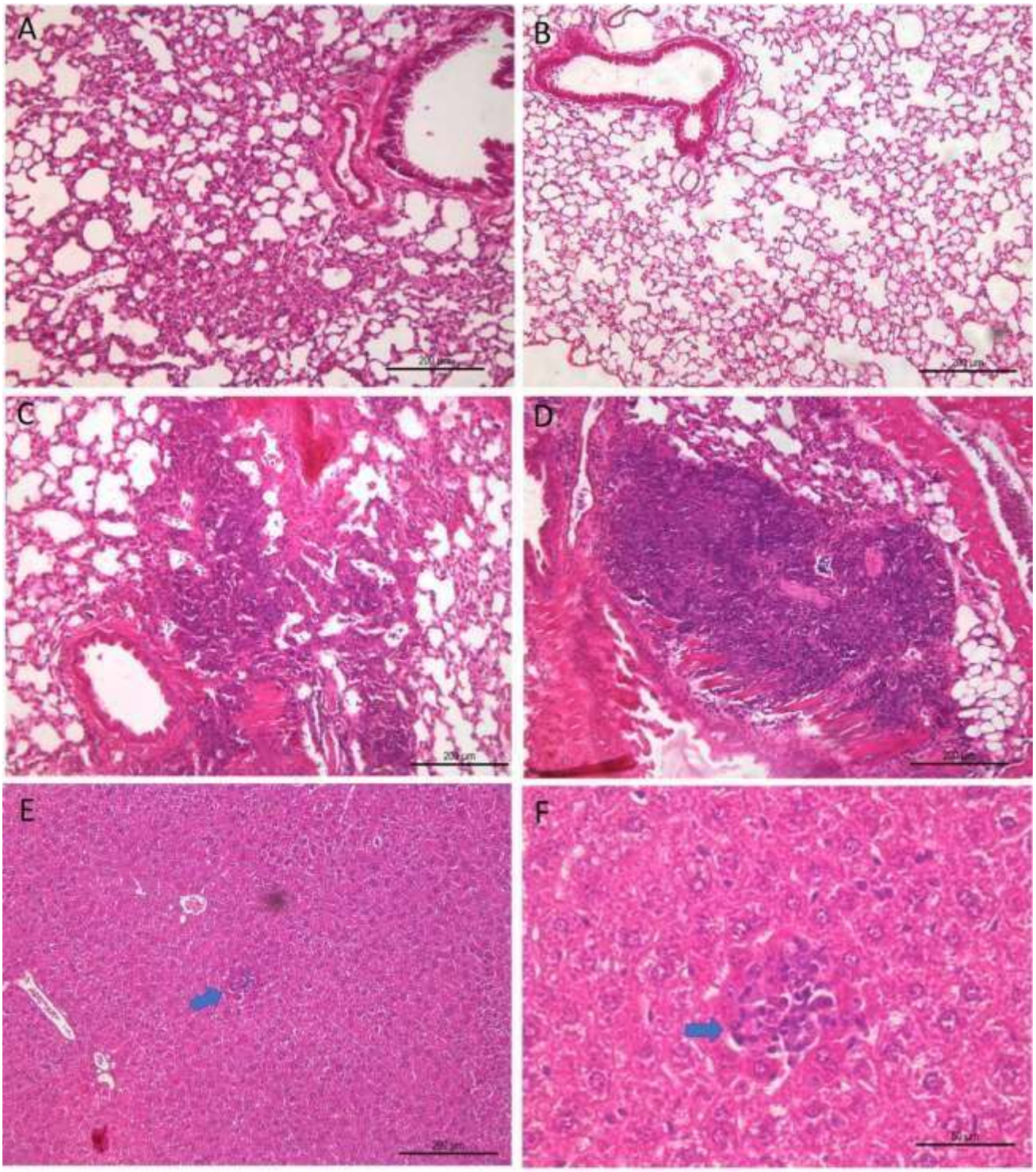


Figura 2. Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão e fígado de camundongos infectados ou não pela via orofaríngea. A) Imagem panorâmica de pulmão de camundongo infectado com *E. cuniculi* exibindo espessamento difuso de paredes alveolares. B) Pulmão de camundongo do grupo Sham, histologicamente preservado. C e D) Pulmão de camundongos infectados com *E. cuniculi* exibindo denso infiltrado mononuclear, assumindo aspecto nodular em D. E) Fígado de camundongos infectados com *E. cuniculi* com discreto infiltrado leucocitário (seta). F) Detalhe da imagem anterior evidenciando infiltrado mononuclear.

3.2. Animais infectados mostraram menor percentual de linfócitos e aumento de macrófagos.

A infecção pela via orofaríngea foi acompanhada pela manutenção das porcentagens de linfócitos T CD8⁺ mensurados nos parênquimas pulmonares e no BAL em relação aos controles. Entretanto, a porcentagem das células T CD4⁺ nos pulmões e de células B nos pulmões e no BAL foram menores que dos controles (Fig. 3B, C). No sangue não foram encontradas diferenças nas quantidades de linfócitos T e B (Fig. Suplementar 1).

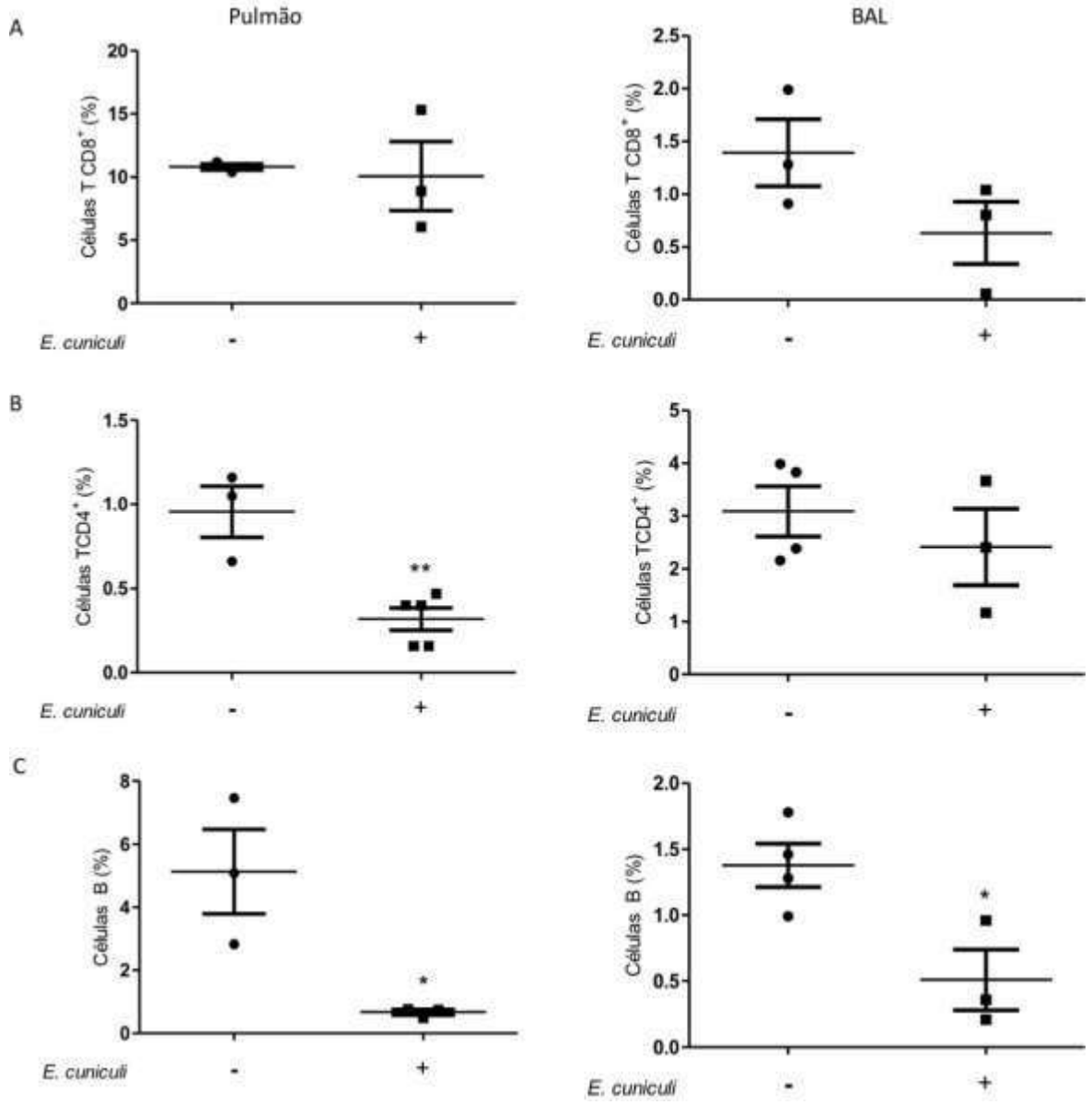


Figura 3. Quantificação de linfócitos presentes nos pulmões ou lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos infectados (+) ou não (-) com *E. cuniculi.* A) Percentual de linfócitos T $CD8^+$ no pulmão e BAL. B) Percentual de linfócitos T $CD4^+$ no pulmão e BAL. C) Percentual de linfócitos B no pulmão e BAL. Teste T revelou $p<0,05$*, $p<0,01$**.

Embora com valores totais de macrófagos semelhantes aos grupos controles (Fig. 4A), o número e porcentagem dos macrófagos intersticiais ($F4/80^+CD11b^+SiglecF^-$) e o número de macrófagos alveolares ($F4/80^+CD11b^-SiglecF^+$) estavam aumentados nos pulmões dos animais do grupo *Infectado* em relação ao *Controle* (Fig. 4B, C). No BAL, a população de macrófagos estava aumentada, sendo essa atribuída especialmente ao expressivo aumento no número e na porcentagem os macrófagos alveolares ($F4/80^+CD11b^-SiglecF^+$), frente aos controles (Fig. 5A, B, C). No sangue, não se observou diferenças. (Fig. Suplementar 2).

