

Infecção experimental pelo *Encephalitozoon cuniculi* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona

Experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection in dexamethasone-immunosuppressed mice

Maria Anete Lallo, Maurício José dos Santos e Eduardo Fernandes Bondan

Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista. São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Hospedeiro imunocomprometido.
Encephalitozoon cuniculi.
Encefalitozoonose. Modelos animais de doenças. Camundongos endogâmicos Balb C. Dexametasona, imunologia. Encefalitozoonose. Microsporidiose. Camundongos imunossuprimidos.

Resumo

Objetivo

O microsporídio *Encephalitozoon cuniculi* tem sido reconhecido como um patógeno oportunista em indivíduos imunossuprimidos, tais como pacientes com Aids. O objetivo do trabalho foi desenvolver animais farmacologicamente imunossuprimidos como modelo da infecção natural pelo *E. cuniculi*.

Métodos

Foram usados grupos distintos de camundongos Balb-C adultos, imunossuprimidos com diferentes doses de dexametasona (Dx, 3 ou 5 mg/kg/dia por via intraperitoneal – IP) e inoculados com esporos de *E. cuniculi* por via IP. Também foram usados grupos controle (animais inoculados, mas não imunossuprimidos, e animais imunossuprimidos, mas não inoculados). Os esporos de *E. cuniculi* foram previamente cultivados em células MDCK. Os animais foram sacrificados e submetidos à necropsia aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias pós-inoculação. Fragmentos teciduais foram coletados e processados para análise por microscopia de luz, utilizando-se as técnicas de coloração de Gram -chromotrope e de hematoxilina-eosina.

Resultados

Em todos os animais imunossuprimidos e inoculados, porém especialmente naqueles que receberam 5 mg/kg/dia de Dx, os achados de necropsia mais proeminentes foram hepato e esplenomegalia. A inoculação experimental resultou em uma infecção disseminada e não-letal, caracterizada por lesões granulomatosas em diversos órgãos (fígado, pulmões, rins, intestino, encéfalo), porém mais notadamente no tecido hepático. Esporos de *E. cuniculi* foram observados em poucos animais tratados com 5 mg/kg/dia de Dx aos 35 dias pós-infecção.

Conclusões

Microsporidiose em camundongos imunossuprimidos com Dx fornece um modelo útil para estudos da infecção por microsporídios, assemelhando-se àquela naturalmente observada em indivíduos imunodeficientes com Aids.

Keywords

Immunocompromised host
Encephalitozoon cuniculi.
Encephalitozoonosis. Animal models, disease. Mice. Inbred Balb C.
Dexamethasone Immunosuppressed

Abstract

Objective

Microsporidian Encephalitozoon cuniculi has been recognized as an opportunistic pathogen in immunosuppressed individuals, such as AIDS patients. The objective of the study was to develop pharmacologically immunosuppressed animals as a model

Correspondência para/Correspondence to:

Maria Anete Lallo
Rua Batataes, 523 apto 152
01423-010 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: bondan@uol.com.br

Trabalho apresentado na XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; 2001.

Bolsista de Iniciação Científica da FAPESP (Processo 99/10688-0).

Recebido em 7/11/2001. Reapresentado em 9/4/2002. Aprovado em 9/5/2002.

mice. *Encephalitozoonosis*.
Microsporidiosis. Animal models.

of the natural occurring E. cuniculi infection.

Methods

Distinct groups of adult Balb-C mice were immunosuppressed with different doses of dexamethasone (Dx, 3 or 5 mg/kg/day, intraperitoneal route - IP) and inoculated with E. cuniculi spores by IP route intraperitoneally. Control groups (inoculated animals but non-immunosuppressed and non-inoculated animals but immunosuppressed) were also used. The spores of E. cuniculi were previously cultivated in MDCK cells. The animals were sacrificed and necropsied at 7, 14, 21, 28 and 35 days post-inoculation. Tissue fragments were collected and processed for light microscopy studies, using Gram-chromotrope and hematoxylin-eosin staining techniques.

Results

In all immunosuppressed and inoculated immunosuppressed mice, specially in those that received 5 mg/kg/day of dexamethasone, the most prominent necropsy findings were hepatomegaly and splenomegaly. The experimental inoculation resulted in a disseminated non-lethal infection, characterized by granulomatous lesions in several organs (liver; lungs, kidneys, gut and brain) but notably in the hepatic tissue. Spores of E. cuniculi were only seen in few animals treated with 5 mg/kg/day of Dx at 35 days post-infection.