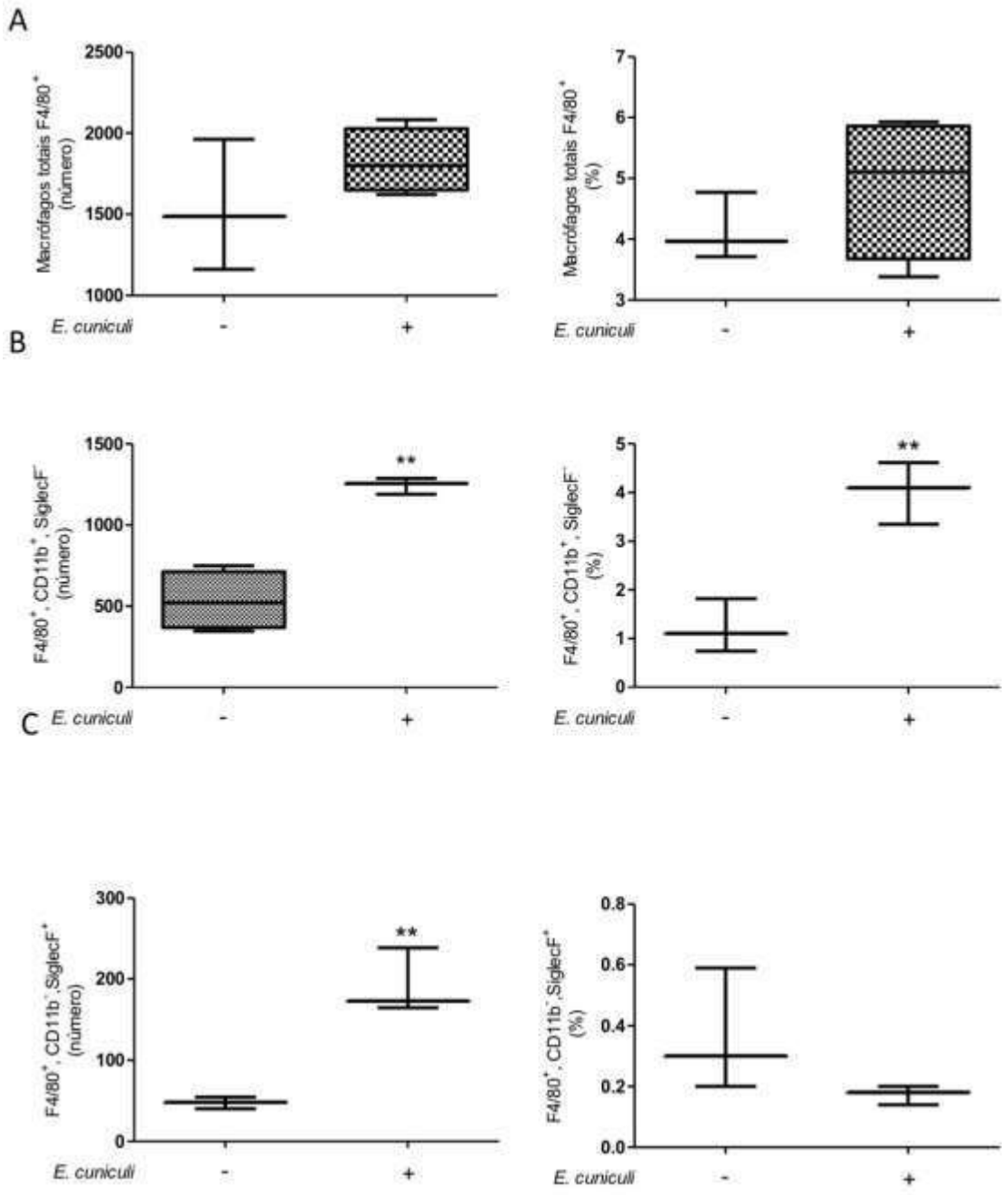


Figura 4. Avalição dos macrófagos presentes nos pulmões de camundongos inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) População total e % de macrófagos nos pulmões. B) População e % de macrófagos F4/80$^+$, CD11b$^+$, SiglecF$^-$ (intersticiais) totais nos pulmões. C) População e % de macrófagos F4/80$^+$, CD11b$^-$, SiglecF$^+$ (alveolares) totais nos pulmões. Teste T revelou $p<0,01$**.

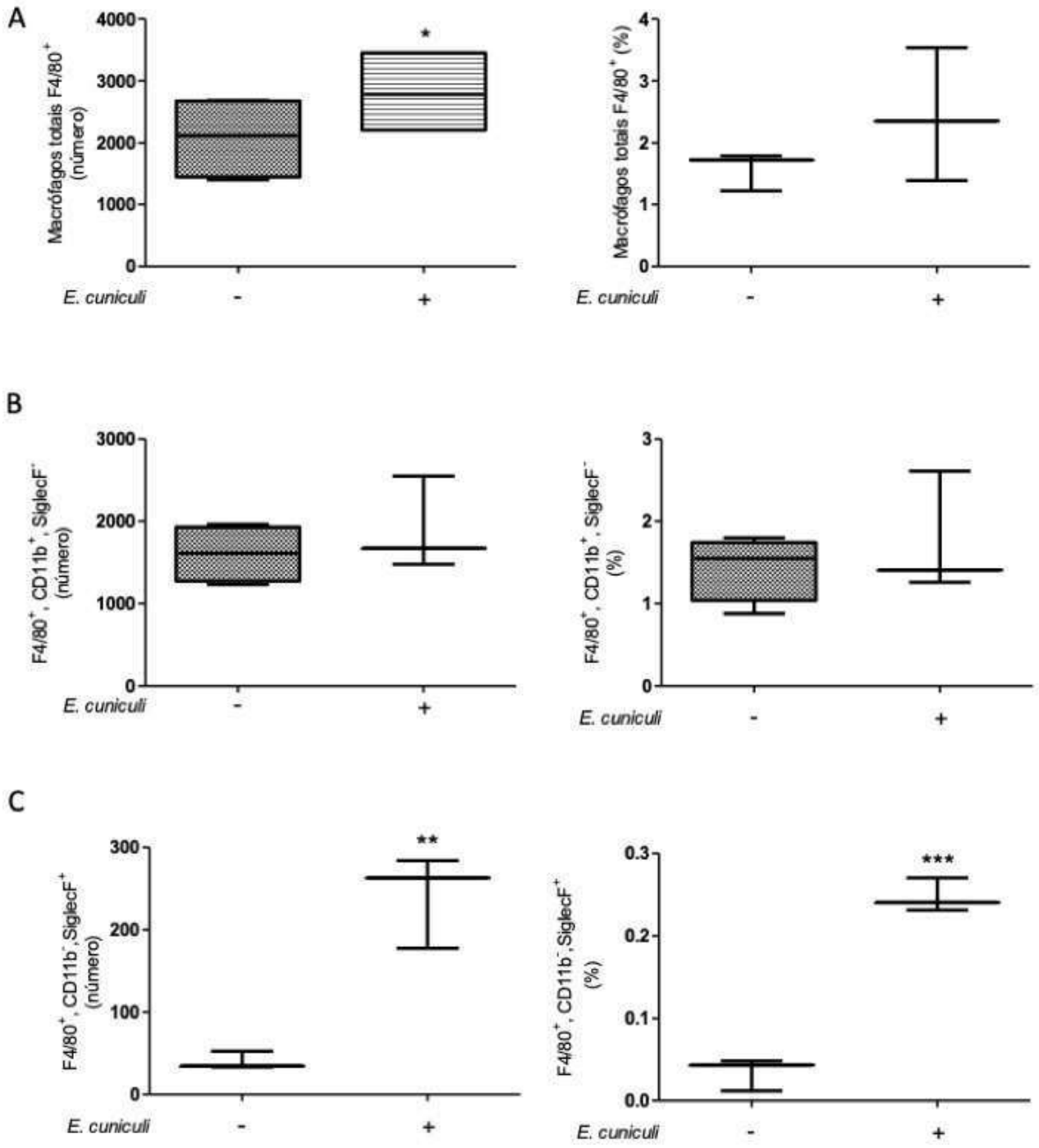


Figura 5. Avalição dos macrófagos presentes nos lavados broncoalveolares de camundongos inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) População total e % de macrófagos nos pulmões. B) População e % de macrófagos F4/80$^+$, CD11b$^+$, SiglecF$^-$ (intersticiais) totais nos pulmões. C) População e % de macrófagos F4/80$^+$, CD11b$^-$, SiglecF$^+$ (alveolares) totais nos pulmões. Teste T revelou $p<0,05$*, $p<0,01$**, $p<0,001$***.

3.3. Perfil misto de citocinas Th1, Th2 e Th17 no grupo Infectado.

As citocinas pró e anti-inflamatórias dos perfis Th1, Th2 e Th17 mensuradas no grupo *Infectado* estavam aumentadas em relação aos controles (Fig. 6). Particularmente, TNF-α, IL-2 e IL-6 tiveram seus valores aumentados 2 e 4 vezes em relação aos controles. A infecção por *E. cuniculi* determinou também aumento de IFN-γ. Entre as citocinas antiinflamatórias, IL-4 também estava aumentada em relação aos controles e a IL-10 não foi detectada. Outro fato interessante foi a detecção aumentada de IL-17 no grupo infectado em relação ao Sham, porém sem diferença com o grupo controle.

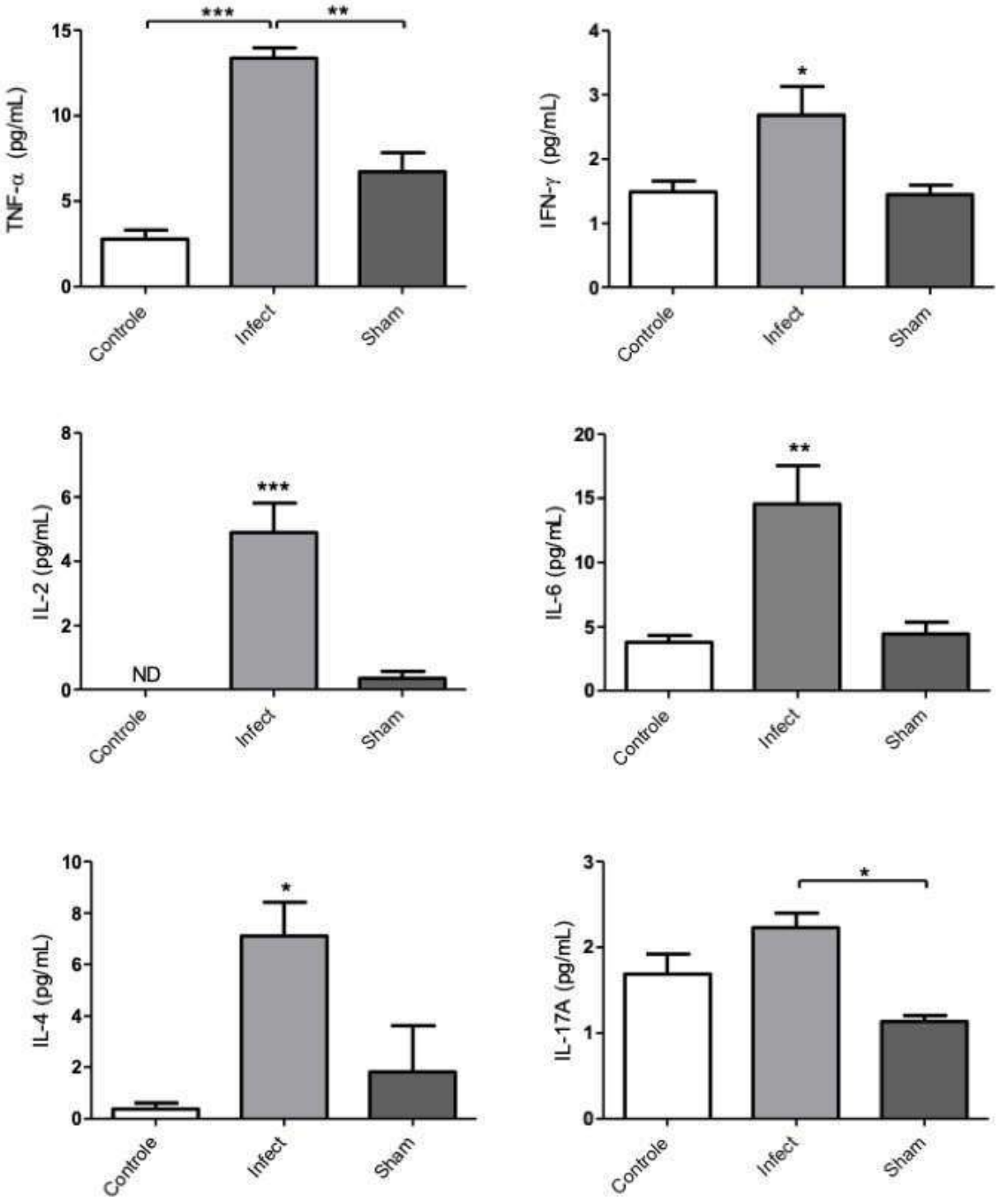


Figura 6. Mensuração de citocinas Th1, Th2 e Th17 no soro de camundongos. Grupos - *Controle* (não infectado), *Infectado* (Infectado com *E. cuniculi*), *Sham* (solução fisiológica estéril pela via orofaríngea). A) TNF-α B) IFN-γ C) IL-2 D) IL-6 E) IL-4 F) IL-17. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, $p<0,05$*, $p<0,01$**, $p<0,001$***.

3.4. Camundongos tratados com ciclofosfamida apresentaram menor carga parasitária e lesões histopatológicas.

Com a finalidade de mostrar o estabelecimento da infecção oportunista pelo *E. cuniculi* pela via orofaríngea, camundongos foram previamente tratados com o fármaco imunossupressor ciclofosfamida e infectados com o patógeno. A carga fúngica foi quantificada pela qPCR no tecido pulmonar e demonstrou ser maior em animais infectados não tratados com Cy em comparação aos tratados com o fármaco (Fig. 7).

Da mesma forma que os animais infectados, os animais tratados com Cy e infectados apresentaram lesões inflamatórias alveolares com predomínio de infiltrado linfoplasmocítico (Fig. 8A, B). Para comparar o efeito da imunossupressão sobre o estabelecimento da infecção pela via orofaríngea, foi realizada a mensuração em percentual de pixels dos *hotspots,* caracterizadas pelo infiltrado inflamatório linfoplasmocítico. No grupo *Infectado* a área de *hotspots* foi significativamente maior que no grupo *Cy-Infectado* (Fig. 8C).

A

Amostras	Número total de esporos nos pulmões
1	2946,74
2	1689,00
3	1550,00
4	2461,32
5	3058,92
6	551,04
7	2190,42
8	692,14
9	1659,77
10	1353,34

B

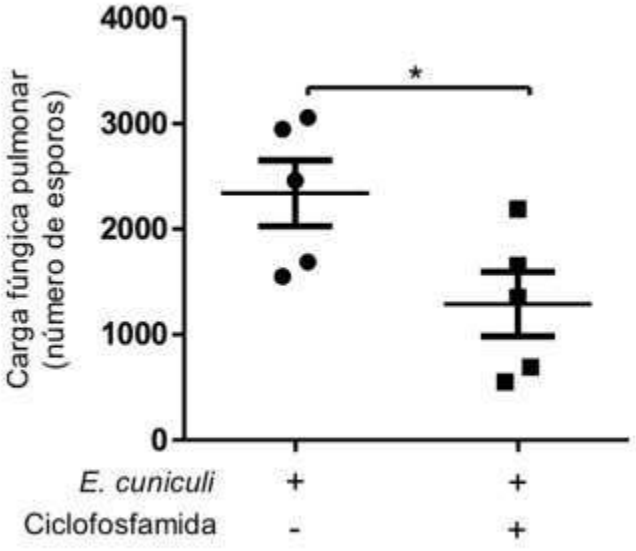


Figura 7. Carga fúngica dos animais infectados com *E. cuniculi* e tratados ou não com ciclofosfamida. A) Quadro com o número total de esporos mensurados pela qPCR nos pulmões de animais infectados (número de 1 a 5) e infectados e tratados com ciclofosfamida (número de 6 a 10). B) Número de esporos contabilizados pela qPCR nos grupos infectados (+) ou não (-) e tratados (+) ou não (-) com ciclofosfamida. Teste T revelou $p<0,05$*.

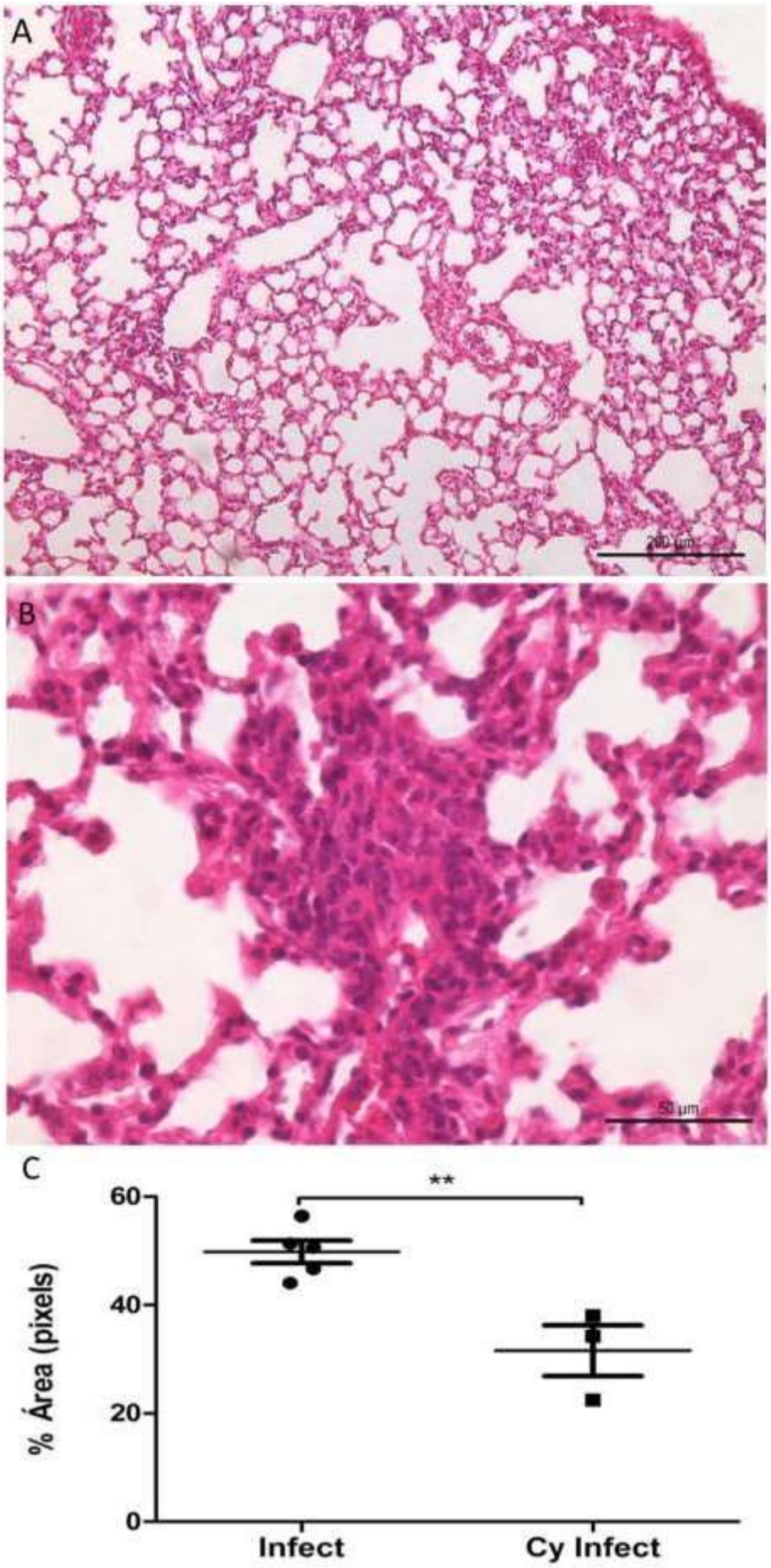

A
B
50 µm
C
**
60
40
20
0
% Área (pixels)
Infect
Cy Infect

Figura 8. Fotomicrografias de cortes histológicos e análise morfométrica de pulmão de camundongos tratados com ciclofosfamida e infectados pela via orofaríngea. A) Imagem panorâmica de pulmão de camundongo tratado com ciclofosfamida e infectado com *E cuniculi* exibindo discreto espessamento difuso de paredes alveolares. B) Pulmão de camundongos tratado com ciclofosfamida e infectados com *E. cuniculi* exibindo denso infiltrado mononuclear, assumindo aspecto nodular. C) Mensuração dos *hotspots*, áreas com predomínio de infiltrado inflamatório, em percentuais obtidos pelo software metamorph dos grupos *Infectado* e tratados com ciclofosfamida e infectados com *E. cuniculi* (*Cy-Infectado*). Teste T revelou $p<0,01^{**}$.