Conclusions

Microsporidiosis in Dx-immunosuppressed mice provides a useful model for studies of the microsporidial infection, resembling that one naturally occurring in immunodeficient individuals with AIDS.

INTRODUÇÃO

Microsporidiose é uma doença parasitária causada por protozoários primitivos, intracelulares obrigatórios, que não possuem mitocôndrias e que pertencem ao filo Microspora. Nos últimos anos, esses microorganismos vêm sendo cada vez mais identificados como importantes agentes de infecção oportunista e emergente em pacientes com Aids.^{4,14}

No homem, os microsporídios causam desde infecções intestinais a infecções sistêmicas, sendo que os aspectos patogênicos da doença variam em função da espécie envolvida e da competência da resposta imune do hospedeiro.^{3,4,6}

Os microsporídios têm sido descritos em muitas espécies animais causando desde infecções assintomáticas e benignas a sintomáticas e graves, muitas vezes fatais.^{4,13}

Embora a transmissão direta dos animais para o homem não tenha sido comprovada, evidências indicam que a microsporidiose pode ser considerada uma zoonose.^{4,7}

Já que a microsporidiose representa uma doença emergente, aspectos fundamentais desses patógenos e da infecção permanecem desconhecidos. Nesse sentido, o desenvolvimento de modelos experimentais pode ajudar a entender todos os aspectos da doença, tais como o curso da infecção no homem e nos animais, seu diagnóstico, sua epidemiologia e tratamen-

to.⁴ A encefalitozoonose murina tem sido tradicionalmente utilizada como modelo da infecção.^{10,11,13} Camundongos eutímicos inoculados com esporos de *Encephalitozoon cuniculi* raramente apresentam sinais clínicos, servindo como um modelo experimental apropriado para o estudo da relação balanceada entre o agente e o hospedeiro.⁵

Por outro lado, camundongos com sistema imunológico deficiente, tais como os animais atímicos e os *severe combined immunodeficient (SCID) mice* desenvolvem infecção disseminada, aguda e fatal.^{3,5,6}

Uma vez que a aquisição e manutenção de tais animais geneticamente imunocomprometidos é difícil, a obtenção do estado de imunossupressão através do emprego de drogas pode representar uma solução alternativa para os que pretendem estudar a doença em modelos animais.

Nesse sentido, Lallo⁷ (1998) procedeu a administração de ciclofosfamida e ciclosporina como drogas depressoras da resposta imune, imediatamente após a inoculação de *E. cuniculi* em camundongos Balb-C. Todos os animais imunossuprimidos manifestaram infecção mais severa do que os animais não-tratados com as drogas, entretanto o curso da doença foi mais lento, quando comparado aos modelos em animais imunossuprimidos naturalmente, como os atímicos ou *SCID*.

O presente trabalho teve por objetivo obter um modelo experimental mediante o emprego de uma

droga com custo mais baixo e de mais fácil aquisição e manipulação, de forma a tornar os modelos utilizados futuramente nessa linha de pesquisa mais acessíveis para um número maior de instituições. Nesse contexto, considerou-se oportuno o emprego da droga glicocorticóide dexametasona (9- α -fluoro-16- α -metilprednisolona), amplamente utilizada por suas propriedades imunossupressoras e antiinflamatórias.²

MÉTODOS

Foram utilizados camundongos isogênicos Balb-C, *germ free*, machos, com 30 a 40 dias de idade, obtidos no Centro de Bioterismo da Unicamp (Campinas, SP). Os animais foram distribuídos em seis grupos de acordo com a dose de dexametasona (Dx) utilizada e a inoculação ou não de *Encephalitozoon cuniculi*. (Tabela 1)

Os animais dos grupos I, III e V foram inoculados, por via intraperitoneal, com 0,5 ml de uma suspensão de esporos de *E. cuniculi* na concentração de 1×10^7 esporos. Os animais controle (grupos II, IV e VI) receberam igual volume de solução salina a 0,9% esterilizada.

Os esporos de *E. cuniculi* utilizados foram previamente cultivados em células MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) no Serviço de Culturas Celulares do Instituto Butantan.⁷

A imunossupressão foi realizada com diferentes doses de Dx (Azium®). A administração do fármaco iniciou-se no dia anterior à inoculação experimental, sendo diariamente realizada por via intraperitoneal até o final do experimento nas doses de 3 mg/kg para os animais dos grupos I e II e de 5 mg/kg para os grupos III e IV. Os animais dos grupos V e VI não receberam tratamento imunossupressivo.