3.5. Aumento de linfócitos TCD8$^+$ foi associado a menor infecção no grupo imunossuprimido e infectado com *E. cuniculi*.

A porcentagem de linfócitos T CD8$^+$ nos parênquimas pulmonares estava aumentada animais do grupo *Cy-Infectado* em relação ao grupo *Cy-não-Infectado* (Fig. 9A). Ao mesmo tempo, os linfócitos T CD4$^+$ estavam aumentados no BAL desse mesmo grupo em todos os grupos em relação ao grupo *Cy-não-Infectado* (Fig. 9B). Nas análises de sangue, não foram encontradas diferenças nas quantidades de linfócitos T e B (Fig. Suplementar 3). As populações de macrófagos foram similares aos animais tratados com Cy sem a infecção, contudo foi identificado aumento de macrófagos, especialmente dos intersticiais (F4/80$^+$, CD11b$^+$, SiglecF$^-$) no BAL (Fig. 11B). Não houve diferenças de macrófagos no sangue (Fig. Suplementar 4). Os animais tratados com Cy infectados demonstraram aumento das citocinas IL-6, IL-17 e IL-4, contudo a citocina IL-2 estava reduzida em relação ao Cy-controle. No grupo Sham foi observado somente aumento de TNF-α.

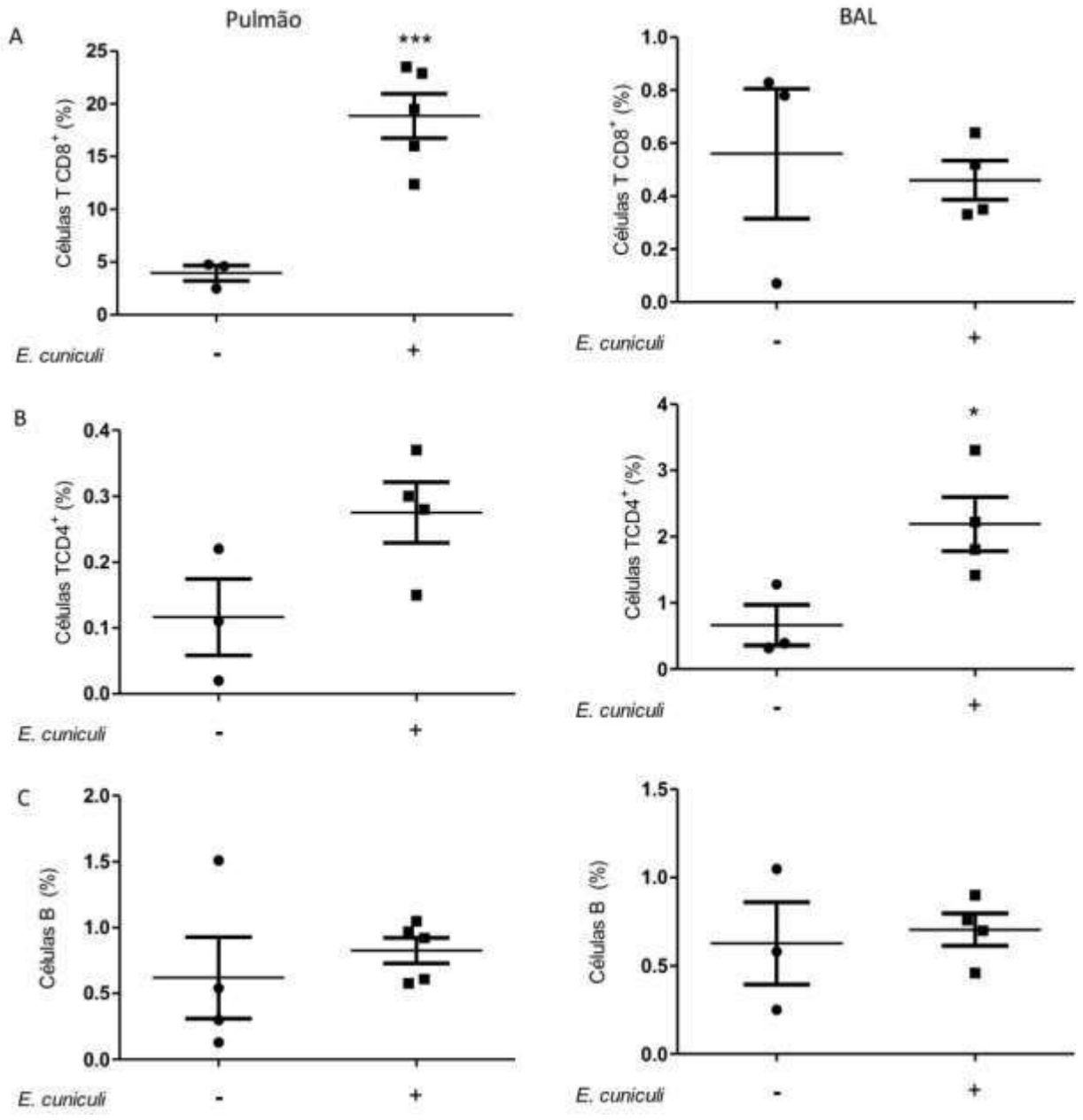


Figura 9. Quantificação de linfócitos presentes nos pulmões ou lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos tratados com ciclofosfamida e infectados (+) ou não (-) com *E. cuniculi.* A) Percentual de linfócitos T $CD8^+$ no pulmão e BAL. B) Percentual de linfócitos T $CD4^+$ no pulmão e BAL. C) Percentual de linfócitos B no pulmão e BAL. Teste T revelou $p<0,05$*, $p<0,001$***

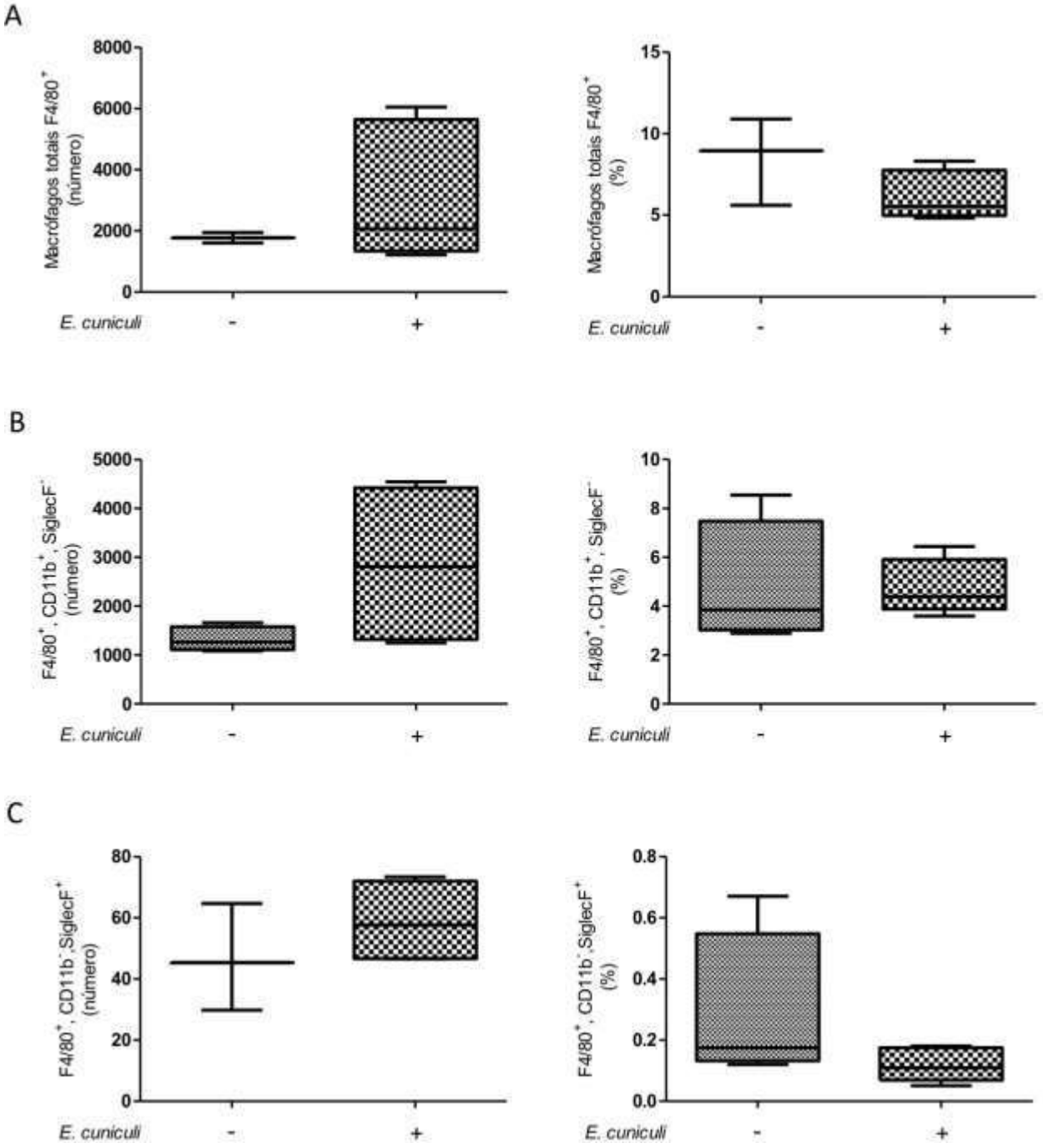


Figura 10. Avalição dos macrófagos presentes nos pulmões de camundongos tratados com ciclofosfamida e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) População total e % de macrófagos nos pulmões. B) População e % de macrófagos F4/80^{+}, CD11b^{+}, SiglecF^{-} (intersticiais) totais nos pulmões. C) População e % de macrófagos F4/80^{+}, CD11b^{-}, SiglecF^{+} (alveolares) totais nos pulmões. Teste T revelou não revelou significância.

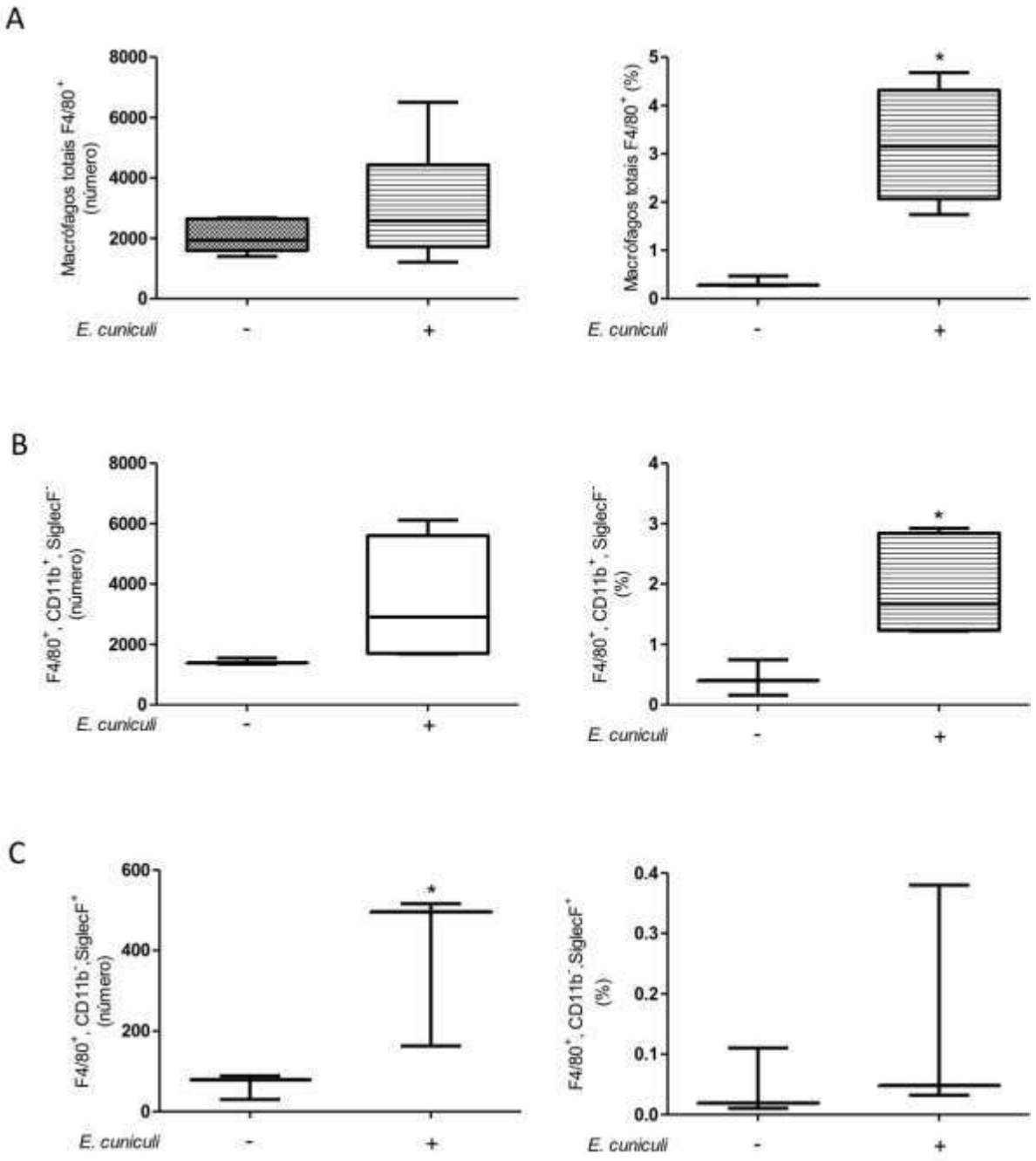


Figura 11. Avalição dos macrófagos presentes nos lavados broncoalveolares de camundongos tratados com ciclofosfamida e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) População total e % de macrófagos nos pulmões. B) População e % de macrófagos F4/80$^+$, CD11b$^+$, SiglecF$^-$ (intersticiais) totais nos pulmões. C) População e % de macrófagos F4/80$^+$, CD11b$^-$, SiglecF$^+$ (alveolares) totais nos pulmões. Teste T revelou $p<0,05$*.

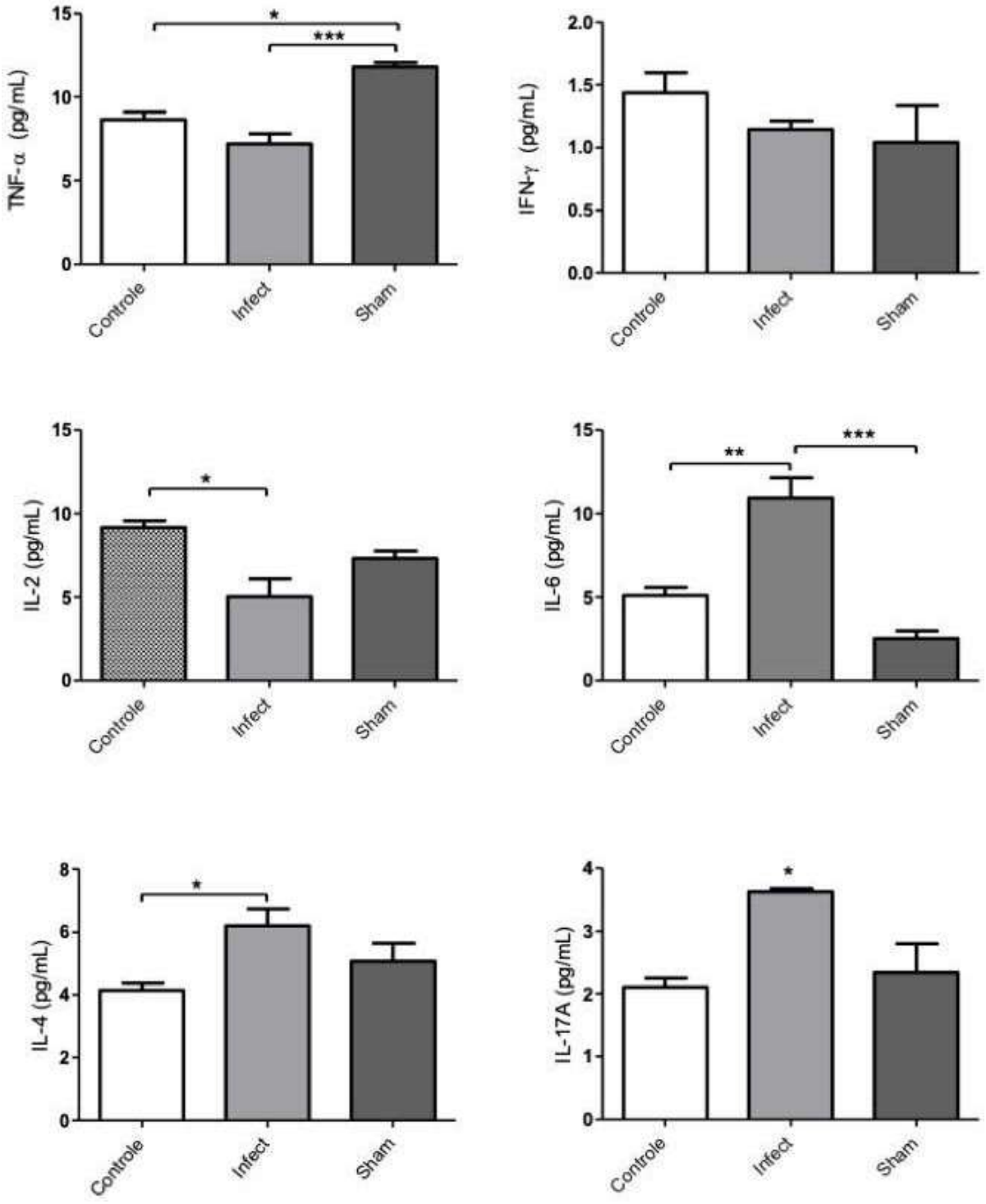


Figura 12. Mensuração de citocinas Th1, Th2 e Th17 no soro de camundongos tratados com ciclofosfamida. Grupos - Controle (não infectado), Infectado (Infectado com *E. cuniculi*), Sham (solução fisiológica estéril pela via orofaríngea). A) TNF-α B) IFN-γ C) IL-2 D) IL-6 E) IL-4 F) IL-17. Análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste Tukey revelou diferenças estatisticamente significantes, p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***.

Em conjunto, esses resultados caracterizam que a via orofaríngea permitiu o estabelecimento da infecção pelo *E. cuniculi* nos tecidos pulmonares com consequente resposta inflamatória, resultando em pneumonia intersticial, às vezes mista, em animais tratados os não com ciclofosfamida. Ao contrário do esperado, a carga fúngica foi maior nos animais não imunossuprimidos em detrimento ao grupo tratado com Cy (Quadro 1). Nos animais infectados não-tratados foi observada redução das células T e B, embora com aumento de macrófagos e padrão misto de citocinas. Nos animais tratados com Cy, notou-se predomínio linfócitos T CD8, com aumento de IL-17, IL-6 e IL-4 (Quadro 1).

Quadro 1. Resumo dos resultados observados nos parâmetros avaliados nos experimentos com animais infectados e imunossuprimidos infectados com *E. cuniculi*

Parâmetro avaliado	**Grupo Infectado**	**Grupo Cy-Infectado**
Carga fúngica	>	
Percentual de lesão pulmonar	>	
Mensuração de linfócitos	↓ células T $CD4^+$ no pulmão ↓ células B no pulmão e BAL	↑ células T $CD8^+$ no pulmão
Mensuração de macrófagos	↑ de macrófagos intersticiais no pulmão e BAL ↑ de macrófagos alveolares no pulmão e BAL	↑ de macrófagos intersticiais no BAL ↑ de macrófagos alveolares no BAL
Citocinas Th1	↑ TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-6	↑ IL-6 e ↓ IL-2
Citocinas Th2	↑ IL-4	↑ IL-4
Citocinas Th17	-	↑ IL-17

4. Discussão

Os microrganismos podem infectar o trato respiratório inferior por 4 vias: 1) aspiração do conteúdo da orofaringe; 2) inalação de aerossóis infectados; 3) disseminação da infecção através de áreas contíguas; 4) disseminação hematógena através de áreas infecciosas extrapulmonares (por exemplo na infecção do trato gastrintestinal). Dentre as formas existentes para os microrganismos alcançarem o trato respiratório inferior, duas merecem destaque, a difusão hematógena e a aspiração. Algumas pesquisas relatam que a aspiração de microrganismos originários das vias aéreas superiores durante o sono ocorre em 45% dos pacientes saudáveis e em 70% dos pacientes com a percepção prejudicada, como em dependentes de álcool, usuários de drogas, epilépticos, em uso de sedação contínua (Guarner and Brandt, 2011). Independente da espécie, o pulmão é o sítio de infecção primária, porém a imunossupressão tornará o indivíduo suscetível à pneumonia clínica (Elango et al., 2022).