Os animais foram sacrificados aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias pós-inoculação por meio do aprofundamento de anestesia inalatória com éter etílico. Foram realizadas necropsia e colheita de fragmentos de pulmão, encéfalo, fígado, rins, baço e intestinos, que foram,

então, fixados em solução de formol tamponado a 10% (pH 7,2-7,4). Após permanecer na solução fixadora por 72 horas (h), o material foi submetido à desidratação, diafanização e inclusão em parafina para a investigação de *E. cuniculi* pelo exame histopatológico.

Cortes histológicos foram montados em lâminas de vidro e corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (H-E) e de Gram-chromotrope.⁹ Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz com os aumentos de 50, 100, 400 e 1000x.

Para comparação dos resultados nos diferentes grupos experimentais, foi realizada análise morfométrica a partir de cortes histológicos de três fragmentos hepáticos colhidos de cada animal e corados pela técnica de H-E. Foi utilizado o sistema de análise de imagens, contendo o programa Optimas (Optimas Corporation of Edmonds, Washington).*

RESULTADOS

Achados Clínicos

Poucos sinais clínicos foram observados nos animais inoculados com *E. cuniculi* neste experimento. Todos os camundongos tratados com Dx e inoculados com *E. cuniculi* (grupos I e III) apresentaram pelame eriçado, letargia e discreto aumento de volume abdominal a partir do 14º dia de infecção. Nenhum sinal clínico da infecção foi observado nos camundongos que constituíram os demais grupos deste experimento.

Achados Macroscópicos

Todos os animais dos grupos I e III, sacrificados a partir do 14º dia de infecção, apresentaram esplenomegalia e hepatomegalia. Os camundongos inoculados com *E. cuniculi* e não tratados com a droga imunossupressora (V) apresentaram somente hepatomegalia.

Os camundongos não inoculados com *E. cuniculi*, pertencentes aos grupos II, IV e VI, não apresenta-

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais segundo o número de animais e as respectivas datas de sacrifício.

Grupos	Número de animais por período de sacrifício em dias					Total
	7	14	21	28	35	
I (Camundongos tratados com 3 mg/kg de Dx e inoculados com <i>E. cuniculi</i>)	2	2	2	2	2	10
II (Camundongos tratados com 3 mg/kg de Dx e não-inoculados com <i>E. cuniculi</i>)	1	1	1	1	1	5
III (Camundongos tratados com 5 mg/kg de Dx e inoculados com <i>E. cuniculi</i>)	2	2	2	2	2	10
IV (Camundongos tratados com 5 mg/kg de Dx e não-inoculados com <i>E. cuniculi</i>)	1	1	1	1	1	5
V (Camundongos não-tratados e inoculados com <i>E. cuniculi</i>)	2	2	2	2	2	10
VI (Camundongos não-tratados e não-inoculados com <i>E. cuniculi</i>)	1	1	1	1	1	5
Total	9	9	9	9	9	45

*Desenvolvido pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

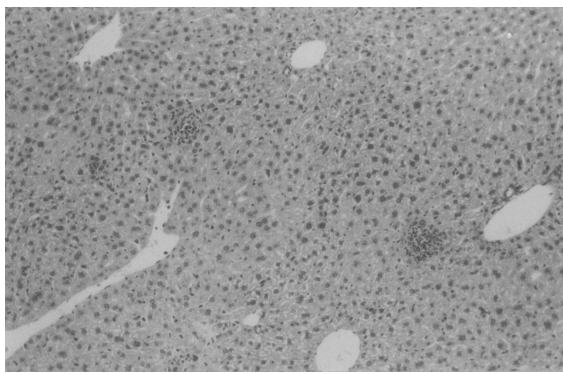


Figura 1 – Formações granulomatosas em tecido hepático de camundongo sacrificado aos 35 dias pós-infecção pelo *E. cuniculi*. H-E, 100x.

ram alterações macroscópicas à necropsia.

Achados Histopatológicos

Alterações histopatológicas foram observadas em todos os camundongos inoculados com *E. cuniculi*, submetidos ou não aos diferentes tratamentos.

O fígado foi o primeiro órgão a mostrar alterações histopatológicas compatíveis com a infecção pelo *E. cuniculi* e foi a víscera mais afetada pelo protozoário. Todos os animais infectados por *E. cuniculi*, pertencentes aos grupos I, III e V, manifestaram lesões hepáticas independentemente da data de sacrifício. Tais lesões eram caracterizadas pela formação de granulomas (Figura 1), de dimensões variáveis, constituídos por células pleomórficas apresentando citoplasma alongado e levemente acidofílico e contendo núcleo central com um único nucléolo.

Não foram visualizados esporos nos tecidos dos camundongos inoculados com *E. cuniculi* pertencentes aos grupos I e V. Entretanto, no grupo III foram encontrados poucos esporos no 35º dia pós-inoculação (Figura 2). Tais esporos, corados pela técnica Gram-cromotrope, mostraram-se de coloração púrpura ou violeta com um halo equatorial menos corado, contrastados com o fundo róseo e ligeiramente esverdeado.

Foram observados graus variáveis de degeneração,

necrose e descamação do epitélio bronquiolar nos animais dos grupos I, III e V. Infiltrados inflamatórios compostos por células mononucleares foram encontrados no parênquima pulmonar, determinando espessamento dos septos alveolares, sendo igualmente mais pronunciados nos camundongos do grupo III sacrificados aos 35 dias pós-infecção.

Nenhuma alteração histopatológica compatível com a administração de Dx foi observada no baço dos animais submetidos ao tratamento com este agente imunossupressor.

No encéfalo dos camundongos inoculados com *E. cuniculi*, foram observadas estruturas granulomatosas contendo aproximadamente entre 20 e 40 células pleomórficas, dotadas de citoplasma acidofílico e núcleo central. Nenhuma forma parasitária foi observada no encéfalo.

Análise Morfométrica

Por meio da análise computadorizada de imagem, três aspectos foram avaliados para comparar a infecção pelo microsporídio nos animais – o número de lesões produzidas pelo parasita, a área média das lesões e a área do corte ocupada pelas lesões. Observou-se que tanto o número quanto a área das lesões foram maiores nos animais do grupo III seguido pelo grupo I e, finalmente, pelo grupo V, conforme se observa na Tabela 2.

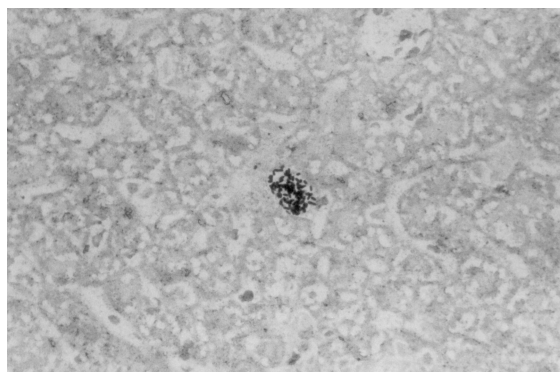


Figura 2 – Esporos de *E. cuniculi* corados pela técnica de gram-cromotrope. Tecido hepático, 400x.

Tabela 2 – Médias dos resultados obtidos pela análise computadorizada de imagens dos fragmentos hepáticos.

Grupos	Número de lesões*/mm ²	Área média das lesões* (m ²)	% de área do corte ocupada por lesões	Área média dos cortes (mm ²)
I	0,33±0,19a	3,74±1,46a	0,35±0,20	24,72±2,58
III	0,40±0,17b	4,54±1,46b	0,34±0,24	27,82±1,61
V	0,15±0,21c	1,38±1,12c	0,13±0,12	23,16±2,76

*Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre si ($\alpha=0,05$; $z=1,645$) pelo teste de duas médias.
Grupo I - camundongos tratados com Dx (3 mg/kg) e inoculados com *E. cuniculi*;
Grupo III - camundongos tratados com Dx (5 mg/kg) e inoculados com *E. cuniculi*;
Grupo V - camundongos não-tratados e inoculados com *E. cuniculi*.

DISCUSSÃO

Os microsporídios têm sido responsabilizados por infecções naturais ou experimentalmente induzidas em animais de laboratório, tais como camundongos, ratos, hamsters e cobaias.¹³ Desta forma, a infecção experimental de animais de laboratório, em especial de camundongos, tem ajudado a entender aspectos patológicos e epidemiológicos dessa doença, considerada hoje uma zoonose emergente.⁴ Como para outros agentes infecciosos, a utilização de modelos biológicos só é possível se os mesmos apresentarem muita similaridade com a doença no homem. Nesse sentido, vários modelos experimentais têm sido propostos para a compreensão da microsporidiose, em especial da encefalitozoonose.