As infecções experimentais por microsporídios em camundongos e outros roedores pelas vias oral, hematógena ou intraperitoneal determinam doença disseminada com comprometimento respiratório em indivíduos imunocomprometidos (Han & Weiss, 2017; Kotkova *et al.*, 2013). O presente estudo demonstrou a ocorrência de pneumonia intersticial linfoplasmocítica ou mista em todos os camundongos infectados com *E. cuniculi* pela via orofaríngea, preenchendo uma lacuna no conhecimento epidemiológico dessa zoonose, uma vez que esta rota de infecção não havia sido demonstrada experimentalmente. Adicionalmente, os fungos são agentes potenciais de infecção respiratória em imunossuprimidos, sendo geralmente responsáveis por quadros clínicos graves (Corrêa *et al.,* 2017), portanto, a evidência da infecção pelo *E. cuniculi* por via orofaríngea, sugere que nas infecções oportunistas pelos microsporídios, essa via pode ser empregada.

Na infecção pela via intraperitoneal por *E. cuniculi,* foram observados graus variáveis de degeneração, necrose e descamação do epitélio bronquiolar, infiltrados inflamatórios compostos por células mononucleares encontrados no parênquima pulmonar de animais submetidos ao tratamento imunossupressor, determinando espessamento dos septos alveolares, sendo igualmente mais pronunciados nos camundongos imunossuprimidos e infectados com *E. cuniculi* (De Vooght *et al.*, 2009). Corroborando parte desses resultados, aqui também foi identificado infiltrado inflamatório mononuclear, porém o padrão misto foi eventual, a o infiltrado inflamatório foi menor no grupo tratado com o imunossupressor.

A ciclofosfamida, fármaco ciclo celular não específico, é um agente alquilante derivado da mostarda nitrogenada que atua incorporando um grupamento alquila ao DNA, impedindo sua síntese e divisão. Os efeitos tóxicos incluem leucopenia, êmese, diarréia e anorexia, que podem ser encontradas frequentemente devido à ação citostática inespecífica da ciclofosfamida, com efeitos também sobre outras células em constante divisão, como as células das mucosas esofágica, gástrica e intestinal. O efeito imunossupressor da ciclofosfamida tem sido atribuído a sua atuação no DNA das células inflamatórias, além de apresentar efeito supressor na medula óssea. O efeito citotóxico é devido a interação de seus metabólitos alquilantes e o DNA. A escolha da ciclofosfamida como droga imunossupressora tem se estabelecido cada vez mais frequente, apesar de seu efeito imunossupressor ainda estar sendo discutido (Chun, *et al*., 2001).

Em trabalhos anteriores,esse fármaco tem possibilitado infecção por *E. cuniculi* pela via peritoneal mais grave,disseminada e com aumento expressivo da letalidade (Lallo, Hirschfeld, 2012; FranciscoNeto et al., 2017; Moysés et al, 2022). Ao contrário do que foi observado na infecção decamundongos pelo *E. cuniculi* por via intravenosa (Moreira *et al.*, 2022), a carga fúngica dogrupo imunossuprimido foi menor que nos camundongos não tratados com ciclofosfamida einfectados pelo *E. cuniculi*, fato bastante intrigante. Para entender o que levou a esseachado, foram avaliadas as quantidades de linfócitos T $CD8^+$ nos pulmões dos gruposinfectados e seus controles. O grupo *Cy-Infectado* teve maior porcentagem de linfócitos $TCD8^+$ em comparação com os demais grupos. Estudos anteriores demonstram que os linfócitos T $CD8^+$ são as células efetoras na encefalitozoonose (Moretto *et al.,* 2007), fatoque pode justificar a menor carga fúngica encontrada neste grupo. Por sua vez, a menorresistência do grupo não imunossuprimido à infecção pela via orofarígea foi surpreendente.

No pulmão existem duas populações distintas de macrófagos: - macrófagos alveolares (MA), que estão em estreito contato com as células epiteliais dos tipos I e II dos alvéolos, e - macrófagos intersticiais (MI), que residem no parênquima entre o endotélio microvascular e o epitélio alveolar. O fenótipo funcional dos MA é modulado pelo microambiente único do pulmão que inclui contato íntimo com células epiteliais, alta tensão de oxigênio e exposição a fluido rico em surfactante, sendo críticos para a homeostase do tecido, defesa do hospedeiro, eliminação do surfactante e detritos celulares, reconhecimento de patógenos, iniciação e resolução da inflamação pulmonar e reparo do tecido danificado (Hu, 2019).

No presente estudo, demonstrou-se aumento das populações de MA (F4/80^{+}CD11b^{-} SiglecF^{+}) nos pulmões e BAL dos animais infectados não-imunossuprimidos, nos quais também foram identificadas maiores carga fúngica e infiltrado inflamatório, caracterizando pneumonia por *Encephalitozoon cuniculi* mais pronunciada. Foi demonstrada pneumonia mais branda em camundongos deficientes de MAs e infectados com metapneumovírus humano, com menor perda de peso corporal, inflamação pulmonar, obstrução das vias aéreas em comparação com camundongos portadores de MAs. Por outro lado, pneumonia causada pelo vírus sincicial foi mais grave em camundongos deficientes de MAs, sugerindoque a atividade dos MAs pode variar em função do agente causal (Kolli *et al*.; 2014). É provável que a presença dos MAs, aqui relatada, possa estar associada à pneumonia mais grave na encefalitozoonose estabelecida pela via orofaríngea.

Como primeira linha de defesa, os MA iniciam a resposta imune inata no pulmão, contudo 2 fenótipos de MA podem ser identificados: macrófago classicamente ativado (MA-M1) e macrófago ativado alternativamente (MA-M2). Os macrófagos M1 respondem a fatores microbianos e citocinas pró-inflamatórias Th1 para exibir metabolismo glicolítico que está associado à liberação de citocinas inflamatórias, aumento da morte bacteriana e recrutamento de células imunes no parênquima pulmonar e alvéolo. Já os macrófagos M2 são induzidos, pela exposição às citocinas Th2, ao metabolismo oxidativo que está associado à liberação de citocinas antiinflamatórias, fagocitose de células apoptóticas (eferocitose) e deposição de colágeno que contribuem para a resolução da inflamação e reparo de tecidos danificados (Hu, 2019).

Nós hipotetizamos que o aumento de MAs associado ao perfil misto de citocinas, Th1 (IFN- γ, TNF-α e IL-6) e Th2 (IL-4), observado no soro dos animais, possam sugerir a presença concomitante de MA dos perfis M1 e M2 nos animais não imunossuprimidos. Em estudo anterior, nós observamos que a eferocitose é favorável ao *E. cuniculi* e induz ao perfil de macrófagos M2, favorecendo a multiplicação e disseminação do patógeno (Dalboni *et al.,* 2021), assim como descrevemos a mudança de perfil de macrófagos infectados com *E. cuniculi*. Nesse contexto, é provável que MAs possam ter contribuído com a maior suscetibilidade dos animais ao patógeno, atuando como “Cavalo de Tróia”.

Os macrófagos intersticiais (MIs) constituem a segunda linha de defesa nos pulmões contra os patógenos invasores, porém é importante ressaltar que existe uma dicotomia entre os MIs. Schyns et al. (2019) demonstraram que a população brônquica de MIs CD206^{+} tinham capacidade superior de secretar citocinas imunorreguladoras, incluindo IL-10, consistente com as funções homeostáticas relatadas na regulação da inflamação e fibrose.

Por outro lado, os MIs CD206⁻ exibiram perfil típico de células apresentadoras de antígenose demonstrou regular os processos relacionados às células T. O aumento nos MIs nos pulmões de camundongos infectados observado no presente estudo e associado à infecção mais grave pode sugerir a adoção de um perfil de imunorregulador, contudo é necessária a ampliação das investigações para maiores esclarecimentos. Por sua vez, os macrófagos MA e MI não estavam aumentados nos pulmões de camundongos tratados com Cy e infectados, os quais demonstraram resolução da infecção no período avaliado e demonstraram população aumentada de linfócitos T CD8, achados que deverão ser mais estudados.

Estudos anteriores mostraram que o aumento de citocinas Th1 no soro dos animais associado ao aumento de produtos reativos de oxigênio e nitrogênio como fatores importantes na resistência às infecções por *Encephalitozoon* em camundongos (Franzen *et al.,* 2005*;* Moretto *et al.,* 2007; Langanke dos Santos *et al.,* 2018). Corroborando nossos achados, que demonstram predomínio de citocinas Th1 (TNF-α, IFN- γ, IL-2, IL-6) no soro dos camundongos infectados.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com várias funções biológicas, incluindo a regulação do sistema imunológico pela produção de outras citocinas antiinflamatórias e pró-inflamatórias (Salát *et al.,* 2008). Estudo anterior, demonstrou que a diabetes mellitus (DM) aumentou a suscetibilidade de camundongos C57BL/6 à encefalitozoonose, os quais mostraram níveis mais elevados de IL-6 (Francisco Neto *et al.,* 2017), corroborando nossos resultados para animais não tratados com Cy. Em oposição, os animais tratados com Cy tinham níveis de IL-6 elevados associados à resolução da infecção, sugerindo papel antiinflamatório e reiterando a ambiguidade dessa citocina.

As citocinas Th17, divididas em seis subtipos de IL-17 de A à F, podem ser produzidas por um amplo espectro de populações celulares, incluindo células γδT, NKT, T CD8+, neutrófilos, micróglia e mastócitos (Khader *et al.*, 2011; Chiricozzi *et al.,* 2011*;* Moretto & Khan, 2022). Outras fontes importantes das IL-17 incluem células mieloides (por exemplo, rins e pulmões) e células de Paneth nas criptas intestinais (Khader et al., 2009). As respostas de IL-17A são necessárias para controlar a infecção por patógenos fúngicos, incluindo *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis carinii, Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (Rudner *et al.,* 2007; Murdock *et al.,* 2014; Sparber *et al.,* 2015; Huang *et al.,* 2016; Levy *et al*., 2016; Guerra *et al.*, 2017). Por outro lado, IL-17C induz inflamação letal por exacerbar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento de infecção fúngica sistêmica (Huang *et al.,* 2016). Esses efeitos paradoxais requerem investigação adicional. Nas condições descrita em nosso estudo, o aumento sérico de IL-17 observado

no grupo *Cy-Infectado*, com a menor inflamação e carga fúngica, sugere que essa citocina atuou em concordância com os resultados obtidos em outras infecções fúngicas (Rudner *et al.,* 2007; Murdock *et al.,* 2014; Sparber *et al.,* 2015; Huang *et al.,* 2016; Levy *et al*., 2016; Guerra *et al.*, 2017).

Os resultados nos permitiram concluir que a infecção via orofaríngea promoveu pneumonia por *E. cuniculi* em camundongos tratados ou não com ciclofosfamida, com mais gravidade em camundongos não imunossuprimidos, estabelecendo-se como modelo de pneumonia intersticial por aspiração.

5. Referências

Ambrosioni, J., van Delden, C., Krause, K.H., Bouchuiguir-Wafa, C., Nagy, M., Passweg, J., et al., 2010. Invasive microsporidiosis in allogeneic haematopoietic SCT recipients. Bone Marrow Transplant. 45, 1249-51. doi: 10.1038/bmt.2009.315.

Berkow, R. et al. 2005. Manual Merck de informação médica: saúde para a família. São Paulo: Manole. p. 1033-1034.

Chiricozzi, A., Guttman-Yassky, E., Suárez-Fariñas, M., Nograles, K.E., Tian, S., Cardinale, I., et al., 2011. Integrative responses to IL-17 and TNF-α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. J Invest Dermatol. 131, 677-87. doi: 10.1038/jid.2010.340.

Chun, R., Garret, I., Macewen, E.G. Cancer chemotherapy. In: withrow, s. J., macewen, e. G. Small animal clinical oncology. 3rd ed. Philadelphia: w. B. Saunders, 2001. P.92-113.

Corrêa, R.A., José, B.P.S., Malta, D.C., Passos, V.M.A., França, E.B., Teixeira, R.A., et al., 2017. Burden of disease by lower respiratory tract infections in Brazil, 1990 to 2015: estimates of the Global Burden of Disease 2015 study. Rev Bras Epidemiol. 20 (Suppl 01), 171-181. Portuguese, English. doi: 10.1590/1980-5497201700050014.

Dalboni, L.C., Alvares Saraiva, A.M., Konno, F.T.C., Perez, E.C., Codeceira, J.F., Spadacci-Morena, D.D., et al., 2021. *Encephalitozoon cuniculi* takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. PLoS One. 16, 0247658. doi: 10.1371/journal.pone.0247658.

De Vooght, V., Vanoirbeek, J.A., Haenen, S., Verbeken, E., Nemery, B., Hoet, P.H. 2009, Oropharyngeal aspiration: an alternative route for challenging in a mouse model of chemical-induced asthma. Toxicology. 259, 84-9. doi: 10.1016/j.tox.2009.02.007.

Elango, K., Mudgal, M., Murthi, S., Yella, P.R., Nagrecha, S., Srinivasan, V. et al. 2022. Trends in the epidemiology and outcomes of pneumocystis pneumonia among human immunodeficiency virus (HIV) hospitalizations. Int J Environ Res Public Health. 19, 2768. doi: 10.3390/ijerph19052768.

Francisco Neto, A., Dell'Armelina Rocha, P.R., Perez, E.C., Xavier, J.G., Peres, G.B., Spadacci-Morena, D.D.,2017. Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. PLoS One. 12, e0186954. doi: 10.1371/journal.pone.0186954.

Franzen, C., Müller, A., Hartmann, P., Salzberger, B., 2005. Cell invasion and intracellular fate of Encephalitozoon cuniculi (Microsporidia). Parasitology. 130, 285-92. doi: 10.1017/s003118200400633x.

Guarner, J., Brandt, M.E., 2011. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. Clin Microbiol Rev**.** 24, 247-280. doi: 10.1128/CMR.00053-10.

Guerra, E.S., Lee, C.K., Specht, C.A., Yadav, B., Huang, H., Akalin, A., 2017. Central role of IL-23 and IL-17 producing eosinophils as immunomodulatory effector cells in acute pulmonary aspergillosis and allergic asthma. PLoS Pathog. 13, e1006175. doi: 10.1371/journal.ppat.1006175.

Han, B., Pan, G., Weiss, L.M., 2021. Microsporidiosis in humans. Clin Microbiol Rev. 34, e0001020. doi: 10.1128/CMR.00010-20.

Han, B., Weiss, L.M., 2017. Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. Microbiol Spectr. 5, 10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016. PMID: 28944750; PMCID: PMC5613672.

Hu, G., Christman, J.W., 2019. Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. Front Immunol. 10, 2275. doi: 10.3389/fimmu.2019.02275.

Huang, J., Meng, S., Hong, S., Lin, X., Jin, W., Dong, C. 2016. IL-17C is required for lethal inflammation during systemic fungal infection. Cell Mol Immunol. 13, 474-83. doi: 10.1038/cmi.2015.56.

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

Khader, S.A., Gaffen, S.L., Kolls, J.K. 2009. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. Mucosal Immunol. 2, 403-11. doi: 10.1038/mi.2009.100.

Khan, I.A., Moretto, M., 1999. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. **Infect Immun.** 67, 1887-1893. doi: 10.1128/IAI.67.4.1887-1893.1999.

Kicia, M., Szydłowicz, M., Cebulski, K., Jakuszko, K., Piesiak, P., Kowal, A., et al., 2019. Symptomatic respiratory Encephalitozoon cuniculi infection in renal transplant recipients. Int J Infect Dis. 79, 21-25. doi: 10.1016/j.ijid.2018.10.016.

Kolli, D., Gupta, M.R., Sbrana, E., Velayutham, T.S., Chao, H., Casola, A., 2014. Alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of human metapneumovirus infection while protecting against respiratory syncytial virus infection. Am J Respir Cell Mol Biol. 51, 502-15. doi: 10.1165/rcmb.2013-0414OC.

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, M.A., Hirschfeld, M.M.P., 2012. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. Exp Parasitol. 131, 339–343.

Langanke Dos Santos, D., Alvares-Saraiva, A.M., Xavier, J.G., Spadacci-Morena, D.D., Peres, G.B., Rocha, P.R.D.A., et al., 2018. B-1 cells upregulate CD8 T lymphocytes and increase proinflammatory cytokines serum levels in oral encephalitozoonosis. Microbes Infect. 20, 196-204. DOI: 10.1016/j.micinf.2017.11.004.

Lévy, R., Okada, S., Béziat, V., Moriya, K., Liu, C., Chai, L.Y., et al., 2016. Genetic, immunological, and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A. 113, E8277-E8285. doi: 10.1073/pnas.1618300114.

Moretto, M.M., Khan, I.A., 2022. Immune response to Microsporidia. Exp Suppl. 114, 373-388. doi: 10.1007/978-3-030-93306-7_13.

Moretto, M.M., Weiss, L.M., Combe, C.L., Khan, I.A., 2007. IFN-gamma-producing dendritic cells are important for priming of gut intraepithelial lymphocyte response against intracellular parasitic infection. J Immunol. 179, 2485-92. doi: 10.4049/jimmunol.179.4.2485.

Carla Renata Serantoni Moysés, C.R.S., Alvares-Saraiva, A.M., Perez, E.C., Spadacci-Morena, D.D., da Costa, L.F., Xavier, J.G., Lallo, M.A. 2022. Mice with genetic and induced B-cell deficiency as a model for disseminated encephalitozoonosis. Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis., 81, 101742, doi: 10.1016/j.cimid.2021.101742.

Murdock, B.J., Huffnagle, G.B., Olszewski, M.A., Osterholzer, J.J., 2014. Interleukin-17A enhances host defense against cryptococcal lung infection through effects mediated by leukocyte recruitment, activation, and gamma interferon production. Infect Immun. 82, 937-48. doi: 10.1128/IAI.01477-13.

Nielsen, T.B., Yan, J., Luna, B., Spellberg, B., 2018. Murine oropharyngeal aspiration model of ventilator-associated and hospital-acquired bacterial pneumonia. J Vis Exp. 28, 57672. doi: 10.3791/57672.

Rudner, X.L., Happel, K.I., Young, E.A., Shellito, J.E., 2007. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. Infect Immun. 75, 3055-61. doi: 10.1128/IAI.01329-06.

Salát, J., Jelínek, J., Chmelar, J., Kopecky, J., 2008. Efficacy of gamma interferon and specific antibody for treatment of microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. Antimicrob Agents Chemother. 52, 2169-74. doi: 10.1128/AAC.01506-07.

Schyns, J., Bai, Q., Ruscitti, C., Radermecker, C., De Schepper, S., Chakarov, S., 2019. Non-classical tissue monocytes and two functionally distinct populations of interstitial macrophages populate the mouse lung. Nat Commun. 10, 3964. doi: 10.1038/s41467-019-11843-0.

Sparber, F., LeibundGut-Landmann, S., 2015. Interleukin 17-mediated host defense against *Candida albicans*. Pathogens. 4, 606-19. doi: 10.3390/pathogens4030606.

Wadi, L., Reinke, A.W., 2020. Evolution of microsporidia: an extremely successful group of eukaryotic intracellular parasites. PLoS Pathog. 16, e1008276. doi: 10.1371/journal.ppat.1008276.

Wiegers, H.M.G., van Nijen, L., van Woensel, J.B.M., Bem, R.A., de Jong, M.D., Calis, J.C.J., 2019. Bacterial co-infection of the respiratory tract in ventilated children with bronchiolitis; a retrospective cohort study. BMC Infect Dis. 19, 938. doi: 10.1186/s12879-019-4468-3.