No presente trabalho, a análise geral dos resultados macroscópicos e microscópicos aliados aos achados clínicos obtidos a partir da inoculação experimental de *E. cuniculi* em camundongos revelou que houve diferença estatisticamente significativa no estabelecimento da infecção entre os animais submetidos ao tratamento imunossupressor e os não imunossuprimidos, sendo que os primeiros mostraram-se mais suscetíveis à infecção.

Shaddock et al¹³ (1979) inocularam, por via intraperitoneal, 1×10^6 esporos de *E. cuniculi* em camundongos eutímicos e observaram que os mesmos não apresentaram sinais clínicos da doença, assim como não exibiram lesões macroscópicas. Histologicamente foi observado que dois dos nove camundongos inoculados apresentavam hepatite granulomatosa, hiperplasia das células do sistema mononuclear-fagocitário esplênico e lesões granulomatosas no encéfalo.

Da mesma forma, nenhum sinal clínico da infecção foi observado no presente trabalho nos camundongos inoculados com *E. cuniculi* e não submetidos ao tratamento imunossupressor (grupo VI). Contudo, tais camundongos revelaram discreta hepatomegalia e hepatite granulomatosa. Resultados similares foram também observados por Gannon⁵ (1980) ao inocular camundongos *black* (C57BL) com *E. cuniculi*.

A encefalitozoonose murina representa uma relação equilibrada entre o hospedeiro e o parasita. Contudo, o sucesso dessa relação simbiótica depende da competência do sistema imune.¹⁴ A exacerbação da resposta imune pode promover grandes danos teciduais pela formação de extensos granulomas e, por outro lado, a ausência dela pode favorecer a multiplicação rápida e o domínio do parasita. Ambas as situações são perigosas para a sobrevivência do parasita e do hospedeiro.⁸

Uma vez que o sistema imune murino previne a infecção letal pelo *E. cuniculi*, sem produzir sinais da doença, a encefalitozoonose murina serve como modelo de estudo de uma relação equilibrada entre hospedeiro e parasita.¹⁰ No presente trabalho, tal equilíbrio foi igualmente observado na infecção experimental dos camundongos não submetidos ao tratamento imunossupressor, pois tais animais apresentaram evolução clínica e lesões anatomo-patológicas semelhantes às dos autores anteriormente citados.^{5,9,13}

O mecanismo de resistência do hospedeiro em relação à infecção por microsporídios ainda é pouco entendido. De maneira genérica, parasitas intracelulares são fagocitados por macrófagos, sendo apresentados a linfócitos T CD₄⁺, os quais passam a produzir citocinas, especialmente do tipo IL-2, cuja função é ativar outros linfócitos T CD₄⁺, linfócitos T CD₈⁺ (citotóxicos), células *natural killer*, granulócitos, outros macrófagos e linfócitos B.¹ Na infecção por *E. cuniculi*, os anticorpos produzidos não eliminam os parasitas, contudo, possuem a importante função de opsonização dos antígenos, favorecendo a fagocitose, e podem ainda ligar-se a antígenos impedindo a entrada do parasita em uma nova célula.¹² Mesmo que muitas células sejam ativadas durante a infecção, somente os macrófagos podem destruir os parasitas, sendo que tal fato só ocorre mediante a presença de citocinas produzidas por células T, especialmente CD₄⁺.^{11,15}

O estudo da infecção pelo *E. cuniculi* tem sido realizado pela inoculação experimental em camundongos portadores de deficiências imunológicas adquiridas geneticamente, tais como os animais *nude* e SCID, nos quais não ocorre o equilíbrio entre a resposta imune e a multiplicação do parasita, podendo o agente infeccioso levar o hospedeiro a óbito.^{3,6} Os camundongos SCID possuem função defeituosa dos linfócitos B e T e conseqüente deficiência das repostas humoral e celular. Já os camundongos atímicos ou *nude* possuem um defeito no cromossomo 11 que se manifesta com o desenvolvimento de timo rudimentar, no qual não ocorre normalmente a maturação de linfócitos T. Portanto, pode-se entender por que os camundongos atímicos e SCID desenvolvem uma infecção aguda e fatal quando inoculados com *E. cuniculi*.¹

No presente experimento, à semelhança dos camundongos *nude* ou SCID, os animais infectados com *E. cuniculi* e tratados Dx apresentaram sintomas relacionados à infecção, tais como aumento discreto do abdômen e letargia. A inoculação de *E. cuniculi*, em camundongos SCID realizada por Koudela et al⁶ (1994) e em camundongos atímicos realizada por Didier et al¹³ (1994), também determinou letargia e aumento do volume abdominal nos animais a partir do 14º dia pós-

infecção. Embora os sinais clínicos constatados na presente investigação tenham sido aparentemente iguais aos observados pelos autores anteriormente citados, o aumento de volume abdominal referido pelos mesmos foi atribuído à ascite e, no presente trabalho, foi decorrente de hepato-esplenomegalia.

Através de sua atividade linfopênica, especialmente quanto à produção de linfócitos T², a Dx pode comprometer todos os mecanismos de ação antiparasitária do sistema imune, fato que explica a maior suscetibilidade à infecção dos animais tratados com a droga. Contudo, a imunossupressão é dose-dependente e foi mais intensa nos animais tratados com 5 mg/kg de Dx.

Gannon⁵ (1980) e Didier et al³ (1994), através da inoculação de *E. cuniculi* em camundongos atímicos, e, adicionalmente Koudela et al⁶ (1994), utilizando camundongos SCID, observaram uma evolução aguda da infecção, registrando a morte dos animais em torno dos 20 a 25 dias. Na presente investigação, o curso clínico da infecção foi mais lento do que o

observado em camundongos SCID e nude pelos autores citados. Adicionalmente, nenhuma morte foi observada sob tal esquema de tratamento com Dx, tanto nos camundongos não inoculados com *E. cuniculi* quanto nos inoculados.

A infecção pelo *E. cuniculi* observada nos camundongos imunossuprimidos com Dx assemelha-se à observada por Lallo⁷ (1998), com o uso de ciclofosfamida como agente imunossupressor. Contudo, tanto o número quanto a área das lesões observadas no presente experimento foram menores que as observadas com ciclofosfamida. É provável que o uso de uma dose maior de Dx, assim como a ampliação do tempo de uso da droga pré-inoculação, possa permitir o estabelecimento de uma infecção mais marcada.

Em relação às lesões histopatológicas observadas, os resultados do presente trabalho concordam com os de Gannon⁵ (1980), de Koudela et al⁶ (1994) e os de Didier et al³ (1994), revelando que o fígado foi o órgão mais afetado pelo agente infeccioso.

REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Celular and molecular immunology*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997. p. 341-61.
2. Diasio RB, LoBuglio AF. Immunomodulators: immunosuppressive agents and immunostimulants. In: Hardman JG, Limbird LE. *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. New York: International; 1996. p. 1292-308.
3. Didier ES, Varner PW, Didier PJ, Aldras AM, Millichamp NJ, Murphey-Corb M et al. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol* 1994;41:1-11.
4. Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect* 2000;2:709-20.
5. Gannon J. The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab Anim* 1980;14:189-92.
6. Koudela B, Vítovec J, Kucerová Z, Ditrich O, Tránicek J. The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol* 1994;40:279-86.
7. Lallo MA. *Estudo da infecção experimental pelo Encephalitozoon cuniculi em camundongos Balb-c tratados com ciclofosfamida ou ciclosporina* [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 1998.
8. Mitchell GF. Effector cells, molecules and mechanisms in host-protective immunity to parasites. *Immunology* 1979;38:209-23.
9. Moura H, Silva JLN, Sodrê FC, Brazil Wallmo K, Wahlquist S, Wallace S et al. Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidial spores in clinical samples. *J Eukaryo Microbiol* 1996;43:94-5S.
10. Schmidt EC, Shadduck JA. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of chronic infection. *Infect Immun* 1983;40:936-2.
11. Schmidt EC, Shadduck JA. Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J Immunol* 1984;133:2712-9.
12. Shadduck JA, Bendele R, Robinson GT. Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Vet Pathol* 1978;15:449-60.
13. Shadduck JA, Watson WT, Pakes SP, Cali A. Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Parasitol* 1979;65:123-9.
14. Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA. Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci* 1998;48:589-95.
15. Vacca A, Felli MP, Martinotti S, Meco D, Gulino A. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhance elements. *J Exp Med* 1992;175:637-46.