ANEXO I- Material Suplementar

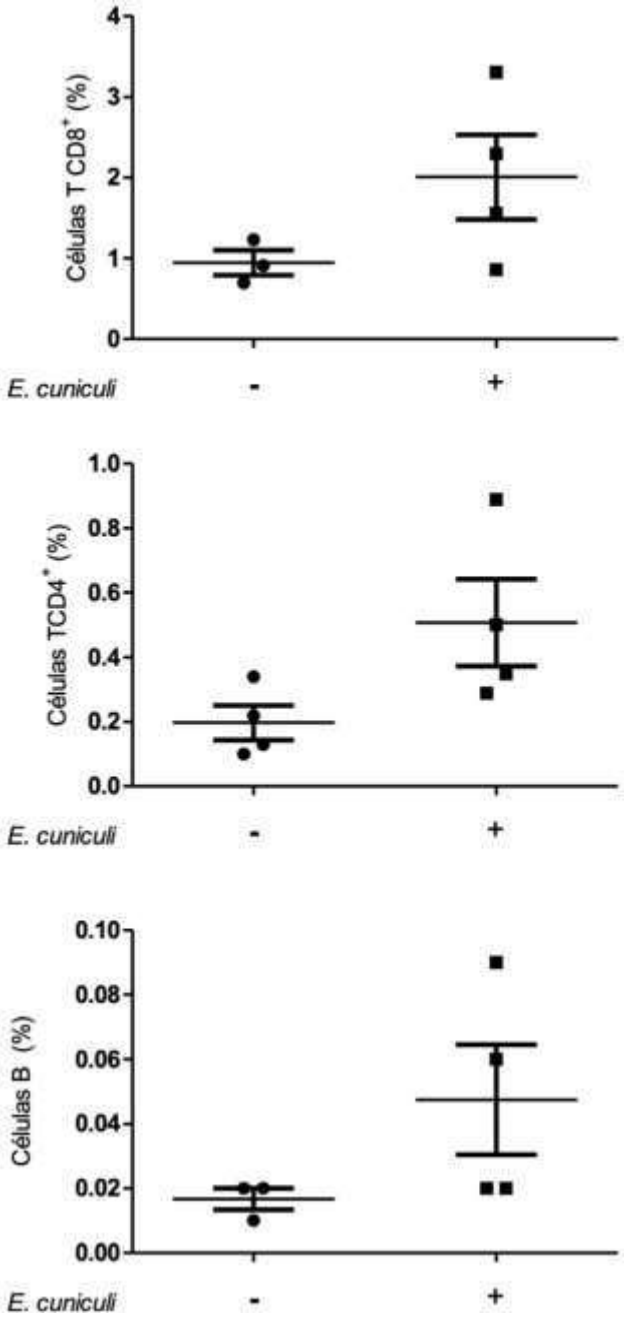


Figura suplemetar 1. Presença de linfócitos T e B no sangue de camundongos após infecção. Avaliação dos linfócitos presentes no sangue de camundongos C57BL/6 inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Teste T.

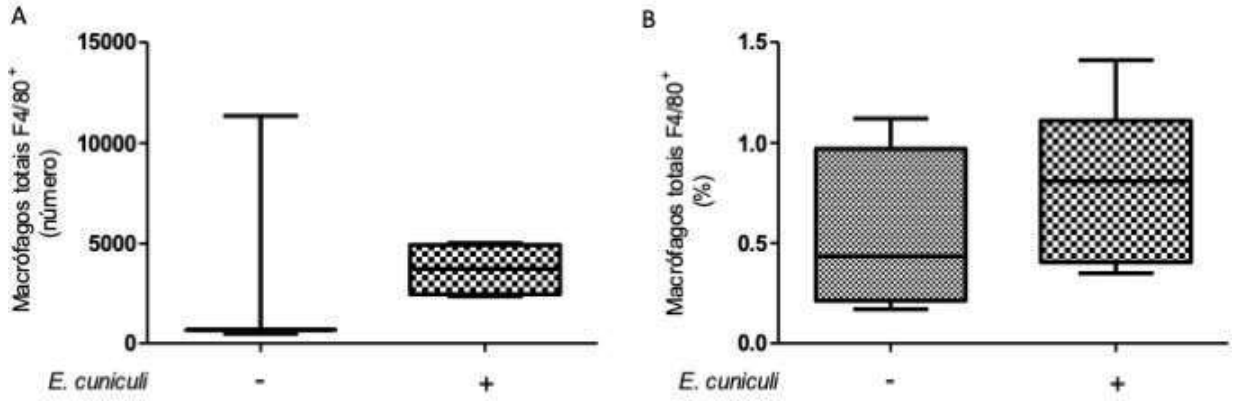
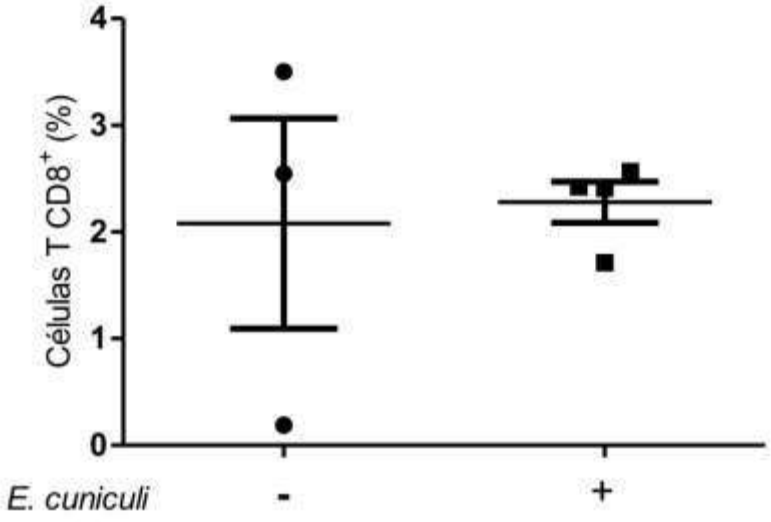
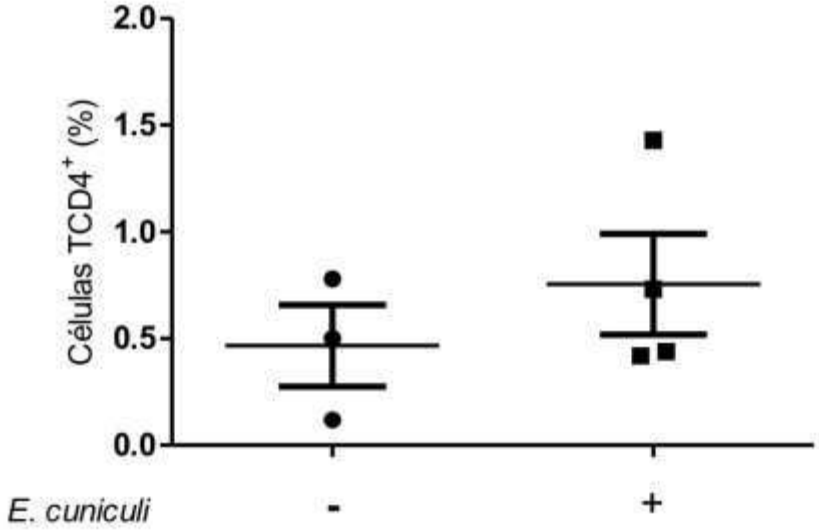


Figura suplementar 2. Avalição dos macrófagos presentes no sangue camundongos inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) População total de macrófagos no sangue. B) Porcentagem de macrófagos totais no sangue. Teste T.


Células T CD8+ (%)
4
3
2
1
0
E. cuniculi
-
+


Células TCD4+ (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
E. cuniculi
-
+

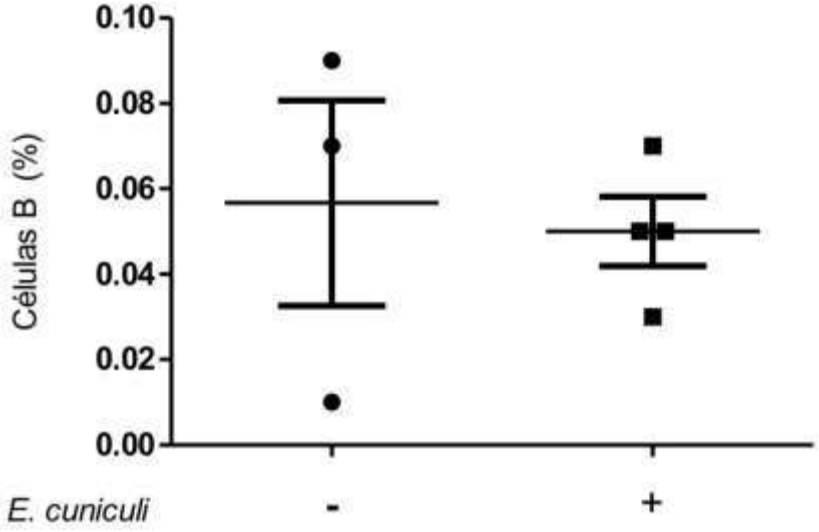

Células B (%)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
E. cuniculi
-
+

Figura Suplementar 3. Presença de linfócitos T e B no sangue de camundongos tratados com ciclofosfamida. Avaliação dos linfócitos presentes no sangue de camundongos C57BL/6, inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. Teste T.

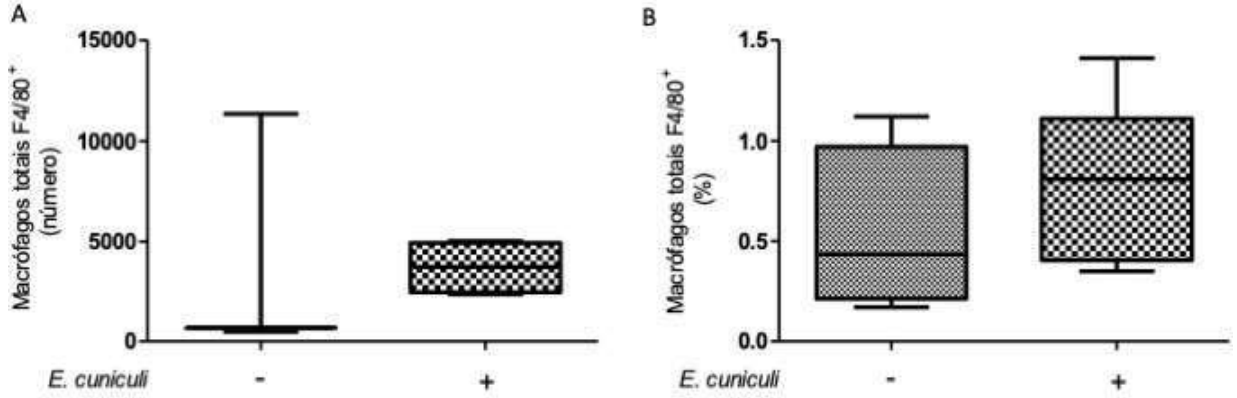


Figura Suplementar 4. Avalição dos macrófagos presentes no sangue camundongos tratados com ciclofosfamida e inoculados (+) ou não (-) com *E. cuniculi*. A) População total de macrófagos no sangue. B) Porcentagem de macrófagos totais no sangue. Teste T sem significância.